

## 虚血性心疾患における細胞死とアポトーシス

竹村元三\*, 藤原久義\*

## はじめに

多細胞生物は、細胞の増殖・分化の制御と同時に細胞の死を制御することで、その細胞社会の統一性のバランスを保持している。アポトーシスは細胞死の制御の重要な機構のひとつであり、細胞増殖と対局の意味を有する。従って、一般的には増殖しないと考えられている最終分化細胞である心筋細胞においてはアポトーシスの関わりは少ないと思われていたが、近年、種々の心疾患の原因あるいは進行にアポトーシスが深く関わっていることを示唆する報告が相次いでなされ、従来の細胞死に対する概念の変革が迫られている。本稿では、まず細胞死の定義と問題点を整理する。次に、虚血性心疾患におけるアポトーシスの関わりについて、現在までの報告と著者らの研究結果をまじえて紹介する。最後に、この方面でのアポトーシス研究の問題点・展望について言及する。

## 細胞死の定義と問題点

## i) 用語の問題点—アポトーシス、オンコーシス、ネクローシス—

現在アポトーシスに対立する言葉としてネクローシスが通常使用されているが、このネクローシスという用語には以下のような問題がある。第一に、アポトーシスも、従来のネクローシスもその最終段階においては細胞は激しい変性におちいり、他の細胞に貪食されるなどして形態学的に区別ができなくなる点である。例えば、アポトーシスで死んだのにネクローシスと区別がつかなくなった場合、postapoptotic necrosis などと呼ぶ煩雑さが生じる。第二に、細胞は通常可逆的段階を

経てその後、不可逆的な死に陥るが、ネクローシスは一般的に不可逆的段階のみを指す用語であるため、可逆的変化の段階を表現できず不便である。例えば、可逆的ネクローシスなどという言葉はナンセンスである。以上の問題点に対し、近年 Majno ら<sup>1)</sup>は細胞死のプロセスに「オンコーシス」(oncosis) という用語を再発掘・導入した(図1)。オンコーシスとは oncology すなわち腫瘍学とい

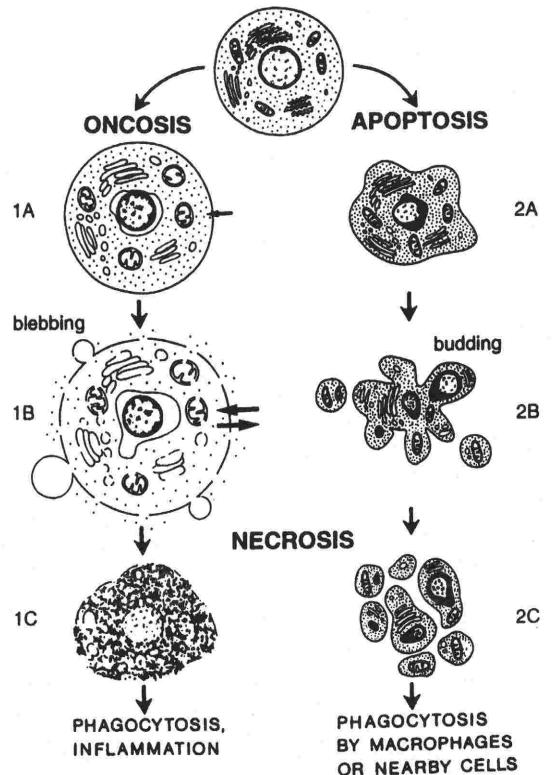


図1 細胞はアポトーシスあるいはオンコーシスの過程を経て、最終的にネクローシスにおちいる(文献<sup>1)</sup>より引用)。

\*岐阜大学医学部第二内科

う言葉からもわかるように「腫大する」「腫れる」という意味である。すなわち、細胞が縮んで死んでゆく過程であるアポトーシスに対比する用語として、膨化～腫大して死んでゆく過程を従来のネクローシスのかわりにオンコーシスという言葉で表すことを提唱した。さらに、オンコーシス、アポトーシスの両者の変性の進んだ最終的な段階をネクローシスと呼ぶことを提唱した。これにより、上記の用語上の問題は解決され、可逆的オンコーシスという言葉が使えることに加え、形態上判別がつかない最終段階はネクローシスとしてクリアにまとめてしまえるわけである。この Majno らの提唱は非常に卓越したものと考えられるので著者らはこれに従い以下の話をすすめたい。

