

脳虚血—再灌流モデルにおける Fas 介在性 アポトーシスの発現

城戸 幹太*, 森 士朗**, 立浪 康晴*
猪狩 俊郎*, 岩月 尚文*

緒 言

虚血による脳神経細胞死にアポトーシスの関与が注目されるようになって久しいが¹⁻³⁾, 未だその機序に関して不明な点も多い。

本研究においては, 虚血性脳疾患におけるアポトーシスの発現のメカニズムとその意義を解明する手がかりの一つとして, アポトーシスを誘導するタンパクとして知られている Fas および Fas ligand (Fas L) が⁴⁻¹⁰⁾, 虚血性脳疾患において関与しているかどうかについて, 機能的な Fas の遺伝子を欠損している MRL/MpJ-*lpr/lpr* (MRL/*lpr*) 系マウス¹¹⁾ および Fas L を規定する遺伝子を欠損している MRL/MpTn-*gld/gld* (MRL/*gld*) 系マウス^{12,13)} を用いて検討し, さらに, 脳梗塞巣に浸潤している好中球がアポトーシスを起こしているかどうか, 起こしているとすれば, Fas L-Fas 系を介しているかどうかについて検討した。

材料および方法

I. 実験動物

Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA) 由来の 2 か月齢の雌雄マウス, MRL/MpJ-+/+ (MRL/+) (正常コントロールマウス), MRL/*lpr* (Fas 欠損マウス), および MRL/*gld* (FasL 欠損マウス) を用い, 東北大学医学部動物実験施設にて同施設の実験指針に準じて飼育・実験を行った¹³⁾。

II. 実験法

一過性局所脳虚血—再灌流モデルの作製: 本研究においては, Yang ら¹⁴⁾ の方法に準じて一過性脳虚血—再灌流モデルを作成した。すなわち, ハロタン 3.5% で麻酔導入し, フェイスマスクを用いてハロタン 1.0~1.5%, 笑気 70%, 酸素 30% で維持し, 保温マットで直腸温を約 37°C にコントロールした。消毒・局所麻酔の後, 頸部中央に縦切開を加え, 右総頸動脈を剖出, 同側外頸動脈を結紮・切断し, そこから先端を丸めた 5-0 ナイロン糸を, 総頸動脈分岐部から中大脳動脈の起始を閉鎖, 遮断するまで内頸動脈に向けて 11±0.5 mm 挿入し, これにより中大脳動脈を閉塞した。所定時間の中大脳動脈閉塞後, ナイロン糸を除去する事により再灌流を行った。コントロールマウスとしてナイロン糸を中大脳動脈を閉塞させるには短い長さの 8 mm 挿入したモデルにも同様の操作を行った (sham 手術)。

1. 虚血時間とアポトーシス発現の関連

MRL/+ (雄 12 匹) を用いて, 前述の一過性中大脳動脈閉塞—再灌流モデルで虚血時間を 30 分, 1 時間, および 2 時間の各群 (n=4) に設定した。24 時間再灌流後, ハロタン麻酔下で屠殺, 直ちに生理食塩水および 10% 中性緩衝ホルマリン液にて灌流固定を行い大脳を摘出, 24 時間固定後, 前交連の部位にて前額断し, 通法に従ってパラフィン包埋, 6 μm の切片を作製, Poly-L-lysine-coated slides を使用し, 病理組織学的検討のためにヘマトキシリン—エオジン (HE) 染色, アポトーシスの評価のために TUNEL 染色を行った¹⁵⁻¹⁸⁾。染色には Takara in situ Apoptosis Detection Kit (Takara 社

*東北大学歯学部附属病院歯科麻酔科

** 同 第二口腔外科学講座

製)¹⁶⁻¹⁸⁾を用いた。

2. 好中球の浸潤とアポトーシスの発現

MRL/+ (n=9), MRL/lpr (n=12), および MRL/gld (n=6)を用いて, 一過性脳虚血-再灌流モデルにおけるアポトーシスの発現を検討した。手術を行ったマウスは, 再灌流24時間後大量ハロセン麻酔により安楽死させ, 直ちに脳および脾臓を採取した。脾臓は TUNEL 法および後述する免疫組織化学的染色の際にコントロールとするため採取した。これらを O.C.T. Compound (Miles Inc. 社製) に包埋, アセトン・ドライアイスにて急速凍結した。作製した凍結組織標本は, 切片作製時まで-80℃で保存した。

