論文の内容の要旨

論文題目　プラスミン阻害剤による炎症性疾患の制御

氏名　佐藤　亜紀

【背景と目的】

マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）はコラーゲンやラミニンなどの細胞外マトリックス構成分子群などの分解をはじめとして様々なサイトカイン及び造血因子の細胞外ドメイン分泌（プロセシング）を促進する作用があり、炎症性疾患や悪性腫瘍などの病態で活性化されていることが知られている。このような背景から、服部らは、エンドトキシンショックモデルマウスや急性移植片対宿主病モデルマウスへ MMP 阻害剤を投与することでサイトカインのプロセシング制御による病態改善効果を認めることを報告した。また、転移性悪性腫瘍治療の目的で MMP 阻害剤の治験が開始されたが、MMP 阻害剤の構造上の問題による副作用のため臨床応用には至らなかった。

一方、血液線維素溶解系（線溶系）因子プラスミンは潜在型酵素 Pro-MMPs から活性型 MMPs へと活性化することが報告されていることから、プラスミン阻害により MMPs を介したサイトカインのプロセシングによる炎症反応の活性化を制御できないかと考え実験を開始した。

【結果と考察】

本研究では、移植片対宿主病（急性 GVHD: acute graft-versus-host disease）モデルマウスとエンドトキシンショックモデルマウスを使用し、プラスミンと各種炎症性疾患との関係について解析を行った。また、27 名の造血幹細胞移植後患者の血液サンプルの解析も行った。

まず、造血幹細胞移植後患者を急性 GVHD の重症度で軽度（Grade 0-I）、中等度（Grade II）、重症（Grade III-IV）に分類し、プラスミン値と急性 GVHD の重症度との関連性を調べた。プラスミン活性の指標となるプラスミン-α2 プラスミンインヒビター複合体（PIC）値と急性 GVHD の重症度に相関性を認めた。また PIC ピーク値は急性 GVHD 発症早期に認められることから、プラスミンの活性化は急性 GVHD 発症の何らかのトリガーとなっている可能性が示唆された。

急性 GVHD は、ドナーとレシピエント間の主要組織適合遺伝子複合体（MHC）の不一致によるド

41-107330 佐藤亜紀

ナーT 細胞の活性化によって引き起こされることが知られている。そこで急性 GVHD モデルマウスとして、2 種類の MHC 不一致急性 GVHD モデルマウスを使用し、プラスミンと急性 GVHD との関連について解析を行った。神戸学院大学薬学部より提供されたプラスミン阻害剤 YO-2 を使用した。YO-2 はプラスミンの活性中心を阻害することで循環しているプラスミンを阻害する特徴を持っている。

まず、全身放射線照射後に骨髄細胞と脾臓細胞（T 細胞を含む）を輸注する致死性急性 GVHD マウスモデルにおいて YO-2 の効果を検討した。YO-2 投与により生存率の改善と急性 GVHD 関連の体重減少の抑制効果を認めた。このモデルにおいて同種遺伝子型マウスの骨髄と脾臓を輸注したマウスでは放射線照射によると思われる軽度のプラスミン活性の上昇を認めたが、異種遺伝子型マウスの骨髄と脾臓を輸注したマウスでは著明なプラスミン活性の上昇を認めたことより、放射線照射よりも MHC 不一致による免疫反応がプラスミン活性化に関与していることが示唆された。

そこで、次に、全身放射線照射の影響がなく、大量の脾臓細胞を輸注することで致死性急性 GVHD を発症させるモデルにおいて YO-2 の効果を検討した。前述の急性 GVHD モデルと同様に、このモデルでも YO-2 投与により生存率改善と急性 GVHD 関連の体重減少の抑制効果を認めた。急性 GVHD の標的臓器である皮膚・肝臓・腸管の急性 GVHD による病理組織所見も YO-2 投与で改善していた。プラスミン阻害剤による急性 GVHD の病態改善のメカニズムを解析するために、以下、この大量脾臓細胞輸注による急性 GVHD 発症モデルマウスを使用し更に検討を行った。

急性 GVHD 発症モデルマウスの血漿サンプルの解析を行ったところ、YO-2 投与群においてプラスミン抗プラスミン複合体（PAP)、MMP-9 産生の低下と、腫瘍壊死因子（TNF-α）、Fas リガンド（FasL)、インターロイキン(IL)-1β、IL-6 などの炎症性サイトカインや Kit リガンド（KitL）などの造血因子や単球走化タンパク質-1(MCP-1) などのケモカインの産生減少を認めた。以上より YO-2 投与による炎症性サイトカイン・ケモカイン、造血因子などの制御が病態改善に繋がっていることが示唆された。

急性 GVHD では、ドナーT 細胞がリンパ節や脾臓などのリンパ系組織に浸潤し、抗原提示細胞（APC）によりドナーT 細胞が活性化され、その後、標的細胞へ T 細胞や単球などのサイトカイン産生エフェクター細胞が浸潤することが知られている。移植後 8 日目の脾臓と腸管組織の浸潤細胞の解析により、T 細胞や単球などの急性 GVHD エフェクター細胞の浸潤が YO-2 投与により抑制されていることが分

41-107330 佐藤亜紀

かった。他の研究グループより、急性 GVHD における炎症細胞の浸潤とケモカインとの関連が報告されており、CCR2 リガンドである MCP-1 は単球、T 細胞や、樹状細胞などの走化に関与していることも知られている。また培養細胞実験において、プラスミンは *MCP-1* の遺伝子発現を促進することも報告されている。本研究においても、YO-2 投与による急性 GVHD モデルマウスで血漿中の MCP-1 濃度低下、脾臓への CCR2 陽性細胞浸潤抑制や、マウス単球系白血病細胞株へのプラスミン添加による *MCP-1* の遺伝子発現量増加と YO-2 添加による *MCP-1* 遺伝子発現の抑制効果などを認めた。このことから YO-2 投与による炎症細胞浸潤の抑制は、プラスミンや MMP などの活性低下による細胞外マトリックス分解抑制に加え、MCP-1 などのケモカインの産生抑制によることが示唆された。

以上より、急性 GVHD モデルマウスにおいて、YO-2 投与によるプラスミン阻害を介したサイトカイン産生抑制やサイトカイン産生エフェクター細胞の組織浸潤抑制作用が病態改善に繋がっている可能性が示唆された。

プラスミン阻害により様々な炎症性サイトカインが制御されることが明らかとなったが、その中でも特に TNF-α はサイトカインストームと呼ばれる病態の初期の炎症反応に重要なサイトカインである。膜型サイトカインである TNF-α のプラスミンによる MMP を介したプロセシングによる活性化機構について、更に検討を行った。

リポポリサッカライド（LPS）投与によるエンドトキシンショックモデルマウスにおいて、対象群と比較して YO-2 投与群やプラスミノーゲン遺伝子欠損（*Plg-/-*）マウス群で生存率の改善、血漿中の PAP、MMP-9、TNF-α 値の低下を認めた。また、MMP-9 遺伝子欠損（*MMP-9-/-*）マウスで、PAP 値の低下は認めないものの、TNF-α 値の低下を認め、生存率の改善効果を認めたことから、MMP-9 を介した TNF-α の抑制効果があることが示された。一方、*MMP-9-/-*マウスに YO-2 を投与すると生存率が更に改善することや、YO-2 投与により血漿中の活性化 MMP-9 のみならず MMP-2 の抑制効果を認めることから、プラスミン阻害は MMP-9 を介さない機序による炎症制御機構もあることが示唆された。

更に培養細胞実験において、単球系白血病細胞株にあらかじめ PBS、YO-2 を添加し、LPS 刺激を行ったところ、YO-2 処理群で、培養上清中のプラスミン活性と MMP-9 活性の低下を認めた。培養上

清中の TNF-α（可溶型 TNFα）は YO-2 添加によりコントロールの 30%にまで減少していたが、*TNF-α* の遺伝子発現量はコントロールの 80%程度にとどまり、細胞上の膜型 TNF-α は蓄積していた。このことから、YO-2 投与により *TNF-α* の遺伝子発現量の軽度抑制に加え、TNF-α の膜型から可溶型へのプロセシング抑制により、培養上清中への可溶型 TNF-α の放出が抑制されている機序が示唆された。

本研究では、プラスミン阻害の作用として、従来報告されている、①サイトカイン・ケモカインの遺伝子発現量の抑制作用、②炎症細胞の組織浸潤の抑制作用に加え、③MMP 抑制作用を介したサイトカインプロセシング抑制によるサイトカイン産生の制御機構も新たに明らかとなった。プラスミンの血栓溶解作用は良く知られているが、過剰なプラスミン産生によるサイトカインプロセシング亢進や細胞外マトリックス分解などのタンパク分解作用による炎症反応活性化機構についてはあまり知られていない。近年、インフルエンザや A 群溶血性連鎖球菌による感染症、リウマチや炎症性腸疾患などの自己免疫疾患とプラスミンの関連についていくつかの報告もあり、本研究により各種炎症性疾患においてプラスミンが新たな治療標的やバイオマーカーとなり得る可能性が明らかとなった。

41-107330 佐藤亜紀