ii) アポトーシスの定義と同定法

アポトーシスは元来、その特徴的な超微形態から定義されたものである<sup>2)</sup>。まず著明な核の変化が特徴的で、核膜に沿って核クロマチンが濃縮し境界明瞭で均一な濃度の塊を形成し、しばしば半月状ないし球状を呈する。さらに細胞質が濃縮し、ある種の細胞では細胞質が核とともにくびれて、やがて断片化する。断片化した細胞片は細胞膜に包まれておりアポトーシス小体と呼ばれる。細胞内小器官の形態は最後まで比較的保持されている。アポトーシスでは死細胞の内容物が細胞外に放出されず、炎症を伴わない。アポトーシスは生理的かつ遺伝子により制御された細胞死であり、発生・器官形成、正常な細胞のターンオーバー、ホルモン依存性の組織萎縮、そして免疫系における生体防御機構の確立等の過程における「不要な」細胞の除去機構の基礎をなしている<sup>2~4)</sup>。一方、オンコーシス（従来のネクローシス）は、有害な外的刺激により誘発され、細胞膜の透過性の亢進、細胞の膨化、細胞内小器官の破壊がおり、崩壊した死細胞からは有害な内容物が放出され炎症反応が惹起される。

上記の形態学的特徴に加え、アポトーシスでは DNA のヌクレオソーム単位での断片化が見られることが知られており<sup>5,6)</sup>、現在、ゲル電気泳動上の DNA ラダー、あるいは Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP in situ nick end labeling 法 (TUNEL 法) による生化学的指標による同定法が広く使われている。むしろ、DNA 断片化のみでアポトーシスの同定を行っている研究

が圧倒的多数を占めているのが現状である。しかし、これには大きな問題点がある。以前より、アポトーシスに DNA 断片化は必ずしも伴わないという議論や、DNA 断片化は必ずしもアポトーシスに特異的ではないのではないかという議論は散見されていたが、Dong らは<sup>7)</sup>、細胞膜の透過性を亢進させ一次的に細胞膜を傷害した典型的なオンコーシスのモデルにおいても DNA 断片化がコンスタントに生じることを明らかにした (図 2)。すなわち、DNA 断片化は現在の研究状況に反して、アポトーシスに特異的でないということが判明しつつある。

虚血性心疾患における心筋細胞死

i) 心筋梗塞におけるアポトーシス

A 急性心筋梗塞における梗塞心筋細胞のアポトーシス (従来の報告)

従来、病理学的に典型的なオンコーシス (すなわち従来のネクローシス) とみなされてきた急性心筋梗塞にアポトーシスが関与するという報告が 1994 年に初めて報告された。以来、心筋梗塞におけるアポトーシスの役割を支持する知見が急速にひろまった。Gottlieb ら<sup>8)</sup>はウサギの 30 分虚血 + 4 時間再灌流心の梗塞領域において、TUNEL 法とゲル電気泳動法 (図 3) で DNA の断片化を証

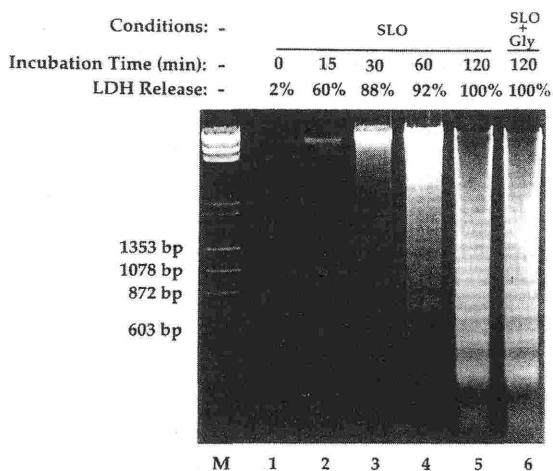


図 2 ストレプトリジン O により一次的に細胞膜傷害をきたして細胞死にいたった典型的なオンコーシスのモデルで、DNA ラダーがみとめられる。したがって、DNA 断片化はアポトーシスに特異的な所見ではない (文献<sup>7)</sup>より引用)。

