

# 虚血性神経細胞死におけるミトコンドリアを介したアポトーシス経路の関与

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9470">http://hdl.handle.net/2297/9470</a>

## 虚血性神経細胞死におけるミトコンドリアを介した アポトーシス経路の関与

金沢大学医学部医学科脳神経外科学講座 (主任: 山下純宏教授)

多 田 吾 行

げっ歯類から霊長類に至るまで、一過性脳虚血の3, 4日後には海馬CA1領域の神経細胞が遅発性の細胞死をきたすことはよく知られている。近年、試験管内の実験系ではアポトーシスによる細胞死にミトコンドリアを介した経路が働いているとされている。本研究では、霊長類の虚血性神経細胞死のメカニズムを明らかにするために、ニホンザルの一過性全脳虚血モデルを用いて、海馬CA1領域でのカスパーゼ-3、カスパーゼ-9およびチトクロームCの発現を、イムノプロット法と免疫組織化学的手法を用いて検討した。同時に、TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling) 法を用いてアポトーシス細胞の局在を同定し、カスパーゼ-3については遺伝子の発現変化をシーケンスディテクターを用いて定量的に検索した。その結果、イムノプロットでは、CA1組織全体のカスパーゼ-9の前駆体とチトクロームCは虚血後72時間後に発現量が有意に減少しており、ミトコンドリア分画でも虚血後24時間で発現量が減少していた。免疫組織化学では、コントロールでは両者とも発現がみられなかったが、虚血後24時間でCA1領域の神経細胞にのみ、核と細胞質にカスパーゼ-9とチトクロームCの陽性所見が認められた。一方、カスパーゼ-3の前駆体は、イムノプロットでは、CA1組織全体でもミトコンドリア分画でも経時的な変化がみられなかった。しかし、免疫組織化学では、カスパーゼ-9やチトクロームCと同様に、虚血後24時間で核と細胞質に陽性所見が認められた。また、カスパーゼ-3のmRNAは虚血後24時間で有意に発現が上昇していた。さらに、イムノプロットと免疫組織化学で、カスパーゼ-3もカスパーゼ-9も虚血後24時間で活性化を示していた。最終的に、虚血後72時間後のCA1領域の神経細胞のほとんどはTUNEL反応陽性であった。以上の結果から、脳虚血に際し、カスパーゼ-9やチトクロームCがミトコンドリアの膜間腔から放出され、カスパーゼ-3を活性化させ神経細胞死に至る経路が関与していることが示唆された。

**Key words** cerebral ischemia, mitochondria, apoptosis, necrosis

海馬CA1をはじめ虚血に対する選択的脆弱性を示す領域においては、一過性脳虚血後3, 4日目に神経細胞死が生じることはよく知られている<sup>1)-3)</sup>。脳虚血後に変性途上にある神経細胞を電子顕微鏡により観察すると、アポトーシスというよりむしろネクローシスに近い形態学的特徴が観察されている<sup>4)-6)</sup>。しかし、近年げっ歯類を対象とした研究で、この細胞死の発生にアポトーシスの機構が働いているという報告が増えている<sup>7)-9)</sup>。アポトーシスの実行にあたって中心的な役割を担うのは、カスパーゼといわれるシステインプロテアーゼである<sup>10)-12)</sup>。げっ歯類の全脳虚血モデルにおいては、海馬CA1領域でカスパーゼ-3の活性が上昇すること、およびその阻害剤である $\alpha$ -VAD, FMK (N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone) の髄腔内投与や<sup>13)</sup>、カスパーゼの内在性の抑制剤であるアポトーシス抑制蛋白質 (Inhibitor of apoptotic protein, IAP) ファミリー蛋白質の強制発現により<sup>14)-16)</sup>、神経細胞死が抑制されることなどが報告されている。

最近の研究では、カスパーゼの活性化には、ミトコンドリアの膜間腔からチトクロームCやカスパーゼなどが細胞質に放出されることが重要であると報告されている<sup>17)</sup>。すなわち、ボックス<sup>18)</sup>、ビッド<sup>19)</sup>、カルシウムイオン<sup>20)</sup>、スーパーオキシド<sup>21)</sup>などの様々な刺激が、ミトコンドリアからのチトクロームCの放出を誘発する。このチトクロームCとd ATP (またはATP) の存在下で、カスパーゼ-9はApaf-1と結合し、カスパーゼ-9が活性化され、また引き続きカスパーゼ-3も活性化される<sup>22)-24)</sup>。チトクロームCの放出にはミトコンドリアにおける2つのチャンネルが関与する。1つは、PT (permeability transition) ポアという巨大なチャンネルで、溶液や水がミトコンドリア内に流入することによりマトリックスが膨化し、外膜が破裂する<sup>25)</sup>。もう1つは、外膜蛋白であるポリン (電位依存性陰イオンチャンネル) がボックスやパッドと相互作用して形成されるもので<sup>26)</sup>、この場合マトリックスの膨化も外膜の損傷もおきない<sup>27)</sup>。シクロスポリンはPTポアが開存することを抑制する<sup>28)</sup>。Bcl-2もチ

平成11年11月26日受付, 平成12年3月1日受理

Abbreviations : COX, cytochrome oxidase subunit IV; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; NMDA, N-methyl-D-aspartate; PFA, paraformaldehyde; PT, permeability transition; ROS, reactive oxygen species; RT, reverse transcription; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling

トクロームCの放出を抑制するが<sup>29)20)</sup>, Bcl-2にはこれとは別な、バックスによる細胞死を抑制する作用もある<sup>27)</sup>.

このように、ミトコンドリアを介したアポトーシスの経路は、試験管内の実験系においては詳細に解明されつつあるが、生体内の実験系における報告はさきわめて少なく、しかも霊長類を対象とした研究は皆無である。本研究においてはニホンザルの一過性全脳虚血モデルにおいて、海馬CA1領域でのカスパーゼ-3、カスパーゼ-9およびチトクロームCの蛋白の発現変化をイムノブロットならびに免疫組織化学にて経時的に検索し、虚血性神経細胞死におけるミトコンドリアを介したアポトーシスカスケードの関与を検討した。

#### 対象および方法

##### I. 虚血モデル

実験には体重5-8 kgのニホンザルを21頭用いた。1.5%のフローセン(武田薬品, 大阪)ガスにて麻酔を導入後気管内挿管し、レスピレーター(Acoma KMA anespirator, 東京)を用いて全身麻酔を行った。0.5%のフローセン, 60%の笑気, 40%の酸素にて全身麻酔を維持し、実験中は乳酸リングル液の持続点滴を行い、血圧と脈拍、直腸温を持続的にモニターした。

一過性全脳虚血は、胸骨の上部を縦切開して縦隔内に進入し、慎重な剥離操作により、大動脈弓から分岐直後の右腕頭動脈と左鎖骨下動脈を直視下に捉え、チタン製のブルドッククリップ(Bonimed, Germany)を用い18分間血流を遮断することにより施した。血流を再開させた後に閉創し、全身麻酔から覚醒させ、サルを一旦飼育ケージに戻した。また、開胸のみして血流遮断しなかったものをコントロールとして組織学的検討用に3頭、またイムノブロットと定量的逆転写PCR(reverse transcription-PCR, RT-PCR)用に4頭用いた。

