

## 論文の内容の要旨

論文題目            脳虚血ストレス下における Mitogen-activated protein Kinase  
Phosphatase-1 (MKP-1)の発現調節とその機能解析

氏名                 堀川 弘吏

### 【序文】

脳血管障害の中でも脳梗塞は未だ有効な治療がなく、新たな治療法の開発が切望される疾患である。脳は他の臓器と比べごく短時間の虚血においても非可逆的な傷害を受けやすいという特徴を持つ。これは脳の虚血に対する脆弱性に起因するところが大きいと考えられるが、その機序は解明されていない。

虚血ストレス下における細胞傷害の進行についてはいくつかの機序が提唱されている。ATP減少による蛋白合成阻害、さらに膜電位の破綻による細胞内ナトリウム、カルシウムの流入が細胞傷害を引き起こすとされる。また虚血下における活性酸素(Reactive oxygen species : ROS)の発生が細胞傷害を引き起こす。特に脳組織は他臓器に比べ重量比の酸素消費量が大きく、また脂質含有量が多いという理由により、酸化ストレスに影響を受けやすいと考えられている。

これまで虚血ストレスに曝された神経細胞は、急性期のうちに組織変化が完成してしまうと考えられていた。しかし近年、虚血後およそ 12 時間後までに急速な組織変化の拡大が認められるが、その後約 72 時間後まで徐々に組織学的変化が拡大していくという報告がなされ、それに伴い虚血脳における遺伝子発現の変化が論じられるようになった。特に虚血周辺部における遺伝子発現の変化は虚血ストレス後の細胞傷害機序、あるいは耐性機構、回復過程などに関する重要な情報を含んでいる可能性が示唆されている。

これまでにわれわれの教室で行った研究において、ラット全脳に 6 分間の虚血負荷をかけると、

海馬 CA1 領域に著明な細胞死が認められるが、梗塞まで至らない 2 分間の虚血負荷(ischemic preconditioning)を行うと、その後の 6 分間の虚血負荷に対し耐性を示すことが示された。その海馬 CA1 領域の遺伝子発現の変化を DNA マイクロアレイにて解析したところ、種々の遺伝子の発現の増減が認められた。中でも mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) は CA1 領域の神経細胞が耐性を獲得する 2 分間の虚血負荷及び神経細胞死をきたす 6 分間の虚血負荷後、双方において著明に増加していた。MKP-1 は mitogen-activated protein kinase (MAP キナーゼ) のセリン、スレオニン残基を特異的に脱リン酸化してその働きを制御するものとして知られている。

近年、脳虚血もしくは虚血再酸素化後に MKP-1 が誘導され、JNK の抑制を介して神経細胞死を抑制しているのではないかとの報告も見られるが、脳虚血ストレス下における MAP キナーゼ及び MKP-1 の機能に関してはいまだ解明されていない。本研究においては、より臨床に即したモデルであるラット局所脳虚血モデルを用いて、虚血ストレス下における MAP キナーゼと MKP-1 の発現動態を調べ、さらに培養細胞を用いてその機能について解析した。

#### 【方法と結果】

*In vivo* においてはラット中大脳動脈閉塞モデルを作製し、各経過時間(虚血後 30 分から 7 日、コントロール及び sham 手術)において脳標本作製した。*In situ* ハイブリダイゼーション法にて MKP-1 mRNA 発現につき、時間的、空間的検討を行った。MKP-1 mRNA は虚血後 30 分という超急性期から虚血側大脳半球の虚血辺縁部から遠隔部の皮質に強く発現していた。虚血ストレス後 3 時間をピークに発現レベルは低下し、24 時間後にはほぼ消失していた。

さらにリアルタイム RT-PCR 法にて MKP-1 mRNA 発現レベルの時間的経過について定量的解析を行った。*In situ* ハイブリダイゼーションの結果と同様に、虚血辺縁部から遠隔部の皮質において虚血後 1 時間から 3 時間にかけて有意な発現レベルの上昇が認められ、その後発現レベルは減少し 24 時間後には負荷前と同程度となった。

次に組織抗体染色により MKP-1 蛋白質の発現を確認し、二重染色により MKP-1 発現細胞を同定した。MKP-1 蛋白質は虚血ストレス後 1 時間の時点において虚血辺縁部から遠隔部の皮質に発現していた。これらの陽性細胞は NeuN との共発現が認められ、MKP-1 は虚血ストレス後急性期において神経細胞に発現している分子であると考えられた。

また MKP-1 のターゲットである ERK、JNK、p38 及びそのリン酸化 (phospho-ERK, pERK; phospho-JNK, pJNK; phospho-p38, pp38) の動態を調べた。ERK、JNK、p38 は両側大脳半球に全体的に低発現していた。一方虚血負荷 1 時間後には虚血辺縁部の皮質において ERK のリン酸化が認められた。この虚血辺縁部でのリン酸化は JNK、p38 には認められず、虚血辺縁部においては MAP キナーゼの中でも ERK のリン酸化が起こっている可能性ことが示された。さらに虚血

神経細胞傷害と MKP-1 発現との機序を解明すべく *in vitro* 研究を計画した。

虚血ストレス下における神経細胞動態の *in vitro* モデルとして HT22 細胞株を用いた。これはマウス海馬由来培養細胞株であり、酸化ストレスによる細胞死を解析するための細胞モデルである。この細胞はイオン型グルタミン酸受容体を持たないため、グルタミン酸負荷により細胞内グルタチオン産生が抑制され、内因性の ROS 蓄積による酸化ストレスによって細胞死を起こすことが示されている。