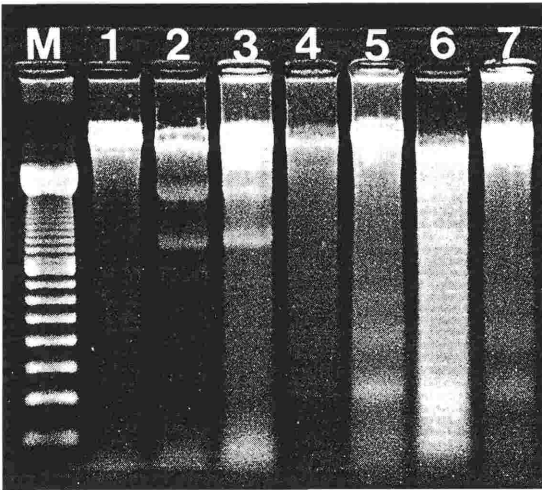


図3 ウサギ心筋のDNAアガロース電気泳動。

レーン1: Sham operation 群の心筋, レーン2: 30分虚血のみ, レーン3: 30分虚血+30分再灌流, レーン4: 30分虚血+2時間再灌流, レーン5: 30分虚血+4時間再灌流, レーン6および7: 30分虚血+24時間再灌流, レーンMは100 ベースペアのマーカーラダーを示す。DNA ラダーが2時間, 4時間, 24時間の一部にみとめられる。

明し, 電子顕微鏡では核に散在性のクロマチンの凝集を観察した<sup>8)</sup>。虚血のみの心筋や好中球を除去したモデルでは上記所見を認めず, アポトーシスは心筋細胞の再灌流障害に特異的であると結論した。一方, Kajstura ら<sup>9)</sup>は再灌流を伴わないラット心筋梗塞モデルで, Fliss ら<sup>10)</sup>はラット心筋虚血+再灌流モデルで相当量の梗塞心筋細胞にDNA断片化を見出し, アポトーシスが梗塞サイズにかなりのウェイトを占めることを示唆した。そのうち Kajstura らはアポトーシスが虚血性心筋障害の主なメカニズムであり, ネクローシス(但し, 従来の意味での)はアポトーシスに続発して起り, 梗塞後に進行する細胞消失に関する独立したメカニズムであると推察している。ヒトにおいては, Itoh らが心筋梗塞の剖検心を用いて, TUNEL 法, ゲル電気泳動で収縮DNA断片化を梗塞心筋細胞に証明し, 心筋梗塞による細胞死には従来の意味でのネクローシスとアポトーシスが混在すると推測した<sup>11)</sup>。ヒトの急性心筋梗塞でこれと同様の所見が相次いで報告されたが, Saraste ら<sup>12)</sup>は再灌流症例を用いており, また Bardales

ら<sup>13)</sup>は TUNEL 陽性細胞が虚血後2~3時間後から検出可能なことより心筋梗塞の早期診断に有用であることを指摘した。

B 急性心筋梗塞における梗塞心筋細胞死はアポトーシスか?

急性虚血性細胞死は従来病理学的に典型的なオンコーススであると考えられてきた。しかし, 神経組織, 腎における虚血性細胞死にアポトーシスの関与が報告され<sup>14~16)</sup>, 引き続き前述のように心筋でも急性心筋梗塞や虚血再灌流障害でアポトーシスの存在が示された。しかしながら, ここで注目すべきことは, 急性心筋梗塞におけるアポトーシスに関する多数の報告はすべて<sup>8~13)</sup>, アポトーシスの証明をDNA断片化の検出のみに依存していることである。すなわち, 電子顕微鏡検索によりアポトーシス小体等を含む心筋細胞のアポトーシスの典型的な超微形態を示した報告は皆無である。これらのうち, Gottlieb ら<sup>8)</sup>のみ, 電顕観察を行い, DNA断片化を呈する心筋細胞を含む虚血再灌流心に核クロマチンの不規則な散在性の凝集(clumping)をみとめる心筋細胞が高頻度にみられることを示している。しかし, この形態変化は心筋の再灌流直後(数分後)からみられることは従来から知られており<sup>17)</sup>, アポトーシスというより, 再灌流に特徴的な変化であると考えられる。かつ, 核クロマチンの凝集はみられるものの, 大小不同不規則かつ散在性に分布し, アポトーシスに典型的な核膜に沿った境界明瞭で均一な濃縮(condensation)とは全く異なっている。