組織学的検討には虚血負荷24時間後(3頭)と72時間後(3頭)に再び全身麻酔をした上で開胸を行い、左心室に18ゲージ注射針を入れ生理食塩水500 mlにて灌流した後、0.1 MのPBSで溶解した4%パラホルムアルデヒド(paraformaldehyde, PFA) 2 Lにて灌流固定した。イムノブロットと定量的RT-PCRのためのサンプル採取には、虚血負荷24時間後(4頭)と72時間後(4頭)に再び全身麻酔を施し、実体顕微鏡下で海馬CA1領域の組織を摘出し液体窒素にて直ちに凍結させ、実際に使用するまで-130℃にて保存した。実験中は直腸温をサーモスタット(Geymar, New York, USA)を使うことにより37.4-38.4℃に保ち、血液ガスと血糖値も正常範囲となるようコントロールした。以上の実験に際し、不必要な痛みを可及的与えず愛護的に飼育するように、ニホンザルの扱いには特に留意した。

##### II. 病理組織学的検討

灌流固定した脳をとりだし、海馬組織を5 mmの厚さに冠状断スライスした後、PFAにて3日間固定し、パラフィンに包埋後、5 μmの組織切片を作成し、HE染色を行った。

##### III. 免疫組織化学的検討

組織切片をキシレンにて脱パラフィン後、連続希釈のエタノールにて親水しPBSで洗浄後、0.3%過酸化水素加メタノールにて内因性ペルオキシダーゼを失活させた。抗原賦活処理のため0.1Mクエン酸緩衝液にスライドガラスを入れ、15分間マイクロウェーブ処置を行った。PBSで洗浄後、非特異的反応抑制のため5%スキムミルク(Difco Laboratories, Detroit, USA)を1-2時間反応させた。一次抗体として抗活性型カスパーゼ-3抗体

(p20/17, 国立精神神経センター桃井 隆博士より分与)を2,000倍、抗カスパーゼ-9抗体(H-83, Santa Cruz Inc., Santa Cruz, USA)を100倍、抗チトクロームC抗体(H-104, Santa Cruz Inc)を100倍にそれぞれ希釈し、4℃で一晩反応させた。対応するビオチン化二次抗体(Vector Laboratories Inc., Durham, USA)を30分間反応させ、発色はアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体法と0.005%過酸化水素加0.02%ジアミノベンチジン(Sigma, St.Louis, USA)処置にて行い、核染はヘマトキシリンにて行った。

##### IV. TUNEL染色

海馬のパラフィン包埋切片に対して、組織内細胞死検出キット(Boehringer Mannheim, Indianapolis, USA)を用いて、TUNEL染色法<sup>28)29)</sup>を行った。具体的には、キシレンにて脱パラフィンした標本を蒸留水にて洗浄後、10 mM トリスクロール緩衝液(pH 7.4)に溶解した20 μg/mlのプロテイナーゼK(Gibco BRL, Rockville, USA)溶液で37℃で20分間反応させた。次に蒸留水で洗浄後、2%過酸化水素水で20分間処理し、さらに蒸留水で洗浄後、末端デオキシリボヌクレオチド転移酵素(terminal deoxyribonucleotide transferase, TdT)とフルオレセイン標識dUTPを含む反応液を37℃で1時間反応させた。PBSで洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗フルオレセイン抗体と37℃で20分間反応させて、最後に0.005%過酸化水素加0.02%ジアミノベンチジンにて発色させた。

##### V. 蛋白の調製

###### 1. 海馬CA1組織

コントロール(n=4)および虚血後24時間後(n=4)、72時間後(n=4)に摘出した海馬CA1組織を、プロテアーゼインヒビターカクテル(Sigma)を含んだ4℃のRIPA溶液(50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5%デオキシコール酸ナトリウム, 0.1% SDS)中にて超音波粉砕して可溶化し、4℃, 8,000×gにて5分間遠心し、上清を回収した。

###### 2. ミトコンドリア分画

ミトコンドリア分画の採取はJohnsonら<sup>30)</sup>の方法に従って行った。すなわち、コントロール(n=3)と虚血後24時間後(n=3)の海馬CA1組織を、プロテアーゼインヒビターカクテルを含んだ低張緩衝液(250 mM ショ糖, 20 mM HEPES-KOH, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM エチレンジアミン四酢酸(β-アミノエチルエーテル)N, N, N, N 四酢酸, 1 mM ジチオトレイトール)中にて、ダウンスホモジナイザー(Wheaton, New Jersey, USA)を用いて穏やかに同質化した。その後、4℃, 750×gにて20分間遠心し、上清をさらに4℃, 8,000×gにて20分間遠心して得られた沈殿をミトコンドリア分画として回収した。

##### VI. イムノブロット

Bradford法(Bio-Rad, Hercules, USA)により蛋白の定量を行った後、電気泳動をLaemmli<sup>31)</sup>のSDS-PAGE法にて行った。14%のSDSポリアクリルアミドゲルを作り、各レーンあたり同量の蛋白を泳動後、イモブリンPVDFメンブレン(Millipore, Bedford, USA)に転写させた。このメンブレンを0.5%のゼラチン(Bio-Rad)を加えた1% Tween 20(和光純薬工業, 東京)入り20 mM TBS-T(Tris-buffered saline-Tween20)にて1時間ブロッキングした。一次抗体は、抗カスパーゼ-3抗体(65906E, Pharmingen, San Diego, USA)を5,000倍、抗カスパーゼ-9抗体(H-83, Santa Cruz Inc)を500倍、抗チトクロームC抗体

(65981A, Pharmingen) を10,000倍にそれぞれTBS-Tで希釈して、2時間反応させた。TBS-Tにて3回洗浄後、HRP標識抗ウサギIgG抗体またはHRP標識抗マウスIgG抗体 (Amersham, Uppsala, Sweden) と1時間反応させた後、再びTBS-Tにて5回洗浄し、ECLキット (Amersham) にて発光させ撮影した。さらに、NIHイメージソフト (Apple Inc., Cupertino, USA) を用いて、OD値を測定した。また、海馬CA1組織とミトコンドリア分画のイムノブロットで、それぞれ $\alpha$ -チューブリン (Sigma) とIV型チトクローム酸化酵素 (cytochrome oxidase subunit IV, COX) (Molecular Probes, Eugene, USA) を内部コントロールとして用い<sup>29,33</sup>、同様に反応させた。

#### Ⅶ. 総RNAの分離と定量的RT-PCR

Chomczynskiら<sup>30</sup>の方法に基づき、ISOGEN (ニッポンジーン, 東京) を用いて、コントロール (n=4)、虚血後24時間 (n=4) および72時間後 (n=4) の海馬CA1領域の組織より総RNAの抽出・精製を行った。

虚血後の海馬CA1領域でのカスパーゼ-3のmRNAの発現を調べるために、Hollandら<sup>35</sup>のTaqman™ケミストリーの理論に基づき、定量的RT-PCRの反応を行い、ABI PRISM 7700シーケンスディテクター (Applied Biosystems, California, USA) を用いて解析した。カスパーゼ-3のセンスプライマーとして5'-GAGGATGACATGGCGTGCAT-3'、アンチセンスプライマー

として5'-CAGGTGTGTGGAGTATGCAT-3'を設計した。また、両者間に特異的にハイブリダイゼーションするTaqManプロローブを5'端のリポーター蛍光色素としてテット、3'端のクエンチャー蛍光色素をタムラとして5'-AAATCCCAGTGGAGGCCGACTTCTTG-3'と設計し、これらの合成を依頼した (Amersham)。内部コントロールとしてグリセラルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) を用いた。同様に、センスプライマーとして5'-GTCATCAATGGAAGCCCCATC-3'、アンチセンスプライマーとして5'-AGTGGACTCCACGACGTACTCA-3'、TaqManプロローブとして5'端のリポーター蛍光色素をファム、3'端のクエンチャー蛍光色素をタムラとし5'-AGCGAGATCCCTCCAAAATCAAGTGG-3'と設計した。RT反応にはMultiScribeリバーストランスクリプターゼ (Amersham) を、PCRにはAmpliTaq Gold DNAポリメラーゼ (Amersham) を使用した。反応は、48℃で30分間のRT反応の後、95℃で10分間の熱変性を行い、95℃で15秒、60℃で1分の2ステップを1サイクルとして、40回増幅した。実際の定量にあたっては、まず、未知量サンプルが検量線内にあるように、連続三倍希釈の既知量サンプル五つを用いて検量線を作製し、未知量サンプルの初期量を内挿法で定量した。この操作をカスパーゼ-3とGAPDHに対して各々行い、カスパーゼ-3 mRNAの初期量を

