

氏名	ふじもと しんじ 藤 本 真 二
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 623 号
学位授与の日付	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 医 療 薬 科 学 専 攻
学位論文題目	出血性脳障害誘発因子としてのセリンプロテアーゼによる神経毒性発現 機序に関する研究
論文調査委員	(主 査) 教 授 赤 池 昭 紀 教 授 金 子 周 司 教 授 佐 治 英 郎

論 文 内 容 の 要 旨

脳出血は、血管壁の変性を基盤とする脳内小動脈瘤の破裂により発症し、出血により脳実質内に血腫が形成される。脳出血による脳組織の障害はいくつかの機序により誘発されることが示唆されている。第一に、血管から漏出した血液自体の物理的作用、すなわち、出血により形成された血腫が周縁の脳組織を圧迫することによる障害である。第二に、血腫に由来する血液成分の生物学的作用が挙げられる。正常時においては血液脳関門が血液と脳を厳密に隔絶しているが、脳出血時には血液成分に脳組織が曝露されるため、血腫周縁において二次的な組織障害が惹起される。二次的な組織障害の原因となる血液成分として、血漿中に前駆体が存在する種々のセリンプロテアーゼが中枢神経系において細胞死を誘発することが報告されている。したがって、セリンプロテアーゼが脳組織に対して毒性を発現する機序を解明することは、脳出血の予後を改善するための治療薬を開発する上で重要な役割を果たすと考えられる。そこで本研究において著者は、セリンプロテアーゼのうち、血液凝固系の酵素であるトロンビンおよび線溶系の酵素であるプラスミンに注目し、中枢神経系におけるこれらの作用に関して研究を進めた結果、以下の新知見を得た。

第一章 培養大脳皮質・線条体切片におけるトロンビン誘発障害の機序

血液凝固に関与するセリンプロテアーゼであるトロンビンは、血液中に存在するプロトロンビンが切断されることにより生成する。細胞構築が維持された実験系であるラット新生仔由来培養大脳皮質・線条体切片を用い、トロンビンの作用を検討したところ、大脳皮質における細胞障害および線条体組織の萎縮が遅延性に惹起された。大脳皮質において障害を受けている細胞は主として神経細胞であり、核の断片化を伴っていた。トロンビンのプロテアーゼ活性の阻害により線条体の萎縮はほぼ完全に抑制されたのに対し、大脳皮質における細胞障害の抑制は部分的であった。Clodronate によるミクログリアの除去は、トロンビンにより誘発される線条体の萎縮を抑制したが、大脳皮質における細胞障害は抑制しなかった。次に、トロンビンの毒性に関与する細胞内情報伝達経路の解析を行ったところ、mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路のうち、extracellular signal-regulated kinase (ERK) 経路の阻害薬はいずれの領域においてもトロンビン誘発障害を抑制したが、p38 MAPK 阻害薬および c-Jun N-terminal kinase (JNK) 阻害薬は線条体の萎縮のみを抑制した。トロンビンは一過性の ERK リン酸化を誘発したが、細胞障害を誘発するためには ERK のリン酸化より長時間のトロンビン曝露が必要であった。以上の結果から、トロンビンにより誘発される脳組織障害は、大脳皮質と線条体で異なる機序を介して進行するが、プロテアーゼ活性が部分的に関与しており、さらに細胞内情報伝達経路として MAPK 経路が重要な役割を果たしていることが示された。

第二章 ラット線条体内トロンビン投与により誘発される細胞障害の機序

脳出血の好発部位である線条体にトロンビンを微量投与したところ、投与直後にはネクローシス様の神経細胞死が惹起され、遅延性にはアポトーシス様の神経細胞死が惹起された。投与部位周縁部においてはミクログリアの活性化および細胞数の増加が生じた。トロンビンにより誘発される線条体の神経細胞死は、ERK 経路の阻害薬、p38 MAPK の阻害薬あるいは

JNK の阻害薬により抑制された。トロンビン投与により ERK および p38 MAPK のリン酸化レベルが投与側線条体において亢進し、リン酸化 ERK およびリン酸化 p38 MAPK は主として活性化ミクログリアに局在していた。さらに、ミクログリアの活性化を阻害する minocycline により、トロンビンの線条体投与後に誘発される神経細胞死は抑制された。以上の結果から、*in vivo* モデルでトロンビンにより誘発される線条体の神経細胞死において、MAPK 経路およびミクログリアの活性化が重要な役割を果たしていることが示された。

第三章 プラスミノーゲンによるトロンビン毒性の増強作用

血液中に存在するプラスミノーゲンは、フィブリン塊の表面や細胞膜上で活性化され、線溶系のセリンプロテアーゼであるプラスミンに変換される。プラスミノーゲンの培養大脳皮質・線条体切片に対する作用を検討したところ、プラスミノーゲン単独では大脳皮質、線条体のいずれにおいても著明な障害を引き起こさなかった。一方、低濃度のトロンビンは大脳皮質において顕著な細胞障害を惹起しなかったが、プラスミノーゲンを同時に適用することにより細胞障害が惹起された。低濃度トロンビンによる線条体の萎縮はプラスミノーゲンの同時適用によって増悪されなかった。トロンビンとプラスミノーゲンの同時適用による大脳皮質での細胞障害はプラスミン阻害薬および ERK 経路の阻害薬により抑制された。以上の結果から、プラスミノーゲンは組織中でプラスミンへと活性化され、一部にはトロンビンと共通の機序を介して大脳皮質でのトロンビン毒性を増強することが示唆された。

以上、著者は、トロンビンおよびプラスミンが遅延性に大脳皮質および線条体の神経細胞障害を惹起すること、その機序として一部には MAPK 経路が重要な役割を果たしており、線条体においてはミクログリアの活性化が神経細胞障害に寄与していることを明らかにした。本研究の成果は、血液中に前駆体が存在するセリンプロテアーゼによる神経毒性の発現機序を明らかにしたものであり、血液脳関門の破綻に関連した出血性脳障害に対する治療薬を開発する上で重要な基礎的知見を提供するものである。

論文審査の結果の要旨

脳出血は、血管壁の変性を基盤とする脳内小動脈瘤の破裂により発症し、出血により脳実質内に血腫が形成される。正常時においては血液脳関門が血液と脳を厳密に隔絶しているが、脳出血時には血液成分に脳組織が曝露されるため、血腫周縁において二次的な組織障害が惹起される。二次的な組織障害の原因となる血液成分として、血漿中に前駆体が存在する種々のセリンプロテアーゼが中枢神経系において細胞死を誘発することが報告されている。したがって、セリンプロテアーゼが脳組織に対して毒性を発現する機序を解明することは、脳出血の予後を改善するための治療薬を開発する上で重要な役割を果たす。申請者は、セリンプロテアーゼのうち、血液凝固系の酵素であるトロンビンおよび線溶系の酵素であるプラスミンに注目し、中枢神経系におけるこれらの作用に関して研究を進めた結果、以下の新知見を得た。

第一章 培養大脳皮質・線条体切片におけるトロンビン誘発障害の機序

血液凝固に関与するセリンプロテアーゼであるトロンビンは、血液中に存在するプロトロンビンが切断されることにより生成する。細胞構築が維持された実験系であるラット新生仔由来培養大脳皮質・線条体切片を用い、トロンビンの作用を検討したところ、大脳皮質における細胞障害および線条体組織の萎縮が遅延性に惹起された。大脳皮質において障害を受けている細胞は主として神経細胞であり、核の断片化を伴っていた。トロンビンのプロテアーゼ活性の阻害により線条体の萎縮はほぼ完全に抑制されたのに対し、大脳皮質における細胞障害の抑制は部分的であった。ミクログリアの除去はトロンビンにより誘発される線条体の萎縮を抑制したが、大脳皮質における細胞障害は抑制しなかった。トロンビンの毒性に関与する細胞内情報伝達経路の解析を行ったところ、extracellular signal-regulated kinase (ERK) 経路の阻害薬はいずれの領域においてもトロンビン誘発障害を抑制したが、p38 MAPK 阻害薬および c-Jun N-terminal kinase (JNK) 阻害薬は線条体の萎縮のみを抑制した。トロンビンは一過性の ERK リン酸化を誘発したが、細胞障害を誘発するためには ERK のリン酸化より長時間のトロンビン曝露が必要であった。以上の結果から、トロンビンにより誘発される脳組織障害は、大脳皮質と線条体で異なる機序を介して進行するが、プロテアーゼ活性が部分的に関与しており、さらに細胞内情報伝達経路として MAPK 経路が重要な役割を果たしていることが示された。

第二章 ラット線条体内トロンビン投与により誘発される細胞障害の機序

脳出血の好発部位である線条体にトロンビンを微量投与したところ、投与直後にはネクロシス様の神経細胞死が惹起され、遅延性にはアポトーシス様の神経細胞死が惹起された。投与部位周縁部においてはミクログリアの活性化および細胞数の増加が生じた。トロンビンにより誘発される線条体の神経細胞死は、ERK 経路の阻害薬、p38 MAPK の阻害薬あるいは JNK の阻害薬により抑制された。トロンビン投与により ERK および p38 MAPK のリン酸化レベルが投与側線条体において亢進し、リン酸化 ERK およびリン酸化 p38 MAPK は主として活性化ミクログリアに局在していた。さらに、ミクログリアの活性化を阻害することにより、線条体投与後で誘発されるトロンビンの神経細胞死は抑制された。以上の結果から、*in vivo* モデルでトロンビンにより誘発される線条体の神経細胞死において、MAPK 経路およびミクログリアの活性化が重要な役割を果たしていることが示された。

第三章 プラスミノゲンによるトロンビン毒性の増強作用

血液中に存在するプラスミノゲンは、フィブリン塊の表面や細胞膜上で活性化され、線溶系のセリンプロテアーゼであるプラスミンに変換される。培養大脳皮質・線条体切片において、プラスミノゲン単独では大脳皮質、線条体のいずれにおいても著明な障害を引き起こさなかった。低濃度のトロンビンとプラスミノゲンを同時に適用することにより細胞障害が惹起された。低濃度トロンビンによる線条体の萎縮はプラスミノゲンの同時適用によって増悪されなかった。トロンビンとプラスミノゲンの同時適用による大脳皮質での細胞障害はプラスミン阻害薬および ERK 経路の阻害薬により抑制された。以上の結果から、プラスミノゲンは組織中でプラスミンへと活性化され、一部にはトロンビンと共通の機序を介して大脳皮質でのトロンビン毒性を増強することが示唆された。

以上、申請者は、トロンビンおよびプラスミンが遅延性に大脳皮質および線条体の神経細胞障害を惹起すること、その機序として一部には MAPK 経路が重要な役割を果たしており、線条体においてはミクログリアの活性化が神経細胞障害に寄与していることを明らかにした。本研究の成果は、血液中に前駆体が存在するセリンプロテアーゼによる神経毒性の発現機序を明らかにしたものであり、血液脳関門の破綻に関連した出血性脳障害に対する治療薬を開発する上で重要な基礎的知見を提供するものである。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものとして認める。

更に、平成19年2月20日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。