

総 説

虚血性脳障害のメカニズム
Mechanisms of ischemic brain damage

内野 博之¹⁾ 平林 剛¹⁾ 横山 智仁¹⁾
池田 幸穂²⁾ 石井 脩夫¹⁾
Hiroyuki UCHINO¹⁾, Go HIRABAYASHI¹⁾, Tomohito YOKOYAMA¹⁾
Yukiho IKEDA²⁾, Nagao ISHII¹⁾

¹⁾東京医科大学 八王子医療センター 麻酔科
(Department of Anesthesiology, Hachioji Medical Center, Tokyo Medical University)
²⁾東京医科大学 八王子医療センター 脳神経外科
(Department of Neurosurgery, Hachioji Medical Center, Tokyo Medical University)

はじめに

我々は、麻酔臨床においてしばしば脳障害に繋がる病態を経験する。一過性の脳虚血は時として脳神経細胞死を誘発し重篤な後遺症を残すことがあり軽視できない。現在、この病態の形成を阻止する有効な治療法の確立はなされていない。そのため、脳障害に関与する基礎的メカニズムの解明が急務となる。近年、我々の研究結果から、虚血性神経細胞死形成に対して免疫抑制剤の抗虚血作用を有するカルシニューリン・イムノフィリン情報伝達系が深く関与することが判明した¹⁾。本稿では、虚血性神経細胞死におけるCa²⁺の役割、ミトコンドリア機能不全誘発におけるカルシニューリン・イムノフィリン情報伝達系の役割と脳保護における重要性を概説する。

1. 臨床の現場で経験する脳虚血を
引き起こす病態について

脳虚血を引き起こす病態は大別すると ① 可逆性

虚血性神経障害：短時間の脳虚血で神経細胞死を伴わない(短時間の脳虚血：TIA (Transient Ischemic Attack) および心停止)。② ある一定の時間以上の心停止(麻酔機の故障、薬物の影響、大量出血、患者の全身状態等を含む様々な要因によって引き起こされるもの)によって起こる全脳虚血(global ischemia)²⁾。③ 妊婦など血液の凝固能が亢進している患者、脳神経外科手術に伴う一時的な脳動脈の閉塞後に起こる脳梗塞(focal ischemia)³⁾。④ 頭部外傷による直接損傷、血腫や脳浮腫に伴う脳の圧迫⁴⁾⁵⁾、ICP (Intra Cranial Pressure) 亢進、脳血管攣縮による二次的な循環障害⁶⁾。⑤ 低酸素性脳障害や脳血管の攣縮等による脳への酸素供給の低下によってひきおこされる脳組織障害⁷⁾。⑥ ウイルス、細菌、寄生虫、真菌、スピロヘータなどによる脳炎、髄膜炎があり、脳炎は脳実質障害を伴う感染症で、主としてウイルスが原因となる⁸⁾。⑦ 痙攣発作(原因として頭部外傷、脳腫瘍、脳血管障害、頭蓋内感染、代謝異常)⁹⁾などが考えられる。しかしながら、虚血性脳障害を引き起こすメカニズムの詳細

2007年9月26日受付、2007年12月20日受理

キーワード：虚血性脳障害、ミトコンドリア機能不全、低酸素誘導因子(HIF)、NF κ B、カルシニューリン・イムノフィリン情報伝達系

(別冊請求先：〒193-0998 東京都八王子市館町1163 内野 博之)

Tel: 0426-65-5611 Fax: 0426-65-1796 E-mail: h-uchi@tokyo-med.ac.jp

細はいまだに明らかではなくその基礎的メカニズムの解析は重要な課題となる。

そこで、本稿では、極めて脆弱な組織である脳の虚血性脳障害の成因を考えるために、基礎実験から得られた結果を基に、脳の虚血に対する脆弱性や脳虚血と脳循環、脳内のエネルギー代謝、蛋白代謝、遺伝子発現、栄養因子、グルタミン酸と Ca^{2+} の関係、虚血によって誘導される因子、ミトコンドリア機能とカルシニューリン・イムノフィリン情報伝達系等に焦点を当てて検討を加えることにする。

2. 虚血に対する易障害性 (動物実験の結果より)

一過性動物モデルの実験結果より、脳虚血発作により部分的に死にやすい神経細胞と死にくい神経細胞に対して異なる影響の起こることが明らかとなり、死にやすい神経細胞を“選択的脆弱性”または“易傷害性”を有すると呼んでいる。さらにこれらの神経細胞死は虚血発作の数日後より現れる特徴を有し、遅発性神経細胞死と定義されている。ラット総頸動脈結紮による前脳虚血により、海馬 CA1 錐体細胞および線条体細胞、大脳新皮質 III、V 層細胞などが選択的に細胞死を起こす¹⁰⁾。脳梗塞の虚血病巣では脳血流が再開しても細胞死を起こすコアのある領域と血流再開によって機能回復を期待できる領域がある。回復が期待

できる部位をペナンプラと呼ぶ³⁾。ペナンプラは虚血再灌流に対する治療戦略を行う上で重要である。

3. 脳血流と脳虚血との関係 (図 1)

a. 脳内エネルギー代謝と脳血流の変化

脳虚血時の脳内エネルギー代謝については Smith 等の実験結果がよく知られている¹⁰⁾。彼等は脳内のグリコーゲン、Phosphocreatinine (Pcr)、リン酸化化合物 (脳内 $ATP+0.5ADP$) の脳内総エネルギー基質 ($ATP+ADP+AMP$) に対する変化率、脳内乳酸濃度の変化を測定した。虚血の時間経過とともに脳内エネルギー基質はすべて低下し、5分以内にグリコーゲンと Pcr はほぼゼロとなり、脳内リン酸化化合物も極めて低い状態となる (図 1A)。これは、脳内での好気性代謝が停止したことを示している。その一方で、脳内乳酸の急激な上昇が誘発される。これは、脳内での嫌気性代謝が亢進していることを示している。この状態は血流の回復とともに速やかに改善し、エネルギー状態もほぼ元通りになる¹⁰⁾ (図 1A)。前脳虚血モデルから得られた結果では脳血流は虚血時にほぼゼロとなり、血流再開とともに一過性に増加した状態 (hyperemia) を呈するが時間経過とともに低下していく (hypoperfusion)。やがて、神経細胞死という病態が訪れる。神経細胞機能が脳波上異常を来す閾値は、1分

