組織型プラスミノゲン活性化因子 (t-PA) は リポタンパク質受容体関連タンパクを介して ストロメライシン-1 (MMP-3) を内皮細胞で誘導する

鈴木 康裕*

Tissue-type plasminogen activator (t-PA) induces stromelysin-1 (MMP-3) in endothelial cells through activation of lipoprotein receptor-related protein

Yasuhiro SUZUKI*

Key words: 組織型プラスミノゲン活性化因子 (t-PA), 脳虚血, 脳内出血, マトリックスメタロプロテアーゼ, 低密度リポタンパク質受容体関連タンパク

1. はじめに

組織型プラスミノゲン活性化因子 (t-PA) は、分子量約 65kD のリジン結合部位を持つセリンプロテアーゼで生体内の線溶因子の一つである¹⁾。フィブリンに対して高い親和性を有し²⁾、プラスミノゲン (Plg) をプラスミン (Pl) に活性化して凝固系で形成されたフィブリンを分解するので線溶薬として用いられている。生体内での主な合成場所は血管内皮細胞³⁾で、主な生体内阻害因子はプラスミノゲン活性化因子阻害因子-1 (PAI-1) である。プラスミンは血中で速やかに内因性阻害因子である α_2 アンチプラスミン (α_2 AP) と速やかに結合して中和され活性を失う。プラスミンはマトリックスメタロプロテアーゼファミリー (MMPs) のいくつかを活性化することが知られており⁴⁾、直接的あるいは MMP を間接的に介して細胞外マトリックスを分解して出血を誘導している可能性が考えられている。

リコンビナントのヒト化 t-PA が開発され、脳梗塞治療薬として世界規模の大規模臨床試験が行われた^{5) 6)}。その結果、発症 3 時間以内の静脈内投与で患者の転帰改善に有効性が示され、2005

年から本国でも導入されている。その後、欧州で大規模臨床試験 ECASS-3 が行われ、発症後 3 時間から 4.5 時間の t-PA 投与は脳出血の合併は増加するものの、発症 3 時間以内の投与と同等な予後を改善するという結果⁷⁾を得て欧州脳卒中会議等で現行のガイドラインの修正が検討中である。このように t-PA の脳梗塞治療効果は、t-PA の脳血栓溶解による脳梗塞縮小効果と重篤な有害事象である頭蓋内出血とのバランスであるが、発症後 t-PA の投与開始遅延により、脳内出血および脳梗塞の拡大の危険性が示唆されている。

脳内出血の一因として t-PA は PAI と結合するためヒト血液中における半減期が 6.3 分 (α 相) と短く、静注終了後速やかに消失する。そのため、t-PA の有効血中濃度を維持するために大量投与が必要となり、出血傾向が生じると考えられている。また、止血反応によって形成されるフィブリン血栓に t-PA が特異的に結合し、PAI との結合を妨げられ、出血部位からの再出血が引き起こされる可能性も示唆されている⁸⁾。

MMPs は、細胞外マトリックスを基質とし、23 種類以上の酵素が存在している⁹⁾。MMPs は分泌型として産生され、体内ではその活性化は

*浜松医科大学医学部薬理学 [〒 431-3192 静岡県浜松市東区半田山 1-20-1]

Department of Pharmacology, Hamamatsu University School of Medicine

[1-20-1 Handayama Higashi-ku, Hamamatsu, Shizuoka 431-3192, Japan]

Tel: 053-435-2271 Fax: 053-435-2270 e-mail: yapplel@hama-med.ac.jp

図1 遺伝子欠損マウスを用いた脳虚血発症4時間後にt-PAを投与した脳内出血量
野生型において脳内出血を観察したが、誘導された脳内出血はプラスミノゲン (Plg) および MMP-3 遺伝子欠損マウス (Plg^{-/-} および MMP-3^{-/-}) では消失したが、MMP-9 欠損マウス (MMP-9^{-/-}) では消失しなかった。一方、t-PA を投与しない場合、MMP-9^{-/-} は脳内出血が減少した。

様々な物質によってコントロールされており、その機能は組織のリモデリングに重要な役割を担っている。血栓が形成され虚血状態に陥ると何らかの傷害によって内皮細胞が剥がれ脱落する。細胞外マトリックスは最後の防波堤として出血を防ぐが、MMPsの活性化により細胞外マトリックスが分解され血管が破綻し、出血を引き起こすのではないかと考えられている。