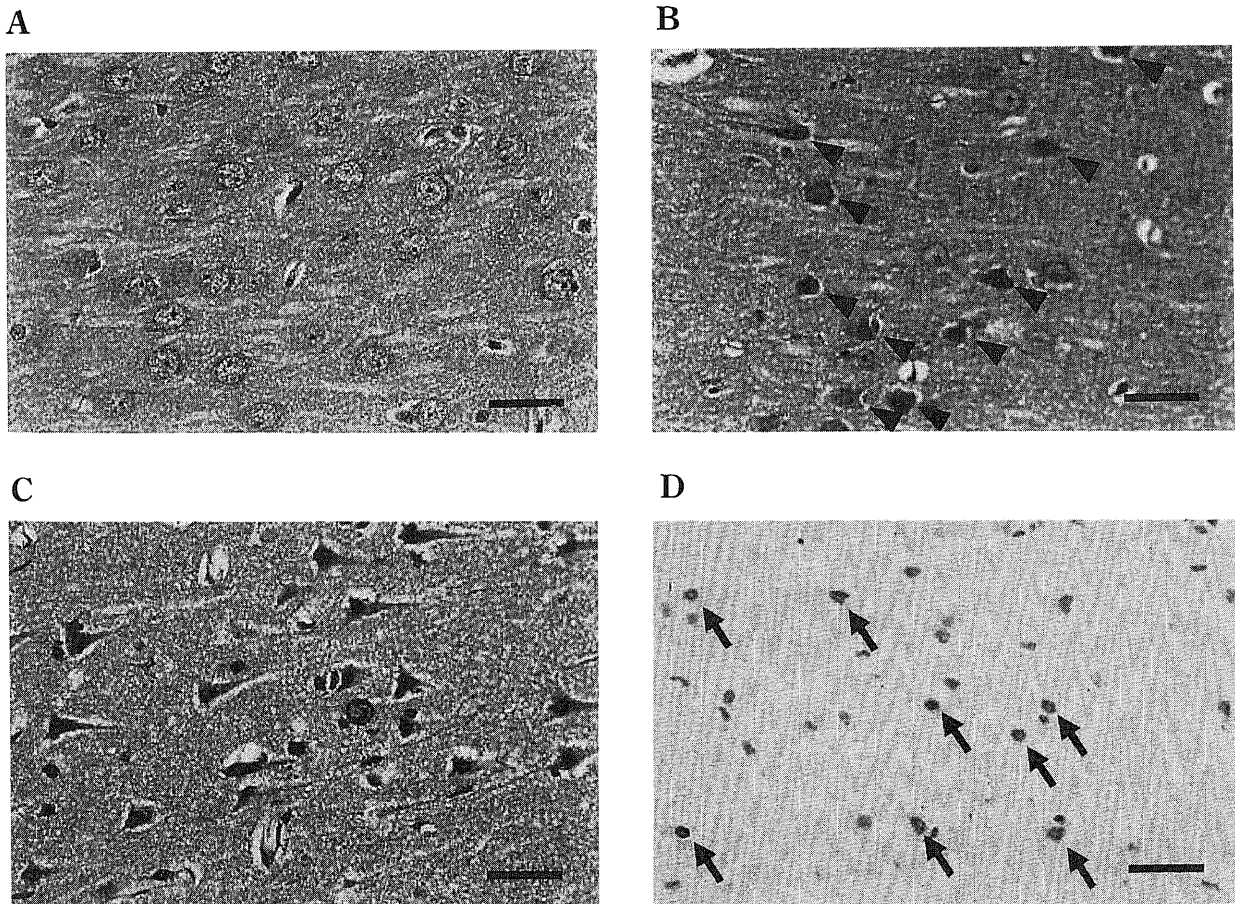


Fig.1. Morphological changes of the CA1 neurons after ischemia. Sham operation (A), 24 hr (B) or 72 hr (C, D) after ischemia. HE staining (A, B, C), TUNEL staining (D). Arrows indicate TUNEL-positive neurons. Scale bar, 30  $\mu$ m.

GAPDHに対する比として計算した。最終的には、虚血後24時間および72時間後におけるカスパーゼ-3 mRNAの発現量を、コントロールに対する比として評価した。

#### Ⅷ. 統計学的検討

データは、バートレット検定を用いて分散が均一であることを検定した後、一元配置分散分析法を用いて検定し、危険率5%未満をもって有意差ありと判定した。有意差が認められたものに対してはさらに、FisherのPLSD法にてポストホックテストを行った。数値は平均±標準偏差で表記した。

## 成 績

### I. 検査データ

虚血負荷直前の検査データは、動脈血酸素分圧 (arterial oxygen pressure, PaO<sub>2</sub>) 174 ± 29 mmHg; 動脈血二酸化炭素分圧 (arterial carbon dioxide pressure, PaCO<sub>2</sub>) 32.9 ± 2.2 mmHg; 動脈血酸素飽和度 (oxygen saturation, SaO<sub>2</sub>) 99.5 ± 0.2%; pH, 7.56 ± 0.08; 直腸温, 37.8 ± 0.4 °C; 血糖値, 89 ± 20 mg/dl; 平均血圧, 86.2 ± 12 mmHgであった。右腕頭動脈と左鎖骨下動脈を遮断