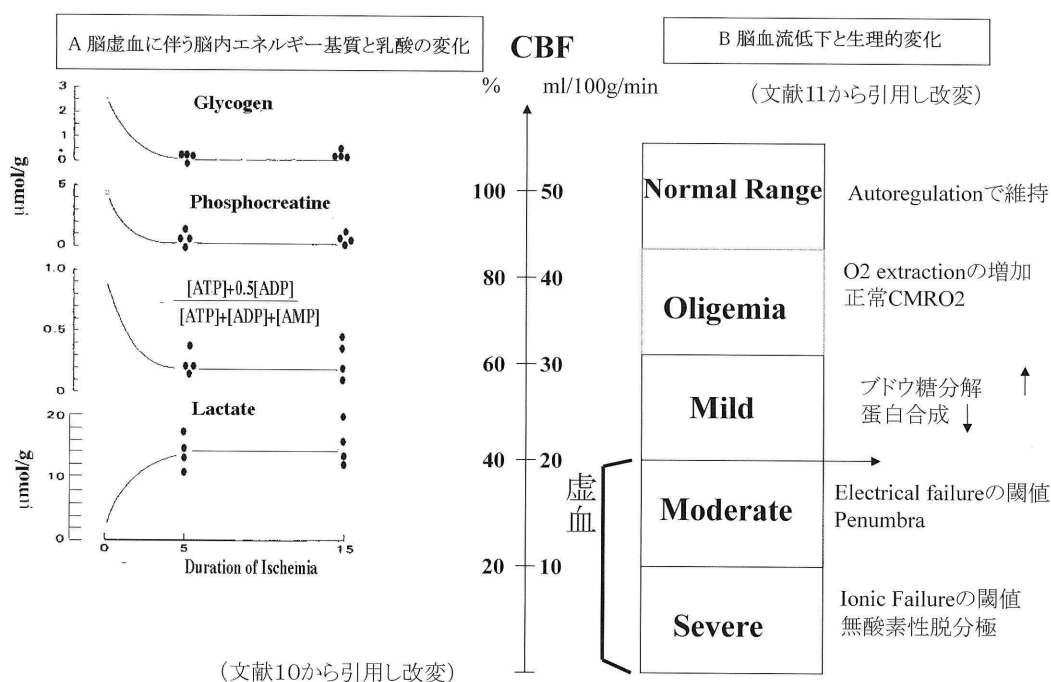


図1 脳内エネルギー基質と乳酸の変化および脳血流の変化
図は、前脳虚血時の脳内のグリコーゲン、Phosphocreatinine、高リン酸化化合物の消費と乳酸の産生状況 (A) および脳血流の変化に伴う症状 (B)を表している。

間の CBF (脳血流量) が 18~20 mL/100 g、CPP (Cerebral Perfusion Pressure) が 50 mmHg 以下、PaO₂ が 30~35 mmHg 以下とされている。CBF が 10 mL/100 g 以下の虚血が長引くと、神経細胞が不可逆的な損傷を受ける (図 1B)。しかし、バルビツレートまたは低体温により代謝が抑制されていれば、1分間の血流が 20 mL/100 g でも虚血は起こらない。

b. 脳虚血時の脳内蛋白代謝の変動

一過性の脳虚血により脳内の蛋白代謝は著しく障害される。脳血流という閾値から考えると蛋白合成は脳血流が正常時の 50% 以下になると障害されると考えられており、ATP の低下やイオンホメオスタシスの破綻 (脳血流が正常時の 20% 以下で出現と推測される) に比して極めて高い。いずれにしても、細胞の代謝、修復に必要な蛋白合成が回復しないことは神経細胞にとっては危機的状況となる。

c. 脳虚血による遺伝子発現の変化

脳虚血はこのような危機的状態で細胞死および生存や修復に関わる遺伝子が発現する。内因性あるいは外因性の刺激によって短時間で一過性に発現する即時型遺伝子群 (immediate early genes: IEGs) は、虚血に曝された脳内での細胞内および細胞間情報伝達に重要な役割を担っている¹²⁾。また、神経栄養因子や成長因子や Fas を介した death pathway や caspase を介したアポトーシス誘発など細胞死に関わるものがある。

d. 熱ショック蛋白とサイトカインと接着因子

熱ショック蛋白 (Heat shock protein: HSP) は種々の外的ストレスが加わって他の蛋白質の合成が全体に低下しているときに誘導される蛋白質であると多くの研究報告¹³⁾ から HSP と脳神経細胞の脆弱性との関連が明らかとなった。Yenari 等により脳虚血に対する HSP72 の遺伝子導入による神経保護効果を証明された¹⁴⁾。

虚血後に生じる遺伝子発現の third phase はサイトカイン (TNF α , IL1 β , IL6, IL-8, MCP-9, CINC, IFN 等) と接着因子 (p-selectin, ICAM-1, ELAM-1 等) によってなされる。サイトカインの産生は活性化ミクログリアやアストロサイトを主体としてなされ、サイトカインの発現と前後して iNOS (inducible Nitric Oxide synthase)¹⁵⁾ や cyclooxygenase-2 (COX-2) などが誘導され、活性酸素産生による脳神経障害に重要な役割を担っていると思われる。

e. 神経栄養因子および成長因子

神経栄養因子は神経細胞の分化、増殖に重要な役割

を果たしているのみならず、さまざまな神経障害から神経を保護する作用を有している。我々の実験結果から、海馬の各部位の 100 mg あたりの BDNF の蛋白量は、歯状回や CA3 では 88 ng、43 ng であるのに対し、CA1 では 8 ng と極めて少ないことから、CA1 の脆弱性と BDNF の発現量との関連が示唆された¹⁶⁾。

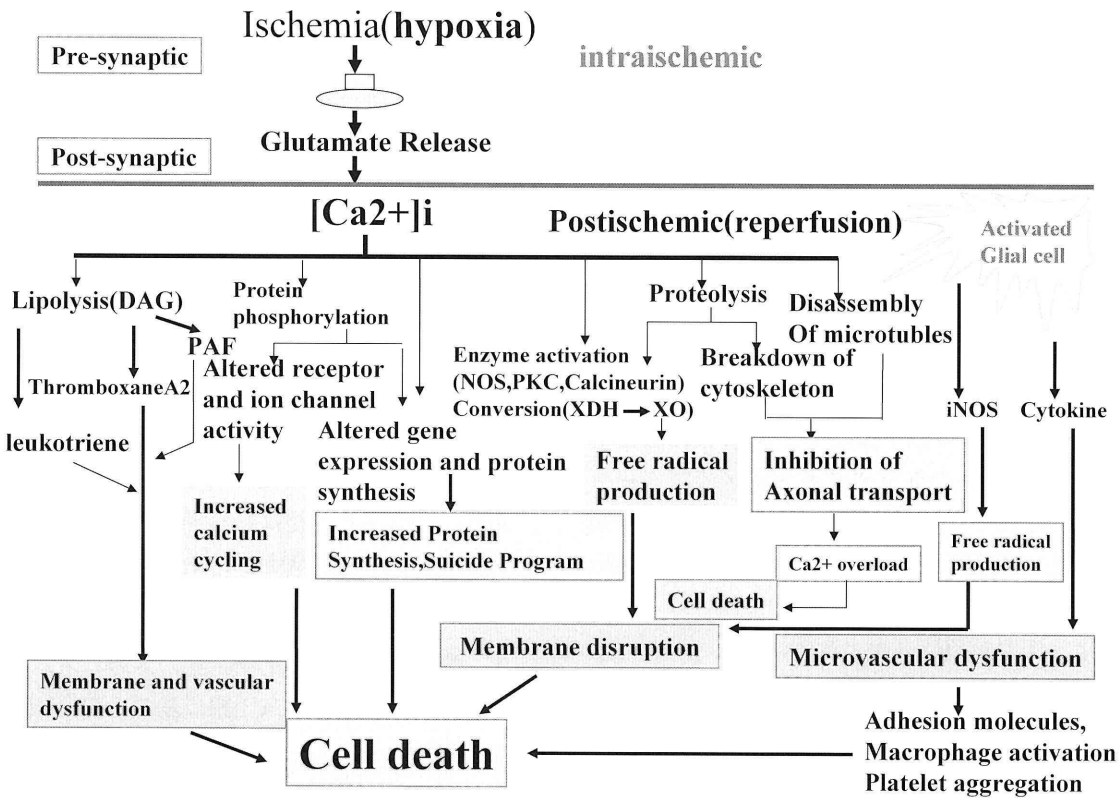
阿部等は局所脳虚血モデルにおいて GDNF が脳虚血障害早期に重要な役割を果たしていることを報告している¹⁷⁾。また、脳梗塞後には他の神経栄養因子も誘導されてくることが報告されており¹¹⁾、組織修復過程における血管新生、神経細胞間連絡の再構築などに重要な役割を担うと考えられる。

近年、PACAP と呼ばれる神経ペプチドのグリア細胞刺激による IL-6 の分泌が遅発性神経細胞死抑制に関与することも報告されている¹⁸⁾。

4. 虚血性脳神経細胞死誘発のメカニズム (図 2) (グルタミン酸-Ca²⁺ 説に基づく神経細胞死)

