

日宇 健 論文内容の要旨

主 論 文

Tissue Plasminogen Activator Enhances the Hypoxia/reoxygenation-induced Impairment of the Blood-brain Barrier in a Primary Culture of Rat Brain Endothelial Cells.

組織プラスミノゲンアクチベーターはラットの内皮細胞単層培養モデルにおいて低酸素/再酸素化による血液脳関門の障害を増悪させる

日宇 健、中川 慎介、林 健太郎、北川 直毅、堤 圭介、川久保 潤一、
本田 優、陶山 一彦、永田 泉、丹羽 正美

Cellular and Molecular Neurobiology 28(8):1139-46, 2008

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 医療科学専攻
(主任指導教員：永田 泉教授)

[緒 言]

脳梗塞急性期の治療として組織プラスミノゲンアクチベーター (tPA) 静注療法は投与時期が発症後 3 時間以内に限定されており、頭蓋内出血が大きな問題となっている。blood brain barrier: BBB についてはいまだ一定の見解が得られておらず、虚血下での tPA の BBB に与える影響について *in vitro* にて検討した。

[対象と方法]

方法は 3 週令 Wistar ラットより脳毛細血片を分離しコーティングしたディッシュで培養しトリプシン処理を行い、2 腔培養系である Transwell を用いて培養することにより、内皮細胞単層での *in vitro* モデルを作成した。まず normal condition での tPA 投与群と非投与群で検討し、次に normal condition と hypoxic condition での tPA 投与群と非投与群の 4 群に分け検討した。hypoxic condition は無糖培地に置換し低酸素キットを用いて 6 時間の低酸素と 3 時間の再酸素とした。

tPA は luminal face のみに投与しヒトでの tPA 静注後の最高血中濃度を反映した 20 $\mu\text{g/ml}$ と設定した。BBB 機能として経内皮電気抵抗 (TEER) および sodium fluorescein (NaF), Evans-blue albumin (EBA) 2 者の透過性を測定した。endocytosis の指標として lucifer yellow の取り込みを評価した。またタイトジャンクションタンパクである ZO1, Claudin5 の免疫染色を行った。

[結 果]

normal condition において 3 時間、6 時間、9 時間後で検討し tPA 投与群と非投与群との間に TEER の差は認めなかった。NaF の透過性も同様に 2 者間で差は認めなかった。しかしながら EBA の透過性は 6 時間、9 時間で tPA 投与群において亢進し ($P < 0.0001$)、lucifer yellow の取り込みも増加していた (6 時間; $P = 0.0074$, 9 時間; $P = 0.0004$)。

よって tPA は normal condition において transcellular transport を亢進させることが示された。

次に normal condition と hypoxic condition で検討し、hypoxic condition では TEER は低下し hypoxic condition 下での tPA 投与によりさらに低下した。透過性試験は hypoxic condition にて NaF, EBA の透過性の亢進 (NaF; $P<0.0001$, EBA; $P=0.0013$) を認め tPA 投与により増強した ($P<0.0001$)。ZO-1、claudin-5 の免疫染色では normal condition での発現に差は認めないものの、hypoxic condition では両者とも発現が低下しており tPA 投与によりさらにその発現は低下していた。hypoxic condition での tPA 投与は transcellular transport に加えタイトジャンクションタンパクを障害させることでの paracellular transport をも亢進させた。

[考 察]

Benchenane らの *in vitro* での検討では paracellular の指標である sucrose, inulin を用いて tPA は低酸素下でのみ sucrose, inulin の透過性を亢進させるとしている。一方で Yepe らの *in vivo* での検討では normal condition でも BBB opening が起こるとし見解の相違がみられる。

今回の結果から transcellular transport、paracellular transport の亢進が示されタイトジャンクションタンパク障害を指摘した点が新たな知見である。機序として LRP など receptor の介在、あるいは NF κ B-MMP-9 pathway の関与が推察される。これらを阻害する脳保護薬を併用することで tPA のより大きな効果が得られ tPA 静注療法の限られた投与時間の延長や tPA による機能予後の改善につながることを期待される。

今回の結果より内皮細胞単層培養モデルにおいて tPA は normoxia では transcellular transport を亢進させ、hypoxic condition での transcellular に加え paracellular transport にも影響を与えることが示された。生体において tPA は非虚血下で一部 BBB opening をきたし、また虚血下で BBB 障害を増悪させる可能性が示唆された。