

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：34311

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830057

研究課題名(和文) 記憶形成における樹状突起発達を制御する新たな因子の探求

研究課題名(英文) The role of alpha2-antiplasmin in memory formation and dendritic growth

研究代表者

河下 映里 (KAWASHITA, Eri)

同志社女子大学・薬学部・助教

研究者番号：80509266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、 α 2-Antiplasmin (α 2AP)が空間記憶、情動記憶、運動学習に関与していることを明らかにした。また、海馬由来神経細胞において、外因性 α 2APが微小管結合タンパク質であるMAP2の発現を誘導し、樹状突起の伸長及び分岐を誘導することを見出した。また、 α 2APによる樹状突起の伸長及び分岐にp38 MAPKの活性化が関与していることを明らかにした。以上より、 α 2APは樹状突起の伸長及び分岐を制御し、記憶形成において重要な因子である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found that α 2-Antiplasmin (α 2AP) is a crucial mediator of cognitive function. We also demonstrated that α 2AP induces dendritic growth in hippocampal neurons through p38 MAPK activation, independent of plasmin.

研究分野：神経科学

キーワード： α 2-antiplasmin 記憶 樹状突起 神経細胞

1. 研究開始当初の背景

急速な高齢化社会を迎え、認知症患者の増大は社会的問題となっており、認知症治療薬の開発が強く望まれている。しかしながら、基盤研究となる記憶の形成機構や認知症の発症機構に関して、未だ不明な点が多く、その解明は神経科学における重要課題の一つである。

近年、血栓溶解系の制御因子として知られる組織型プラスミノゲンアクチベータ (tPA) が、シナプス伝達における NMDA (N-methyl-D-aspartate) 型グルタミン酸受容体の機能を制御していることが明らかにされ、線維素溶解系因子の中樞神経機能における役割が注目されている。一方、血栓溶解酵素であるプラスミンの生理的阻害剤である $\alpha 2$ アンチプラスミン ($\alpha 2AP$) は、脳の海馬領域において顕著に発現していることが判明しているものの、 $\alpha 2AP$ の海馬神経の機能制御に関しては全く明らかにされていない。

申請者らは、先駆けて $\alpha 2AP$ がリガンドとして筋線維芽細胞に作用し、プラスミンを介さない経路で分化を誘導することを明らかにした。このことは、 $\alpha 2AP$ がプラスミン依存的あるいは非依存的という2面的な作用によって細胞機能を制御していることを示唆している。

2. 研究の目的

(1) 海馬神経細胞の成熟過程における樹状突起の発達に対する $\alpha 2AP$ の役割を明らかにする。

(2) $\alpha 2AP$ による樹状突起発達の分子機構を解明する。

(3) 記憶形成における $\alpha 2AP$ の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 神経細胞の成熟過程における樹状突起の発達に対する $\alpha 2AP$ の役割の解明

$\alpha 2AP$ 欠損マウス及び野生型マウスの海馬由来神経細胞について、樹状突起の発達に必要な分子であり、樹状突起マーカーである microtubule associated protein 2 (MAP2) の発現量を解析した。また樹状突起の長さと同様に、樹状突起の長さと同様に、 $\alpha 2AP$ の添加により、この影響が消失するかどうかについて解析した。

(2) $\alpha 2AP$ による樹状突起発達の分子機構の解明

$\alpha 2AP$ による樹状突起発達にプラスミンが介在しているかどうかを明らかにするため、

プラスミンの前駆体であるプラスミノゲン (Plg) 欠損マウス由来神経細胞において、 $\alpha 2AP$ を添加することによる樹状突起の長さと同様に、樹状突起の長さと同様に、関与するシグナル伝達分子を明らかにするため、シグナル伝達阻害剤を用いた薬理的解析を行った。