虚血というアクシデントによる細胞死が生理的あるいはプログラムされた死であるとは一般的に考えにくく, かつ遺伝子の制御下にあるとの証拠は今のところない。また, 急性心筋梗塞ではアポトーシスに特徴的な超微形態が見出されていない。さらに, 急性心筋梗塞では, CPKやLDHなどの細胞内容の逸脱がみられ, 引き続き炎症が生じる。すなわち, 急性心筋梗塞での心筋細胞死はアポトーシスの基本的特徴を満たしていないと考えられる。現在のところ, DNA断片化のみが梗塞心筋細胞死におけるアポトーシスの存在を示唆する唯一のデータである。但し, アポトーシスをおこしている心筋細胞は一部であるためにアポトーシスに特徴的な超微形態を有する細胞が見落とされ, また, 炎症反応はその他の壊死心筋細胞

に由来するものであるとの考えも成り立つ。そこで、DNA断片化を呈する心筋細胞は本当にアポトーシスを意味するのか?という疑問を再検討する必要がある。この疑問を解決するためには、まず、DNA断片化を呈する心筋細胞がどのような超微形態を有するのかを確認する必要があるであろう。そのアプローチとして著者らは電顕的TUNEL法を採用した<sup>18)</sup>。本法によれば同一細胞で超微形態とDNA断片化(より正確には高頻度のDNA 3'-OH末端)を同時に観察できる。電顕的TUNEL法の最終産物は金コロイドで標識した。ウサギの30分虚血+再灌流による心筋梗塞モデルで検討したところ、非虚血群では心筋細胞は超微形態的に正常(図4-A)、金コロイドは核辺縁のヘテロクロマチンに僅かに集積をみとめるのみであった。30分虚血のみで再灌流しない群のリスキエリア内の心筋細胞では、グリコーゲン顆粒の消失、ミトコンドリアの膨化、細胞質の浮腫、筋原線維の弛緩(Iバンドの開大)がみられ、核ではクロマチンの辺縁化に伴う著しいセンターリングをみとめた。これらは従来報告されている再灌流を伴わない虚血心筋細胞の超微形態に合致する所見である<sup>19)</sup>。辺縁に凝縮したクロマチンにはTUNEL陽性を示す著明な金コロイドの集積はみられなかった。これに対し、30分の再灌流を加えた群では、ミトコンドリアの膨化、クリスタの崩壊があり、デンスボディを有するものもみられ、筋原線維では過収縮帯(contraction band)が見られ、細胞膜の破綻も観察された。核ではクロマチンの辺縁化に加え、不規則な大きさのクロマチン凝集塊が散在していた。これらの所見は従来報告されている虚血後再灌流された心筋細胞の超微形態に合致し<sup>17)</sup>、不可逆的オンコーススの像である。しかし、凝集クロマチンへの金コロイドの著明な集積はいずれの細胞にもみとめられなかった。2時間再灌流群では、30分再灌流群と基本的に同様であったがより明瞭な形態変化がみられた。しかし、この時点ではじめて、一部の心筋細胞で核内の凝集したクロマチンへの著明な金コロイドの集積がみとめられた。再灌流に特徴的な形態変化は4時間再灌流群でより明瞭となる傾向があった。この群ではより多くの心筋細胞(>80%)で著明な金コロイドの集積が認められたが、それらは観察しうる限りすべて、明らかに細胞膜が破綻し、