凍結組織切片は, クライオスタットを用いて前交連の部位にて前額断し, 厚さ 4 μm で作製, スライドガラスには Poly-L-lysine coated slides を使用し, TUNEL 染色を行った¹⁵⁻¹⁸⁾。

さらに梗塞に伴って浸潤する好中球の検討のため, 前述した一過性脳虚血-再灌流モデルの検討に用いたマウスのうち MRL/+ (n=6), MRL/lpr (n=5) について, 好中球を特異的に検出する抗マウス Ly-6G (Gr-1) モノクローナル抗体 (PharMingen 社, USA)^{19,20)}を用いて avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) 法免疫組織化学的染色を行った^{21,22)}。

また, Ly-6G 染色と TUNEL 染色との二重染色法により好中球におけるアポトーシスの発現についても検討した。

3. TUNEL 陽性細胞数のカウント

光学顕微鏡を用いて, 各実験群の TUNEL 陽性細胞を全てカウントした。アポトーシス小体は集簇している一群をもって1個とした。

4. 好中球浸潤の検討

厚さ 4 μm の3枚の連続切片を作製, それぞれの切片に含まれる細胞数はほぼ同等であると考えられることから, それぞれに上記の染色を行い次のような関係式を用いて, TUNEL 陽性の好中球数について検討した。

- ① 全 TUNEL 陽性細胞数 (A)
- ② Ly-6G 抗体陽性細胞数 (B)
- ③ 二重染色による TUNEL 陽性細胞数と Ly-6G 陽性細胞数の和 (C)
- ④ 好中球以外の TUNEL 陽性細胞数 (D) = C - B

⑤ 好中球の TUNEL 陽性細胞数 (E) = A - D

以上の式より好中球の TUNEL 陽性細胞数および好中球以外の TUNEL 陽性細胞数をそれぞれのマウスについて算出した。

5. 統計学的検討

全ての測定した実測値は平均±標準偏差で表し, 群間の比較は student-t 検定を行った。p < 0.05未満をもって有意差ありとした。

結 果

1. 虚血時間とアポトーシス発現の関連

中大脳動脈を30分間閉塞し, 24時間再灌流した MRL/+ の群においては, 虚血側の中大脳動脈の支配領域である視索前野および線条の領域に, 比較的局限して梗塞巣を認め, 虚血時間が1時間, 2時間と長くなるのに従って, 梗塞巣が拡大し, 2時間閉塞した群においては, 大脳皮質におよぶ梗塞巣を認めた (図1)。

梗塞巣と正常組織との境界領域のいわゆるペナンプラには, 核が凝縮した細胞やアポトーシス小体と思われる断片化した核の集簇がみられ, 好中球の浸潤を伴っていた。

TUNEL 陽性細胞の出現頻度は虚血時間が30分から1時間にかけて有意に増加していた。虚血時間2時間の群においては壊死した細胞が多く認められ, 梗塞巣が広範囲に及んでいた。(写真1, 図2)。

2. TUNEL 陽性細胞数の検討

MRL/+ において虚血時間の違いによる TUNEL 陽性細胞の発現を観察したところ, 1時間虚血-24時間再灌流モデルにおいて, 最もよくアポトーシスがみられた。従って, 本研究においては, この条件において, Fas 欠損マウスとして MRL/lpr, Fas L 欠損マウスとして MRL/gld, および正常コントロールとして MRL/+ の一過性脳虚血-再灌