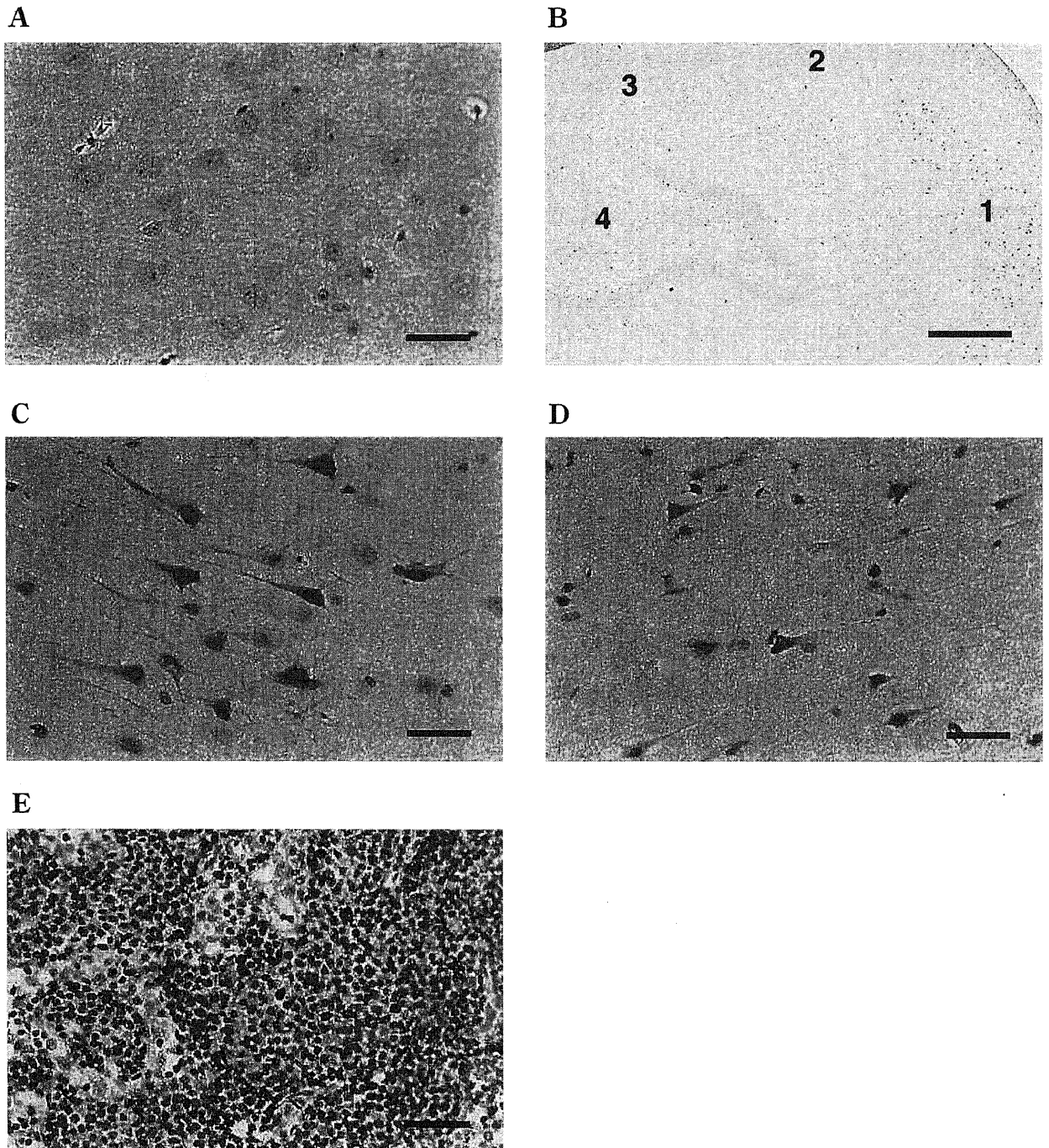


Fig. 2. Immunohistochemical demonstration of activated-caspase-3 in the CA1 neurons. Sham operation (A), 24 hr (B, C) or 72 hr (D) after ischemia. Monkey lymph node (E) serves as a positive control. Scale bars, 30  $\mu$ m (A, C, D and E); 500  $\mu$ m (B).

すると、サルは瞳孔は直ちに散大し、血圧は一旦急激に上昇(平均血圧の最大値  $169 \pm 9.7$  mmHg)した後、徐々に下がっていった。18分間の虚血負荷を終えた後、血管クリップを開放し血流を再開させた直後の検査データは、負荷前とほぼ同様であった。

### II. 海馬 CA1 領域の遅発性神経細胞死

HE染色では、コントロールのCA1領域の神経細胞(図1A)と比較すると、虚血後24時間の神経細胞の一部は軽度の虚血性変化を示した(図1B)。ところが、虚血後72時間の時点では、正常な形態を示す神経細胞はほとんどみられず、胞体は著明な萎縮と好酸性変化およびニッスル小体の消失を示し、核は濃縮像を示した(図1C)。TUNEL染色を行うと、虚血後72時間で半分以上の神経細胞が陽性所見を示した(図1D)。

### III. 免疫組織化学

活性化型カスパーゼ-3 (p20/17) はコントロールにおいては陰性であった(図2A)。一方、虚血後24時間では、CA1領域の神経細胞のみ特異的に核と細胞質が陽性所見を示した(図2B, 2C)。しかし、虚血後72時間ではこの染色性は弱くなっていた(図2D)。陽性コントロールとして用いたサルのリンパ節胚中心のリンパ球は同様の染色所見を示した(図2E)。

同様に、カスパーゼ-9とチトクロームCもコントロールでは陰性であったが(図3A, 3C)、虚血後24時間ではCA1の神経細胞のみ陽性所見を示した(図3B, 3D)。

### IV. イムノブロット

カスパーゼ-3の前駆体は分子量32 kDaのバンドとして検出され、その発現量は、コントロールを基準とすると、虚血後24時間で約  $1.05 \pm 0.03$  倍、72時間で約  $1.03 \pm 0.10$  倍と発現量は経時的にほぼ不変であった(図4A)。またカスパーゼ-9の前駆体は分子量47 kDaのバンドとして検出され、その発現量は虚血後24時間で約  $0.82 \pm 0.12$  倍、72時間で約  $0.69 \pm 0.14$  倍と有意な減少を示した(図4B)。さらに、チトクロームC蛋白は分子量15 kDaのバンドとして検出され、その発現量は、虚血後24時間で約  $1.13 \pm 0.07$  倍、72時間で約  $0.95 \pm 0.04$  倍であった(図4C)。さらに、虚血後24時間でカスパーゼ-3では分子量20 kDaの(図4A)、カスパーゼ-9では分子量10 kDaの(図4B)、ともに活性型に相当するバンドが検出された。しかも、これらの活性型蛋白に相当するバンドは、虚血なしのサンプルではみられなかった。

ミトコンドリア分画のイムノブロットでは、コントロールに比べ虚血後24時間で、カスパーゼ-9蛋白とチトクロームC蛋白の発現量が減少していた。しかし、カスパーゼ-3蛋白には発現量の変化はほとんどみられなかった(図5)。

### V. カスパーゼ-3のmRNAの発現量の変化

シーケンスディテクターによる定量的検索では、海馬CA1領域のカスパーゼ-3のmRNAの発現量は、コントロールと比べ虚血後24時間で約  $2.6 \pm 0.16$  倍、虚血後72時間で約  $1.8 \pm 0.42$