本稿は、脳虚血発症後外因性t-PA投与による脳内出血とストロメライシン-1 (MMP-3) との関わりについて血栓性中大脳動脈閉塞病態動物モデルを用いた我々のデータを中心に研究を紹介する。

2. 虚血性脳梗塞発症後のt-PA投与による脳内出血とMMPsの影響

我々は光化学反応を用いた血栓性中大脳動脈閉塞動物病態モデルを確立していた。その技術をマウスに応用し、外因性t-PAによる脳内出血を評価できるモデルを確立した⁸⁾。

次にPliによって活性を受けることが知られているMMP-3およびMMP-9に着目し、Plg, MMP-3, およびMMP-9遺伝子欠損マウス(Plg^{-/-}, MMP-3^{-/-}, MMP-9^{-/-})を用いて検討を行っ

た¹⁰⁾。虚血性脳梗塞発症4時間後にt-PAを投与し、野生型において誘導された脳内出血を観察した。誘導された脳内出血はPlg^{-/-}およびMMP-3^{-/-}では認められなかった(図1A, B)が、MMP-9^{-/-}では出現した(図1C)。また、セリンプロテアーゼ活性を不活化したt-PAを投与した場合にも脳内出血は誘導されなかった。これらのことから、t-PA/Pli/MMP-3経路が考えられ、投与されたt-PAによる出血にはMMP-3が関与し、MMP-9はあまり関与していないことを示している。

一方、t-PAを投与しない場合において、MMP-9の野生型と欠損型を比較すると出血は欠損型の方が少なかった(図1C)。このことから、MMP-9は脳虚血による血管の損傷に対して関与が大きいことが示唆された。

MMPsの活性中心が似ているためそれぞれのMMPに特異的な低分子阻害薬は現在開発の段階である。一般的に手に入るMMPs阻害薬はブロードタイプなものである。そこで、我々はGM-6001をMMP-3野生型および欠損型マウスに投与してt-PA起因脳内出血を抑制できるかどうか検討した。GM-6001は、脳組織で誘導されるMMP-3の結果から、t-PA投与4時間後および8時間後に腹腔内投与を行った。ブロードタイプ

MMPs 阻害薬は、野生型の t-PA 起因脳内出血を抑制し、MMP-3^{-/-}では MMPs 阻害薬の抑制効果を認めることができなかった。このことから MMP-3 が t-PA 起因脳内出血に重要な役割を果たしていることが示唆された。

3. 脳虚血による内皮細胞での MMP-3 の誘導

次に脳組織での脳虚血による MMP-3 産生量の変化を検討した。MMP-3 は正常生理状態においては産生されず、組織リモデリングが起こると誘導される酵素である。そこで脳虚血発症後の時変化を検討したところ、脳組織中の mRNA およびタンパク質レベルは、脳虚血発症 8 時間後において有意な増加が認められ、24 時間後まで徐々に増加していった。また脳虚血発症 4 時間後に t-PA を投与しても MMP-3 の変化に影響がなかった。そこで脳虚血発症 24 時間後の脳切片を作成し、形態学的な検討を行った。MMP-3 は脳梗塞中心部位とその周辺領域で誘導されていた。さらに、大脳皮質神経細胞では、脳虚血によって誘導されていることが観察されたが、血管内皮細胞では脳虚血によって MMP-3 が誘導されていなかった。t-PA 投与群は、血管内皮細胞にも MMP-3 が誘導されており、t-PA 起因脳内出血では血管内皮細胞で誘導される MMP-3 が重要であることが示唆された。

4. 脳微小血管内皮培養細胞における MMP-3 産生

脳虚血動物モデルにおいて t-PA による脳内出血に内皮細胞で誘導される MMP-3 が重要であることを見出したので、次にマウス脳微小血管内皮培養細胞 (bEnd.3) での産生のメカニズムについて検討を行った¹¹⁾。24 時間に培養液中に放出される MMP-3 は有意に 6 時間の低酸素・低グルコース状態 (OGD) によって誘導された。t-PA 添加によって正常状態および OGD 群で MMP-3 は用量依存的に誘導をされ、虚血刺激と相加的な反応であった。また、セリンプロテアーゼとしての酵素を不活化させた場合には消失した。このことから、MMP-3 の産生において t-PA の酵素活