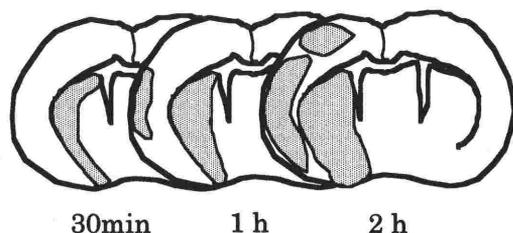


図1 虚血時間と梗塞巣の広がり

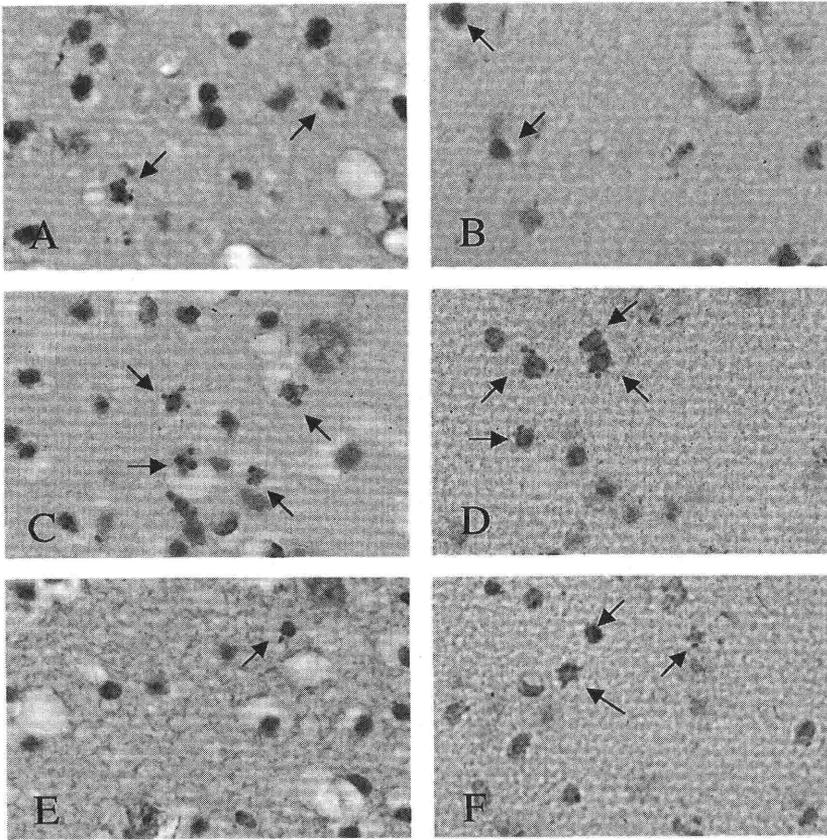


写真1 虚血時間と TUNEL 陽性細胞の発現

A, B: 30分虚血-24時間再灌流 C, D: 60分虚血-24時間再灌流
 E, F: 120分虚血-24時間再灌流
 A, C, E: いずれも H-E 染色×132
 B, D, F: いずれも TUNEL 染色×132

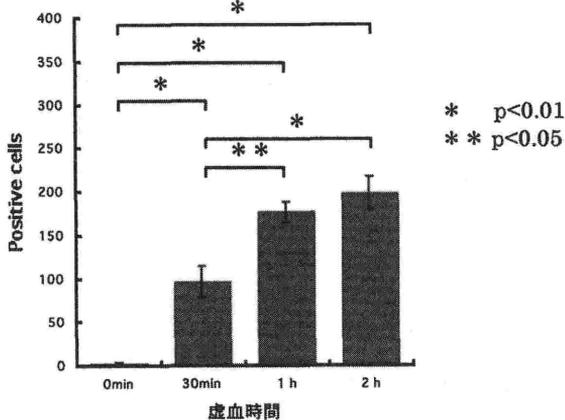


図2 虚血時間と TUNEL 陽性細胞数

流におけるアポトーシスの発現の検討を行った。

MRL/+, MRL/lpr, および MRL/gld の 3 群の全 TUNEL 陽性細胞数を比較したところ, MRL/+ は 519.2 ± 196.5 個, MRL/lpr は 241.3 ± 87.2 個, MRL/gld では 318.3 ± 105.1 個となり, MRL/+ と MRL/lpr 間に $p < 0.01$, MRL/+ と MRL/gld の間に $p < 0.05$ で有意差を認めた (図 3). MRL/lpr と MRL/gld の間には有意差は認めなかった. また, sham 手術を行ったマウス, および脳虚血再灌流モデルの非虚血側には TUNEL 陽性細胞の発現は認めなかった.