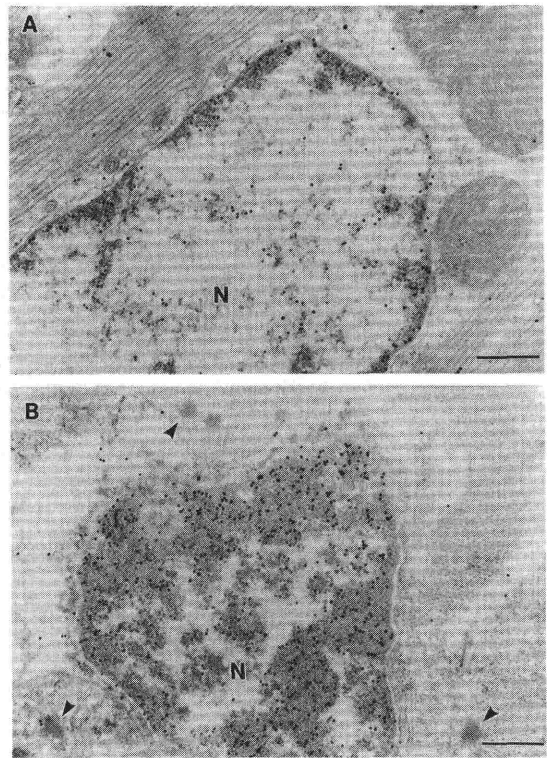


図4 正常心筋細胞(A), および30分虚血+4時間再灌流により作製されたウサギ心筋梗塞の梗塞心筋細胞(B)の電顕的TUNEL法標本の電子顕微鏡写真。

(B)の細胞は細胞膜の破綻、浮腫、ミトコンドリアの膨化とデンスボディの沈着(矢尻)がみられ、不可逆的オンコーススの特徴がみられる。TUNEL陽性を示す金粒子は、(A)では核(N)の辺縁部に僅かに集積しているのみであるが、(B)では凝集した核クロマチンに著明に集積している。すなわち、(B)はDNA断片化をともなったオンコーススである。金コロイドのコントラストを出すため、写真は薄くプリントされている。バー:1ミクロン。

形態的には典型的なオンコーススを呈していた。すなわち、DNA断片化が超微形態的にはオンコーススを呈する心筋細胞にみられた(図4-B)。再灌流の経過を通じてアポトーシスの超微形態を示す心筋細胞は全く見出されなかった。従って、急性心筋梗塞で報告されているいわゆるアポトーシス心筋細胞は、DNA断片化を伴うオンコースス心筋細胞であることが示された。つまり生化学的にはアポトーシス、形態学的にはオンコーススという死の様式を示す。また、急性虚血性心筋障害は、可逆的オンコーススより先ずDNA断片化

を伴わない不可逆的オンコースに進み、さらに大部分の細胞はDNA断片化を伴う不可逆的オンコースに到ることが明らかになった。

### C 急性心筋梗塞におけるアポトーシス関連因子の変動ならびに阻害因子の影響

著者らは心筋梗塞のヒト剖検心での免疫組織学的検討により、梗塞周囲の残存心筋細胞に急性期ではアポトーシス抑制因子であるBcl-2蛋白が発現するのに対し、陳旧期になるとそれが消失し、逆にアポトーシス促進因子であるBaxが過剰発現することを見出した<sup>20)</sup>。Bcl-2とBaxの両者の比が、アポトーシスの進行を決定する因子となるので、急性期のBcl-2の発現は虚血に対する防御機構である可能性があるのに対し、陳旧性のBax発現は陳旧期におけるアポトーシスの促進を意味している可能性がある。Kajsturaらは、ラット心筋梗塞モデルで同様の結果に加え、Fas抗原の発現も示した<sup>9)</sup>。

著者らは急性心筋梗塞発症24時間後に、アポトーシス抑制因子のひとつである可溶性Fasの血中濃度が、著明にかつ有意に上昇し、その後急速に元のレベルに戻ることを見出した<sup>21)</sup>。

Yaoitaら<sup>22)</sup>はラットの虚血再灌流による心筋梗塞モデルにてCaspase阻害薬(ZVAD-fmk)の投与により梗塞サイズの減少および心機能の改善を観察した。