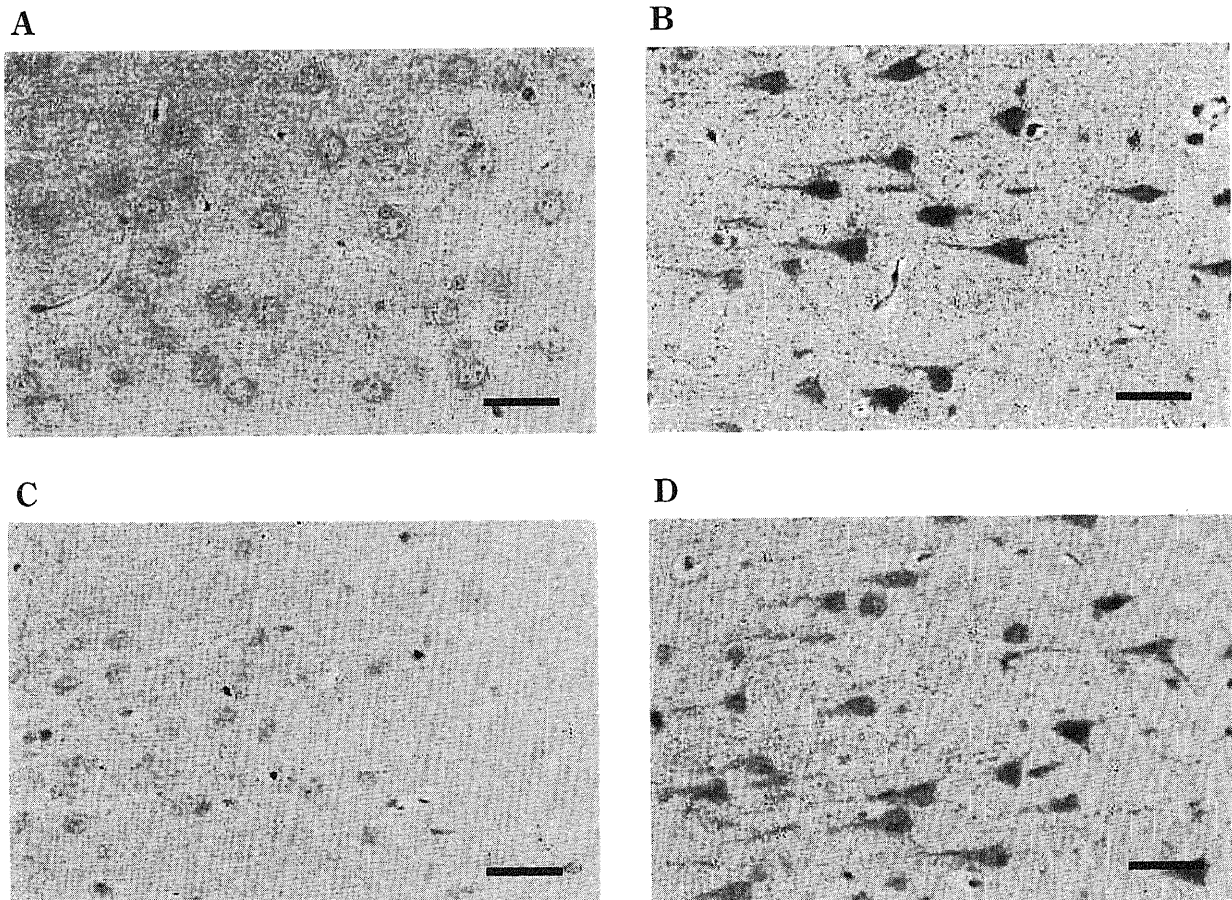


Fig. 3. Immunohistochemical demonstration of caspase-9 (A, B) or cytochrome c (C, D) in the CA1 neurons. Sham operation (A, C) or 24 hr after ischemia (B, D). Scale bar, 30  $\mu$ m.

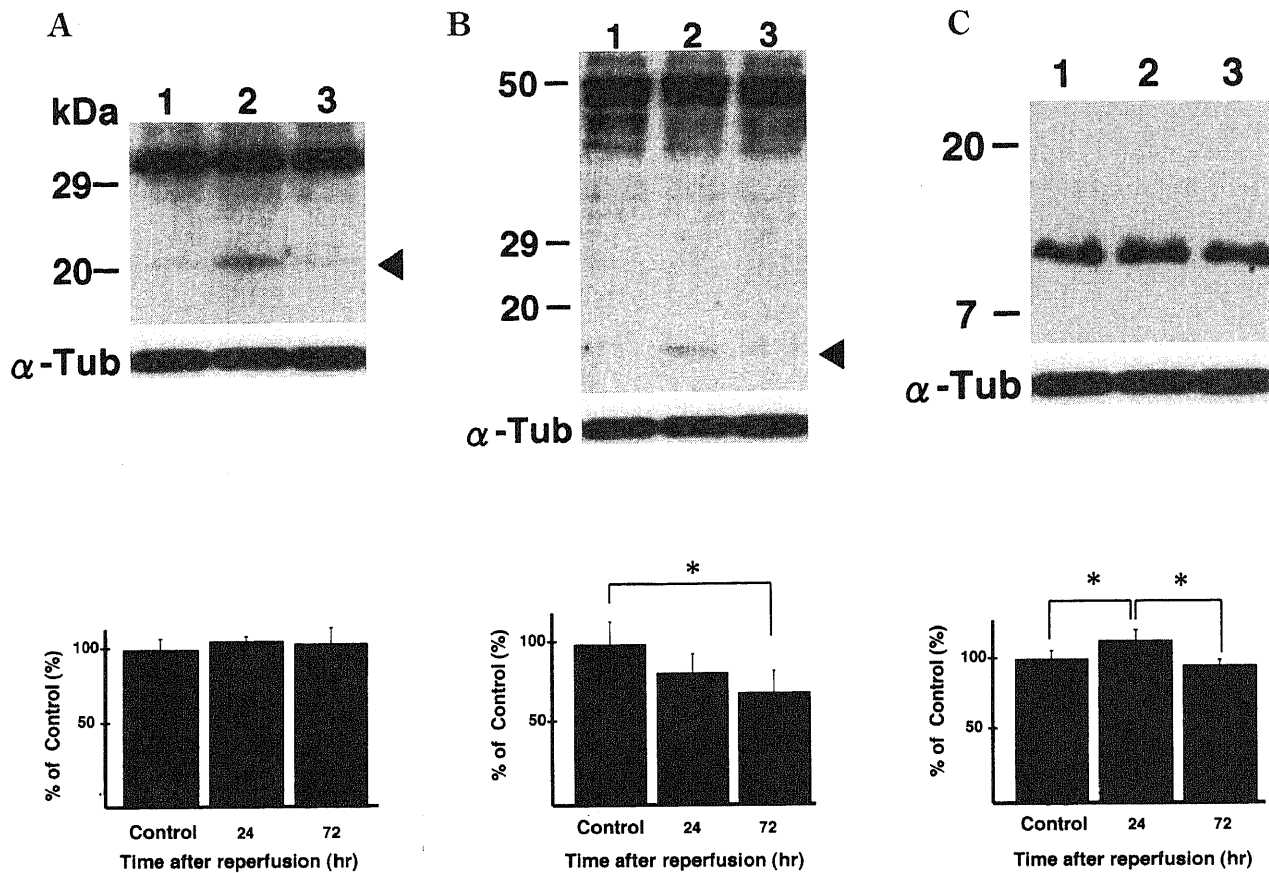


Fig. 4. Western blot analysis for caspase-3 (A), caspase-9 (B) or cytochrome c (C) protein of the CA1 tissue lysates (15  $\mu$ g/lane) after sham operation (lane 1), 24 hr (lane 2) or 72 hr (lane 3) after ischemia. Representative experiments are shown.  $\alpha$ -Tubulin was used as an internal control (bottom). Faint cleaved products are present (arrow heads) both in the studies of caspase-3 (A) and caspase-9 (B) at 24 hr after ischemia.

Graphs. Semiquantitative results of the Western blot analysis of the CA1 lysates after sham operation, 24 hr or 72 hr after ischemia for caspase-3 (A), caspase-9 (B) or cytochrome c (C). The optical density of immunopositive-bands was measured and expressed as % of control. Data are mean  $\pm$  SD (n = 4 per time point). \* p < 0.05 indicates a significant difference.

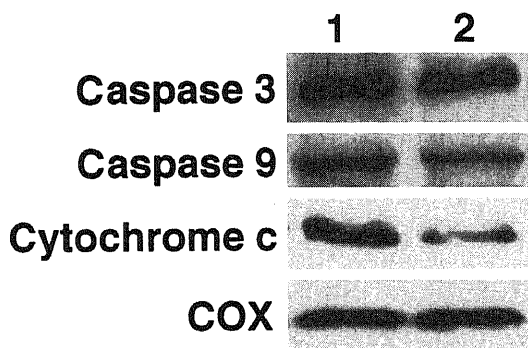


Fig. 5. Western blot analysis of the mitochondrial fractions in the CA1 sector for pro-caspase-3, pro-caspase-9 and cytochrome c. The results shown are representative of three independent experiments. Cox was used as an internal control (bottom). Lane 1, sham operated brain; Lane 2, ischemic brain 24 hr after ischemia.