3. 梗塞巣周辺領域における好中球浸潤とアポトーシスの発現

梗塞に伴って出現する好中球浸潤とアポトーシスの発現の検討のため, 抗マウス Ly-6G モノク

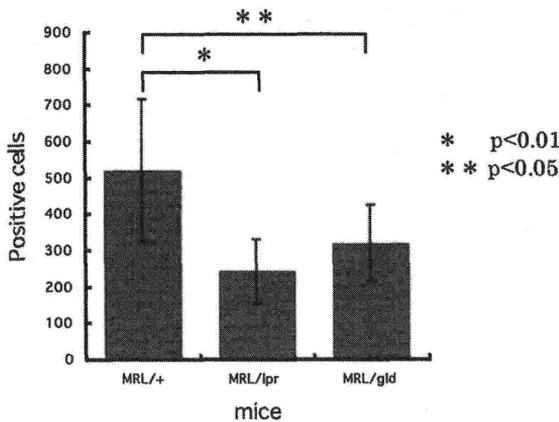


図3 全 TUNEL 陽性細胞数

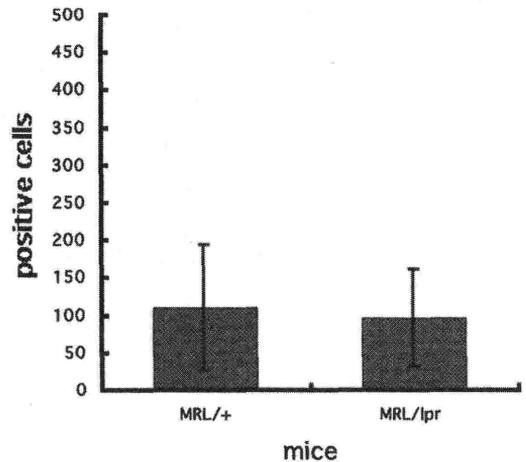


図4 好中球における TUNEL 陽性細胞数

ローナル抗体を用いて ABC 法による免疫組織化学的染色を行い、さらに Ly-6G 染色と TUNEL 染色との二重染色法により好中球におけるアポトーシスの発現についても検討した。

MRL/+ と MRL/lpr の脳梗塞巣周辺領域に浸潤する Ly-6G 陽性細胞数に有意な差は認めなかった。前述の算定式により算出された TUNEL 陽性 Ly-6G 陽性である細胞は MRL/+ で 109.5 ± 83.1 個、MRL/lpr で 96.2 ± 65.4 であり二群間に有意差は認めなかった(図4)。Ly-6G 陽性細胞を除いた TUNEL 陽性細胞数は、MRL/+ が 345.4 ± 165.5 、MRL/lpr が 122.3 ± 63.5 であり、二群間に有意差を認めた ($p < 0.01$) (図5)。また、MRL/+ において全 TUNEL 陽性細胞数に対する Ly-6G 陽性 TUNEL 陽性の細胞数の割合は 21.09% であった。

考 察

脳虚血の開始とともに急速に始まるエネルギー代謝障害によって進展する神経細胞の形態的变化は、従来、典型的な壊死(ネクローシス)と考えられてきた。しかし、1993年の Tominaga ら¹⁾の報告以来、これまで虚血性神経細胞死の実験モデルとして広く用いられてきた中大脳動脈閉塞モデルなどで、脳虚血におけるアポトーシスの発現を示唆する報告がなされるようになってきた^{1-3, 23-26)}。

Chopp ら²⁵⁾は、一過性局所脳虚血モデルを用いた詳細な検討により、TUNEL 陽性の神経細胞が梗塞巣と正常組織との境界領域に観察され、その発現が虚血時間の延長とともに増加し、虚血後一か月にわたり観察されることを報告している。ま

