

氏名 (本籍) 伊 藤 毅 (愛知県)  
 学位の種類 博士 (医学)  
 学位授与番号 甲第 478 号  
 学位授与日付 平成 13 年 7 月 18 日  
 学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当  
 学位論文題目 Antithrombotic therapy and expression of plasminogen activator genes in ischemic brain  
 1) Comparison of the antithrombotic effects and bleeding risk of fractionated aurin tricarboxylic acid and the GPIIb/IIIa antagonist GR144053 in a hamster model of stenosis  
 2) Elevation of mRNA levels of tissue-type plasminogen activator and urokinase-type plasminogen activator in hippocampus and cerebral cortex following middle cerebral artery occlusion in rats  
 審査委員 (主査) 教授 坂 井 昇  
 (副査) 教授 植 松 俊 彦 教授 犬 塚 貴

### 論文内容の要旨

脳梗塞は脳卒中の他の三大病型である脳出血、クモ膜下出血に対し、近年相対的に増加している。この虚血性脳血管障害に対する治療として tissue-type plasminogen activator (tPA) や、urokinase-type plasminogen activator (uPA) を投与する治療法の有効性が報告されている。しかし、その効果については一定の見解がなく、かつ脳出血などの合併症がみられ、より効果的な血栓溶解法の開発が望まれる。一方、従来血管内で線溶系として働くと考えられていた tPA、uPA は血管内だけでなく、中枢神経系においてもその発現が報告されており、正常脳では神経細胞の分化、発達や神経可塑性等に関わっているとされ、また病的状態においてはてんかん発作の後に増加することが知られている。また、tPA は高濃度では neuron の変性を引き起こすことも報告されており、虚血脳でのこれらの protease の動態についての知見は生物学的にも治療上においても重要と考えられるが、この点についての報告は極めて少ない。

そこで今回申請者は、論文 1 ではより効果的な薬剤効果を見い出すため頸動脈の血栓モデルにおいて tPA と抗血小板剤の併用による経時的抗血栓効果を検討し、論文 2 では tPA および uPA の遺伝子レベルでの発現量変化を中大脳動脈閉塞モデルでの虚血脳、及び低酸素負荷を加えた神経細胞系培養細胞 PC12 において経時的に解析、検討した。

### 研究方法

1) ハムスターを用い右総頸動脈内膜をカテーテルにて損傷、内皮細胞を剥離し血栓による血管閉塞を作製した。その 30 分後より 30 分間の tPA (0.52 mg/kg) の経静脈的投与を行った (tPA 単独投与群)。これに加え抗血小板剤を併用した 2 群を設け、血小板 glycoprotein (GP) Ib の inhibitor である fractionated aurin tricarboxylic acid (ATA) (0.1 mg/kg/h)、もしくは GPIIb/IIIa の antagonist である GR144053 (0.3 mg/kg/h) のいずれかを経静脈的に術後 7 日まで持続投与した。頸動脈損傷部位で Doppler flow probe を用い以後の血流を経時的に計測し、出血時間も経時的に測定し各群間で比較検討した。

2) ラットを用い右内頸動脈よりナイロン糸を挿入して右中大脳動脈を閉塞し、閉塞後 0, 1, 3, 6 及び 24 時間で断頭し脳を摘出した。これらの脳より両側性に中大脳動脈領域の脳皮質及び海馬を分離し、各々より total RNA を抽出した。また、PC12 細胞に酸素分圧 1% の低酸素負荷を加えた後、脳と同様の time course で細胞を回収し、total RNA を抽出した。これらの sample を用い reverse transcription PCR 法にて tPA および uPA の発現量の変化を semiquantitative に解析した。

## 結果

1) tPA単独投与群では内頸動脈の完全開存を認めた確率は投与開始90分後, 1日後, 3日後, 7日後で各々0%, 0%, 0%, 0%であり, この際閉塞前と比較した血流量の平均は各々45%, 24%, 35%, 42%であった。tPAとATAの併用群では同様のtime courseで完全開存率が各々0%, 0%, 66%, 92%, 血流量の平均は各々56%, 54%, 88%, 85%であった。これに対し, tPAとGR144053の併用群では同様のtime courseで閉塞率が各々50%, 75%, 75%, 92%, 血流量の平均は各々87%, 75%, 80%, 92%と他の2群に比べ有意に良好であった。一方, 抗血小板剤の併用はいずれもtPA投与時の出血時間を延長したが, tPA投与終了後60分および7日後の出血時間においては両群ともcontrol群およびtPA単独投与群に比べ有意差を認めなかった。

2) 閉塞中大脳動脈灌流領域の右大脳皮質においては閉塞後12時間でtPA, 24時間でuPA mRNAが増加した。反対側である左中大脳動脈領域の大脳皮質では両者とも有意の増加を認めなかった。これに対し海馬においては両側とも右中大脳動脈閉塞後1時間よりtPA, 6時間よりuPA mRNAが増加した。PC12細胞では低酸素負荷6時間後よりtPA mRNAが増加したが, uPA mRNAは負荷前後ともに発現を認めなかった。

## 考察

1) 血栓溶解による内頸動脈の再開通率, 亜急性期の再開塞抑制効果はtPA単独よりも抗血小板剤の併用が有用であったが, ATAに比べGR144053の方が再開通率, 再開塞抑制ともより効果的であった。出血性合併症の程度を判定するために有用と考え出血時間を測定した結果, 抗血小板剤の併用はtPA投与終了時のみにおいて出血時間を延長し, 特にATA併用群で著明であったが, 1時間を経過するとこの傾向はみられなくなった。以上よりtPAを用いた血栓溶解療法において抗血小板剤glycoprotein IIb/IIIa antagonistを線溶療法に併用することは少ないriskの増加で大きな効果を期待できると考えられた。

2) tPA, uPAは正常脳にも発現があり, 虚血刺激にて増加がみられた。虚血に対して脆弱とされている海馬では, 閉塞した中大脳動脈の直接灌流領域ではないにも拘わらずこれらのgeneの発現量が中大脳動脈閉塞によって反応的に増加した。これらの結果は, tPA, uPAが興奮性神経病態のみならず, 虚血脳における神経の変性, 再構築においても影響を及ぼす事を示唆した。PC12においてはuPAの発現を認めなかったが, 過去の報告に照らし合わせてもneuronではtPAのみが発現すると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

申請者 伊藤毅は内頸動脈血栓症モデルを用いてtPAを使用した線溶療法に加え抗血小板剤の併用による効果を検討した結果, 血栓溶解療法にはtPAに加えglycoprotein IIb/IIIa antagonistの併用が有用であることを明らかにした。また, 従来血管内で線溶系として働くと考えられていたtPA, uPA遺伝子の発現を中大脳動脈閉塞モデルを用いて検討し, 虚血により反応性にこれらの遺伝子が増加することを発見し, neuronにおいてはこれらのうちtPAのみが発現することを示唆した。これらの研究の成果は脳神経外科および脳卒中学の発展に少なからず寄与するものと認める。

### [主論文公表誌]

Antithrombotic therapy and expression of plasminogen activator genes in ischemic brain.

- 1) Comparison of the antithrombotic effects and bleeding risk of fractionated aurin tricarboxylic acid and the GPIIb/IIIa antagonist GR144053 in a hamster model of stenosis  
1999年 Thrombosis Research 95:49-61
- 2) Elevation of mRNA levels of tissue-type plasminogen activator and urokinase-type plasminogen activator in hippocampus and cerebral cortex following middle cerebral artery occlusion in rats  
2000年 Neurological Research 22:413-419