前に述べた脳虚血による好氣的な反応の停止はエネルギー基質の喪失反応を惹起し、嫌氣的な反応を促進させ細胞内の乳酸と H⁺ 濃度を上昇させ、脳内アシドーシスへと至る。さらには ATP 依存性の ion homeostasis の喪失、細胞外 K⁺ 増加と細胞内 Na⁺ 増加を生じ、細胞は脱分極を起こす。また、電位依存性 Ca²⁺ channel (VSCCs) を介した Ca²⁺ の流入が起こり、シナプス前膜部より細胞外腔への過剰なグルタミン酸放出を誘発し、過剰なグルタミン酸は細胞膜上の受容体 (NMDA、AMPA あるいは代謝型受容体) と結合することで細胞内 Ca²⁺ 濃度 ([Ca²⁺]_i) の上昇を惹起して Ca²⁺ 依存性の酵素の活性化 (NOS、PLA₂、CaMKinase 等) を介した情報伝達系を賦活化する。また、膜構成成分の脂質の障害 (lipolysis)、遺伝子発現、蛋白リン酸化、蛋白分解、微小管構造の分解、活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS: O₂⁻ (酸素ラジカル)、⁻OH (ヒドロキシラジカル)、H₂O₂) や活性窒素種 (Reactive Nitrogen Species: RNS)) 等のフリーラジカル産生、サイトカイン産生が誘発される。結果として下流にあるカスケードである細胞膜機能不全、Ca²⁺ cycling の増加、suicide program の発動、軸索輸送障害、Ca²⁺ overload、微小血管障害に伴う、接着因子マクロファージ活性化、血小板凝集が引き起こされ細胞死へと至る (図 2)。

従来、脳虚血は、ミトコンドリア呼吸鎖の傷害と ATP 産生不全という過程を引き起こし、これらが引



脳虚血後の細胞死誘発のカスケード

図2 脳虚血後の細胞死誘発のカスケード

脳虚血を呈する病態では、細胞は脱分極を起こす。シナプス前部より細胞外腔への過剰なグルタミン酸放出を誘発し、細胞膜上の受容体 (NMDA、AMPA あるいは代謝型受容体) と結合して細胞内への持続的な Ca^{2+} 流入を惹起する。さらには、細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の上昇は Ca^{2+} 依存性の酵素の活性化 (NOS、PLA2、CaMKinase 等) を介した情報伝達系を賦活化し、膜構成成分の脂質の障害、ROS の産生、ミトコンドリア呼吸鎖の傷害と ATP 産生不全という過程が引き金となって急性あるいは遅発性の神経細胞死が誘発されると考えられてきた。

き金となって急性あるいは遅発性の神経細胞死が誘発されると考えるグルタミン酸- Ca^{2+} 説が支持されてきた³⁾。しかし、近年、心臓や肝臓を用いた再灌流傷害誘発機構の解析結果から¹⁹⁾²⁰⁾、脳神経細胞死においても虚血再灌流に伴う持続的な $[Ca^{2+}]_i$ 増加による MPT (Mitochondrial Permeability Transition: ミトコンドリア内膜透過性亢進: 後述) 誘発によるミトコンドリア機能不全と神経細胞死の可能性が強く示唆され、脚光を浴びはじめている²¹⁾²²⁾。

5 脳虚血下の低酸素によって誘導される反応

前述したように脳組織の中でも神経細胞は虚血や低酸素の敏感で、低酸素ストレスに曝されると即時型反応のみならず低酸素誘導因子 (Hypoxic Inducible Factor-1: HIF-1) に代表される酸素センサーを介した多くの遺伝子発現により細胞機能を環境に適応させようとする。

Nowak 等が虚血後蛋白合成が抑制されるにもかかわらず

ならずストレス蛋白の一種である熱ストレス蛋白 (heat shock protein: HSP) 70 の発現が海馬錐体細胞に見られることを初めて報告した²³⁾。Sharp 等は蛋白変性、低酸素、拡張性脱分極 (Spreading Depression) などにより遺伝子発現が変動する領域を分子ペナンブラ (Molecular Penumbra) と呼んだ²⁴⁾。

また、Iadecola は虚血後の遺伝子発現を時間的経過に沿って3相に分類している²⁵⁾。第一相は、即時型遺伝子の発現、第二相は HSP などのストレス蛋白、第三相は炎症反応に関与する各種サイトカイン、細胞接着因子、炎症関連酵素、神経栄養因子、アポトーシス関連遺伝子などである。将来的には、これらの遺伝子発現に対するインターベンションが可能となれば、脳梗塞の患者で tPA (tissue plasminogen activator) の適応外である3-6時間以降の患者に対しても神経損傷軽減のための治療法を模索することに繋がるため遺伝子解析は重要な課題となる²⁶⁾。

また、脳虚血後に転写因子は標的遺伝子に結合して

効果を発揮するが、その発現量、低酸素負荷後のリン酸化、酸化還元状態に基づく DNA 結合活性の変化の変化が重要な役割を果たすと考えられ、AP-1 結合能のみが 1-24 時間まで虚血巣周囲で増加し、CREB や NF κ B 活性は 5 日目に虚血巣周囲で増加し、細胞の適応過程に関係すると考えられる²⁷⁾。特に、CREB は虚血後の細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇による Ca/CaMkinase によってリン酸化され、bcl-2、BDNF、NGF、IL-6²⁸⁾ などの神経栄養因子を発現しリン酸化 CREB は神経細胞生存に関与する可能性がある。

6. NF κ B を介した炎症関連遺伝子の発現

脳梗塞では、虚血後 6-24 時間は血流の低下した虚血中心部で各種サイトカイン、細胞接着因子、炎症関連酵素などが発現してくる。血管内皮上での白血球の rollig に関連する P-セレクトリンなどの細胞接着因子の発現は、虚血早期からみられ、12 時間後にピークとなる²⁹⁾。腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor- α : TNF- α) の発現は虚血後 3 時間において認められ³⁰⁾、I κ B のリン酸化を介して NF κ B を活性化し、NF κ B 結合部位を有するインターロイキン-1 β (IL-1 β)、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) iNOS (induced NO synthase)、シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) など多くの遺伝子を発現する。

一方、脳虚血後に NF κ B は神経細胞を傷害するとの報告も見られるが³¹⁾、逆に NF κ B を介した SOD の発現を促進することで神経保護作用を発揮しているとの報告もあり³²⁾、デコイ療法³³⁾ による単純な NF κ B の抑制には批判的な見解もある。

7. 低酸素負荷後の遺伝子発現を調節する HIF-1

HIF-1 は 1992 年に Semenza 等によって発見された転写因子で、もともと低酸素血症下での腎でのエリスロポイエチン (EPO) 産生を誘導する因子として同定された³⁴⁾。その後、この転写因子の低酸素エレメント (Hypoxia Response Element: HRE) が EPO のみならず嫌気性解糖系酵素、グルコーストランスポーター、VEGF、iNOS、HO-1、チロシン水酸化酵素などにも存在することが明らかとなり、遺伝子発現を介して低酸素刺激に対する多くの生体応答を制御していると考えられるようになった³⁵⁾。すなわち、HIF-1 は、虚血を含む低酸素状態を感知し、エネルギー代謝経路の変化、組織循環の改善、血管構築の改変を通じて細胞と生体の機能を適応させてゆく役割を果たしている

と考えられる³⁶⁾。

HIF-1 蛋白は α/β ヘテロ二量体であり、各々の蛋白は別の遺伝子上にコードされているが、いずれも哺乳類のアリル炭化水素レセプター (AHR) のホモログであり、とくに HIF-1 β は多くの細胞で発現している核蛋白 AHR nuclear translocator (ARNT) ファミリーに属する³⁷⁾。虚血下の低酸素状態で細胞内の Redox State (NAD⁺/NADH や NADP⁺/NADPH の比率から酸化還元状態のバランスを表すこと) が変化すると HIF-1 α が安定化し³⁸⁾、核内へ移行して HIF-1 β と CBP/p300 と複合体を形成して HRE に結合する³⁹⁾。再酸素化により、HIF-1 α は von Hippel-Lindau tumor suppressor protein (VHL) によりユビキチン化され、プロテアゾームによりすみやかに分解されるので⁴⁰⁾、その半減期は数分とされる。最近、HIF-2 α 、HIF-3 α が同定された。

HIF-1 α と HIF-1 β の発現は、仔ラットでは大脳皮質と海馬の神経細胞に限局しているが、成熟ラットでは脳内すべての領域でみられ、低酸素下ではアストロサイト脳室上衣細胞、血管内皮にも HIF-1 α の発現が見られる⁴¹⁾。局所脳虚血モデルでの虚血巣周囲での HIF-1 α と GLU-1、アルドラーゼ-1、乳酸脱水素酵素の誘導⁴²⁾ や全脳虚血モデルでの海馬 CA1 や大脳皮質の HIF-1 α と VEGF 発現が報告されている⁴³⁾。

また、HIF-1 複合体の DNA 結合能は低酸素+無グルコース負荷で速やかな上昇を認め⁴⁴⁾、局所脳虚血モデルでは HIF-1 の HRE 結合能が 3 時間後から上昇し、24 時間をピークとして 3 日後まで持続する⁴⁵⁾。以上から、低酸素負荷に対する早い生体応答は、HIF-1 の速やかな DNA 結合能変化によってもたらされる可能性が考えられる。

脳虚血における HIF-1 発現の意義は、エネルギー代謝の活性化、血管新生、神経再生に関与している可能性があり、EPO は神経細胞やアストロサイトに発現し、虚血後には虚血巣周囲の活性化アストロサイト、ミクログリア、血管内皮にも発現し⁴⁶⁾、細胞分化、増殖、抗アポトーシス作用を有すると考えられ、局所脳虚血モデルでは EPO が海馬神経細胞の保護作用を持つことが報告され⁴⁷⁾、仔ラット脳虚血モデルへのリコンビナントヒト EPO 投与による脳損傷の軽減が報告されている⁴⁸⁾。また、HIF-1 は虚血耐性の誘導に関与する⁴⁸⁾ ことも指摘されている。

その一方で、HIF-1 の発現が神経細胞死に関与するというエビデンスもある。低酸素負荷による HIF-1 α

の発現は癌抑制蛋白の p53 を安定化させ、アポトーシスを誘導する⁴⁹⁾ ことや HIF-1 α を KO した ES 細胞では低酸素に対するアポトーシスが誘導されないという報告もあり、脳虚血における HIF-1 の作用は虚血の強さ、持続時間、部位、細胞の種類などにより異なり神経保護あるいは細胞死誘導にはたらくと考えられる。今後の研究により新しい知見の得られることに期待したい。

8. 虚血再灌流に伴う脳内 Ca²⁺ の変動と ミトコンドリア機能不全

虚血に陥った臓器に血流が再開された状況を再灌流 (reperfusion) と呼ぶ。遅発性神経細胞死や no-reflow 現象の誘発に関与すると考えられている。虚血再灌流に伴う酸素供給は同時に活性酸素種や活性窒素種 (前述) の発生を生じ、ミトコンドリア呼吸鎖に特異的なリン脂質である Cardiolipin を傷害する可能性も示唆されている⁵⁰⁾。神経細胞が虚血により細胞死に陥る過程においては、細胞内カルシウムイオン濃度 [Ca²⁺]_i の上昇 (Ca²⁺ overload) が深く関わると考えられる⁵¹⁾。[Ca²⁺]_i 増加により PLA2 や Free radical が受容体やイオンチャネルの構成蛋白やリン脂質の機能を障害して透過性の変化を誘発し、持続的な [Ca²⁺]_i 増加を作り出すのではないかとという説もある⁵¹⁾。前述したように、持続的な [Ca²⁺]_i 増加はミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) の低下および ATP 産生低下を来し、ミトコンドリア機能不全を誘発する。ミトコンドリアの Ca²⁺ の取り込みは、内膜上に存在する uniporter を通してミトコンドリアの膜電位 ($\Delta\Psi_m$) を driving force として用いることで行われ⁵²⁾、Ca²⁺ の放出は Na⁺/H⁺ 交換系と連動した Na⁺/Ca²⁺ antiporter によって行われる。生理的な条件下では、[Ca²⁺]_i はミトコンドリア内より 10-50 倍も低い濃度であるため、ミトコンドリアは Ca²⁺ を取り込み緩衝していく役割を担わず、主にミトコンドリア内 Ca²⁺ 依存性酵素の pyruvate dehydrogenase、 α -oxoglutarate-dehydrogenase および isocitrate dehydrogenase の制御を行っている。

uniporter を介した Ca²⁺ の取り込みは高容量であるが、過剰な Ca²⁺ の取り込みはミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) の低下を招く。これはミトコンドリアにおける uniporter を介した Ca²⁺ の取り込みが呼吸鎖における ATP 産生と競合するためと考えられる⁵²⁾。さらに、ミトコンドリアからのカルシウム放出は、低容量

の Na⁺/Ca²⁺ antiporter を介しているため時間を要するという特徴もある。通常ミトコンドリア内の総 Ca²⁺ 含有量は 1-3 nmol/mg of protein であるが脳虚血に伴う再灌流 24 時間後には 6-9 nmol/mg of protein へと増加することが報告されている⁵³⁾。これは、脳虚血再灌流後の “Ca²⁺ overload” においてミトコンドリアが細胞内 Ca²⁺ 緩衝作用を発揮して [Ca²⁺]_i 上昇に伴う細胞内情報伝達系の過剰な活性化とそれに連動した細胞死の誘発から細胞を保護しようとすることを示唆しているものであると考えられる⁵⁴⁾。ミトコンドリア機能不全と Ca²⁺ 依存性酵素活性化による二次的な細胞障害により神経細胞死へと至ると考えられている。特に近年、神経細胞死はミトコンドリア内膜に対する様々な刺激 (Ca²⁺ 過剰負荷、酸化ストレス) を誘因とする非特異的な pore の形成に伴う MPT (Mitochondrial Permeability Transition: ミトコンドリア内膜透過性亢進) が誘発されて、アポトーシス誘発因子を放出し、アポトーシスおよびネクローシスに至る可能性が指摘された³⁾⁵⁵⁾。

MPT pore は 1.5 kd 以下の物質の通過が可能な蛋白複合体であり、これまでに外膜の Porin/VDAC、内膜の ANT、マトリックスの CypD が構成蛋白の一部を成すのではないかと考えられている。さらに、アポトーシス誘発時には MPT pore は Mega pore を形成またはそれ自体の形態の変化を起こしてアポトーシス誘発因子を放出する可能性が指摘されたが、正確な構造は今だ不明である。

近年、植田等は細胞内の ATP レベルが維持されている時はアポトーシスが誘発され、ATP レベルの低下に伴ってネクローシスに変化していくことを報告しているが、その一方で、細胞内のグルコースレベルが重要な鍵を握っている可能性も指摘している⁵⁶⁾。

9. MPTpore 開孔における仮説

現在、MPT の起こる機序として 4 つのパターンが提唱されている。まずは、ANT、VDAC、CypD などが複合体となって MPTpore を構成して MPT が誘発されるが、MPTpore 構築に関与する蛋白質は必ずしも ANT でなくてもよく他のまだ同定されていない蛋白質に置き換えることも可能である⁵⁷⁾。2 つ目の説はミトコンドリア膜の間を動いて物質を輸送する Tom/Tim または SAM50 と呼ばれる輸送蛋白質システムにより MPT が誘発されるという説⁵⁸⁾ 3 つ目と 4 つ目の説は誤って折りたたまれた蛋白質 (misfold protein)

によって MPT が誘発されるという説と蛋白質同士が橋かけ結合した状態となって MPT を誘発するという説がある⁵⁹⁾。しかしながら、その分子生物学的特徴の詳細はあきらかとなっていない。

10. MPT におけるプロテオミックスを用いた解析

MPT は複数のたんぱく質が複合体となって MPTpore を形勢することで誘発されると考えられている。MPTpore を構成する蛋白複合体は内膜と外膜が接する部位 (そこはマトリックス、内膜と外膜の膜間腔と細胞質間の代謝調節を行う場所であると考えられている) に存在すると考えられている⁶⁰⁾。精力的な解析がなされてきたにも拘らず、正確な分子機構は依然として明らかとなっていない。MPTpore 形成に関与する蛋白には外膜に存在する VDAC (Voltage dependent anion channel) または porin、末梢性のベンゾジアゼピン受容体の PBR (Peripheral benzodiazepine receptor)、内膜の ANT (Adenine Nucleotide Translocase)、マトリックスの Cyclophilin D (CypD) があるとの仮説が一般的に支持されている⁶¹⁾。これまでに、VDAC、ANT、CypDなどを標的とした薬理的解析が *in vitro* および *in vivo* で行われて、MPTpore にこれらの分子が関与するという仮説が支持されてきた⁶²⁾⁶³⁾。

内膜と外膜が接する部位 (contact site) には VDAC や ANT などの分子が豊富に存在し、他の蛋白との反応を介して MPT を誘発すると信じられてきた⁶¹⁾。脳のミトコンドリアを用いた contact site に関わる蛋白質の解析結果からは VDAC、ANT、Hexokinase、CypD が見出されている⁶⁴⁾。リポゾームや人工膜を用いた再構築実験からは、MPTpore と似たチャンネル形成が可能であったと報告されている⁶⁴⁾。その一方で、VDAC、ANT が含まれなくても MPTpore に似た構造体の形成が可能であることが明らかとなった⁶⁴⁾。この実験結果は、ANT、CypD を遺伝子改変した動物の実験結果によってさらに支持され、MPTpore の構成には ANT や CypD は必要不可欠ではないが修飾因子として重要であるとの結論に至った。さらに、VDAC isoform 遺伝子を有する動物を用いた解析結果も結論を出すまでには至らなかった。そのため、MPT を形成する分子は病的な状況において複合体を形成するものと考えられている。実際に、糖尿病のモデルラットで腎障害と MPT の関係が報告されている⁶⁵⁾。

11. MPT とネクローシスおよびアポトーシスの連関 (図3)

この MPT pore はアポトーシスやネクローシスの形成に重要な役割を果たしていることがわかってきたが、その機序として以下の可能性が考えられている²²⁾。

① ミトコンドリアにおける ROS (Reactive Oxygen Species) の産生や Ca^{2+} の取り込みが閾値を越えることによって MPT pore の開孔が惹起され、さらに細胞質の Ca^{2+} の増加、ミトコンドリアの膨化、ATP 合成の低下、ミトコンドリア膜電位の低下等が加わりミトコンドリア機能不全へと至る。この際 MPTpore を通してアポトーシスまたはネクローシスを誘発する因子として AIF (apoptosis inducing factor) やチトクローム C がミトコンドリアから細胞質へ放出される⁶⁶⁾。これらの因子はさらに Caspase や CAD の活性化をもたらしてアポトーシスやネクローシスを引き起こすことがすでに報告されている²²⁾。

② ミトコンドリア膜電位の低下が長く続く場合には、ミトコンドリアの持続的な脱分極と電子伝達系の uncoupling が引き起こされ、ミトコンドリアは膨化し、外膜の破綻を来すことに加え、大量の ROS の産生と ATP の産生停止がさらに加わり細胞はネクローシスへと至る³⁾。MPT が細胞をネクローシスに至らしめる過程における ATP 産生の低下には PARP (Poly(ADP-ribose)polymerase) が深く関わりとされる。PARP は核内に存在する酵素であり、DNA の修復や細胞の分化に対してその役割を担っている。虚血後の再灌流時に PARP が過剰に活性化される NAD^+ の消費を介した ADP-ribosyl-eEF-2 を形成が蛋白合成の抑制および NAD^+ の消失を招くため ATP の産生が停止し細胞はネクローシスに至る。

③ 一方、ミトコンドリアの脱分極が一過性で可逆的である場合にも AIF (apoptosis inducing factor) やチトクローム C の放出は起こりうる。すなわち、細胞死を誘発する因子 (Bax、Bad など) の作用により MPTpore が開孔して AIF やチトクローム C を放出し、Caspase9 活性化とそれに引き続く caspase3 活性化を誘発してアポトーシスを経てネクローシスへと至る場合である。この場合には MPT を伴わないか伴ってもわずかであると考えられている。

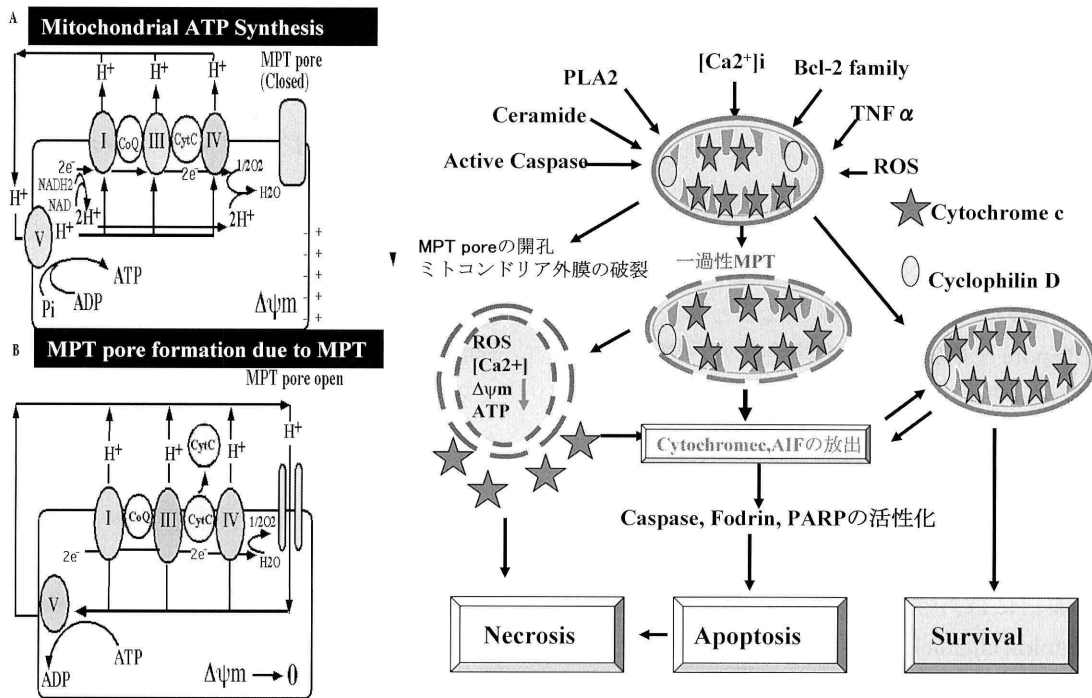


図3 ミトコンドリアにおけるエネルギー産生と MPT、MPT 誘発とアポトーシスおよびネクロシスの連関
 ミトコンドリアにさまざまなストレスが加わり非特異的な孔が開く。これが Mitochondrial Permeability Transition (MPT) である。ミトコンドリアは通常 H^+ 勾配を利用して ATP 産生を行っているが (A)、MPT が誘発されると ATP を消費して H^+ がミトコンドリアから放出されるため (B)、膜電位が維持できなくなりミトコンドリアからチトクローム C や AIF が放出され、APOPTOSIS または Necrosis が誘発される。膜電位が著しいと細胞はネクロシスとなると考えられている。中川等の実験より CypD を介した MPT は APOPTOSIS に関与しないということが明らかとなった。