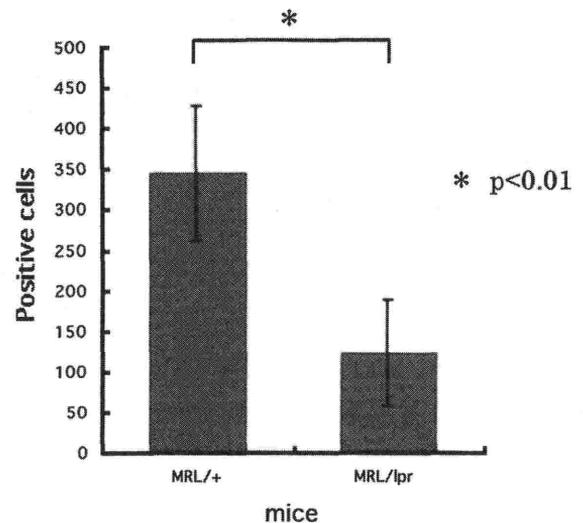


図5 好中球以外の細胞における TUNEL 陽性細胞数

た、局所脳虚血モデルにおいてもアポトーシス小体が光顕^{1, 23-27)}・電顕レベル²⁸⁾で観察されており、本研究においても同様の結果が得られた。従って、虚血性神経細胞死の一部にアポトーシスが関与することはほぼ間違いないものと考えられる。一方、アポトーシスを誘導するタンパクとして Fas 抗原がよく知られている。Fas は Tumor Necrosis Factor (TNF) ファミリーに属す・型膜蛋白質で⁴⁻⁷⁾、同じく TNF ファミリーに属する・型膜蛋白質の Fas L が⁷⁻⁹⁾、その受容体である Fas に結合することにより細胞にアポトーシスを誘導する¹⁰⁾。Matsuyama ら^{29, 30)}は、一過性脳虚血一再灌

流モデルを用いた実験から、虚血後の脳において Fas mRNA が虚血後6時間をピークに誘導され、24時間後には消失するという結果を示し、虚血後の脳においては Fas 介在性アポトーシスが、再灌流後24時間以内に始まることを推測している。しかし、Matsuyama ら^{29,30)}の報告においては、脳虚血における Fas の発現動態は示されてはいるが、アポトーシスの発現動態を直接示す結果は提示されていない。アポトーシスの誘導には、Fas の他に p 53 や bcl-2 を含めた様々なアポトーシス関連遺伝子の発現が関与している。従って、Fas の発現が、即アポトーシスの誘導を意味するものではなく、Fas の発現とアポトーシスの誘導を同時に検討して、はじめて虚血性脳疾患における Fas 介在性アポトーシスの関与を論ずることができるかと思われる。

本研究においては、機能的な Fas の遺伝子を欠損している MRL/lpr、さらに Fas L を規定する遺伝子を欠損している MRL/gld を使用し、虚血性脳疾患における Fas 介在性のアポトーシスの関与について TUNEL 法を用いて検討した。その結果、コントロールマウスである MRL/+ のアポトーシス発現頻度に比べ、MRL/lpr、MRL/gld のアポトーシス発現頻度が有意に少なく、脳の梗塞性病変部におけるアポトーシスの発現に Fas および Fas L が関与することが示された。

本研究の結果から考えると、Fas あるいは Fas L の発現の調節を介した虚血性脳疾患の治療法も可能かと考えられる。

一方、好中球より放出されるフリーラジカルやプロテアーゼが、アポトーシスの引き金となっていると考えられることから、白血球接着因子 (CD 11) に対する抗体を投与し、脳虚血時の脳組織中への好中球の動員を抑制し、脳組織におけるアポトーシスを間接的に抑制する試みもなされている³¹⁾。この報告では、抗 CD 11 抗体の投与により、アポトーシスを示す神経細胞数の減少とともに、梗塞巣の縮小が示されている。虚血性脳疾患病変部の病理組織学上の経時変化として、虚血状態成立後約24時間で好中球浸潤を認める。従って、この好中球の浸潤を抑制できれば、前述したように、脳組織におけるアポトーシスのある程度抑制できる可能性がある。しかし、生体においては、約48時間後には好中球浸潤が消退するこ