性が必要であることが示唆された。

t-PA は特定の受容体を持っていない線溶因子であり、いくつかの蛋白と結合するが、その中で低密度リポ蛋白受容体関連蛋白 (Low density lipoprotein receptor-related protein : LRP) と結合することが知られている¹²⁾。LRP はリポ蛋白受容体ファミリーのひとつで、様々なりガンドをスカベンジしリポ蛋白の代謝に関与している¹³⁾、成人脳における酵素とその阻害因子との複合体のクリアランスに関与している。t-PA が脳血管内皮細胞で MMP-9 が誘導されるという報告がされ¹⁴⁾、LRP の活性化を介して血液-脳関門 (BBB) の透過性が亢進するという報告された¹⁵⁾。このことから、特定な受容体を持たない t-PA が LRP を介して MMP-3 を誘導する経路の一つの候補であると我々は着目した。そこで、低密度リポ蛋白受容体ファミリー拮抗薬である Receptor-associated protein (RAP) および抗 LRP 抗体を用いて前処理を行うと t-PA による MMP-3 の誘導はされなかった¹¹⁾。

t-PA/LRP/MMP-9 において、LRP 活性を介して転写因子である nuclear factor kappa-B (NF- κ B) が刺激されることも報告されている¹⁴⁾。MMP-3 は正常状態においてプロモーター領域に NF- κ B 結合領域は露出していないが¹⁶⁾、グリオーマ¹⁷⁾、動脈硬化¹⁸⁾、リウマチ¹⁹⁾などの病態状態で NF- κ B を介して MMP-3 産生されていることが報告されている。そこで、我々は虚血刺激あるいは t-PA 刺激によって NF- κ B 結合領域が露出して MMP-3 を誘導するかどうか検討した。OGD によって核内の NF- κ B 量は増加し、t-PA 添加によってさらに NF- κ B 量は増加した。プロテオソームを阻害し I- κ B の分解を阻害することで NF- κ B の核への移行を阻害する MG-132 を用いて検討を行ったところ、t-PA による核内 NF- κ B 量の増加分が抑制された。また、抗 LRP 抗体の添加によっても同様に抑制された。さらに、虚血下における t-PA 刺激による MMP-3 産生誘導は MG-132 にて抑制した。これらの結果から、虚血下において tPA/LRP/NF- κ B/MMP-3 経路が内皮細胞で存在することが示唆された。

図2 低密度リポタンパク質受容体関連タンパク (LRP) の虚血による内皮細胞での誘導
マウス脳での LRP (A, D) と CD-31 (内皮細胞マーカー, B, E) の免疫二重染色法により, LRP は正常領域では内皮細胞での発現はほとんど検出されず, 虚血領域で誘導されていた。

5. 虚血による LRP の内皮細胞での誘導と LRP 阻害による t-PA による脳内出血抑制

培養内皮細胞において6時間の虚血刺激によって LRP の mRNA は誘導された。また, タンパク質レベルでも増加が認められた。動物病態モデルにおいても中大脳動脈閉塞後6時間後の脳梗塞半球において LRP は有意に誘導された。免疫二重染色法により, その多くは神経皮質細胞で発現していた。内皮細胞においては, 虚血前あるいは脳梗塞の対側半球においてほとんど検出限界以下である (図 2C) が, 虚血によって誘導されていることが分かった (図 2F)。このことは, 虚血によって LRP が誘導されると t-PA がそこに結合しシグナルが増強されることが考えられる。このことは, 脳虚血発症後遅延した t-PA 投与によって脳内出血が増大し, 発症後早期に t-PA 投与すれば脳内出血が少ない一因である可能性が考えられる⁵⁾⁻⁷⁾。

また, 動物モデルにおいても RAP は虚血境界領域における血管内皮細胞での t-PA による MMP-3 の誘導を抑制し, 脳内出血も抑制した。これらのことから, t-PA のセリンプロテアーゼとしての活性も MMP-3 の産生および脳内出血において関与していることから t-PA が LRP に

