

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	岡 本 年 男
学 位 論 文 題 目			
<p>Transforming growth factor-beta1 induces matrix metalloproteinase-9 expression in human meningeal cells via ERK and Smad pathways (Transforming growth factor-beta1はヒト髄膜細胞においてERKおよびSmad経路を介しmatrix metalloproteinase-9の発現を促進する)</p>			
共 著 者 名			
高橋悟、中村英記、長屋建、林時仲、藤枝憲二			
Biochemical and Biophysical Research Communications 383: 475-479			
平成21年6月			
研 究 目 的			
<p>未熟児の出血後水頭症 (posthemorrhagic hydrocephalus: PHH) は、脳室内出血に引き続いて生じる交通性水頭症で、現在確立された唯一の治療法は脳室-腹腔内シャントである。しかし早産児では外科的侵襲に耐えられないため、新生児医療の現場では、より侵襲の少ない治療法の開発が望まれている。そこで我々が注目したのは、出血後水頭症を発症した新生児のうち、脳室拡大の進行が停止し、自然軽快する症例が存在することである¹⁾。近年PHHの発症機序として、脳室内出血後に炎症性サイトカインであるtransforming growth factor (TGF) -β1が髄液中に放出され、その作用で細胞外マトリックスが増殖し、髄液吸収障害が生じることが報告された²⁾。一方、増殖した細胞外マトリックス分解の中心的役割を果たすのが、matrix metalloproteinases (MMPs)である³⁾。従って、PHHの自然軽快においては、髄液中のMMPs活性が上昇している可能性が考えられる。我々はこの仮説を証明するため、正常新生児3名、クモ膜下出血2名およびPHH3名の髄液中MMP-9活性をSDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis) zymographyで検討し、髄液中MMP-9活性が高いのはPHH児のみであり、その中でも脳室拡大が軽快した2症例の方がシャント術に至った1症例に比べてMMP-9活性が高かったことを報告した。すなわち、髄液中MMP-9はPHH軽快に重要な役割を果たしていると考えられ、このメカニズムを明らかにすることがPHHに対する新たな治療戦略の開発につながる可能性がある。今回の研究では、PHHの病態において髄液中にMMP-9が産生される機序を明らかにすることを目的とした。</p>			
材 料 ・ 方 法			
<ol style="list-style-type: none"> 1. ヒト髄膜細胞 (HKBMM)を様々な濃度のhuman recombinant TGF-β1で刺激し、MMP-9の発現量が変化するかどうかをreverse transcription PCR (RT-PCR) 法で検討した。 2. TGF-β1のMMP-9産生に関わる細胞内シグナル伝達経路を明らかにするため、主要経路であるmitogen-activated protein kinase (MAPK)とSmadに対する特異的インヒビターを用い、HKBMMをhuman recombinant TGF-β1で刺激した際のMMP-9発現量の変化をRT-PCR法で検討した。 3. HKBMMをhuman recombinant TGF-β1で刺激した際のMAPKおよびSmadのリン酸化の変化をWestern blottingにて検討した。 			

成 績

1. TGF- β 1刺激によって、HKBMMにおけるMMP-9産生は濃度依存性に促進された。一方でMMP-9の特異的インヒビターであるtissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)-1の産生に変化は認めなかった。
2. TGF- β 1刺激によるHKBMMのMMP-9産生促進は、MEKおよびSmad3インヒビターによって阻害された。一方、JUNおよびp38 MAPKインヒビターではTGF- β 1刺激によるMMP-9産生に変化を認めなかった。
3. TGF- β 1刺激によって、ERK1/2およびSmad2のリン酸化を認めた。

考 案

過去の報告において、TGF- β 1刺激によるMMP-9産生への影響は細胞特異性に異なることが示されているが、HKBMMではTGF- β 1刺激によってMMP-9産生は促進された。また、TGF- β 1の細胞内シグナル伝達経路としてはMAPKとSmadが知られているが、今回の研究でERK1/2およびSmadがHKBMMのMMP-9産生に関与していることが示唆された。炎症性サイトカインであるTGF- β 1は、IVH後に脳室内に放出され、PHH発症に関わっているとされるが²⁾、今回の研究結果より、IVH後に髄液中に放出されたTGF- β 1は、髄膜細胞からのMMP-9産生を促進させている可能性があると考えられた。以前我々はPHH患者の髄液中MMP-9活性を検討し、MMP-9がPHH軽快に重要な役割を果たしている可能性を示したが、これらの結果を併せるとTGF- β 1はPHHの病態において増悪・軽快の両者に働いている可能性があると考えられる。