とが知られており、また、一般に脳梗塞巣においては膿瘍すなわちネクローシスに陥った好中球の集簇巣が形成されないことも周知のことである。好中球がネクローシスに陥った場合、好中球の細胞質内に含有しているフリーラジカルやプロテアーゼなどが散乱し、周囲組織を破壊することが考えられることから^{31,32)}、脳梗塞巣に浸潤する好中球がアポトーシスを起こすとすれば、好中球でのアポトーシス発現は、組織破壊の拡大を防止するメカニズムの一つと考えられる。しかし、脳梗塞巣における好中球のアポトーシスについての報告は少ない³³⁾。虚血性脳疾患におけるアポトーシスの発現のピークは虚血後24時間から48時間であることが知られており³⁰⁾、この期間は好中球が脳組織に浸潤している期間でもある。従って、本研究においては、脳梗塞巣における好中球のアポトーシスの発現についても検討した。その結果、梗塞性病変部で認められるアポトーシスに陥っている細胞の約20%が好中球である可能性が示唆された。しかし好中球のアポトーシスの発現が Fas 介在性であるかどうかについては不明であった。また、好中球以外の細胞におけるアポトーシスでは各群で有意差が認められたが、これらの細胞には主に神経細胞やグリア細胞、血管内皮細胞また他の炎症性細胞などが含まれる可能性がある³³⁾。今後、これらの細胞にアポトーシスの発現に関して詳細な検討が望まれる。

これまで、虚血性脳疾患におけるアポトーシスは、生体にとってネガティブな細胞応答として捉えられてきており、アポトーシスの抑制法などを提唱する報告もなされている³¹⁾。しかし、脳組織の障害は、たとえそれが極めて小範囲なものであっても、生体にとっては致命的である場合がある。従って、虚血性脳疾患におけるアポトーシスの発現の意義についての評価は慎重であるべきである。今後、好中球を含めた虚血性脳疾患の病変部に出現する様々な細胞の細胞死のメカニズムに関してのさらなる検討が必要である。

文 献

- 1) Tominaga T, Kure S, Narisawa K, et al : Endonuclease activation following focal ischemic injury in the rat brain. *Brain Research* 608 : 21-26, 1993
- 2) 松本昌泰, 鎌田武信 : 脳血管障害と神経細胞のアポトーシス. *最新医学* 49 : 1116-1123, 1994