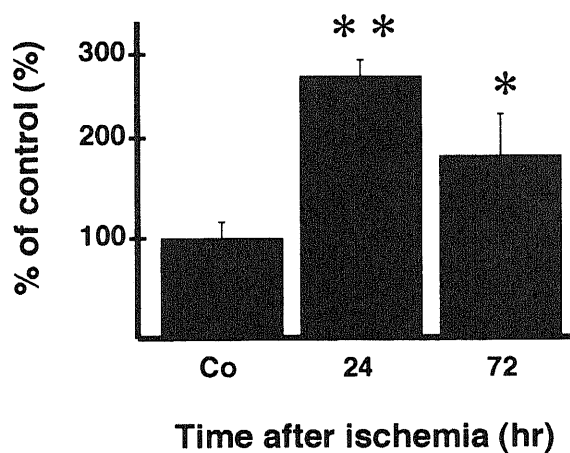


Fig. 6. Quantitative RT-PCR analysis of the CA1 sector after ischemia for caspase-3 mRNA expression. Relative changes in the amount of caspase-3 mRNA are shown at 24 hr or 72 hr after ischemia as compared with sham controls. Data are mean  $\pm$  SD (n = 3 per time point). \* p < 0.05, and \*\* p < 0.005.

倍と有意に増加していた(図6)。

## 考 察

虚血性神経細胞死の発生にカルシウムイオンが重要な役割を果たすことは広く知られている<sup>39,47)</sup>。すなわち、海馬スライスを用いた低酸素・低ブドウ糖負荷モデル<sup>39,39)</sup>、およびラットを使った一過性全脳虚血モデル<sup>40,41)</sup>のいずれにおいても、虚血負荷中にCA1領域に特異的にカルシウムイオンの動員がみられる。細胞質でのカルシウムイオンの上昇は、当初はNMDA(N-methyl-D-aspartate)レセプターを介した細胞外からの流入であるのに対し、その後持続する上昇はミトコンドリアや小胞体等の細胞内器官からの細胞内動員である<sup>42)</sup>とされている。また、活性酸素(reactive oxygen species, ROS)も同様に虚血による神経細胞障害のトリガーとなる<sup>43)</sup>。グルタミン酸刺激でのROSの代表的な供給源であるミトコンドリアにおいて、NMDAに曝された神経細胞ではROSの産生が増加する<sup>44)</sup>。さらに、10分間の全脳虚血ラットでは、CA1の神経細胞で虚血後3時間以内にバックス蛋白の過剰発現がみられる<sup>45)</sup>。これらカルシウムイオン、ROSおよびバックスなどはいずれもミトコンドリアに作用し、カスパーゼの活性化因子を放出するように働くことが知られている<sup>14)</sup>。したがって、一過性の全脳虚血後に生ずるCA1領域の神経細胞死の発生においても、ミトコンドリアを介したアポトーシスの経路が働いている可能性がある。

正常の神経細胞においては、免疫組織化学的にカスパーゼ-3の染色性は認められず<sup>46)</sup>、免疫ブロットではカスパーゼ-3やカスパーゼ-9は細胞質以外にミトコンドリアにも存在するとされている<sup>47,48)</sup>。一般にPFA固定をした切片では、通常の免疫組織学的方法でミトコンドリア内の抗原と一次抗体が反応しにくい<sup>49)</sup>。コントロールの免疫組織で染色性がみられなかったことは、サルの神経細胞においても、カスパーゼ-3、カスパーゼ-9の両者とも前駆体としてその多くがミトコンドリア内に存在していることを示していると思われる。

カスパーゼ-9に対する抗体は前駆体と活性型の両方を認識する抗体であるが、免疫組織化学で虚血後24時間に特に核に強い染色性を示していた。これはKrajewskiら<sup>50)</sup>の犬を用いた一過性全脳虚血モデルのデータと一致する。免疫ブロットではミトコンドリアのカスパーゼ-9は減少しており、また全CA1組織中でも経時的に減少していた。しかも、虚血24時間後には活性型に相当するバンドがみられた。これはカスパーゼ-9はミトコンドリアから放出されて、活性化をうけるため消費されていることを示すものと思われる。ラットの過性の局所虚血モデルや<sup>51)</sup>、脊髄損傷モデル<sup>52)</sup>、ヒトの心筋症<sup>53)</sup>などで報告されているように、チトクロームCも同様に、ミトコンドリアから放出されていることが示唆された。チトクロームCは細胞質でアポトーシス誘導活性をもたない<sup>54)</sup>アポチトクロームCとして合成された後、ミトコンドリア内に入り込み、ヘムと結合してチトクロームCとなるが、免疫ブロットでチトクロームCの発現量が虚血後24時間において増えていることは、アポチトクロームCからの動員、そして細胞質への大量の放出を意味するものと思われる。また、虚血後72時間では発現量が有意に減少していた。一方、カスパーゼ-3については免疫ブロットで、その発現量にミトコンドリア分画においても全CA1組織においても経時的な変化はみられなかった。これは、虚血後にカスパーゼ-3のmRNA発現量が有意に増えているために、カスバ

ーゼ-3は消費された分だけ新たに産生されたものと解される。事実、活性型のカスパーゼ-3のみを認識する抗体で、虚血後24時間に免疫組織化学で陽性所見が認められており、免疫ブロットでもカスパーゼ-3の活性型に相当するバンドが検出された。

カスパーゼは活性をもたない前駆体として生成された後、プロセッシングを受けて活性型となりアポトーシスを実行する<sup>55)</sup>。10種以上あるカスパーゼの中で特にカスパーゼ-3は中心的な役割を担い、様々な基質を分解する。例えば、ゲノムDNAラダーに必要なDNaseのインヒビターであるDFF45/ICAD<sup>54,55)</sup>や、アポトーシス小体形成に関与するといわれるフォドリン<sup>56)</sup>などを分解することで、アポトーシスを実行する。今回の実験では、カスパーゼ-3の基質となり得るこれらの蛋白に関しては検索しなかったが、虚血後24時間でカスパーゼ-3やカスパーゼ-9の活性化がみられたことから、一過性全脳虚血後遅発性に死にゆくサルの海馬CA1の神経細胞においても、ミトコンドリアを介したアポトーシスの経路が働いていることが強く示唆された。

しかし、虚血性神経細胞死がアポトーシスの基準をすべて満たす訳では決してない<sup>57,58)</sup>。本実験でも、虚血後72時間でCA1の神経細胞に胞体の萎縮や核の濃縮といったアポトーシスに特徴的な形態学的変化<sup>59)</sup>が光顕的に観察されたが、アポトーシス小体は認められなかった。Yamashimaら<sup>60)</sup>は同一のサル脳虚血モデルにおいて、リソソーム膜や胞体膜の損傷など、むしろネクローシスに特徴的な所見を電顕的に観察している。虚血後72時間でTUNEL陽性の神経細胞が多数みられたことは、神経細胞がアポトーシスに陥っていることを必ずしも意味する訳ではない<sup>61)</sup>。カスパーゼ-3やカスパーゼ-9の活性化はすでに虚血後24時間で認められたが、この時点ではTUNEL陽性となる神経細胞は認められなかった。このことは、アポトーシスをすみやかに実行するに足るカスパーゼの絶対量が不足していることや、カスパーゼの内在性のインヒビターの発現の増加などを意味しているのかもしれない。

近年、虚血性神経細胞死はアポトーシスとネクローシスの中間的な病態を示す<sup>57)</sup>と報告されている。すなわち、両方のカスケードが同時に進行していたとしても、いずれのカスケードが優先されるかは、障害の程度や神経の成熟度、栄養因子の有無、細胞内のカルシウムイオン濃度などに依存している<sup>62)</sup>。細胞死はさらに、ATPの量によっても影響され、アポトーシスのカスケードは、たとえ始まったとしても細胞内のATPを奪うことにより阻まれ細胞は結局、ネクローシスにより死ぬ。これとは反対にATPが豊富な場合はアポトーシスで死ぬ<sup>62,63)</sup>。げっ歯類の一過性脳虚血モデルにおいては、虚血中は急激に神経細胞のATP値は減少するが、再灌流後は再び急激にATP値が回復する<sup>64)</sup>ことが知られている。このことは、げっ歯類の再灌流モデルでは神経細胞は少なくとも急性のネクローシスからは免れていて、アポトーシスが実行されうる環境にあることを意味するのであろう。