この細胞にグルタミン酸負荷を行い、MKP-1 の発現および ERK のリン酸化について検討を行った。各経過時間 (0 分から 90 分) において lysate を採取し、ウェスタンブロッティングにて発現を検証した。グルタミン酸負荷 10 分後より ERK のリン酸化が認められた。20 分から 30 分後をピークにリン酸化レベルは減少し、90 分後には負荷前と同程度となった。それに対し MKP-1 の発現は ERK のリン酸化にやや遅れ、負荷後約 60 分をピークとして上昇しその後発現レベルは低下した。同様の時間経過にてリアルタイム RT-PCR により MKP-1 mRNA の発現レベルの推移について定量し評価した。MKP-1 mRNA はグルタミン酸負荷後、およそ 30 分をピークに上昇し、その後発現レベルは減少した。

次に MKP-1 の虚血ストレス下における機能を検証するために MKP-1 発現組み換えアデノウイルス (Ad-MKP-1) を用いて MKP-1 を HT22 細胞に強制発現させ、その細胞死に果たす役割につき検討した。感染二日後にグルタミン酸負荷を行い、LDH (lactate dehydrogenase) アッセイにて溶解した細胞から放出される LDH の量を定量した。MKP-1 強制発現群はコントロールと比べグルタミン酸負荷 9、11、13 時間後の各時間において有意に LDH 放出量が減少した。LDH アッセイにて著明な差が認められたグルタミン酸負荷後 13 時間の時点にて、Ad-MKP-1 の量を MOI 20、40 と振り分けて MKP-1 を導入し、グルタミン酸負荷後の細胞死を dye exclusion test を用いて評価した。Ad-MKP-1 MOI 20 群、MOI 40 群ともにコントロールと比べ有意に細胞死が抑えられた。

#### 【考察】

MKP-1 は虚血ストレス後急性期に虚血側大脳半球の虚血辺縁部の神経細胞に特異的に発現する分子であることを見いだした。この分子は虚血ストレスに対してきわめて敏感に発現し、一過性の発現動態を示すことが示された。さらに MKP-1 と同じく虚血辺縁部において、ERK のリン酸化が虚血超急性期に起こっていることが判明した。

MKP-1 の発現部位は最終的に脳梗塞を免れる部分に非常に類似していた。ischemic preconditioning によって MKP-1 が誘導されたという点からも、この分子が虚血ストレスに対して細胞死を抑制すべく作用するのではないかと仮説を考え、アデノウイルスにより MKP-1 を強制発現させ、細胞死に関する実験を行ったところ、MKP-1 の導入により酸化ストレスに対し細胞死が抑制されるという結果が示された。

今回、急性期の虚血辺縁部に MKP-1 が発現することを示したが、同じ虚血辺縁部において ERK のリン酸化も起こっていることが示され、また培養細胞を用いた実験においても MKP-1 の発現に先行して ERK のリン酸化が起こっていることが示された。他の MAP キナーゼである JNK や p38 に関してはこの虚血急性期の虚血辺縁部におけるリン酸化は今回の研究においては認められなかった。従来 ERK は細胞増殖や分化に作用し、細胞生存へと働くと考えられていた。また JNK や p38 はアポトーシスに促進的に働くと考えられていた。その一方で、持続する ERK の活性化は細胞傷害を引き起こし、むしろ細胞死を来すということが報告されている。これらより虚血辺縁部の ERK の制御を介した MKP-1 の細胞死抑制効果についても考慮が必要ではないかと考えた。

本研究にはいくつかの限界が存在する。脳は他臓器に比べ酸化ストレスに脆弱であると言われている。今回用いた HT22 細胞はグルタミン酸負荷により内因性の ROS が蓄積し細胞死を来すという、脳虚血下における酸化ストレスによる細胞死を研究するためのモデル細胞株である。しかし脳虚血ストレス時には他の因子による細胞傷害の経路もあり、それらの影響については今回の実験系においては考慮されていない。また脳は神経細胞以外にもアストロサイトやミクログリア、血管内皮細胞などいわゆる Neuro-glia-vascular unit で構成されており、それら神経細胞以外の細胞からの影響も今回は考慮されていない。今後、他の細胞株や、primary culture を用いた虚血負荷、さらには *in vivo* における実験などにてさらなる解析が必要と考えられる。

#### 【結論】

本研究においては ischemic preconditioning を行った後に著明に発現が増大していた MKP-1 について、より臨床の脳梗塞の病態に近い動物モデルである中大脳動脈閉塞モデルを用いてその発現動態を検討し、その発現が虚血辺縁部において虚血ストレス後、極めて早い時間に一過性に発現が増強することを示した。また培養細胞を用いた検討より MKP-1 が虚血ストレスに対し、細胞死を抑制すべく作用する可能性があることを示した。虚血ストレス下において MKP-1 は JNK の活性を抑えることで細胞死を抑制すべく働くとの報告もあるが、今回、虚血辺縁部においてはむしろ ERK の活性化が MKP-1 の発現に先行して認められていること、また ERK の持続する活性化がむしろ細胞毒性を引き起こすという報告もあり、虚血辺縁部の ERK の制御を介した細胞死抑制効果についても考慮が必要と考えた。

今後のさらなる研究により ischemic preconditioning の機序を解明し、脳梗塞の治療においてさらなる発展が期待できるものとする。