- 3) Linnik MD, Miller JA, Sprinkle-Cavallo J, et al : Apoptotic DNA fragmentation in the rat cerebral cortex induced by permanent middle cerebral artery occlusion. *Molecular Brain Research* 32 : 116-124, 1995
- 4) Yonehara S, Ishii A, Yonehara M : A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *Journal of Experimental Medicine* 169 : 1747-1756, 1989
- 5) Itoh N, Yonehara S, Ishii A, et al : The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66 : 233-243, 1991
- 6) Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Itoh N, et al : The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *Journal of Immunology* 48 : 1274-1279, 1992
- 7) Suda T, Takahashi T, Golstein P, et al : Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75 : 1169-1178, 1993
- 8) Takahashi T, Tanaka M, Brannan CI, et al : Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 76 : 969-976, 1994
- 9) Takahashi T, Tanaka M, Inazawa J, et al : Human Fas ligand ; gene structure, chromosomal location and species specificity. *International Immunology* 6 : 1567-1574, 1994
- 10) Nagata S, Golstein P : The Fas death factor. *Science* 267 : 1449-1456, 1995
- 11) Murphy ED, Roths JB : Autoimmunity and lymphoproliferation : Induction by mutant gene *lpr*, and acceleration by a male-associated factor in strain BXSB mice. *Genetic Control of Autoimmune Disease* (ed. by Rose NR et al) Elsevier North Holland Inc., NY 207, 1979
- 12) Roths JB, Murphy ED, Eicher EM : A new mutation, *gld*, that produces lymphoproliferation and Autoimmunity in C3H/HeJ mice. *Journal of Experimental Medicine* 159 : 1-20, 1984
- 13) Ito RM, Terasaki S, Itoh J, et al : Rheumatic diseases in an MRL strain of mice with a deficit in the functional Fas Ligand. *Arthritis & Rheumatism* 40 : 1054-1063, 1997
- 14) Yang G, Chan PH, Chen J, et al : Human copper-zinc superoxide dismutase transgenic mice are highly resistant to reperfusion injury after focal ischemia. *Stroke* 25 : 165-170, 1994
- 15) Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, et al : A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 41 : 7-12, 1993
- 16) Gold R, Schmied M, Rothe G, et al : Detection of DNA fragmentation in apoptosis: application of in situ nick translation to cell culture systems and tissue sections. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 41 : 1023-1030, 1993
- 17) Strater J, Gunther AR, Bruderlein S, et al : Microwave irradiation of paraffin-embedded tissue sensitizes the TUNEL method for in situ detection of apoptotic cells. *Histochemistry & Cell Biology* 103 : 157-160, 1995
- 18) Dolzhanskiy A, Basch RS : Flow cytometric determination of apoptosis in heterogeneous cell populations. *Journal of Immunological Methods* 180 : 131-140, 1995
- 19) Lewinson DM, Bargatze RF, Butcher EC : Leukocyte-endothelial recognition evidence of a common molecular mechanism shared by neutrophils, lymphocytes, and other leukocytes. *Journal of Immunology* 147 : 22-28, 1987
- 20) Lagasse E, Weissman IL : Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. *Journal of Immunological Methods* 197 : 139-150, 1988
- 21) Hsu S, Raine L, Fanger H : Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 29 : 577-580, 1981
- 22) Mori S, Sawai T, Teshima T, et al : A new decalcifying technique for immunohistochemical studies of calcified tissue, especially applicable to cell surface marker demonstration. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 36 : 111-114, 1988
- 23) MacManus JP, Hill IE, Huang ZG, et al : DNA damage consistent with apoptosis in transient focal ischaemic neocortex. *Neuroreport* 5 : 493-496, 1994
- 24) Li Y, Chopp M, Jiang N, et al : Temporal profile of in situ DNA fragmentation after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 15 : 389-397, 1995
- 25) Li Y, Chopp M, Jiang N, et al : Induction of DNA fragmentation after 10 to 120 minutes of focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 26 : 1252-1258, 1995
- 26) Li Y, Chopp M, Jiang N, et al : In situ detection of DNA fragmentation after focal cerebral ischemia in mice. *Brain Research. Molecular Brain Research* 28 : 164-168, 1995
- 27) Chopp M, Li Y : Apoptosis in focal cerebral ischemia. *Acta Neurochirurgica Supplementum* 66 : 21-26, 1996
- 28) Li Y, Sharov VG, Jiang N, et al : Ultrastructural and light microscopic evidence of apoptosis after middle cerebral artery occlusion in the rat. *American Journal of Pathology* 146 : 1045-1051, 1995
- 29) Matsuyama T, Hata R, Tagaya M, et al : Fas antigen mRNA induction in postischemic murine brain. *Brain Research* 657 : 342-346, 1994
- 30) Matsuyama T, Hata R, Yamamoto Y, et al : Localization of Fas antigen mRNA induced in postischemic murine forebrain by in situ hybridization. *Brain Research. Molecular Brain Research* 34 : 166-172, 1995
- 31) Chopp M, Li Y, Jiang N, et al : Antibodies against adhesion molecules reduce apoptosis after transient middle cerebral artery occlusion in rat brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 16 : 578-584, 1996
- 32) Kogure T, Kogure K : Molecular and biochemical event within the brain subjected to cerebral ischemia (Targets for therapeutical intervention). *Clinical Neuroscience* 4 : 179-183, 1997
- 33) Li Y, Powers C, Jiang N, et al : Intact, injured, necrotic and apoptotic cells after focal cerebral ischemia in the rat. *Journal of the Neurological sciences* 156 : 119-132, 1998