ミトコンドリアのPTはアポトーシスだけではなく、ネクローシスのカスケードにも関係するとされている。すなわち、ミトコンドリアからチトクロームCやカスパーゼが放出される際には、同時に電子伝達系が妨害されること、酸化リン酸化反応が阻害されること、フリーラジカルが産生されることなどによりATPが奪われ、細胞はネクローシスへと向かっていく<sup>65)</sup>。したがって、ミトコンドリアは細胞がアポトーシス、ネクロー



シスのいずれに向かうかを調整している器官であるといえる<sup>60)</sup>。ミトコンドリアのPTの抑制剤は両者のカスケードを阻止しうる<sup>61)</sup>ので、虚血による神経細胞死を防ぐ治療薬として大きな可能性を秘めていると思われる。

本研究では、ミトコンドリアを介してカスパーゼ-3の活性化に至るアポトーシスの経路を検索した。今後、カスパーゼ-3を活性化させるほかの経路の関与、カスパーゼ-3の基質の分解の検索およびPTの抑制剤を投与しての動物実験など、さらなる検討が必要である。

## 結 論

虚血性神経細胞死におけるミトコンドリアを介したアポトーシスの経路の関与を明らかにするため、ニホンザルを用いて一過性全脳虚血モデルを作成し、海馬CA1領域でのカスパーゼ-3、カスパーゼ-9およびチトクロームCの発現を検索し、以下の結果を得た。

1. 霊長類の脳虚血モデルにおいても、カスパーゼ-3とカスパーゼ-9の活性化が虚血後24時間の時点で示された。

2. カスパーゼ-3は、イムノブロットでミトコンドリアからの放出は認められず、経時的な発現量の変化もほとんどなかったが、mRNAの発現量は虚血後に有意に増加していた。免疫組織化学では、虚血後24時間で神経細胞の核と細胞質に陽性所見を得た。

3. カスパーゼ-9もチトクロームCもイムノブロットでは、虚血後24時間でミトコンドリアから放出され、虚血後72時間で共に蛋白の発現量が有意に減少していた。また、免疫組織化学では神経細胞の核と細胞質に陽性所見を認めた。

4. 虚血後72時間で海馬CA1領域の神経細胞は、ほとんどすべてが変性しており多くがTUNEL陽性であった。

以上の結果より、一過性全脳虚血後に生じるサル海馬CA1領域の遅発性神経細胞死において、ミトコンドリアを介したアポトーシスの経路が関与していることが示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました金沢大学医学部脳神経外科学講座山下純宏教授に深甚なる謝辞を表します。また、直接の御指導を賜りました同教室の山崎哲盛助教授と、貴重な抗体を頂いた国立神経精神センターの桃井 隆博士に心から感謝致します。さらに、実験手技の御指導を賜りました金沢大学医学部教育研究器械センターの原田真一助手に厚く御礼申し上げます。最後に、動物実験に協力して頂いた高野恭一君と、御支援と御協力を頂きました金沢大学脳神経外科講座の皆様にも心から感謝致します。

## 文 献

- 1) Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* 239(1): 57-69, 1982
- 2) Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* 11(5): 491-498, 1982
- 3) Tabuchi E, Endo S, Ono T, Nishijo H, Kuze S, Kogure K. Hippocampal neuronal damage after transient forebrain ischemia in monkeys. *Brain Res Bull* 29(5): 685-690, 1992
- 4) Deshpande J, Bergstedt K, Linden T, Kalimo H, Wieloch T. Ultrastructural changes in the hippocampal CA1 region following transient cerebral ischemia: evidence against programmed cell

death. *Exp Brain Res* 88(1): 91-105, 1992

- 5) Colbourne F, Sutherland GR, Auer RN. Electron microscopic evidence against apoptosis as the mechanism of neuronal death in global ischemia. *J Neurosci* 19(11): 4200-4210, 1999
- 6) MacManus JP, Buchan AM, Hill IE, Rasquinha I, Preston E. Global ischemia can cause DNA fragmentation indicative of apoptosis in rat brain. *Neurosci Lett* 164(1-2): 89-92, 1993
- 7) Nitatori T, Sato N, Waguri S, Karasawa Y, Araki H, Shibani K, Kominami E, Uchiyama Y. Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis. *J Neurosci* 15(2): 1001-1011, 1995
- 8) Vexler ZS, Roberts TP, Bollen AW, Derugin N, Arief AI. Transient cerebral ischemia. Association of apoptosis induction with hypoperfusion. *J Clin Invest* 99(6): 1453-1459, 1997
- 9) Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87(2): 171, 1996
- 10) Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22(8): 299-306, 1997
- 11) Chen J, Nagayama T, Jin K, Stetler RA, Zhu RL, Graham SH, Simon RP. Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J Neurosci* 18(13): 4914-4928, 1998
- 12) Xu DG, Crocker SJ, Doucet JP, St-Jean M, Tamai K, Hakim AM, Ikeda JE, Liston P, Thompson CS, Korneluk RG, Mackenzie A, Robertson GS. Elevation of neuronal expression of NAIP reduces ischemic damage in the rat hippocampus. *Nat Med* 3(9): 997-1004, 1997
- 13) Xu D, Bureau Y, McIntyre DC, Nicholson DW, Liston P, Zhu Y, Fong WG, Crocker SJ, Korneluk RG, Robertson GS. Attenuation of ischemia-induced cellular and behavioral deficits by X chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein overexpression in the rat hippocampus. *J Neurosci* 19(12): 5026-5033, 1999
- 14) Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281(5381): 1309-1312, 1998
- 15) Masaki Narita, Shigeomi Shimizu, Toshinori Ito, Thomas Chittenden Robert J. Lutz, Hikaru Mathuda, Yoshihide Thujimoto. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(25): 14681-14686, 1998
- 16) Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94(4): 481-490, 1998
- 17) Bernardi P, Broekemeier KM, Pfeiffer DR. Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr* 26(5): 509-517, 1994
- 18) Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 18(1): 44-51, 1997