また、 $TNF\alpha$ によって Fas を介して caspase8 が活性化され、Bid のミトコンドリアへの translocation が引き起こされ、MPT へと至るといふ考えもあり、MPT を誘発する経路は多岐に亘ると思われる。中川等は CypD knockout マウスを作成してすべての組織に亘って詳細にその特徴を調べた結果、CypD はアポトーシスには全く影響を与えないことが判明した。そのため、MPT からアポトーシスという仮説モデルは姿を消すことになった。その一方で、CypD の欠損した細胞は、活性酸素やカルシウムイオノフォアによって誘導されるネクロシスに対しては有意に耐性となっていることより、CypD はカルシウムや活性酸素が深く関与する虚血再灌流障害において MPT 形成に重要な役割を担うことが判明した⁶⁷⁾。

12. カルシニューリンと細胞死

カルシニューリンは Calmodulin (CaM) dependent cyclic phosphodiesterase の inhibitor として Wang 等によって 1976 年に発見された⁶⁸⁾。その後、この酵素が注目を浴びた他の理由としては、この酵素が免疫抑制剤のひとつであるサイクロスポリン A (CsA) および

FK506 のターゲットであることが報告され⁶⁹⁾、T 細胞活性化に伴う免疫機構制御に不可欠な酵素としてその役割が重要視されてきたためである。カルシニューリンは牛脳より単離され、クローニングされたセリン/スレオニンホスファターゼであり、活性基をもつカルシニューリン A (CnA: MW 61KD)、と機能サブユニットであるカルシニューリン B (CnB: MW 19KD) のヘテロ 2 量体である。現在までに、A サブユニットに関しては CnA α 、CnA β 、CnA γ 、CnB サブユニットに関しては CnB α 、CnB β が存在し、脳では特に CnA α が全体の 70-80% を占め、残りが CnA β と考えられている。脳内の分布は海馬、線条体、大脳皮質に多く、細胞内の局在を見るとシナプス後膜の肥厚部およびシナプス前部の神経終末に多く分布している。

カルシニューリンが免疫抑制剤である CsA や FK506 の標的分子となる事実は Liu 等により報告されたが⁶⁹⁾、この過程には CsA や FK506 と結合するイムノフィリンと呼ばれる結合タンパクが重要な役割を担う。イムノフィリンは prolyl cis/trans isomerase 活性を持ち、CsA や FK506 はそれぞれのイムノフィリンと複合体を形成して、カルシニューリンの触媒部

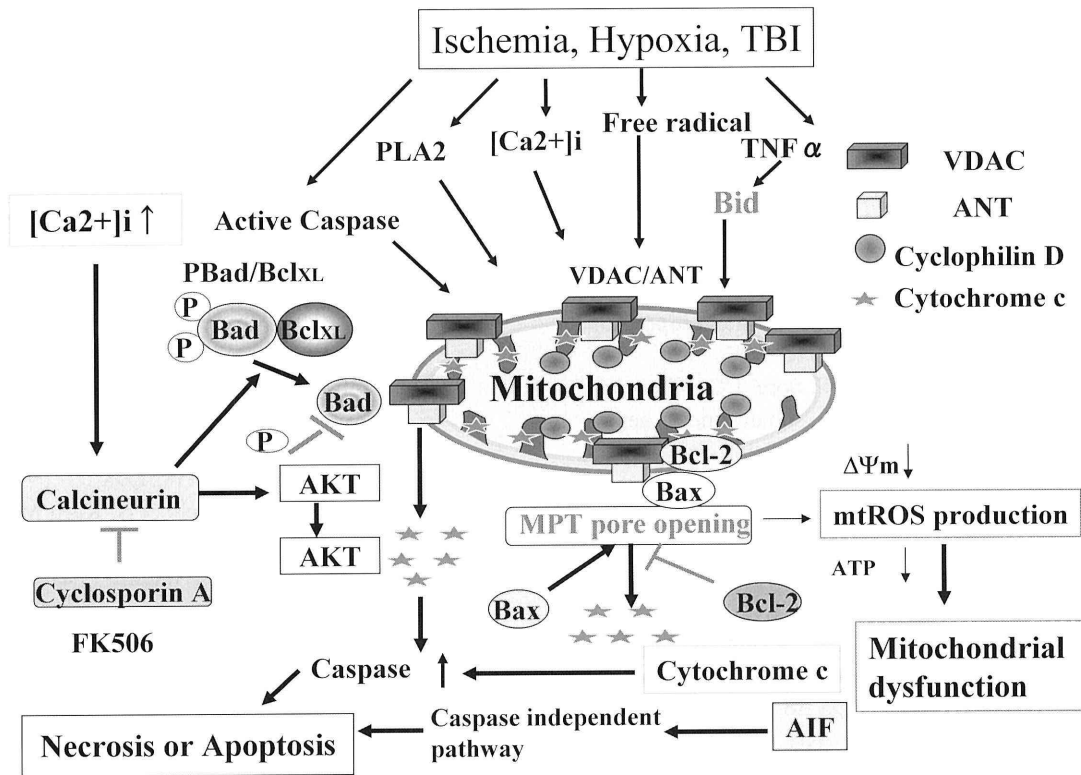
位の立体障害を起こし、活性阻害を生じるものと考えられている。カルシニューリンは生理的な条件下では NMDA 受容体、IP3 受容体やリアノジン受容体を脱リン酸化して Ca²⁺ の流入を抑制する。森岡等⁷⁰⁾ はカルシニューリンは Ca²⁺ buffering protein の役割を有するとの考えを示している。脳虚血後に NFκB を介した SOD (superoxide dismutase) の発現を促進することで神経保護作用を発揮しているとの報告⁷¹⁾ もある。

一方、芝崎等⁷²⁾ は Bcl-2 がカルシニューリンの活性抑制を起こす事実を見出ししている。また、カルシニューリン/Bad を介する系が神経細胞におけるアポトーシス誘導に対して重要な経路となることを報告している。我々の実験結果からは前脳虚血後の海馬体(歯状回、CA3、CA1) のカルシニューリン活性上昇と Bad を介する細胞死誘導情報伝達系の活性化とチトクローム C の流出と遅発性神経細胞死との関係が明らかとなった⁷³⁾。遅発性神経細胞死誘発におけるカル

シニューリンの重要性に加えてミトコンドリア内のイムノフィリンが重要な鍵を握ることも明らかとなった⁷⁴⁾。しかしながら、カルシニューリンと MPT の関係は不明な点が多い。

13. 免疫抑制剤の抗虚血作用からみた虚血性神経細胞死のメカニズム (カルシニューリン/イムノフィリン情報伝達系の細胞死への関与)

免疫抑制剤の抗虚血作用が注目されはじめたのは Sharky 等が 1994 年に FK506 の梗塞縮小作用を報告したことに端を発する⁷⁴⁾。著者は翌年に CsA の前脳虚血に対する抗虚血作用を報告した⁷⁵⁾。これらの実験結果から、虚血後の脳内においてはカルシニューリンの Bad を介した情報伝達系とイムノフィリン (Cyclophilin D) という全く異なる機能活性を持つ分子作用が複雑に絡み合って MPT を誘発し、ミトコンドリア膜電位、ATP 産生低下、ミトコンドリア内活性酸素種