### ii) 陳旧性心筋梗塞周囲の残存心筋におけるアポトーシス

Chengら<sup>23)</sup>はラットの陳旧性心筋梗塞モデルで一見正常にみえる梗塞周囲の残存心筋にDNA断片化を認めた。また、Sharovら<sup>24)</sup>はイヌの冠動脈へのマイクロスフィア注入による多発性微小梗塞の慢性期モデルで残存心筋にアポトーシスを見出し、これら残存心筋の持続的な死が本モデルでの心不全進行に関与する可能性を示唆した。ただし、これらのモデルは同時に心不全を伴っていることに注意すべきである。

### iii) 心筋梗塞後増殖した間質細胞におけるアポトーシス

急性心筋梗塞の発症にともない、梗塞巣には好中球を中心とした急性炎症細胞が浸潤し、引き続き肉芽組織が形成され最終的に細胞成分がきわめて乏しい線維組織(scar)におきかわる。著者らは電子顕微鏡観察、DNA断片化の両所見から、

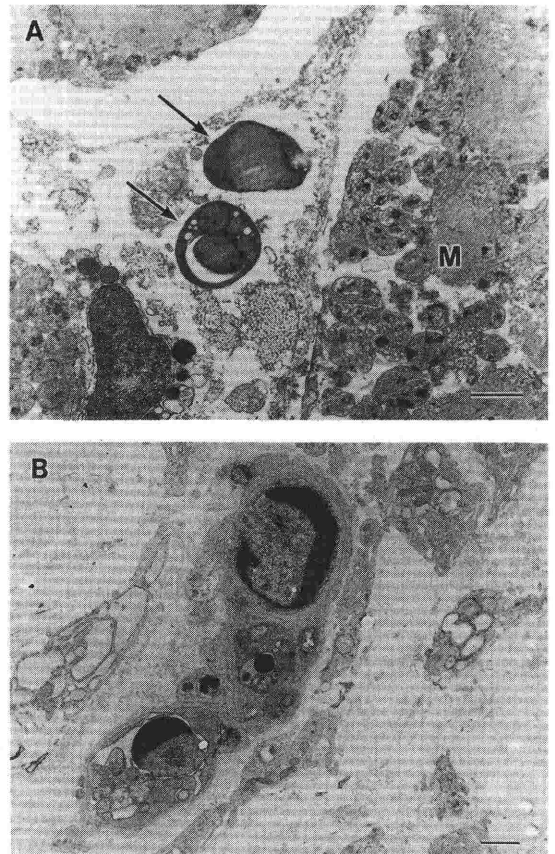


図5 (A) ウサギ心筋梗塞2日後の急性炎症組織にみられた白血球のアポトーシス(矢印)、および(B) 2週間後の肉芽組織にみられた筋線維芽細胞のアポトーシスの電子顕微鏡写真。  
M: 心筋細胞, バー: 1  $\mu$ m.

心筋梗塞の治癒過程における白血球、筋線維芽細胞、マクロファージ、内皮細胞などの細胞がアポトーシスを介して消失することを証明した(図5)<sup>25)</sup>。

### まとめと今後の展望

急性心筋梗塞の梗塞心筋細胞の死にアポトーシスが関与することが数年来報告されてきたが、これはオンコース(従来のネクローシス)であることが判明した。しかしながら、このオンコースではDNA断片化が見られ、アポトーシス関連因子の変動を伴い、また、Caspase阻害薬により梗塞サイズの縮小がみられるという報告もある。一方、Shimizuらは<sup>26)</sup>、青酸カリ(KCN)などに



よる化学的低酸素による細胞死, すなわちオンコシスのモデルに対し, アポトーシス抑制因子である Bcl-2 や Caspase 阻害薬が死の抑制効果をもつことを示している。これらを総合すると, 急性心筋梗塞における梗塞心筋細胞のオンコシスの進行のプロセスにはアポトーシスのメカニズムもかなり関与する可能性が示唆される。したがって将来の展望としては, 第一に細胞死 (アポトーシスのみならずオンコシスに関して) のメカニズムをさらに解明することが重要であり, 第二に, 細胞死に関与する阻害薬等を用いて細胞死をコントロールし, 臨床応用することが今後の重要な課題になると思われる。

## 文 献

- 1) Majno G, Joris I : Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. *Am J Pathol* 146 : 3-15, 1995
- 2) Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR : Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26 : 239-257, 1972
- 3) Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR : Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68 : 251-306, 1980
- 4) Cohen JJ : Programmed cell death in the immune system. *Adv Immunol* 50 : 55-85, 1991
- 5) Wyllie AH : Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activity. *Nature* 284 : 555-556, 1980
- 6) Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH : Apoptosis: the role of the endonuclease. *Am J Pathol* 136 : 593-608, 1990
- 7) Dong Z, Saikumar P, Weinberg JM, et al : Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. *Am J Pathol* 151:1205-1213, 1997
- 8) Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, et al : Reperfusion injury induced apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* 94 : 1621-1628, 1994
- 9) Kajstura J, Cheng W, Reiss K, et al : Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest* 74 : 86-107, 1996
- 10) Fliss H, Gattinger D : Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res* 79 : 949-956, 1996
- 11) Itoh G, Tamura J, Suzuki M, et al : DNA fragmentation of human infarcted myocardial cells demonstrated by the nick end labeling method and DNA agarose gel electrophoresis. *Am J Pathol* 146 : 1325-1331, 1995
- 12) Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, et al : Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation* 95 : 320-325, 1997
- 13) Bardales RH, Hailey LS, Xie SS, et al : In situ apoptosis assay for detection of early acute myocardial infarction. *Am J Pathol* 149 : 821-829, 1996
- 14) Linnik MD, Zobrist RH, Hatfield MD : Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 24 : 2002-2008, 1993
- 15) Héron A, Pollard H, Dessi F, et al : Regional variability in DNA fragmentation after global ischemia evidenced by combined histological and gel electrophoresis observations in the rat brain. *J Neurochem* 61 : 1973-1976, 1993
- 16) Schumer M, Colombel MC, Sawczuk IS, et al : Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. *Am J Pathol* 140 : 831-838, 1992
- 17) Kloner RA, Ganote CE, Whalen DA Jr., et al : Effect of a transient period of ischemia on myocardial cells. II. Fine structure during the first few minutes of reflow. *Am J Pathol* 74 : 399-422, 1974
- 18) Ohno M, Takemura G, Ohno A, et al : "Apoptotic" myocytes in the infarct area in rabbit hearts may be oncotic myocytes with DNA fragmentation. Analysis by immunogold electron microscopy combined with in situ nick end labeling. *Circulation* 98:1422-1430, 1998
- 19) Jennings RB, Baum JH, Herdson PB : Fine structural changes in myocardial ischemic injury. *Archiv Pathol* 79 : 135-143, 1965
- 20) Misao J, Hayakawa Y, Ohno M, et al : Expression of bcl-2 protein, an inhibitor of apoptosis, and Bax, an accelerator of apoptosis, in ventricular myocytes of human hearts with myocardial infarction. *Circulation* 94:1506-1512, 1996
- 21) Nishigaki K, Minatoguchi S, Noda T, et al : Expression of plasma soluble Fas, an apoptosis inhibitor, and plasma soluble Fas ligand, an inducer of apoptosis, in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 31:487 A, 1998(abstract)
- 22) Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, et al : Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation* 97 : 276-281, 1998
- 23) Cheng W, Kajstura J, Nitahara JA, et al : Programmed myocyte cell death affects the viable myocardium after infarction in rats. *Exp Cell Res* 226 : 316-327, 1996
- 24) Sharov VG, Sabbah HN, Shimoyama H, et al : Evidence of cardiocyte apoptosis in myocardium of dogs with chronic heart failure. *Am J Pathol* 148 : 141-149, 1996
- 25) Takemura G, Ohno M, Hayakawa Y, et al : Role of apoptosis in the disappearance of infiltrated and proliferated interstitial cells after myocardial infarction. *Circ Res* 82 : 1130-1138, 1998
- 26) Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, et al : Retardation of chemical hypoxia-induced necrotic cell death by Bcl-2 and ICE inhibitors: possible involvement of common mediators in apoptotic and necrotic signal transduction. *Oncogene* 12 : 2045-2050, 1996