結合するだけでなくそこで酵素として働くことが重要であることが推測される。Plg^{-/-}においても t-PA による脳内出血が抑制されることから t-PA/Plⁱ の線溶システムが重要であることは考えられる。しかしながら, MMP-3 の産生に関しては, 他の LRP の活性化の報告¹⁵⁾ から必ずしも Plⁱ が必須であるかどうか分かっていない。つまり, t-PA 自身が LRP と結合し LRP を活性化するかあるいは周囲の基質となりうる蛋白を活性化している可能性がある。今後の検討を要するところである。

6. 薬物治療方法の可能性

t-PA は, 脳梗塞治療薬として重要な薬であり, 脳梗塞進展抑制において血栓溶解による脳組織血流確保は最重要である。しかし, また抗血栓薬として脳出血の危険性あるいは血栓が溶解できなかった時の虚血下におけるグルタミン酸受容体を介した神経細胞毒性促進作用^{20) 21)} は避けられないものである。実際に t-PA を投与できる患者は数%程度と言われており, 治療可能時間延長の方策は重要である。

MMP-3 あるいは MMP-9 などを含めた MMPs の抑制は一つの選択肢であると思われる。これま

図3 脳梗塞治療におけるt-PA遅延投与による脳内出血の増加の仮説

脳血栓が形成され、虚血状態に陥るとLRPが内皮細胞に誘導される。そこに発症から時間が経過した状態でt-PAが投与されるとLRPに結合し、NF- κ Bが活性化し、MMP-3が誘導され、傷害をうけた血管がさらに破綻し出血を起こすものと考えられる。

でMMPs拮抗薬の臨床開発は行われたが、その肝への毒性のため中止となった²²⁾。また、特定のMMPに対して薬の選択性を増すことは、MMPs同士が類似の活性構造を持つため困難であるのが現状である。また、長期投与もMMPsが組織リモデリングに関わることから有効性が認められていない²³⁾。しかし、t-PA起因出血に対しては我々の結果から有効であり、出血のリスク軽減としての使用は有望であると考えられる。

LRPの阻害薬については、t-PA以外の蛋白などの代謝に関わることから様々な有害事象が懸念される。しかしながら、t-PAがLRPに結合してどのような詳細なメカニズムによりMMP-3の産生を誘導するか解明されれば創薬につながるものと考えられる。

7. おわりに

遺伝子改変動物を用いた実験において脳虚血におけるt-PA起因脳内出血にMMP-3が関与していることが明らかとなった。そのメカニズムの可能性として脳血栓が形成され、虚血状態に陥るとLRPが内皮細胞に誘導される。そこに発症

から時間が経過した状態でt-PAが投与されるとLRPに結合し、NF- κ Bが活性化し、MMP-3の産生が誘導・亢進され、傷害をうけた血管がさらに破綻し出血を起こすものと考えられる(図2)。このようにt-PA/LRP/NF- κ B/MMP-3 pathwayはt-PA起因脳内出血の原因の一つであると思われる。

今後、副作用が少ないMMP-3阻害薬の開発が望まれ、脳内出血の危険性を軽減し脳梗塞治療可能時間を延長することでより多くの患者が救われることを望む。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本賞の選考に関わられた諸先生方に深く感謝致します。本研究は、浜松医科大学医学部薬理学の梅村和夫教授のご指導のもと、教室の皆様のご協力を得て進められたものです。また、近畿大学医学部第2生理学の永井信夫先生、浜松医科大学医学部附属薬剤部の川上純一教授、山川花朱美先生など多くの先生方のご教授・ご協力のもと進められたものであり、この場をお借りして厚く御礼を申し上げます。

Disclosure of Conflict of Interests

The author indicated no potential conflict of interest.