Mitochondrial Central theory

図4 ミトコンドリア機能不全誘発とカルシニューリン/イムノフィリン情報伝達系の関係

虚血、低酸素、頭部外傷などのストレスにより細胞内 Ca²⁺ の増加が起こり細胞内脱リン酸化酵素のカルシニューリンの活性化、ミトコンドリア機能不全が誘発される。カルシニューリンは、免疫抑制剤である CSA と FK506 の共通の標的分子で、ミトコンドリア機能不全は ANT、VDAC、Cyclophilin D (CypD) を介して MPT が誘発されて起こり、膜電位の低下と ROS (活性酸素種) の発生、さそれに続くチトクローム C および AIF の流出により、アポトーシスやネクロトーシスが誘発される。サイクロスポリン A (CsA) や FK506 は Bad の脱リン酸化を抑制する。しかし、CsA はミトコンドリアに特異的なイムノフィリン (CypD) を制御して MPT を抑制することで細胞保護作用を発揮すると考えられる。

過剰産生から最終的にはミトコンドリア機能不全となる。一方、MPTに伴う Cytochrome c や AIF の放出からアポトーシスやネクローシスに至るためカルシニューリンとイムノフィリン情報伝達系はアポトーシスやネクローシス制御に重要な役割を果たすことが明らかとなった。今後は脳虚血後のアポトーシスおよびネクローシスの制御機構解明にはカルシニューリン/イムノフィリン情報伝達系として総括的に捉えていくことが必要であると考えられる (Mitochondrial Central Theory) (図4)。

文 献

- 1) Uchino H, Minamikawa-Tachino R, Kristian T, Perkins G, Narazaki M, Siesjö BK, Shibasaki F: Differential neuroprotection by cyclosporin A and FK506 following ischemia corresponds with differing abilities to inhibit calcineurin and the mitochondrial permeability transition. *Neurobiol Dis* **10**: 219-233, 2002
- 2) Kirino T: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* **239**: 57-69, 1982
- 3) Siesjö BK and Siesjö P: Mechanisms of secondary brain injury. *European Journal of Anesthesiology* **13**: 247-268, 1996
- 4) Smith DH, Meanev DF, Shull WH: Diffuse axonal injury in head trauma. *J Head Trauma Rehabil* **18**: 307-316, 2003
- 5) Faden AI: Neuroprotection and traumatic brain injury: theoretical option or realistic proposition. *Curr Opin Neurol* **15**: 707-712, 2002
- 6) Wu CT, Wong CS, Yeh CC, Borel CO: Treatment of cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage—a review. *Acta Anaesthesiol Taiwan* **42**: 215-222, 2004
- 7) Biagas K: Hypoxic-ischemic brain injury: advancements in the understanding of mechanisms and potential avenues for therapy. *Curr Opin Pediatr* **11**: 223-228, 1999
- 8) Yoshikawa T: Newly discovered human herpesviruses: pathogenesis and treatments for central nervous system infection due to HHV-6. *Rinsho Shinkeigaku* **44**: 849-851, 2004
- 9) Bengzon J, Mohapel P, Ekdahl CT, Lindvall O: Neuronal apoptosis after brief and prolonged seizures. *Prog Brain Res* **135**: 111-119, 2002
- 10) Smith ML, Bendek G, Dahlgren N, Rosen I, Wieloch T, Siesjö BK: Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model. *Acta Neurol Scand* **69**: 385-401, 1984
- 11) Ueki M, Linn F, Hossmann KA: Functional activation of cerebral blood flow and metabolism before and after global ischemia of rat brain. *JCBFM* **8**: 486-494, 1988
- 12) Abe K: Gene therapy and neuroprotection for cerebral infarction. *Rinsho Shinkeigaku* **43**: 894-896, 2003
- 13) Blanco M, Lizasoain I, Sorbrino T, Vivancos J, Castillo J: Ischemic preconditioning: a novel target for neuroprotective therapy. *Cerebrovasc Dis* **21** Suppl 2: 38-47, 2006
- 14) Yenari MA, Fink SL, Sun GH, Chang LK, Patel MK, Kunis DM, Onley D, Ho DY, Sapolsky RM, Steinberg GK: Gene therapy with HSP72 is neuroprotective in rat models of stroke and epilepsy. *Ann Neurol* **44**: 584-591, 1998
- 15) Moro MA, Cardenas A, Hurtado O, Leza JC, Lizasoain I: Role of nitric oxide after brain ischaemia. *Cell Calcium* **36**: 265-275, 2004
- 16) Kokaia Z, Nawa, H, Uchino H, Elmer E, Kokaia M, Carnahan J, Lindvall O: Regional brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein levels following transient forebrain ischemia in the rat. *Brain Res Mol Brain Res* **38**: 139-144, 1996
- 17) Abe K: Gene therapy with GDNF. *Nippon Rinsho* **64** Suppl 7: 649-654, 2006
- 18) Botia B, Basille M, Allais A, Raoult E, Falluel-Morel A, Galas L, Jolivel V, Wurtz O, Komuro H, Fournier A, Vaudry H, Burel D, Gonzalez BJ, Vaudry D: Neurotrophic effects of PACAP in the cerebellar cortex. *Peptides* **28**: 1746-1752, 2007
- 19) Honda HM, Korge P, Weiss JN: Mitochondria and ischemia/reperfusion injury. *Ann N Y Acad Sci* **1047**: 248-258, 2005
- 20) Halestrap AP: The mitochondrial permeability transition: its molecular mechanism and role in reperfusion injury. *Biochem Soc Symp* **66**: 181-203, 1999
- 21) Kristian T, Siesjö BK: Calcium in ischemic cell death. *Stroke* **29**: 705-718, 1998
- 22) Siesjö BK, Elmer E, Janelidze S, Keep M, Kristian T, Ouyang YB, Uchino H: Role and mechanisms of secondary mitochondrial failure. *Acta Neurochir Suppl* **73**: 7-13, 1999
- 23) Vass K, Welch WJ, Nowak TS Jr: Localization of 70-kDa stress protein induction in gerbil brain after ischemia. *Acta Neuropathol (Berl)* **77**: 128-135, 1988
- 24) Sharp FR: Multiple molecular penumbras after focal cerebral ischemia. *JCBFM* **20**: 1011-1032, 2000
- 25) Iadecola C: Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci* **20**: 132-139, 1997
- 26) 野川 茂: 脳虚血と遺伝子発現. *神経内科* **52**: 18-27, 2000
- 27) Salminen A, Liu PK, Hsu CY: Alteration of transcription factor binding activities in the ischemic rat

- brain. *Biochem Biophys Res Commun* **212**: 939-944, 1995
- 28) Suzuki S, Tanaka K, Nagata E, Ito D, Dembo T, Fukuuchi Y: Cerebral neurons express interleukin-6 after transient forebrain ischemia in gerbils. *Neurosci Lett* **262**: 117-120, 1999
- 29) Zhang R, Chop M, Zhang Z, Jiang N, Powers C: The expression of P- and E-selectins in three models of middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* **785**: 207-214, 1998
- 30) Wang X, Yue TL, Barone FC, White RF, Gagnon RC, Feuerstein GZ: Concomitant cortical expression of TNF-alpha and IL-1 beta mRNAs follows early response gene expression in transient focal ischemia. *Mol Chem Neuropathol* **23**: 103-114, 1994
- 31) Stephenson D, Yin T, Smalstig EB, Hsu MA, Panetta J, Little S, Clemens J: Transcription factor nuclear factor-kappa B is activated in neurons after focal cerebral ischemia. *JCBFM* **20**: 592-603, 2000
- 32) Beni SM, Tsenter J, Alexandrovich AG, Galron-Krool N, Barzilai A, Kohen R, Grigoriadis N, Simeonidou C, Shohami E: CuZn-SOD deficiency, rather than overexpression, is associated with enhanced recovery and attenuated activation of NF-kappaB after brain trauma in mice. *JCBFM* **26**: 478-490, 2006
- 33) Moroshita R, Sugimoto T, Aoki M, Kida I, Tomita N, Moriguchi A, Maeda K, Sawa Y, Kaneda Y, Higaki J, Ogiwara T: In vivo transfection of cis element "decoy" against nuclear factor-kappaB binding site prevents myocardial infarction. *Nat Med* **3**: 894-899, 1997
- 34) Semenza GL, Wang GL: A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* **12**: 5447-5454, 1992
- 35) Guillemin K, Krasnow MA: The hypoxic response: huffing and HIFing. *Cell* **89**: 9-12, 1997
- 36) Semenza GL: HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* **88**: 1474-1480, 2000
- 37) Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL: Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. *Proc Natl Acad Sci* **92**: 5510-5514, 1995
- 38) Salminen A, Liu PK, Hsu CY: Alteration of transcription factor binding activities in the ischemic rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* **212**: 939-944, 1995
- 39) Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H, Poellinger L: Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. *EMBO J* **17**: 6573-6586, 1998
- 40) Salceda S, Caro J: Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* **272**: 22642-22647, 1997
- 41) Chavez JC, Agani F, Pichiule P, LaManna JC: Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in the brain of rats during chronic hypoxia. *J Appl Physiol* **89**: 1937-1942, 2000
- 42) Bergeron M, Yu AY, Solway KE, Semenza GL, Sharp FR: Induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes following focal ischaemia in rat brain. *Eur J Neurosci* **11**: 4159-4170, 1999
- 43) Jin KL, Mao XO, Nagayama T, Goldsmith PC, Greenberg DA: Induction of vascular endothelial growth factor receptors and phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling by global cerebral ischemia in the rat. *Neuroscience* **100**: 713-717, 2000
- 44) Ruscher K, Isaev N, Trendelenburg G, Weih M, Iurato L, Meisel A, Dirnagl U: Induction of hypoxia inducible factor 1 by oxygen glucose deprivation is attenuated by hypoxic preconditioning in rat cultured neurons. *Neurosci Lett* **254**: 117-120, 1998
- 45) Matrone C, Pignataro G, Molinaro P, Irace C, Scorziello A, Di Renzo GF, Annunziato L: HIF-1alpha reveals a binding activity to the promoter of iNOS gene after permanent middle cerebral artery occlusion. *J Neurochem* **90**: 368-378, 2004
- 46) Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E: A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *JCBFM* **19**: 643-651, 1999
- 47) Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M, Sasaki R: In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci* **95**: 4635-4640, 1998
- 48) Sun Y, Zhou C, Polk P, Nanda A, Zhang JH: Mechanisms of erythropoietin-induced brain protection in neonatal hypoxia-ischemia rat model. *JCBFM* **24**: 259-270, 2004
- 49) An WG, Kanekal M, Simon MC, Maltepe E, Blagosklonny MV, Neckers LM: Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1alpha. *Nature* **392**: 405-408, 1998
- 50) Petrosillo G, Ruggiero FM, Paradies G: Role of reactive oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrome c from mitochondria. *FASEB J* **17**: 2202-2208, 2003
- 51) Erecinska M, Silver IA: Calcium handling by hippocampal neurons under physiologic and pathologic conditions. *Adv Neurol* **71**: 119-136, 1996

- 52) Crompton M, Andreeva L : On the involvement of a mitochondrial pore in reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* **88** : 513-523, 1993
- 53) Zaidan E, Sims NR : The calcium content of mitochondria from brain subregions following short-term forebrain ischemia and recirculation in the rat. *J Neurochem* **63** : 1812-1819, 1994
- 54) Tibor Kristian, Bo K Siesjo : Calcium in ischemic cell death. *Stroke* **29** : 705-718, 1998
- 55) Saris NE, Eriksson KO : Mitochondrial dysfunction in ischemia-reperfusion. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl* **107** : 171-176, 1995
- 56) Ueda H, Fujita R : Cell death mode switch from necrosis to apoptosis in brain. *Biol Pharm Bull* **27** : 950-955, 2004
- 57) Newmeyer DD, Ferguson-Miller S : Mitochondria : releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* **112** : 481-490, 2003
- 58) González-Barroso MM, Fleury C, Levi-Meyrueis C, Zaragoza P, Bouillaud F, Rial E : Deletion of amino acids 261-269 in the brown fat uncoupling protein converts the carrier into a pore. *Biochemistry* **36** : 10930-10935, 1997
- 59) Armstrong JS : Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. *Bioessays* **28** : 253-260, 2006
- 60) Knoll G, Brdiczka D : Changes in freeze-fractured mitochondrial membranes correlated to their energetic state. Dynamic interactions of the boundary membranes. *Biochim Biophys Acta* **733** : 102-110, 1983
- 61) Crompton M, Barksby E, Johnson N, Capano M : Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death. *Biochimie* **84** : 143-152, 2002
- 62) Halestrap AP, Brenner C : The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr Med Chem* **10** : 1507-1525, 2003
- 63) Waldmeier PC, Zimmermann K, Qian T, Tintinot-Blomley M, Lemasters JJ : Cyclophilin D as a drug target. *Curr Med Chem* **10** : 1485-1506, 2003.
- 64) Beutner G, Ruck A, Riede B, Welte W, Brdiczka D : Complexes between kinases, mitochondrial porin and adenylate translocator in rat brain resemble the permeability transition pore. *FEBS Lett* **396** : 189-195, 1996
- 65) Oliveira PJ, Esteves TC, Seça R, Moreno AJ, Santos MS : Calcium-dependent mitochondrial permeability transition is augmented in the kidney of Goto-Kakizaki diabetic rat. *Diabetes Metab Res Rev* **20** : 131-136, 2004
- 66) Caj J, Yang J, Jones DP : Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta* **1366** : 139-149, 1998
- 67) Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, Inohara H, Kubo T, Tsujimoto Y : Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* **434** : 652-658, 2005
- 68) Wang JH, Desai R : A brain protein and its effect on the Ca²⁺-and protein modulator-activated cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun* **72** : 926-932, 1976
- 69) Liu J, Farmer JD Jr, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL : Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* **66** : 807-815, 1991
- 70) Morioka M, Hamada J, Ushio Y, Miyamoto E : Potential role of calcineurin for brain ischemia and traumatic injury. *Progress in Neurobiol* **58** : 1-30, 1999
- 71) Clemens JA : Cerebral ischemia: gene activation, neuronal injury, and the protective role of antioxidants. *Free Radic Biol Med* **28** : 1526-1531, 2000
- 72) Shibasaki F, Kondo E, Akagi T, Mckeeon F : Suppression of signalling through transcription factor NF-AT by interactions between calcineurin and Bcl-2. *Nature* **386** : 728-731, 1997
- 73) Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, Mckeeon F, Bobo T, Franke TF, Reed JC : Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* **284** : 339-343, 1999
- 74) Sharkey J, Butcher SP : Immunophilins mediate the neuroprotective effects of FK506 in focal cerebral ischemia. *Nature* **371** : 336-339, 1994
- 75) Uchino H, Elmer E, Uchino K, Lidvall O, Siesjo BK : Cyclosporin A dramatically ameliorates CA1 hippocampal damage following transient forebrain ischemia in the rat. *Acta Physiol Scand* **155** : 469-471, 1995