結 論

TGF- β 1刺激によってHKBMMにおけるMMP-9産生は濃度依存性に促進され、その作用にはERK1/2およびSmadのシグナル伝達経路が関与していることが示唆された。今回は*in vitro*での結果であるが、今後さらに研究が進めばPHHが軽快するメカニズムが明らかになり、更には新たな治療法の開発につながる可能性がある。




引 用 文 献

1. Volpe JJ. Intracranial hemorrhage, in: Volpe JJ. Neurology of the Newborn, Philadelphia, Saunders, 2001, pp. 428-493.
2. Whitelaw A, Cherian S, Pople I. Transforming growth factor- β 1: a possible signal molecule for posthemorrhagic hydrocephalus? *Pediatr Res* 1999; 46: 576-580.
3. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92: 827-839.

参 考 論 文

1. Okamoto T, et al. Matrix metalloproteinases in infants with posthemorrhagic hydrocephalus. *Early Hum Dev* 2008; 84: 137-139
2. 岡本年男、高橋弘典、更科岳大、大久保淳、町田祐子、小久保雅代、高橋悟、梶野真弓、高瀬雅史、白井勝、坂田宏、沖潤一：PIカテーテルを用いた脳室外ドレナージが有効であった脳室内出血後水頭症の1例、旭川厚生病院誌；15：109-114、2005

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	岡本 年男
<p>審査委員長 千石 一雄 </p> <p>審査委員 鎌田 恭輔 </p> <p>審査委員 梶野 浩樹 </p>			
学位論文題目			
<p>Transforming growth factor-beta 1 induces matrix metalloproteinase-9 expression in human meningeal cells via ERK and Smad pathways</p> <p>(Transforming growth factor-beta 1 はヒト髄膜細胞において ERK および Smad 経路を介し metalloproteinase-9 の発現を促進する)</p>			
<p>出血後水頭症は脳室内出血に引き続いて生じる交通性水頭症で、早産児の最も重篤な合併症の一つである。現在唯一確立された治療法である脳室-腹腔内シャント術は児の未熟さゆえに施行できないことが多く、有効かつ侵襲の少ない治療法の開発が待たれている。</p>			

一方で出血後水頭症では自然軽快例の存在が知られており、そのメカニズムの解明がシャント術にかわる治療法の開発につながる可能性がある。

申請者の先行研究により、出血後水頭症患者の髄液中 matrix metalloproteinases -9 (MMP-9)活性および濃度は、水頭症軽快例の方がシャント症例に比べて優位に高いことが明らかにされており、髄液中 MMP-9 は出血後水頭症軽快に重要な役割を果たしていると考えられている。

本研究は、出血後水頭症の病態において髄液中に MMP-9 が産生される機序を明らかにすることを目的としたものである。

本研究では、まずヒト髄膜細胞と同様の生化学的性質を示す髄膜腫細胞 (HKBMM)を用い、ヒトリコンビナント TGF- β 1 の刺激による、MMP-9 の発現量の変化を RT-PCR 法で検討し、その結果、HKBMM における MMP-9 産生は TGF- β 1 濃度依存性に促進されることを証明した。

また、TGF- β 1 の MMP-9 産生に関わる細胞内シグナル伝達経路を明らかにするため、主要経路である MAPK と Smad に対する特異的インヒビターを用いた検討、ならびに Western blot 法による TGF- β 1 刺激による ERK および Smad のリン酸化の解析から、ERK および Smad が TGF- β 1 による MMP-9 産生のシグナル伝達に深く関与することを明らかにした。

本研究は出血後水頭症軽快例の分子病態を初めて示したものであり、学術的価値は極めて高いと判断される。

また、諮問審査においても適切かつ論理的な回答が得られ、提出者は十分な学問的知識を有することが示された。

以上の審査結果から、本審査委員会は、本論文が学位論文としてふさわしい内容であると判断する。