文 献

- 1) Lijnen HR, Collen D : Tissue-type plasminogen activator. *Ann Biol Clin (Paris)* **45** : 198-201, 1987.
- 2) Tsurupa G, Medved L : Identification and characterization of novel tPA- and plasminogen-binding sites within fibrin (ogen) alpha C-domains. *Biochemistry* **40** : 801-808, 2001.
- 3) Levin EG : Latent tissue plasminogen activator produced by human endothelial cells in culture : evidence for an enzyme-inhibitor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80** : 6804-6808, 1983.
- 4) Lijnen HR : Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost* **86** : 324-333, 2001.
- 5) The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group : Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* **333** : 1581-1587, 1995.
- 6) Clark WM, Wissman S, Albers GW, Jhamandas JH, Madden KP, Hamilton S : Recombinant tissue-type plasminogen activator (Alteplase) for ischemic stroke 3 to 5 hours after symptom onset. The ATLANTIS Study : a randomized controlled trial. Alteplase Thrombolysis for Acute Noninterventional Therapy in Ischemic Stroke. *JAMA* **282** : 2019-2026, 1999.
- 7) Werner Hacke, Markku Kaste, Erich Bluhmki, Miroslav Brozman, Antoni Davalos, Donata Guidetti, et al. : Thrombolysis with Alteplase 3 to 4.5 Hours after Acute Ischemic Stroke. *New Eng J Med* **359** : 1317-1329, 2008.
- 8) Suzuki Y, Nagai N, Collen D : Comparative effects of microplasmin and tissue-type plasminogen activator (tPA) on cerebral hemorrhage in a middle cerebral artery occlusion model in mice. *J Thromb Haemost* **2** : 1617-1621, 2004.
- 9) Nagase H, Visse R, Murphy G : Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* **69** : 562-573, 2006.
- 10) Suzuki Y, Nagai N, Umemura K, Collen D, Lijnen HR : Stromelysin-1 (MMP-3) is critical for intracranial bleeding after t-PA treatment of stroke in mice. *J Thromb Haemost* **5** : 1732-1739, 2007.
- 11) Suzuki Y, Nagai N, Yamakawa K, Kawakami J, Lijnen HR, Umemura K : Tissue-type plasminogen activator (t-PA) induces stromelysin-1 (MMP-3) in endothelial cells through activation of lipoprotein receptor-related protein. *Blood* **114** : 3352-3358, 2009.
- 12) Bu G, Williams S, Strickland DK, Schwartz AL : Low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor is an hepatic receptor for tissue-type plasminogen activator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89** : 7427-7431, 1992.
- 13) Herz J, Hamann U, Rogne S, Myklebost O, Gausepohl H, Stanley KK : Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *EMBO J* **7** : 4119-4127, 1988.
- 14) Wang X, Lee SR, Arai K, et al. : Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator. *Nat Med* **9** : 1313-1317, 2003.
- 15) Yepes M, Sandkvist M, Moore EG, Bugge TH, Strickland DK, Lawrence DA : Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. *J Clin Invest* **112** : 1533-1540, 2003.
- 16) Westermarck J, Kahari VM : Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J* **13** : 781-792, 1999.
- 17) Cheng SM, Xing B, Li JC, Cheung BK, Lau AS : Interferon-gamma regulation of TNFalpha-induced matrix metalloproteinase 3 expression and migration of human glioma T98G cells. *Int J Cancer* **121** : 1190-1196, 2007.
- 18) Chase AJ, Bond M, Crook MF, Newby AC : Role of nuclear factor-kappa B activation in metalloproteinase-1, -3, and -9 secretion by human macrophages *in vitro* and rabbit foam cells produced *in vivo*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22** : 765-771, 2002.
- 19) Bondeson J, Foxwell B, Brennan F, Feldmann M : Defining therapeutic targets by using adenovirus : blocking NF-kappaB inhibits both inflammatory and destructive mechanisms in rheumatoid synovium but spares anti-inflammatory mediators. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** : 5668-5673, 1999.
- 20) Nicole O, Docagne F, Ali C, Margaill I, Carmeliet P, MacKenzie ET, Vivien D, Buisson A : The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med* **7** : 59-64, 2001.
- 21) Nagai N, Zhao BQ, Suzuki Y, Ihara H, Urano T, Umemura K : Tissue-type plasminogen activator has paradoxical roles in focal cerebral ischemic injury by thrombotic middle cerebral artery occlusion with mild or severe photochemical damage in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* **22** : 648-651, 2002.
- 22) Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM : Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer : trials and tribulations. *Science* **295** : 2387-2392, 2002.
- 23) Zhao B-Q, Wang S, Kim H-Y, Storrie H, Rosen BR, Mooney DJ, Wang X, Lo EH : Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke. *Nat Med* **12** : 441-445, 2006.