- 19) Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86(1): 147-157, 1996
- 20) Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91(4): 479-489, 1997
- 21) Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 91(5): 627-637, 1997
- 22) Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399(6735): 483-487, 1999
- 23) Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(9): 4997-5002, 1998
- 24) Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Hirsch T, Susin SA, Masse B, Kroemer G. Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. *FEBS Lett* 384(1): 53-57, 1996
- 25) Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275(5303): 1129-1132, 1997
- 26) Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275(5303): 1132-1136, 1997
- 27) Rosse T, Olivier R, Monney L, Rager M, Conus S, Fellay I, Jansen B, Borner C. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* 391(6666): 496-499, 1998
- 28) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119(3): 493-501, 1992
- 29) Sgonc R, Boeck G, Dietrich H, Gruber J, Recheis H, Wick G. Simultaneous determination of cell surface antigens and apoptosis. *Trends Genet* 10(2): 41-42, 1994
- 30) Johnson D, Lardy H. *Methods in Enzymology, Oxidation and Phosphorylation* Vol. X: 94-96, Academic Press, New York, 1967
- 31) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970
- 32) Namura S, Zhu J, Fink K, Endres M, Srinivasan A, Tomaselli KJ, Yuan J, Moskowitz MA. Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. *J Neurosci* 18(10):3659-3668, 1998
- 33) Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Murakami K, Kawase M, Chan PH. Cytosolic redistribution of cytochrome c after transient focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 18(11): 1239-1247, 1998
- 34) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1): 156-159, 1987
- 35) Holland PM, Abramsom RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(16): 7276-7280, 1991
- 36) Kristian T, Siesjo BK. Calcium-related damage in ischemia. *Life Sci* 59(5-6): 357-367, 1996
- 37) Lazarewicz JW. Calcium transients in brain ischemia: role in neuronal injury. *Acta Neurobiol Exp (Warsz)* 56(1): 299-311, 1996
- 38) Mitani A, Yanase H, Sakai K, Wake Y, Kataoka K. Origin of intracellular  $Ca^{2+}$  elevation induced by in vitro ischemia-like condition in hippocampal slices. *Brain Res* 601(1-2): 103-110, 1993
- 39) Yamashima T, Takita M, Akaike S, Hirano M, Miyakawa A, Miyazawa A, Kudo Y, Yoshioka T. Temperature-dependent  $Ca^{2+}$  mobilization induced by hypoxia-hypoglycemia in the monkey hippocampal slices. *Biochem Biophys Res Commun* 205(3): 1843-1849, 1994
- 40) Silver IA, Erecinska M. Ion homeostasis in rat brain in vivo: intra- and extracellular  $[Ca^{2+}]$  and  $[H^+]$  in the hippocampus during recovery from short-term, transient ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 12(5): 759-772, 1992
- 41) Nakamura T, Minamisawa H, Katayama Y, Ueda M, Terashi A, Nakamura K, Kudo Y. Increased intracellular  $Ca^{2+}$  concentration in the hippocampal CA1 area during global ischemia and reperfusion in the rat: a possible cause of delayed neuronal death. *Neuroscience* 88(1): 57-67, 1999
- 42) Zhang Y, Lipton P. Cytosolic  $Ca^{2+}$  changes during in vitro ischemia in rat hippocampal slices: major roles for glutamate and  $Na^+$ -dependent  $Ca^{2+}$  release from mitochondria. *J Neurosci* 19(9): 3307-3315, 1999
- 43) Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262(5134): 689-695, 1993
- 44) Dugan LL, Sensi SL, Canzoniero LM, Handran SD, Rothman SM, Lin TS, Goldberg MP, Choi DW. Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *J Neurosci* 15(10): 6377-6688, 1995
- 45) Krajewski S, Mai JK, Krajewska M, Sikorska M, Mossakowski MJ, Reed JC. Upregulation of bax protein levels in neurons following cerebral ischemia. *J Neurosci* 15(10): 6364-6376, 1995
- 46) Krajewska M, Wang HG, Krajewski S, Zapata JM, Shabalk A, Gascoyne R, Reed JC. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease. *Cancer Res* 57(8): 1605-1613, 1997
- 47) Samali A, Zhivotovsky B, Jones DP, Orrenius S. Detection of pro-caspase-3 in cytosol and mitochondria of various tissues. *FEBS Lett* 431(2): 167-169, 1998
- 48) Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Brenner C, Larochette N, Prevost MC, Alzari PM, Kroemer G.

- Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med* 189(2): 381-394, 1999
- 49) Goldenthal KL, Hedman K, Chen JW, August JT, Willingham MC. Postfixation detergent treatment for immunofluorescence suppresses localization of some integral membrane proteins. *J Histochem Cytochem* 33(8):813-820, 1985
- 50) Krajewski S, Krajewska M, Ellerby LM, Welsh K, Xie Z, Deveraux QL, Salvesen GS, Bredesen DE, Rosenthal RE, Fiskum G, Reed JC. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(10): 5752-5757, 1999
- 51) Springer JE, Azbill RD, Knapp PE. Activation of the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *Nat Med* 5(8): 943-946, 1999
- 52) Narula J, Pandey P, Arbustini E, Haider N, Narula N, Kolodgie FD, Dal Bello B, Semigran MJ, Bielsa-Masdeu A, Dec GW, Israel S, Ballester M, Virmani R, Saxena R, Kharbanda S. Apoptosis in heart failure: release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(14): 8144-8149, 1999
- 53) Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 281(5381): 1312-1316, 1998
- 54) Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89(2): 175-184, 1997
- 55) Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391(6662): 96-99, 1998
- 56) Martin SJ, O'Brien GA, Nishioka WK, McGahon AJ, Mahboubi A, Saido TC, Green DR. Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. *J Biol Chem* 270(12):6425-6428, 1995
- 57) Barinaga M. Stroke-damaged neurons may commit cellular suicide. *Science* 281(5381): 1302-1303, 1998
- 58) Lee JM, Zipfel GJ, Choi DW. The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature* 399(6738 Suppl): A7-14, 1999
- 59) Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 32: 223-254, 1991
- 60) Yamashima T, Saido TC, Takita M, Miyazawa A, Yamano J, Miyakawa A, Nishijyo H, Yamashita J, Kawashima S, Ono T, Yoshioka T. Transient brain ischaemia provokes  $Ca^{2+}$ , PIP<sub>2</sub> and calpain responses prior to delayed neuronal death in monkeys. *Eur J Neurosci* 8(9): 1932-1944, 1996
- 61) de Torres C, Munell F, Ferrer I, Reventos J, Macaya A. Identification of necrotic cell death by the TUNEL assay in the hypoxic-ischemic neonatal rat brain. *Neurosci Lett* 230(1): 1-4, 1997
- 62) Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* 57(10): 1835-1840, 1997
- 63) Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 185(8): 1481-1486, 1997
- 64) Sims NR, Zaidan E. Biochemical changes associated with selective neuronal death following short-term cerebral ischaemia. *Int J Biochem Cell Biol* 27(6): 531-550, 1995
- 65) Reed JC. Cytochrome c: can't live with it-can't live without it. *Cell* 91(5): 559-562, 1997
- 66) Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 60: 619-642, 1998
- 67) Hirsch T, Susin SA, Marzo I, Marchetti P, Zamzami N, Kroemer G. Mitochondrial permeability transition in apoptosis and necrosis. *Cell Biol Toxicol* 14(2): 141-145, 1998

**Involvement of the Mitochondrial Apoptotic Pathway in Delayed Neuronal Death after Transient Global Ischemia**

Motoyuki Tada, Department of Neurosurgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 – J. Juzen Med Soc., 109, 99 – 109 (2000)

**Key words** cerebral ischemia, mitochondria, apoptosis, necrosis

**Abstract**

The present study was performed to clarify the involvement of the mitochondrial apoptotic cascade in ischemic hippocampal CA1 neuronal death of primates. Expressions of caspase-3, caspase-9 and cytochrome c were examined by immunohistochemistry and immunoblotting in the hippocampal CA1 sector undergoing 18 min transient global ischemia. By immunohistochemistry, caspase-9, cytochrome c and active-caspase-3 immunoreactivities were confirmed specifically in the CA1 neurons at 24 hr after ischemia. By TUNEL staining, majority of the CA1 neurons was immunopositive at 72 hr after ischemia. By immunoblot study, both CA1 pro-caspase-9 and cytochrome c protein levels were significantly decreased at 72 hr, and mitochondrial pro-caspase-9 and cytochrome c were also decreased at 24 hr. On the other hand, both CA1 and mitochondrial pro-caspase-3 protein were not changed after ischemia, whereas caspase-3 mRNA was induced at 24 and 72 hr after ischemia. In addition, faint cleaved products representing the active forms were present in immunoblot studies of caspase-3 and caspase-9 at 24 hr after ischemia. These data strongly suggest that cytosolic accumulation of cytochrome c and caspase-9 from mitochondria leads to sequential activation of caspase-9 and caspase-3, which contributes to delayed neuronal cell death after transient global ischemia.