

博士(医学) 原田恒介

### 論文題目

Combination of reactive oxygen species and tissue-type plasminogen activator enhances the induction of gelatinase B in brain endothelial cells

(活性酸素種と組織型プラスミノゲン活性化因子の組み合わせは脳血管内皮細胞においてゲラチナーゼ B の誘導を亢進する)

### 論文の内容の要旨

#### [はじめに]

組織型プラスミノゲン活性化因子 (tissue-type plasminogen activator: t-PA) は、脳血栓を溶解し、急性期脳梗塞治療薬として使用されている。しかし、t-PA は脳出血等の副作用を引き起こすため臨床上的の問題となっている。一方、脳梗塞時に発生する活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) も、脳梗塞を増悪させる重要な因子の一つとして考えられている。最近の報告によると、脳梗塞動物モデルにおいて、t-PA 治療時に生じる脳出血が、フリーラジカル消去薬エダラボンの投与によって減少することが証明されている。よって t-PA と ROS とが相互作用を起こし、脳出血のリスクを増大させる可能性が考えられる。

そこで、t-PA と ROS との相互作用について、細胞外マトリックスを分解し、血液脳関門の破綻、そして脳出血リスクの増大に関与していると考えられているマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloprotease: MMP) のひとつゲラチナーゼ B (MMP-9) の産生調節について検討した。さらに、その相互作用に対するエダラボンの効果とそのメカニズムについても検討した。

#### [材料ならびに方法]

マウス脳微小血管内皮細胞 (bEnd.3) に t-PA と ROS として過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) を添加し、MMP-9 の mRNA 及びタンパク質量をリアルタイム PCR 法及びウェスタンブロット法で測定した。また、細胞体を回収、細胞質成分及び核内成分を抽出後、核内因子  $\kappa B$  活性の指標である Nuclear Factor- $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ) の核内移行量や細胞質内量、NF- $\kappa B$  の核移行を抑制的に調節している因子 I- $\kappa B$  の細胞質内量を測定した。次に、NF- $\kappa B$  抑制薬 Bay 11-7082 及び MG-132、細胞外シグナル制御キナーゼ (extracellular regulated kinase 1/2: ERK1/2) 抑制薬 PD-98059 を用い、t-PA と ROS との相互作用への効果を検討した。最後に、フリーラジカル消去薬エダラボンの、t-PA と ROS の相互作用への効果を検討した。

#### [結果]

$H_2O_2$  及び t-PA により、それぞれ MMP-9 産生量は無刺激群と比較して有意に増大した。さらに、サブマックス量である  $H_2O_2$  に t-PA を添加した所、MMP-9 産生量は更に増大した。

$H_2O_2$  刺激では MG-132、Bay 11-7082 並びに PD-98059 の前処置群において、MMP-9 産生量が有意に減少した。一方 t-PA 単独刺激では Bay 11-7082 前処置群でのみ MMP-9 産生量が

有意に減少した。t-PA と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の共刺激では、MG-132 前処置群でのみ有意に減少し、また MG-132 と PD-98059 の両前処置群では、コントロールレベルにまで有意に減少した。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> では NF-κB 細胞質内量は有意に増大し I-κB 細胞質内量は有意に減少した。一方、t-PA では I-κB 細胞質内量は変化しなかった。

最後にエダラボンで前処置したところ、NF-κB 経路が抑制され、t-PA と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による MMP-9 産生がコントロールレベルにまで有意に減少した。

#### [ 考察 ]

今回の研究から、脳微小血管内皮細胞を ROS と t-PA で共刺激したところ、更なる MMP-9 産生量の亢進が認められたことから、ROS と t-PA が相互的に MMP-9 の産生量の亢進に関与し、脳出血のリスクを増大させる可能性が示された。

次にその産生経路について検討した所、NF-κB 経路を阻害した時に ROS と t-PA の共刺激による MMP-9 産生の亢進が有意に抑制されたことから、主経路として NF-κB 経路を介して MMP-9 産生量を亢進することが確認された。本研究で、t-PA 刺激では NF-κB の誘導が認められた一方、I-κB の分解が認められなかったのに対し、ROS 刺激では t-PA では認められなかった I-κB の分解が認められた。I-κB の分解は NF-κB の核内移行に必須の工程であることから、t-PA と ROS が同時に血管内皮細胞を刺激することにより、NF-κB 経路を介した更なる MMP-9 産生亢進が引き起こされたと考えられる。

#### [ 結論 ]

脳血管内皮細胞において、t-PA による MMP-9 産生が ROS により NF-κB 経路、特に I-κB の分解を介し更に増大し、脳出血が助長される可能性を示した。

### 論文審査の結果の要旨

急性期脳梗塞に対する血栓溶解療法で用いられる組織型プラスミノゲン活性化因子 (t-PA) は、脳出血を助長するという臨床上的問題点を有する。最近 t-PA 治療時の脳出血がフリーラジカル消去薬エダラボンの投与によって減少することが動物モデルにおいて示された。これより申請者は、t-PA と活性酸素種 (ROS) との相互作用について、脳出血リスクの増大に関わる matrix metalloproteinase 9 (MMP9) に着目して検討した。

マウス脳微小血管内皮細胞 (bEnd.3) を、t-PA あるいは ROS として過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) で処理すると、リアルタイム PCR 法で測定した MMP-9 の mRNA 量及びウェスタンブロット法で測定したタンパク量が増加し、いずれも両者の併用で相加的に増加した。阻害実験の結果、t-PA の作用は LDL 受容体関連タンパクを介し、その下流は mitogen-activated protein (MAP) kinase ではなく H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と同様に主に NF-κB 経路を介することが確認された。ROS 単独刺激では NF-κB の誘導と I-κB 分解が認められたのに対し、t-PA では後者は認められなかった。I-κB の分解は NF-κB の核内移行に重要な過程であることより、ROS は本機構を介して t-PA による MMP-9 産生亢進を助長すると結論づけた。申請者は更に、エダラボンが t-PA と

ROS の併用による MMP-9 の産生亢進をコントロールと同レベルまで抑制することを示した。

審査委員会では、t-PA による MMP-9 産生亢進を ROS が助長する機構を初めて明らかにし、エダラボンによりこれを抑制する可能性を明らかにした点を高く評価した。

以上により、本論文は博士（医学）の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 浦野 哲盟  
副査 福田 敦夫 副査 山本 清二