(3) 記憶形成における $\alpha 2AP$ の役割の解明

$\alpha 2AP$ 欠損マウス及び野生型マウスについて、行動学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) 神経細胞の成熟過程における樹状突起の発達に対する $\alpha 2AP$ の役割の解明

$\alpha 2AP$ 欠損マウス (+/+) 及び野生型マウス (-/-) の海馬由来神経細胞を 2、4、7 日間培養し、MAP2 の細胞内タンパク質発現量を解析した。2 日目及び 4 日目において、 $\alpha 2AP$ 欠損マウス由来神経細胞における MAP2 発現量が、野生型マウス由来神経細胞と比較して、有意に減少していた。7 日目においては、両者間でほとんど差が認められなかった (図 1)。

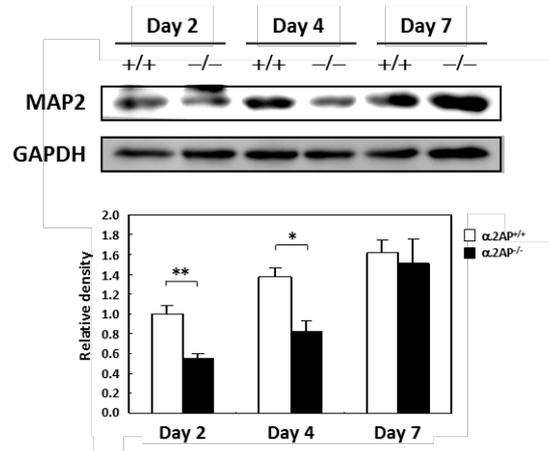


図 1 $\alpha 2AP$ 欠損の MAP2 発現量に対する影響

次に、同様に培養した $\alpha 2AP$ 欠損マウス及び野生型マウスの海馬由来神経細胞について、MAP2 に対する抗体を用いて細胞免疫染色を行い、樹状突起の形態を観察した。2 日目及び 4 日目において、 $\alpha 2AP$ 欠損マウス由来神経細胞における樹状突起の長さが、野生型マウス由来神経細胞と比較して、有意に短くなっていた。一方、7 日目においては、両者間で顕著な差は認められなかった。さらに、樹状突起の分岐数を比較した結果、2 日目、4 日目及び 7 日目において、 $\alpha 2AP$ 欠損マウス由来神経細胞における樹状突起の分岐数が、野生型マウス由来神経細胞と比較して、減少していた (図 2)。

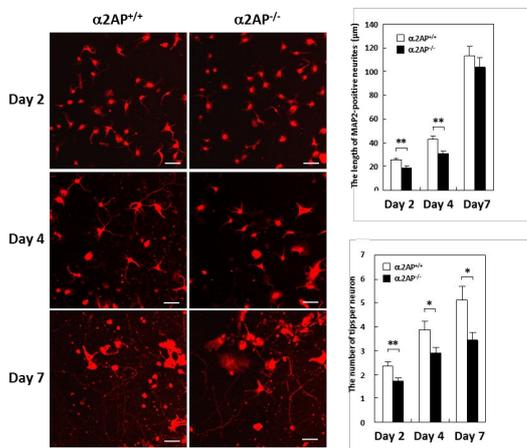


図2 α2AP 欠損の樹状突起の長さ及び分岐数に対する影響

さらに、両マウスの海馬由来神経細胞に対し、α2AP を添加することによる MAP2 発現量及び樹状突起の発達に対する影響を解析した。

野生型マウス由来神経細胞において、α2AP は細胞内 MAP2 タンパク質発現量を増大させた(図 3A)。また、α2AP 欠損マウス由来神経細胞において減少していた MAP2 発現量は、α2AP の添加により部分的に回復した(図 3B)。樹状突起の形態について、α2AP の添加により、樹状突起の伸長が誘導された(図 3C)。

以上より、α2AP が MAP2 の発現量の増大と、それに伴う樹状突起の発達誘導に関与することが示唆された。

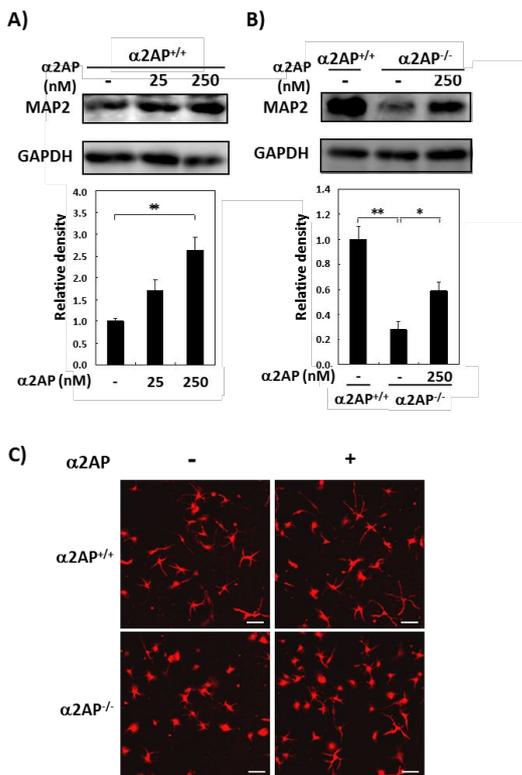


図3 α2AP 添加による MAP2 発現及び樹状突起の発達に対する影響

(2) α2AP による樹状突起発達の分子機構の解明

プラスミノーゲン欠損マウス由来神経細胞 (Plg^{-/-}) において、α2AP の添加による樹状突起の発達への影響を解析した。プラスミンが生成されないにも関わらず、α2AP が MAP2 の発現量を増大させ(図 4A)、樹状突起の伸長を誘導したことから(図 4B)、α2AP はプラスミンを介さない経路で樹状突起の発達を誘導することが明らかとなった。

また、α2AP による MAP2 発現量の増大と樹状突起の発達誘導は、p38 MAPK 阻害剤 (SB203580) 存在下で抑制され(各々図 5A、図 5B)、α2AP による樹状突起の発達誘導に p38 MAPK が関与していることが示された。

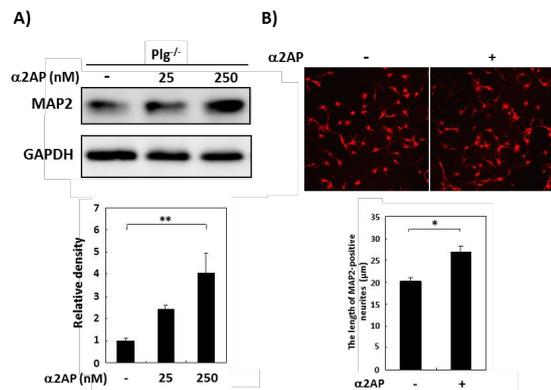


図4 Plg 欠損マウス由来神経細胞における α2AP 添加による MAP2 発現及び樹状突起の発達への影響

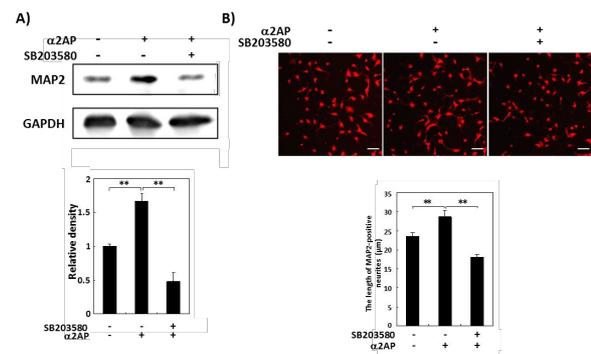


図5 α2AP による MAP2 発現及び樹状突起の発達に対する p38 MAPK 阻害剤の影響

(3) 記憶形成における α2AP の役割の解明

α2AP 欠損マウス及び野生型マウスについて、ワーキングメモリーを評価する Y-maze 試験(図 6A)、空間学習記憶を評価する Morris water maze 試験(図 6B)、情動記憶を評価する恐怖条件付け試験(図 6C)を行った。すべての試験において、α2AP 欠損マウスの記憶学習能力が、野生型マウスと比較して顕著に低下しており、α2AP が記憶形成において重要な因子であることが示唆された。

