

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：34306

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18380

研究課題名（和文）加齢性認知症の治療戦略に向けた神経可塑性の新たな制御因子の役割

研究課題名（英文）A novel role of alpha2-antiplasmin in memory formation and age-related cognitive decline

研究代表者

河下 映里（KAWASHITA, ERI）

京都薬科大学・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） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、記憶形成過程や加齢性記憶学習能力の低下における 2アンチプラスミン（2AP）の役割を解明することを目的とした。2APが記憶の獲得および維持に関与していることや、2APにより制御される記憶形成機構に関与する分子を見出すことができた。さらに、加齢に伴う脳内における2AP量の増加が記憶学習能力の低下を引き起こしている可能性が示唆された。本研究で得られた成果は、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ている。

研究成果の概要（英文）：The goal of this study is to elucidate the roles of 2-antiplasmin in memory formation and age-related cognitive decline. We demonstrated that 2-antiplasmin is involved in memory formation and retention. We also found that the increased level of 2-antiplasmin might lead to age-related cognitive decline.

研究分野：神経薬理学

キーワード：2-antiplasmin 記憶 老化

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ーゲンアクチベータ (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、線維素溶解因子のプラスミンの生理的阻害因子である $\alpha 2$ アンチプラスミン ($\alpha 2$ AP) は、脳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、 $\alpha 2$ AP の中樞神経系の機能における役割についてはほとんど明らかではない。

申請者らは、これまでに $\alpha 2$ AP が神経細胞の樹状突起の発達に参与することを明らかにした。また、 $\alpha 2$ AP がプラスミン依存的あるいは非依存的という両面的な作用により、樹状突起の伸長を制御するという興味深い知見を得た。さらに、 $\alpha 2$ AP 欠損マウスを用いた行動試験により、 $\alpha 2$ AP 欠損により記憶学習能力が低下することも明らかにした。しかしながら、記憶形成時や加齢に伴う記憶学習能力の低下における $\alpha 2$ AP の役割は不明である。

2. 研究の目的

- (1) 記憶形成および保持における $\alpha 2$ AP の役割を解明する。
- (2) 加齢に伴う記憶学習能力の低下と $\alpha 2$ AP との関連性を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 記憶形成および保持における $\alpha 2$ AP の役割の解明

3ヶ月齢の C57BL/6J 系統マウスについて、Morris water maze 試験の訓練セッション1日目終了後、抗 $\alpha 2$ AP 中和抗体および $\alpha 2$ AP を脳室内に投与した。翌日の訓練セッション終了30分後、プローブ試験を行った。さらに、同マウスについて、1ヶ月あるいは3ヶ月後にもプローブ試験を行った。また、抗 $\alpha 2$ AP 中和抗体を側脳室に投与し、Y 迷路試験を行った。

- (2) 加齢に伴う記憶学習能力の低下と $\alpha 2$ AP との関連性

若齢(12週齢)および老齢(93-100週齢)の C57BL/6J 系統マウスの海馬、大脳皮質、

脳脊髄液および血中の $\alpha 2$ AP 量を western blotting および ELISA により解析した。さらに、脳内 $\alpha 2$ AP 発現量と短期作業記憶力との相関性を解析した。

一方、加齢による脳内炎症への $\alpha 2$ AP の関与を明確にするため、(12週齢)および老齢(60週齢)の野生型マウスおよび $\alpha 2$ AP 欠損マウスの海馬および大脳皮質における炎症性サイトカインの発現量を real-time PCR により解析した。

4. 研究成果

- (1) 記憶形成および保持における $\alpha 2$ AP の役割の解明

空間記憶学習能力の形成および維持における $\alpha 2$ AP の役割を明確にするため、抗 $\alpha 2$ AP 中和抗体を側脳室内に投与し、Morris water maze 試験を行った。プラットフォームまでの到達時間は、コントロール群と比較して、抗 $\alpha 2$ AP 中和抗体群において有意に短かった(図1A)。プローブ試験において、プラットフォームのあった場所を横切った回数を解析した結果、コントロール群では、時間の経過とともに、減少したが、抗 $\alpha 2$ AP 中和抗体群においては、その減少が抑制された(図1B)。

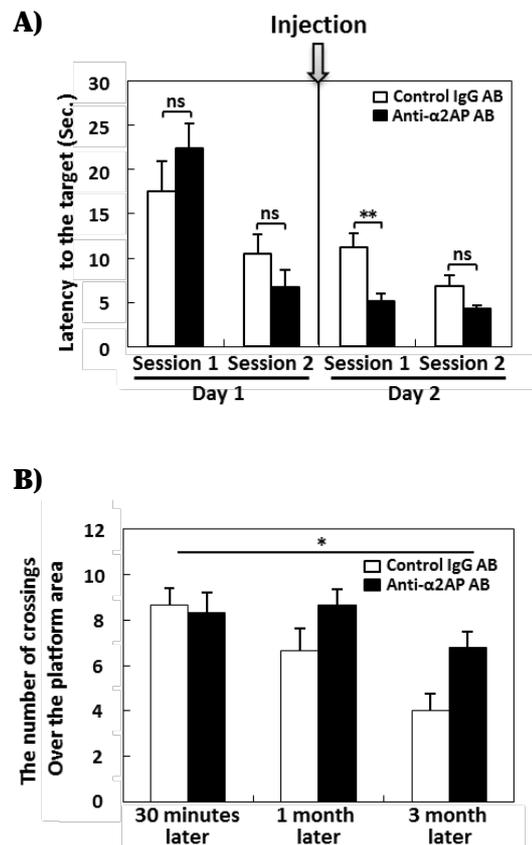


図1 抗 $\alpha 2$ AP 中和抗体脳室内投与による空間学習能力への影響

次に、 $\alpha 2AP$ を側脳室内に投与し、Morris water maze 試験を行った。訓練過程におけるプラットフォームまでの到達時間は、コントロール群と $\alpha 2AP$ 群間で顕著な差は認められなかった (図 2A)。プローブ試験におけるプラットフォームのあった場所を横切った回数は、コントロール群と比較して、 $\alpha 2AP$ 群では、時間の経過とともに有意に減少した (図 2B)。

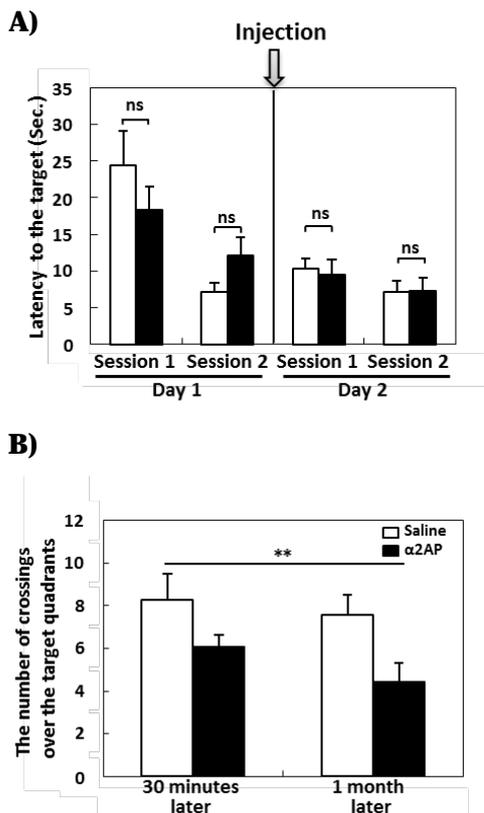


図 2 $\alpha 2AP$ の脳室内投与による空間学習能力への影響

さらに、短期作業記憶における $\alpha 2AP$ の役割を明確にするため、抗 $\alpha 2AP$ 中和抗体を側脳室内に投与し、Y-maze 試験を行った結果、抗 $\alpha 2AP$ 中和抗体投与により、交替行動率が有意に増加した (図 3)。

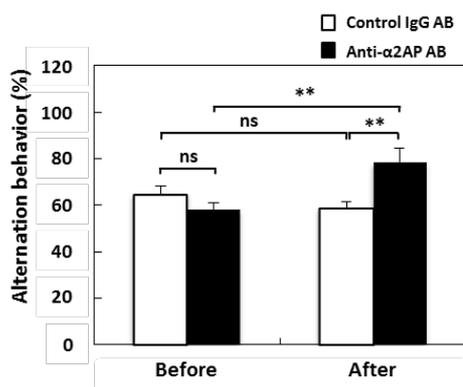


図 3 抗 $\alpha 2AP$ 中和抗体脳室内投与による短期作業記憶への影響

(2) 加齢に伴う記憶学習能力の低下と $\alpha 2AP$ との関連性

加齢に伴う脳内 $\alpha 2AP$ 量の変化を明確にするため、若齢および老齢の C57BL/6J 系統マウスの海馬および大脳皮質における $\alpha 2AP$ の発現量を western blotting により解析した。その結果、老齢マウスでは、若齢マウスと比較して $\alpha 2AP$ の発現量が有意に増加していた (図 4)。また、plasmin の発現量について、若齢マウスと老齢マウス間で顕著な差は認められなかった。さらに、血中および脳脊髄液中の $\alpha 2AP$ を ELISA により定量した。血液中の $\alpha 2AP$ 量については、若齢マウスと老齢マウス間で顕著な差は認められなかったが、脳脊髄液中の $\alpha 2AP$ 量は、老齢マウスにおいて若齢マウスと比較して有意に増加していた。

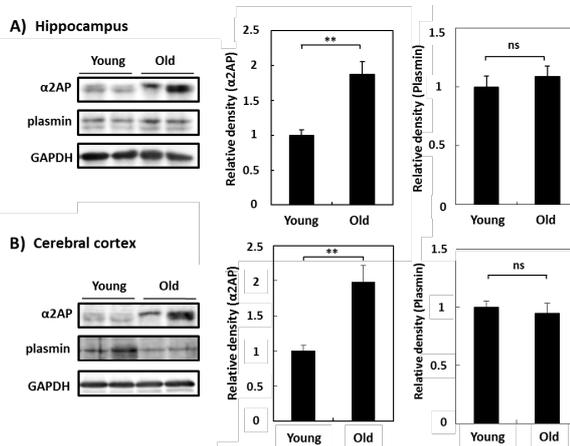


図 4 加齢による脳内 $\alpha 2AP$ 量の変動

次に、若齢および老齢マウスの海馬および大脳皮質における $\alpha 2AP$ 発現量と、Y-maze 試験における交替行動率との相関性を解析した結果、 $\alpha 2AP$ の発現量と短期作業記憶力に負の相関性がみられた (図 5)。

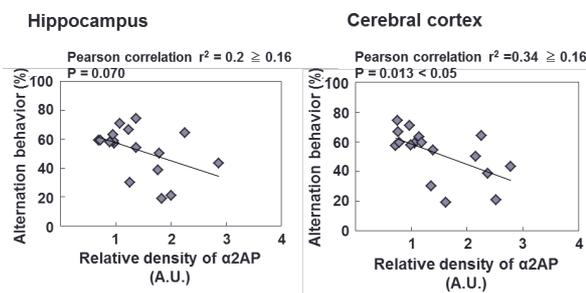


図 5 脳内 $\alpha 2AP$ 量と交替行動率の負の相関性

さらに、加齢による脳内炎症への $\alpha 2AP$ の関与を明確にするため、若齢および老齢の $\alpha 2AP$ 欠損マウスおよび野生型マウスの海馬および大脳皮質における IL-6 の発現量を解析した。大脳皮質では、加齢に伴う IL-6 発現量の増加は認められなかった。一

方、海馬における IL-6 の発現量は、若齢マウスと比較して老齢マウスにおいて増加しており、この増加は、 $\alpha 2AP$ 欠損マウスでは有意に抑制された (図 6)。

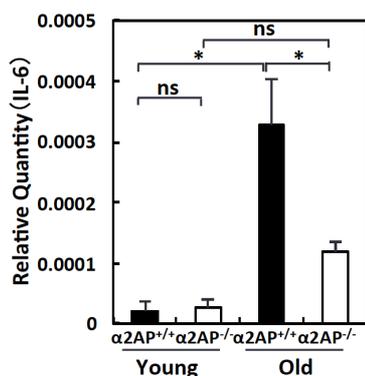


図 6 $\alpha 2AP$ 欠損および野生型マウスの海馬における IL-6 の発現解析

以前の我々の研究で、野生型マウスと比較して $2AP$ 欠損マウスにおける空間記憶学習能力が低下していることを明らかにした。しかしながら、本研究において、中和抗体を用いた $\alpha 2AP$ の機能抑制により、空間記憶の形成および保持能力は向上することが明らかとなった。「 $2AP$ 欠損による記憶学習能力の低下」と、「中和抗体を用いた $2AP$ の機能抑制による記憶力の向上」という相反する結果は、 $2AP$ が脳の発達過程と記憶形成過程において、神経回路形成と維持を綿密に制御するバランスとしての役割を担っている可能性を示唆している。さらに、加齢に伴い脳内 $2AP$ 量が増加することや、脳内 $2AP$ 量が短期作業記憶力と負の相関性を示すこと、加齢性の海馬における IL-6 の発現量の増加に $2AP$ が寄与していることから、脳老化やそれに起因する認知症の発症機構に $2AP$ が関与していると示唆される。本研究で得られた成果は、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)

- (1) Kuriyama N, Mizuno T, Yasuike H, Matsuno H, Kawashita E, Tamura A, Ozaki E, Matsui D, Watanabe I, Koyama T, Miyatani F, Kondo M, Tokuda T, Ohshima Y, Muranishi M, Akazawa K, Takada A, Takeda K, Matsumoto S, Mizuno S, Yamada K, Nakagawa M, Watanabe Y.
CD62-mediated activation of platelets in cerebral white matter lesions in patients with cognitive decline.
Arch. Gerontol. Geriatr. 62: 118-124. (2016)

査読有り

doi: 10.1016/j.archger.2015.09.001.

- (2) Kawashita E, Tsuji D, Kanno Y, Tsuchida K, Itoh K.
Enhancement by Uridine Diphosphate of Macrophage Inflammatory Protein-1 Alpha Production in Microglia Derived from Sandhoff Disease Model Mice.
JIMD Rep. 28: 85-93. (2016) 査読有り
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5059200/pdf/978-3-662-52847-1_Chapter_496.pdf
- (3) Kanno Y, Ishisaki A, Kawashita E, Kuretake H, Ikeda K, Matsuo O.
uPA Attenuated LPS-induced Inflammatory Osteoclastogenesis through the Plasmin/PAR-1/Ca(2+)/CaMKK/AMPK Axis.
Int J Biol Sci. 12: 63-71. (2016) 査読有り
doi: 10.7150/ijbs.12690.

〔学会発表〕(計 3 件)

- (1) 河下映里、秋葉聡、石原慶一、松尾理
線維素溶解系因子の中樞神経機能における生理的・病理的役割の解明
第 5 回 4 大学連携研究フォーラム (ポスター発表)
京都工芸繊維大学 (京都府京都市)
2015.11.15.
- (2) Eri Kawashita, Keiichi Ishihara, Osamu Matsuo, Satoshi Akiba
Alpha2-antiplasmin as a potential mediator contributing to memory function and age-related cognitive decline (Poster session)
Neuroscience 2016 (San Diego, USA)
2016.11.16.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河下 映里 (KAWASHITA, Eri)
京都薬科大学・薬学部・助教
研究者番号: 80509266

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし