



発達期ラットの低酸素性虚血性脳障害に対するトロンビン機能的受容体(Protease-activated receptor-1, PAR-1)活性化の効果

橋本, 直樹

(Citation)

神戸大学医学部紀要, 62(3/4):75-83

(Issue Date)

2002-03

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00317221>



発達期ラットの低酸素性虚血性脳障害に対するトロンビン機能的受容体 (Protease-activated Receptor-1, PAR-1) 活性化の効果

橋 本 直 樹

神戸大学大学院医学系研究科成育医学講座 (小児科学)
(指導: 中村 肇教授)

連絡先: 常 石 秀 市
〒650-0017 神戸市中央区楠町 7-5-1
内線: 078-382-6090, FAX: 078-382-6099

(平成13年12月28日受付)

要 約

凝固系蛋白であるトロンビンは、前駆体であるプロトロンビンとその受容体の両者が中枢神経系において発現していることが確認され、神経系の分化やアポトーシス、可塑性への関与が注目されている。実際にラット脳におけるトロンビン機能的受容体 (Protease-activated Receptor-1, PAR-1) の発現が、神経グリア細胞の増殖・遊走時期 (分化前段階) である出生～日齢15において豊富であることを確認した。

生体への展開として、幼若ラットの脳室内へPAR-1の人工リガンドペプチドである Thrombin Receptor Activating Peptide (TRAP) を注入後、低酸素虚血負荷をかけ、負荷後7日目に組織障害評価を行った。海馬CA1神経細胞の残存率 (平均±SD) は、生食群 $66.7 \pm 12.8\%$, TRAP少量投与群 ($0.5 \mu\text{g}$) $98.4 \pm 3.6\%$, TRAP大量投与群 ($50 \mu\text{g}$) $60.7 \pm 27.8\%$ であり、TRAP少量投与ではほぼ完璧に細胞死を阻止したが、TRAP大量投与では細胞防護効果は認められなかった。アポトーシスの解析では、生食群とTRAP大量投与群でのみ、海馬組織DNAの解析にて明瞭なDNA ladder bandsが認められ、アポトーシスを起こした細胞に有意に認められる抗single-stranded DNA抗体に対する染色性を示した。PAR-1の至適な活性化が低酸素虚血障害による海馬神経細胞死を抑制することが認められ、PAR-1の活性化により神経細胞の障害への閾値が上昇することが示唆された。

緒 言

中枢神経系における凝固線溶系蛋白の発現が次々と確認され、これらセリンプロテアーゼとそのインヒビターの相互作用が注目されている。両者のバランスは厳密に制御されており、シナプス形成や髄鞘化、アポトーシスなどへの関与が解明されつつある¹⁾。中でもトロンビンは、前駆体であるプロトロンビンとその機能的受容体の両者が中枢神経系において発現していることが確認され、注目されている²⁻⁴⁾。トロンビン機能的受容体 (Protease-activated Receptor-1, PAR-1) は、トロンビンによりN末のセリン残基部位で切断され、新たにN末断端となった自身の6個のアミノ酸配列 (SFLLRN) が、受容体自身の細胞膜外ドメインに作用し、自己活性化をおこすユニークな受容体である⁵⁻⁸⁾。このことは、6個のアミノ酸配列を含む人工ペプチドを外因的に作用させて、リガンドとして受容体を活性化できることを意味している^{9, 10)}。また、この人工リガンドペプチドを使用することで、多岐にわたるトロンビンの生物学的活性を除外した実験系を作成することができる。

In vitroにおいて、PAR-1活性化は神経グリア細胞の分化を、形態的にも分子生物学的にも一過性に抑制し、様々な障害に対する閾値を上昇させることが報告されている¹⁰⁻¹⁴⁾。その一方で、PAR-1の過剰な活性化がネクロトーシス^{15, 16)}やアポトーシス^{10, 17-21)}を誘導し、結果的に細胞障害を惹起することも報告されている。この2面性の影響は、幼若脳の分化発達に大きな役割を果たしていると考えられる^{10, 16, 21)}。また、中枢神経系の障害時にPAR-1やプロトロンビンの発現が増強

キーワード: トロンビン機能的受容体, protease-activated receptor-1 (PAR-1), 低酸素性虚血性脳症, アポトーシス, 新生仔ラット

されることも報告されている^{4, 14, 22)}。生体の脳における神経細胞とグリア細胞の相互作用の系においても、至適な PAR-1 の活性化は障害抵抗性を誘導するのであろうか。あるいは、過剰な活性化は障害を誘導するのであろうか。我々は、ラットの発達期脳における低酸素虚血脳障害モデルにおいて、TRAP を用いた PAR-1 活性化による障害防護効果とその単独活性化がもつ生物学的意義を検討した。

方 法

①ラット脳組織のノザンブロット解析

日齢 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, および成獣ラットの大脳半球と小脳をグアニジンチオシアン酸溶液中にてホモジェナイズ後、塩化セシウムをクッションに用いた超遠心法にて全 RNA 分画を回収した。PAR-1 の核酸配列⁵⁾よりプライマーを作製し、RNA 分画を利用した RT-PCR 法にて cDNA プローブを得た (nt. 481~1599, 1119-bp)。20 μ g の全 RNA をアガロースゲルにて電気泳動したものをナイロンメンブレン (Hybond-N⁺, Amersham) に転写後、³²P にてラベルした cDNA プローブとハイブリダイゼーション (ExpressHyb, Clontech) を行い、オートラジオグラフィにて mRNA 発現量を半定量解析した。等量の RNA サンプルによる検討である確認は、泳動後の ribosomal RNA の濃淡、および同一メンブレンを用いた re-probe 法により、内因性コントロールの解糖系酵素 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の発現量の比較により確認した。

②ラット低酸素虚血障害モデル

日齢 7 の Sprague-Dawley ラットをエーテル吸入麻酔にて鎮静し、保温下敷きブランケットにて直腸温を 36.0 $^{\circ}$ C 前後に保持しながら処置を行った。ラット頭部を固定し、微少ガラス管を定位的に右側脳室内に穿刺し、5 μ l の生食水もしくは 0.5 or 50 μ g/5 μ l の TRAP (Sigma) 溶液を注入した。脳室腔への正確なガラス管の挿入により、ガラス管内の注入予定溶液が重力で自然落下することで、適所への注入を確認した。また、黒インクの注入にてモデル実験をしたところ、前述手技にてインクの両側側脳室腔への拡散を確認できた。脳室腔への注入処置後 2 時間の回復時間をとった後、左総頸動脈を結紮切離し、さらに 2 時間の回復時間を与えた後、8%O₂ による低酸素を 2 時間負荷し、その後母親ラットへ戻して哺育させた。脳室穿刺のみで薬液を注入せず、かつ左総頸動脈を露出させただけで、低酸素負荷をかけていないものを sham 処置群と

した。

③海馬組織評価

負荷後 7 日目にエーテル麻酔下、4%パラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定し、断頭して脳組織を回収した。海馬組織を含む冠状断切片を作製し、HE 染色にて組織学的検討を行った。海馬 CA1 領域の連続する 3 視野において、組織画像をコンピュータに取り込んで残存神経細胞数をカウントし、sham 処置群に対する神経細胞残存率を算出した。統計処理は、Mann-Whitney U 検定を用い、 $p < 0.05$ にて有意とした。

④アポトーシスの検出

1) DNA ladder の検出

負荷後 7 日目に麻酔下断頭し、海馬組織のみを線条体と大脳皮質から分離回収した。同じ処置群の 3 匹分の海馬組織を混合し、その DNA 分画を抽出回収し、アガロースゲルにて電気泳動処理後、エチジウムブロマイドにて可視化して DNA ladder band の有無を検討した。

2) single-stranded DNA の検出

負荷後 7 日目の海馬組織を含む冠状断切片を作製し、100 倍希釈のウサギ抗ラット single-stranded DNA 抗体 (DAKO) にて 1 時間インキュベートした後、DAB (3,3'-diaminobenzidine, tetrahydrochloride) を基質とした horseradish peroxidase 法を用いて免疫組織化学的に染色した。

結 果

①ラット脳における PAR-1 の発現

ラット大脳、小脳、ともに 3.4kb の単一バンドを明瞭に検出できた。大脳半球における PAR-1 mRNA の発現は、日齢 0~15 にかけて非常に豊富であり、以後漸減して成獣が日齢 0 の 54% と、もっとも発現が少量であった (図 1A)。ラット小脳における PAR-1 mRNA の発現は、日齢 0 に非常に豊富であり、以後急激に減少して日齢 30, 成獣が、それぞれ日齢 0 の 38%, 46% と少量であった (図 1B)。

②低酸素性虚血性脳障害に対する PAR-1 活性化の影響

1) 海馬神経細胞死の評価

生食群, TRAP 群, 共に処置後のラット生存率は約 90% と差はなかった。肉眼的には、生食群, TRAP 大量投与群 (50 μ g) の結紮側脳半球に軽度の萎縮を認めるものの、嚢胞形成はみられなかった。HE 弱拡大 ($\times 40$ 倍) では、明らかな組織の欠落や細胞構築の乱

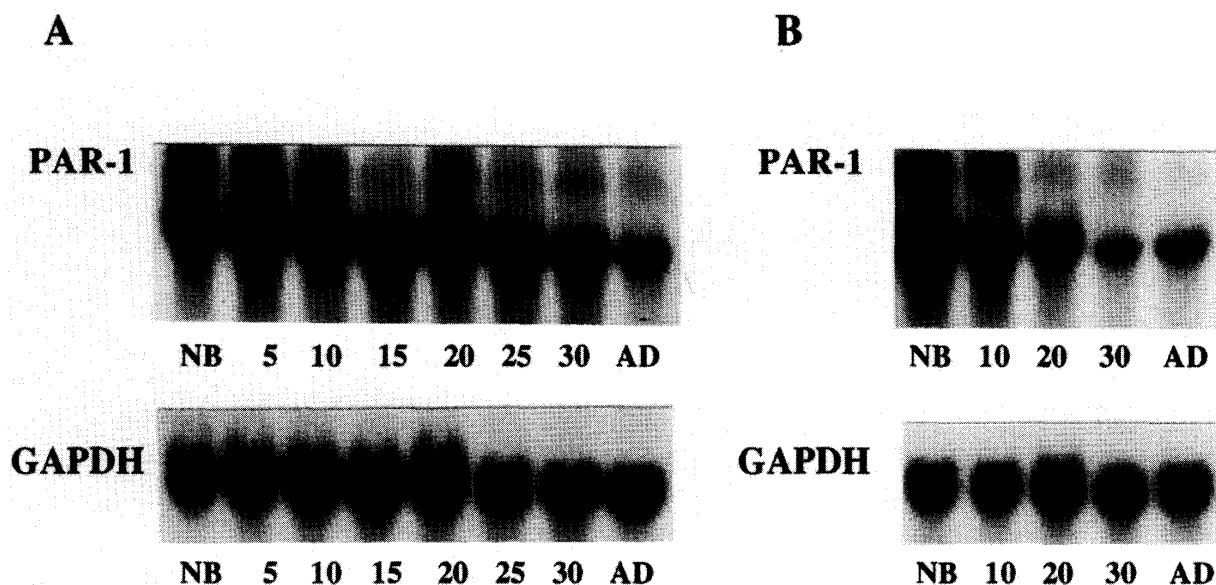


図1 ラット大脳, 小脳におけるPAR-1の発現

各生後日数において, ラットの大脳半球と小脳から, 超遠心法にて全RNA分画を回収し, 各レーン20 μ gの全RNAを用いてノザンブロットを行なった。

A:大脳, B:小脳, NB; newborn, AD; 成獣, PAR-1; protease-activated receptor-1, GAPDH; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

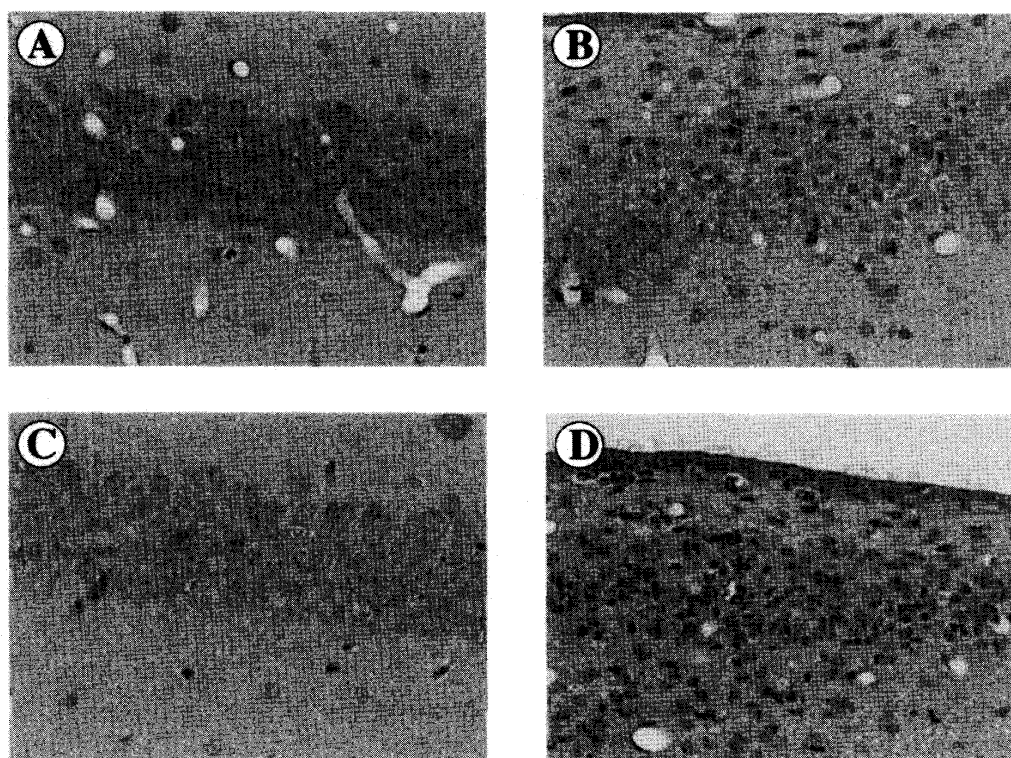


図2 低酸素性虚血性脳障害に対するPAR-1活性化の影響

日齢7の幼若ラット脳室内へ, PAR-1の人工リガンドであるTRAPを投与し, その2時間後に左総頸動脈を結紮切離した。さらに2時間の回復時間を与えた後, 8%O₂によるRiceモデル低酸素虚血負荷を2時間与えた。負荷後7日目に海馬組織を含む冠状断切片を作製し, HE染色(×400倍)にて組織学的検討を行った。

A: sham処置群, B: 生食群, C: TRAP 0.5 μ g投与群, D: TRAP 50 μ g投与群

れなど明らかではなかったが, TRAP小量投与群(0.5 μ g)に比べて, 生食群, TRAP大量投与群のCA1領域における神経細胞層の細胞密度の減少を認めた。海

馬CA1領域の強拡大(×400倍)では, 生食群では神経細胞の崩壊像と配列の乱れ, 細胞密度の減少を認めた(図2B)。TRAP大量投与群では生食群同様に神経

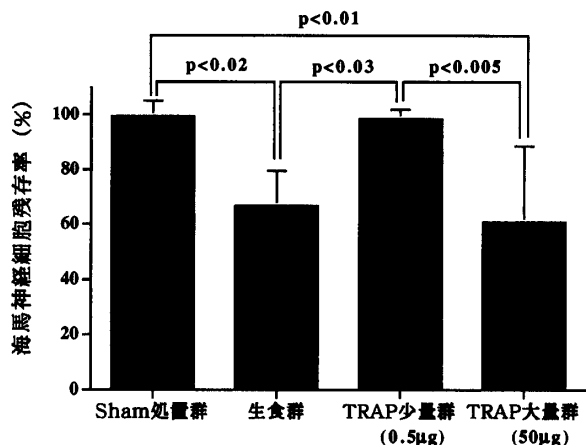


図3 低酸素性虚血性脳障害に対するPAR-1活性化の海馬神経細胞障害への影響

負荷後7日目の組織にて海馬CA1領域の連続する3視野を選定し、残存神経細胞数をカウントして、sham処置群に対する神経細胞残存率を算出した。各群5匹のラットにて検討し棒グラフに平均±1SDを示す。

細胞の崩壊像と配列の乱れ、組織の縮小、細胞密度の減少を認めた。また、核が濃縮、濃染した細胞も多数認めた (図2D)。TRAP 少量投与群では、sham処置群 (図2A) に比し明らかな変化は認められなかった (図2C)。

Sham処置群と比較した海馬CA1領域における神経細胞の残存率 (平均±1SD, n=5) は、生食群66.7±12.8% (p<0.02対sham処置群), TRAP少量投与群98.4±3.6%, TRAP大量投与群60.7±27.8%であった (p<0.01対sham処置群)。TRAP少量投与群ではほぼ完璧に細胞死を阻止したが (p<0.03対生食群), TRAP大量投与群では生食群と同等の細胞死を認め、TRAP少量投与群との間に有意差を認めた (P<0.005対TRAP少量投与群) (図3)。

2) アポトーシスの検出

海馬組織中のDNA ladderの確認では、生食群とTRAP大量投与群では明瞭な複数のDNA ladder bandsが認められ、逆にTRAP少量投与群ではsham処置群同様、DNA ladderは認められなかった (図4)。

抗single-stranded DNA抗体を用いた免疫染色では、生食群では小数の神経細胞に極弱く、TRAP大量投与群では強く染色された神経細胞を多数海馬組織に認めた。sham処置群およびTRAP少量投与群では、有意な染色性は認められなかった (図5)。

考 察

近年、プロテアーゼが受容体のN末膜外ドメインを修飾し、変化したN末部分が受容体自身の活性化をも

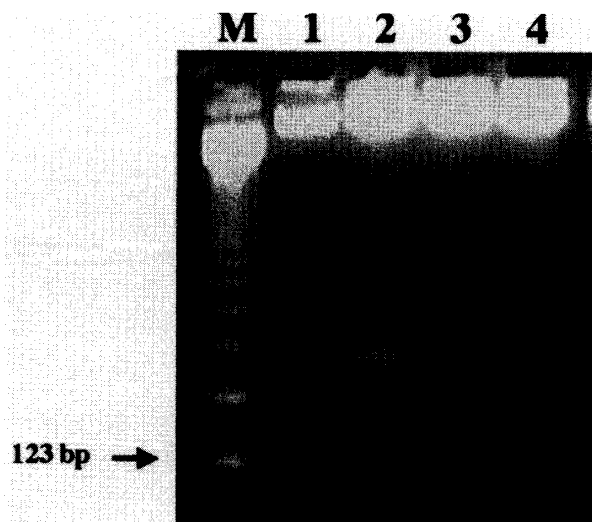


図4 アポトーシス現象に対するPAR-1活性化の影響

負荷後7日目に同じ処置群3匹分の海馬組織を混合し、そのDNA分画を抽出回収し電気泳動処理した。

M: marker (123bpの倍数のladder), lane 1: sham処置群, lane 2: 生食群, lane 3: TRAP 0.5μg投与群, lane 4: TRAP 50μg投与群

たらすという特殊な活性化機構をもつ受容体群が注目を集めている⁸⁾。そのProtease-activated Receptors (PARs) familyの中でも、トロンビンを間接的リガンドとするPAR-1は、血小板凝集を誘導したり、皮膚の損傷修復を促進することが報告されている⁹⁾。In vivoの神経系においても、損傷させた末梢神経におけるプロトロンビンとその拮抗物質であるネキシン-1の発現増強が確認されたり²³⁾、マウス前脳虚血モデルの海馬組織におけるネキシン-1の遷延性発現増強が示されたり²⁴⁾、ヒト脳においてトロンビンが生理的に漏出してくる脳血管周囲にネキシン-1の発現が局在的に増強している²⁵⁾などの報告がなされている。このように、セリンプロテアーゼとそのインヒビターの相互バランス、そしてそのターゲットのひとつであるPAR-1の重要性が確認されるようになり¹⁾、発達期の脳においても、シナプス形成や髄鞘化、アポトーシスなどへの関与が示唆されている^{10, 17-20)}。

実際にPAR-1の発達期ラット脳における発現をノザンブロットにて解析したところ、大脳半球、小脳ともに、日齢0~10が最も発現が豊富であり、その後日齢20から成獣に向かって減少した。この変化は、グリア関連蛋白であるグリア線維性酸性蛋白 (GFAP) や髄鞘関連蛋白であるプロテオリピッド蛋白 (PLP)、ミエリン塩基性蛋白 (MBP) とは全く異なる傾向であった²⁶⁾。すなわち、PAR-1の発現ピークは、神経グリアの分化時期よりも早期の、増殖あるいは遊走時期に合

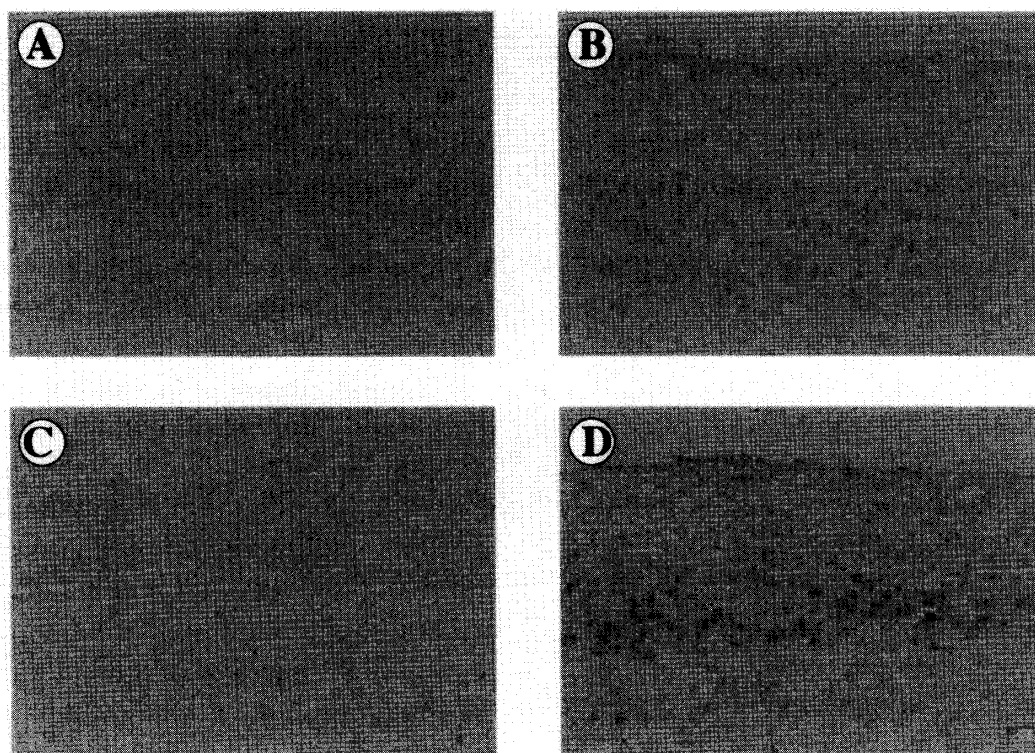


図5 アポトーシス現象に対するPAR-1活性化の影響

負荷後7日目の海馬組織に対して、抗single-stranded DNA抗体を用いた免疫組織化学染色を行なった(×400倍)。

A: sham処置群, B: 生食群, C: TRAP 0.5 μ g投与群, D: TRAP 50 μ g投与群

致していると思われる。

PAR-1の活性化が神経系細胞に及ぼす生理活性については、様々な報告がなされている¹⁾。それらをまとめると、PAR-1の活性化は神経系細胞の形態的な分化現象を阻害し^{12, 27)}、脱分化方向へ誘導し、障害への閾値を上昇させると考えられている¹¹⁾。培養神経細胞において、PAR-1活性化は低血糖や過酸化物質、 β -アミロイドに対する障害抵抗性を向上させる¹³⁾。しかし、この現象はリガンドであるトロンビンやTRAPのdoseに依存しており、より高濃度の投与実験ではアポトーシスを誘導することによって、逆に細胞障害性に作用することが報告されている^{10, 17-21)}。

我々の培養細胞を用いた研究から、PAR-1の活性化がグリア前駆細胞のオリゴデンドログリア方向への分化に強く影響を有することが示唆された(未発表)。このことは、幼若脳への障害発生時には、PAR-1の活性化により神経グリア細胞の障害閾値が上昇する反面、グリア前駆細胞の分化方向がよりアストログリア方向へ誘導され、結果的にオリゴデンドログリアへの分化障害、すなわち白質発達障害を惹起する可能性が考えられる。逆に、PAR-1の活性化抑制はグリア分化現象を促進する可能性があり、結果として脳障害への閾値を低下させることが示唆される。

生体の神経系への応用については、その投与経路と投与量が問題となる。PAR-1は血管内皮細胞や血小板に豊富に発現しているため、経静脈的投与は不適當である。実験段階では、モデル動物の脳実質(海馬、線条体)への直接注入、あるいは脳室系への注入がなされている。トロンビンをラット尾状核へ直接持続注入した報告では、トロンビンは炎症反応を惹起し、反応性グリオシスを誘導した²⁸⁾。Xiらは、尾状核へのトロンビン直接注入による脳浮腫が、少量のトロンビン注入による前処置後に軽減することを報告している²⁹⁾。また、トロンビンの前処置により、線条体の虚血病巣が縮小することも報告している³⁰⁾。Strigrowらは、Mongolian gerbilsの虚血負荷前の脳室内へトロンビンを注入することで、海馬神経細胞障害を軽減することが可能であるが、高濃度のトロンビンでは逆に障害を助長することを示した¹⁶⁾。しかし、幼若動物での検討やTRAPを脳室系へ注入した報告は未だなされていない。

そこで我々は、ラットの発達期脳における低酸素虚血脳障害モデルにおいて、TRAPを用いたPAR-1活性化による障害防護効果につき検討した。TRAP注入による神経細胞防護の作用機序の検討のため、遅発性神経細胞死の主要機序であるアポトーシス現象を、低

酸素虚血負荷後7日目(生後14日目)の脳組織を用いて解析した。また、TRAPの脳室内投与量を、TRAP少量投与群(0.5 μ g)とTRAP大量投与群(50 μ g)の2種類試行して、その効果を比較した。その結果、海馬CA1神経細胞の残存率では、TRAP少量投与群ではほぼ完璧に細胞死を阻止したが、TRAP大量投与群では生食群と同等の細胞死を誘導した。また、中等量のTRAP 5.0 μ gの脳室内投与も試行したが、結果のばらつきが大きく、検討から除外した。

海馬組織中のDNA ladderの解析では、生食群とTRAP大量投与群では明瞭なDNA ladder bandsが認められ、一方TRAP少量投与群ではsham処置群同様、DNA ladderは認められなかった。また、アポトーシスにより出現してくるsingle-stranded DNAに対する免疫染色によっても、生食群とTRAP大量投与群では明瞭な染色性を海馬領域に認めたが、TRAP少量投与群とsham処置群では認めなかった。

これらの結果より、TRAP少量投与による適切なPAR-1活性化は、アポトーシス現象を抑制することで遅発性神経細胞死を減少させ、脳保護的に作用することが示唆された。また、TRAP大量投与による不適切に過剰なPAR-1活性化は、逆にアポトーシス現象を誘導して遅発性神経細胞死を増加させることが明らかとなった。この投与量の違いによる2面性の効果は、培養細胞を用いた研究^{10, 21)}やラット脳室内投与の研究¹⁶⁾でも報告されており、興味深いところである。最近ではこの2面性の説明として、PAR-1の持続的活性化による時間的な差異、あるいは受容体活性化後の細胞質内second signal系が全く異なっているという報告もある¹⁴⁾。また、この神経防護作用は、in vitroの研究で明らかとなったように、神経細胞の分化を一時的に抑制することで、障害への閾値を上昇させているものと考えられる。従って、生後のどの時期においても観察される効果ではないであろう。ラットの日齢7はヒトにおける満期(40週)に相当することから、発達期神経系のアポトーシス現象を体外からのTRAP投与により調節する試みは、新生児の低酸素性虚血性脳障害の治療戦略において、therapeutic windowを得ることを可能にするものと期待される。

謝 辞

この研究は文部科学省科学研究費補助金(第13671137号)の援助を受けたものである。

文 献

- (1) Turgeon, V.L., Houenou, L.J.: The role of thrombin-like (serine) proteases in the development, plasticity and pathology of the nervous system. *Brain Res.* 25:85-95, 1997.
- (2) Weinstein, J.R., Gold, S.J., Cunningham, D.D., Gall, C.M.: Cellular localization of thrombin receptor mRNA in rat brain: expression by mesencephalic dopaminergic neurons and codistribution with prothrombin mRNA. *J. Neurosci.* 15:2906-2919, 1995.
- (3) Grand, R.J.A., Turnell, A.S., Grabham, P.W.: Cellular consequences of thrombin-receptor activation. *Biochem. J.* 313:353-368, 1996.
- (4) Citron, B.A., Smirnova, I.V., Arnold, P.M., Festoff, B.W.: Upregulation of neurotoxic serine proteases, prothrombin, and protease-activated receptor-1 early after spinal cord injury. *J. Neurotrauma* 17:1191-1203, 2000.
- (5) Vu, T-K.H., Hung, D.T., Wheaton, V.I., Coughlin, S.R.: Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 64:1057-1068, 1991.
- (6) Bahou, W.F., Coller, B.S., Potter, C.L., Norton, K.J., Kutok, J.L., Goligorsky, M.S.: The thrombin receptor extracellular domain contains sites crucial for peptide ligand-induced activation. *J. Clin. Invest.* 91:1405-1413, 1993.
- (7) Chen, J., Ishii, M., Wang, L., Ishii, K., Coughlin, S.R.: Thrombin receptor activation. *J. Biol. Chem.* 269:16041-16045, 1994.
- (8) Dery, O., Corvera, C.U., Steinhoff, M., Bunnett, N.W.: Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am. J. Physiol.* 274:C1429-1452, 1998.
- (9) Stiernberg, J., Redin, W.R., Warner, E.S., Carney, D.H.: The role of thrombin and thrombin receptor activating peptide (TRAP-508) in initiation of tissue repair. *Thromb. Haemostas.* 70:158-162, 1993.
- (10) Debeir, T., Benavides, J., Vige, X.: Dual effects of thrombin and a 14-amino acid peptide agonist of the thrombin receptor on septal cholinergic neurons. *Brain Res.* 708:159-166, 1996.
- (11) Nelson, R.B., Siman, R.: Thrombin and its

- inhibitors regulate morphological and biochemical differentiation of astrocytes in vitro. *Dev. Brain Res.* 54:93-104, 1990.
- (12) Suidan, H.S., Stone, S.R., Hemmings, B.A., Monard, D.: Thrombin causes neurite retraction in neuronal cells through activation of cell surface receptors. *Neuron* 8:363-375, 1992.
 - (13) Vaughan, P.J., Pike, C.J., Cotman, C.W., Cunningham, D.D.: Thrombin receptor activation protects neurons and astrocytes from cell death produced by environmental insults. *J. Neurosci.* 15:5389-5401, 1995.
 - (14) Donovan, F.M., Cunningham, D.D.: Signaling pathways involved in thrombin-induced cell protection. *J. Biol. Chem.* 273:12746-12752, 1998.
 - (15) Gingrich, M.B., Junge, C.E., Lyuboslavsky, P., Traynelis, S.F.: Potentiation of NMDA receptor function by the serine protease thrombin. *J. Neurosci.* 20:4582-4595, 2000.
 - (16) Strigrow, F., Riek, M., Breder, J., Henrich-Noack, P., Reymann, K.G., Reiser, G.: The protease thrombin is an endogenous mediator of hippocampal neuroprotection against ischemia at low concentration but causes degeneration at high concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:2264-2269, 2000.
 - (17) Donovan, F. M., Pike, C. J., Cotman, C. W., Cunningham, D.D.: Thrombin induces apoptosis in cultured neurons and astrocytes via a pathway requiring tyrosine kinase and RhoA activities. *J. Neurosci.* 17:5316-5326, 1997.
 - (18) Turgeon, V. L., Lloyd, E.D., Wang, S., Festoff, B.W., Houenou, L.J.: Thrombin perturbs neurite outgrowth and induces apoptotic cell death in enriched chick spinal motoneuron cultures through caspase activation. *J. Neurosci.* 18: 6882-6891, 1998.
 - (19) Smirnova, I.V., Zhang, S.X., Citron, B.A., Arnold, P.M., Festoff, B.W.: Thrombin is an extracellular signal that activates intracellular death proteases pathway inducing apoptosis in model motor neurons. *J. Neurobiol.* 36:64-80, 1998.
 - (20) Turgeon, V.L., Milligan, C.E., Houenou, L.J.: Activation of the protease-activated thrombin receptor (PAR-1) induces motoneuron degeneration in the developing avian embryo. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58:499-504, 1999.
 - (21) Sarker, K.P., Abeyama, K., Nishi, J., Nakata, M., Tokioka, T., Nakajima, T., Kitajima, I., Maruyama, I.: Inhibition of thrombin-induced neuronal cell death by recombinant thrombomodulin and E5510, a synthetic thrombin receptor signaling inhibitor. *Thromb. Haemost.* 82:1071-1077, 1999.
 - (22) Strigrow, F., Riek-Burchardt, M., Kiesel, A., Schmidt, W., Henrich-Noack, P., Breder, J., Krug, M., Reymann, K.G., Reiser, G.: Four different types of protease-activated receptors are widely expressed in the brain and are up-regulated in hippocampus by severe ischemia. *Eur. J. Neurosci.* 14:595-608, 2001.
 - (23) Smirnova, I. V., Ma, J.Y., Citron, B.A., Ratzlaff, K.T., Gregory, E.J., Akaaboune, M., Festoff, B.W.: Neural thrombin and protease nexin I kinetics after murine peripheral nerve injury. *J. Neurochem.* 67:2188-2199, 1996.
 - (24) Hoffmann, M.C., Nitsch, C., Scotti, A.L., Reinhard, E., Monard, D.: The prolonged presence of glia-derived nexin, an endogenous protease inhibitor, in the hippocampus after ischemia-induced delayed neuronal death. *Neuroscience* 49:397-408, 1992.
 - (25) Choi, B.H., Suzuki, M., Kim, T., Wagner, S.L., Cunningham, D.D.: Protease nexin-1: localization in the human brain suggests a protective role against extravasated serine proteases. *Am. J. Pathol.* 137:741-747, 1990.
 - (26) Tsuneishi, S., Takada, S., Motoike, T., Ohashi, T., Sano, K., Nakamura, H.: Effects of dexamethasone on the expression of myelin basic protein, proteolipid protein, and glial fibrillary acidic protein genes in developing rat brain. *Dev. Brain Res.* 117-123, 1991.
 - (27) Grabham, P., Cunningham, D.D.: Thrombin receptor activation stimulates astrocyte proliferation and reversal of stellation by distinct pathways: involvement of tyrosine phosphorylation. *J. Neurochem.* 64:583-591, 1995.
 - (28) Nishino, A., Suzuki, M., Ohtani, H., Motogashi, O., Umezawa, K., Nagura, H., Yoshimoto, T.: Thrombin may contribute to the pathophysiology of central nervous system injury. *J. Neurotrauma* 10:167-179, 1993.

- (29) Xi, G., Keep, R.F., Hua, Y., Xiang, J., Hoff, J.T.: Attenuation of thrombin-induced brain edema by cerebral thrombin preconditioning. *Stroke* 30:1247-1255, 1999.
- (30) Masada, T., Xi, G., Hua, Y., Keep, R.F.: The effects of thrombin preconditioning on focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 867:173-179, 2000.

Effect of the Protease-activated Receptor-1 (PAR-1) Activation against the Hypoxic-ischemic Brain Damage in Developing Rat.

Naoki Hashimoto

Department of Pediatrics, Kobe University School of Medicine

(Director : Hajime Nakamura)

ABSTRACT

Protease-activated receptor-1 (PAR-1) is a key structure in the balance between serine proteases and its inhibitors, and plays an important role in development and plasticity of the developing brain. A unique artificial peptide, TRAP (thrombin receptor activating peptide), which has an amino acid sequence of SFLLRN, can directly activate PAR-1. *In vitro* TRAP transiently depressed the neuronal and glial cell differentiation, and raised the thresholds against the various insults. We investigated the usefulness of TRAP to prevent neuronal cells from the hypoxic-ischemic (HI) insult in the developing rats.

7-day old (P7) Sprague-Dawley rats were introduced to the HI loading by the combination of left common carotid artery ligation and the exposure to 8% O₂ for 2 hrs. Low dose TRAP (0.5 μ g) administration intracerebro-ventricularly at 2 hours before HI insult rescued the CA1 hippocampal nerve cells significantly at P14. High dose TRAP (50 μ g) did not rescue but worsened the viability of CA1 nerve cells in contrast. Both the saline and TRA P-50 μ g groups showed clear DNA ladder formation and positive immunostaining against single-stranded DNA in their hippocampal tissue, suggesting the significant presence of apoptotic nerve cell death.

Adequate activation of PAR-1 using TRAP can inhibit the nerve cell loss against the HI insult in the developing rat brain. This effect is in part dependent on anti-apoptotic function of PAR-1 activation.