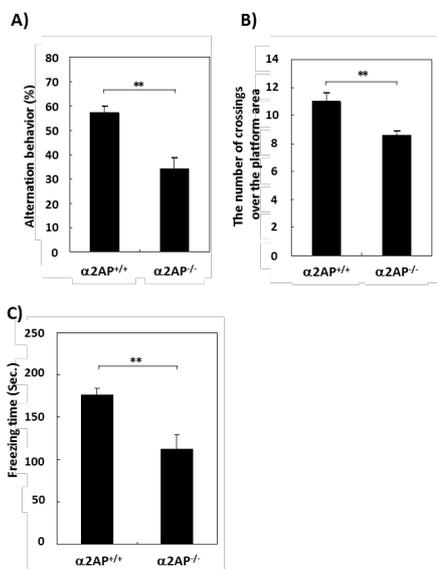


図 6 $\alpha 2AP$ 欠損による記憶学習能力に対する影響

本研究のさらなる研究展開により、神経細胞の成熟過程における樹状突起発達、あるいは海馬依存性記憶における神経可塑性の制御に関して、 $\alpha 2AP$ が介在する新たな分子機構の解明が期待される。また、加齢に伴う認知症において樹状突起の複雑性低下が認められることから、本研究で得られる成果は、認知症の新しい治療戦略へのアプローチにつながると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Kawashita E, Kanno Y, Ikeda K, Kuretake H, Matsuo O, Matsuno H
Altered behavior in mice with deletion of the alpha2-antiplasmin gene
PLoS One 9: e97947 (2014) 査読あり
doi: 10.1371/journal.pone.0097947.

Kawashita E, Kanno Y, Ikeda K, Kuretake H, Matsuo O, Matsuno H
Involvement of $\alpha 2$ -antiplasmin in dendritic growth of hippocampal neurons
J. Neurochem. 126: 58-69 (2013) 査読あり
doi: 10.1111/jnc.12281.

〔学会発表〕(計4件)

池田夏菜子、河下映里、菅野陽介、呉竹宏美、土田佳穂、松尾理
脳老化における $\alpha 2$ -antiplasmin 及び plasminogen/plasmin の関与 (2015/03/27)
日本薬学会第135年会
兵庫医療大学(兵庫県神戸市)
(ポスター発表)

池田夏菜子、菅野陽介、呉竹宏美、河下映里

$\alpha 2$ -antiplasmin の記憶形成及び加齢性認知症への関与 (2014/10/17)
第64回日本薬学会近畿支部総会・大会
京都薬科大学(京都府京都市)
(ポスター発表)

河下映里

中枢神経機能における $\alpha 2$ -antiplasmin の役割 (2014/08/29) 生体機能と創薬シンポジウム
近畿大学(大阪府東大阪市)
(招待講演・シンポジウム)

Eri Kawashita, Yosuke Kanno, Haruka Asayama, Kiyotaka Okada, Shigeru Ueshima, Hiroshi Kaji, Osamu Matsuo, Hiroyuki Matsuno
 $\alpha 2$ -antiplasmin is a potential regulator of neuronal morphology (2013/07/01)
XX Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis
Amsterdam (Holland)
(口頭発表)

〔その他〕

ホームページ等

http://research-db.dwc.doshisha.ac.jp/rd/html/japanese/researchersHtml/3039/3039_Researcher.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

河下 映里 (KAWASHITA, Eri)
同志社女子大学・薬学部・特別任用助教
研究者番号: 80509266

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし