様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　 ６ 月 １４ 日現在

機関番号：３４２０４
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2015～2017
課題番号：１５Ｋ０８１９４

研究課題名（和文）脳梗塞後の血管透過性亢進における線溶系の機能の解明

研究課題名（英文）Roles of fibrinolytic system on vascular permeability after ischemic stroke

研究代表者
永井　信夫（Nagai, Nobuo）

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：９０２６０２８１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では脳梗塞誘導に誘導されるプラスミン（Pli）活性の役割をマウス脳定量傷害モデル及び脳由来培養血管内皮細胞系を用い検討した。
脳梗塞に伴う血管透過性亢進領域サイズの経時的な縮小がPli遺伝子欠損により有意に減少、および傷害誘導4日目の血管透過性亢進部位でのPli活性の血管に沿った血管基底部側での分布を認め、Pli活性が血管基底部のリモデリングに寄与する可能性を示唆した。培養血管内皮細胞では、虚血を模した低酸素・低グルコース処理（6時間）によって血液脳関門の構成因子の発現量は減少するもののPliの添加影響しないことを明らかにし、Pliは血液脳関門の破たんには寄与しないことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Roles of plasmin activity associated with ischemic stroke was studied using a mouse brain damage model and brain derived endothelial cell line.
It was found that the sequential reduction of the vascular permeable region size was significantly reduced by gene deficient of plasminogen and plasmin activity was distribute apical side of the vessel at the region where vascular permeability was increased. These findings suggested the involvement of plasmin activity on the remodeling of basal lamina. I was also found that the expression of tight junction molecules in cultured brain derived endothelial cell line was suppressed by hypoxia mimicking oxygen-glucose deprivation treatment but not affected by plasmin treatment. These findings suggested plasmin did not contribute to the blood brain barrier disruption under ischemic condition.

研究分野：病態生理学

キーワード：脳梗塞　虚血　血管透過性　血液脳関門　線溶系　プラスミン

１．研究開始当初の背景

脳梗塞に伴う血管透過性亢進は血液脳関門の構造的な変化に起因するが、その詳細には不明な点が多い。我々は、(1)脳梗塞 4 日後では脳傷害周囲の特定の血管のみで血管透過性が亢進し細胞接着因子の VE Cadherin 免疫陽性反応が消失すること、(2)同領域でプラスミンの活性が特定の血管に局在していること、さらに(3)この領域の血管透過性は 7 日目には低下していること見いだしており、プラスミンが血管透過性亢進に寄与する可能性を見い出した。

２．研究の目的

本申請課題では、脳梗塞 4 日目にプラスミンが細胞接着因子の分解あるいは発現の制御を介して血管透過性の亢進に寄与する可能性を検討するとともに、脳梗塞後の傷害部位の血管における血管透過性の継時的変化を検証することを目的として研究を行った。

３．研究の方法

(1)　プラスミノゲン(Plg)遺伝子欠損(KO)マウスと野生型（WT）マウスの脳傷害後４日後の脳梗塞領域の血管におけるプラスミン活性、MMP 活性の局在と血管透過性マーカーとの共在を検討し、血管透過性亢進におけるプラスミンの寄与を検証した。また、プラスミノゲン活性化因子である tPA および uPA の遺伝子欠損マウス（tPAKO, uPAKO）とその野生型対象（tPAWT, uPAWT）マウスにおけるプラスミン活性の誘導を確認した。また、血管マーカーのトマトレクチンを投与し、トマトレクチンとプラスミン活性の分布を比較し、プラスミン活性の詳細な分布を検討した。

(2)　単層培養した血管内皮細胞株 bEnd.3 に酸素グルコース除去とプラスミン添加を行い、VE-Cadherin、Occludin、α2β1-Integrin の mRNA 発現量とタンパク発現量および細胞層の物質透過性を検討し、プラスミンによる細胞接着因子の発現制御を検討した。

４．研究成果

(1)　PlgWT マウスで認められた脳梗塞４日の傷害周囲部でのプラスミン活性は PlgKO マウスで認められないこと（図１）、および同領域で MMP 活性は PlgWT マウスでも PlgKO マウスで同様に認められることを示し、プラスミンは MMP の活性化を介さず寄与する可能性を明らかにした。

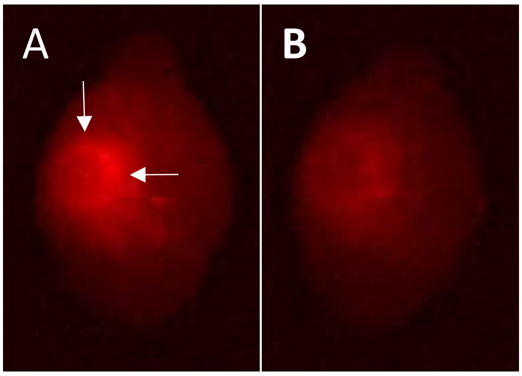

図1　傷害4日目の脳におけるPlgWTマウス(A)とPlgKOマウス(B)プラスミン活性の局在。WTの傷害周囲部(矢印)に認められた活性がKOでは消失した。

また、本プラスミン活性は tPAKO マウスでは tPAWT マウス同様に認められるものの uPAKO マウスでは消失することから、uPA により活性化されることが明らかとなった。さらに、トマトレクチンとプラスミン活性の局在の比較から、プラスミンは血管内腔側ではなく、血管基底部に分布す

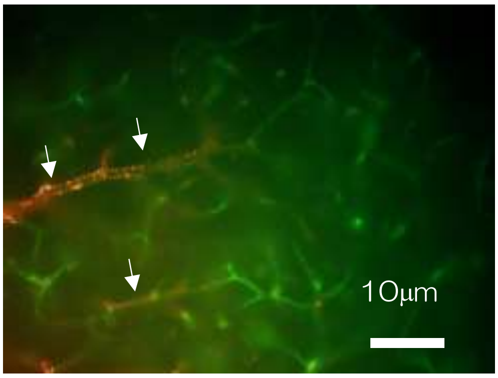

図2　トマトレクチン(緑)とプラスミン活性(赤)の分布。一部の血管(矢印)で活性の共在が認められた。

ることが示され、プラスミン活性が血管基底部のリモデリングに寄与する可能性が示唆された(図2)。

(2) マウス脳由来血管内皮細胞であるbEnd.3を用いた検討において、血液脳関門の構成因子でVE-CadherinおよびClaudin-5のタンパク質量及びmRNA量が虚血を模した低酸素・低グルコース処理（6時間）によって減少するもののPliの添加によっては変化しないことを明らかにし、血液脳関門の破たんにはPliは寄与しないことを明らかにした。

５. 主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計　1件）

1. Ohmori C, Sakai Y, Matano Y, Suzuki Y, Umemura K, Nagai N. Increase in blood-brain barrier permeability does not directly induce neuronal death but may accelerate ischemic neuronal damage. Experimental Animals. 2018 in press.査読有 DOI: 10.1538/expanim.18-0038

2. Suzuki Y, Nagai N, Umemura K. A Review of the Mechanisms of Blood-Brain Barrier Permeability by Tissue-Type Plasminogen Activator Treatment for Cerebral Ischemia. Front Cell Neurosci. 2016; 10: 2. 査読有 DOI 10.3389/fncel. 2016.00002.

〔学会発表〕（計　6件）

1. 足立悠太、湯川直人、鈴木康裕、梅村和夫、永井信夫. 脳梗塞の傷害部位周辺での血管透過性亢進の修復におけるプラスミンの寄与　第39回日本血栓止血学会学術集会P-059（2017.6.8-10、名古屋）

2. Matano Y, Takayama K, Ohi R, Nagai N. Reactive oxygen species generation and neural network rearrangement is associated with the increase in vascular permeability after ischemic stroke. 第94回日本生理学会大会　2P-191（2017.3/28-30、浜松）

3. Kimura K, Hasegawa M, Nagai N. Identification of novel substrates of plasmin on endothelial cell. The 1st Joint Meeting of ISFP and PA Workshop. PS1-020 (Shizuoka, Japan, 2016/10/17-21)

4. Matano Y, Sakai Y, Ohmori C, Yamada M, Suzuki Y, Umemura K, Nagai N. Roles of t-PA/plasmin system on the functional recovery and histological repair after ischemic stroke in mice. The 1st Joint Meeting of ISFP and PA Workshop. PS3-01 (Shizuoka, Japan, 2016/10/17-21)

5. Nagai N, Ono M, Utsuno T, Hirata T. Roles of alpha2-antiplasmin on patho-genesis of non-alcoholic steato-hepatitis under high-fat diet feeding. The 1st Joint Meeting of ISFP and PA Workshop. OS10-03 (Shizuoka, Japan, 2016 10/17-21)

6. 永井 信夫、木村 七海、長谷川 慎. 血管内皮細胞上のプラスミンの新規の基質の同定。第38回日本血栓止血学会学術集会O-035,P-043（2016.6.16-18、奈良）

〔図書〕（計　0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計　0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計　0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
http://www.nagahama-i-bio.ac.jp/introduction/%E7%A0%94%E7%A9%B6%E5%AE%A4%E7%B4%B9%E4%BB%8B2/#labo1

６．研究組織
(1)研究代表者
永井　信夫（NAGAI、Nobuo）
長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授
　研究者番号：90260281

(2)研究分担者
　　　　　　　　（　　　）

　研究者番号：

(3)連携研究者
　　　　　　　　（　　　）

　研究者番号：

(4)研究協力者
俣野　泰毅（MATANO、Yasuki）
足立　悠太（ADACHI、Yuta）
木村　七海（KIMURA、Nanami）