

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790068

研究課題名(和文) てんかん発作感受性遺伝子MMPの機能的役割と発現機構の網羅的解析

研究課題名(英文) Comprehensive research of MMP gene in an animal model of epileptic seizure

研究代表者：

溝口 博之 (MIZOGUCHI HIROYUKI)

名古屋大学・環境医学研究所・助教

研究者番号：70402568

研究成果の概要(和文)：

本研究では、ペンチレンテトラゾール (pentylenetetrazole: PTZ) 連続投与によりキンドリングを形成したマウスの海馬におけるマトリックスメタロプロテアーゼ-9 (matrix metalloproteinase-9: MMP-9) の動態と機能解析について検討した。PTZ の連続投与はキンドリング形成に伴った MMP-9 の発現増加と活性化を引き起こした。キンドリングマウスで認められる MMP-9 の活性化は痙攣誘発因子である brain-derived neurotrophic factor (BDNF) の mature 化を引き起こすことで、キンドリングの形成を導く可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

In the present study, we investigated the role of matrix metalloproteinase (MMP)-9 in the development of pentylenetetrazole (PTZ)-induced kindled seizure in mice. Repeated treatment with PTZ (40 mg/kg) produced kindled seizure, which was accompanied by enhanced MMP-9 activity and expression in the hippocampus. No change in MMP-9 activity was observed in the hippocampi of mice with generalized tonic seizure following single administration of PTZ (60 mg/kg). MMP-9 colocalized with the neuronal marker NeuN and the glial marker GFAP in the dentate gyrus of the kindled mouse hippocampus. Coadministration of diazepam or MK-801 with PTZ inhibited the development of kindling and the increased MMP-9 levels in the hippocampus. Marked suppression of kindled seizure progression in response to repeated PTZ treatment was observed in MMP-9^(-/-) mice compared with wild-type mice, an observation that was accompanied by decreased hippocampal levels of mature brain-derived neurotrophic factor (BDNF) despite similar BDNF mRNA levels. These findings suggest that MMP-9 is involved in progression of behavioral phenotypes in kindled mice owing to conversion of pro-BDNF to mature BDNF in the hippocampus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：MMP、BDNF、てんかん、キンドリリング、海馬

1. 研究開始当初の背景

てんかんは中枢神経系の疾患の中で最も罹患率が高い疾患の一つである。米国の疫学調査によれば、生涯に1回でもてんかん発作を経験するヒトは人口の約10%、2回以上経験するヒトは約4%、頻回に経験し治療を要するてんかん患者はおよそ1%であることが示されている。日本においても100万人以上のてんかん患者がいるといわれている。また、てんかん患者の中には、抗てんかん薬による薬物治療に抵抗性を示し、統合失調症に類似した幻覚・妄想、躁うつ病、学習記憶障害などのてんかん性精神病を示す症例もある（難治性てんかん）。てんかん性精神病の治療目的で使用する抗精神病薬や抗うつ薬は、てんかん症状を悪化させることが臨床報告されている。このような背景の下、てんかん発作の抑制を目的とした治療薬剤の開発や外科的治療が進んできたが、多くの場合は未だ根本的な治療法がなく、抗てんかん薬を長期服用する対症療法に頼らざるを得ないのが現状である。それゆえ、てんかんの発症機構解明とその新規治療法開発に向けて、さらなる研究が望まれている。

近年てんかんの基礎研究において分子生物学的な研究手法が導入され、てんかん発作には海馬における顆粒細胞の異常分裂や苔状繊維の異常発芽など、シナプスの異常な可塑性や再構築が関与することが明らかとなっている。本研究において注目したマトリックスメタロプロテアーゼ（matrix metalloproteinase: MMP）は、ラミニン・コラーゲン等の細胞外マトリックス（extracellular matrix: ECM）を分解する亜鉛要求性プロテアーゼ群の総称名であり、現在までに23種類以上のMMPが報告されている。MMPの一種であるgelatinase（MMP-2およびMMP-9）によるECMの分解は、組織や臓器の形成過程で認められており、MMP-2およびMMP-9の活性変化は個体に重要な影響を及ぼすことが知られている。

神経系においても、MMPは神経突起の伸長や発達期における神経細胞の移動に重要な役割を果たすことが知られている。また、脳

虚血、アルツハイマー病、薬物依存症などのモデル動物を用いた基礎研究において、MMPのタンパク発現や活性は増大することが示されており、MMPの活性化は、神経毒性として働くことで多様な中枢神経疾患の発症に関与している可能性が報告されている。

2. 研究の目的

我々は、マウスに単回投与ではけいれん発作を誘発しないような低用量のペンチレンテトラゾール（PTZ, 40 mg/kg）を2日に1回投与し、発作の程度が次第に増悪して最終的には強直性痙攣が認められるまで連続投与（キンドリリング）したマウスの脳部位（前頭皮質、海馬）において、MMP-9のmRNAレベルおよび活性が増加することを明らかにした。また、行動薬理的検討により、MMP-9遺伝子欠損マウス [MMP-9(-/-)] では、キンドリリング形成が有意に低下し、MMP-9はてんかん脆弱性遺伝子の一つである可能性を突き止めた。

本研究課題では、『てんかんの発症には、神経突起の進展作用などを有するMMPによる異常なシナプス可塑性が関与している』との仮説をもとに、てんかんの発症機構解明と新規治療法開発に向けて、行動薬理的および神経化学的手法を用いて検証を試みた。

3. 研究の方法

実験には、8週齢の雄性ICR系マウス、9-14週齢のMMP-9遺伝子欠損 [MMP-9(-/-)] マウスを用いた。ペンチレンテトラゾール（pentylentetrazole: PTZ）（30-60 mg/kg, i.p.）を単回あるいは48時間間隔で7-11回連続投与した。また、PTZ最終投与2-24時間後の海馬におけるMMP-2およびMMP-9の活性ならびにタンパクレベルはgel zymography法およびwestern blotting法により測定した。海馬におけるMMP-9の活性およびタンパクの局在を*in situ* zymography法および免疫組織染色法により検討した。尚、本実験は名古屋大学動物実験委員会より承認を受け、倫理的配慮のもとで行った。

4. 研究成果

- (1) PTZ を連続投与したキンドリングマウスの海馬において、MMP-9 の活性化および発現の増加が認められた。その発現は、神経細胞、グリア細胞由来であった。
- (2) PTZ を連続投与すると海馬内 BDNF の mRNA およびタンパク発現が増加することが示されたが、laminin、neuronal cell adhesion molecule、beta-dystroglycan の発現に変化は認められなかった。
- (3) 野生型マウスに PTZ を連続投与すると海馬における mature 型 BDNF タンパクの発現が増加したが、MMP-9(-/-) マウスでは認められなかった。
- (4) キンドリングマウスの海馬脳において苔状線維の異常発芽が認められた。この異常発芽は MMP-9(-/-) マウスの海馬脳では認められなかった。
- (5) MMP-9(-/-) マウスは野生型マウスと比較して、学習障害および情動障害が認められた。
- (6) 野生型マウスにおけるPTZ 誘発キンドリングの形成は、BDNF scavenger を脳室内に注入すると抑制された。PTZ 誘発キンドリングの形成に抵抗性を示す MMP-9(-/-) マウスの脳室内にBDNF scavenger を注入しても、PTZ 誘発キンドリングに対する相加的抑制効果は認められなかった。野生型マウスの海馬歯状回に pro-BDNF を微量注入すると、PTZ 誘発キンドリングの形成は増強された。MMP-9(-/-) マウスの海馬歯状回に pro-BDNF を微量注入すると、若干の増強は認められたが有意なものではなかった。
- (7) PTZの連続投与はMMPのmRNA発現の増加とヒストンH3のアセチル化を促すことが示された。この時、ヒストンアセチル化酵素、脱アセチル化酵素の活性に変化はなかった。また、DNA メチル化研究については今後の検討課題である。

以上の結果より、PTZ の連続投与はキンドリング形成に伴った MMP-9 の発現増加と活性化を引き起こした。キンドリングマ

ウスで認められる MMP-9 の活性化は痙攣誘発因子である BDNF の mature 化を引き起こし、苔状線維の異常発芽といった海馬脳の器質的変化を促すことで、キンドリングの形成を導く可能性が示唆された。すなわち、キンドリングの形成には、MMP や BDNF などのけいれん脆弱因子が密接に関与しており、一分子では同定できない複雑な発症機序が存在すると考えられる。今後更なるてんかん疾患克服に向けた基礎研究が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

Mizoguchi H, Ibi D, Takase F, Nagai T, Kamei H, Toth E, Sato J, Takuma K, Yamada K. Nicotine ameliorates impairment of working memory in methamphetamine-treated rats. *Behav Brain Res.* (2011) 220:159-163.

Mizoguchi H, Fukaya K, Mori R, Itoh M, Funakubo M, Sato J. Lowering barometric pressure aggravates depression-like behavior in rats. *Behav Brain Res.* (2011) 218:190-193.

Mizoguchi H, Ibi D, Takuma K, Toth E, Sato J, Itohara S, Nabeshima T, Yamada K. Alterations of emotional and cognitive behaviors in matrix metalloproteinase-2 and -9-deficient mice. *The Open Behav Sci J.* (2010) 4:19-25.

[学会発表] (計 2 件)

溝口博之、他 意思決定の行動学的解析：放射状迷路を用いた小動物用ギャンブルテスト 第118回日本薬理学会近畿部会 (2010年11月19日、大阪)

溝口博之、他 ラットを用いた意思決定の行動学的解析：放射状迷路を用いた小動物用ギャンブルテスト 第45回日本アルコール・薬物医学会、第22回日本アルコール精神医学会、第13回ニコチン・薬物依存研究フォーラム (2010年10月9日、福岡)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

溝口博之 (MIZOGUCHI HIROYUKI)

研究者番号：70402568

(2) 研究分担者

該当なし（ ）

研究者番号：

(3) 連携研究者

該当なし（ ）

研究者番号：