

機関番号：13901  
 研究種目：基盤研究(B)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19390062  
 研究課題名（和文）ドーパミン関連神経精神疾患モデルにおける t P A の動態と機能解析

研究課題名（英文）ANALYSES OF DYNAMIC CHANGES AND THE FUNCTION OF TISSUE PLASMINOGEN ACTIVATOR IN ANIMAL MODELS OF DOPAMINE-RELATED MENTAL DISORDERS

研究代表者

山田 清文 (YAMADA KIYOFUMI)  
 名古屋大学・医学部附属病院・教授  
 研究者番号：30303639

研究成果の概要（和文）：本研究では、ドーパミン関連神経精神疾患の動物モデルを用いて、その病態生理・病因に tPA-プラスミンシステムが関与しているかどうか行動薬理的に解析した。その結果、tPA-プラスミンシステムが覚せい剤依存および覚せい剤精神病の形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに、脳内における tPA 放出にドーパミン D1 受容体刺激が重要であり、ドーパミン D1 受容体-tPA シグナルが記憶形成に関与していることも明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In the present study we investigated whether tissue plasminogen activator (tPA)-plasmin system was involved in the pathophysiology/pathogenesis of dopamine-related neuropsychiatric disorders, by using animal models for the diseases. Our findings suggest that tPA-plasmin may play a role in the development of methamphetamine dependence as well as methamphetamine-induced psychosis. Furthermore, it is indicated that the activation of dopamine D1 receptors leads to an increase in extracellular tPA activity and the dopamine D1 receptor-tPA signaling may play a role in memory formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
総計	13,200,000	3,960,000	17,160,000

研究分野：神経精神薬理学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：組織プラスミノゲン活性化因子、プラスミン、ドーパミン、薬物依存、覚せい剤精神病、認知症

#### 1. 研究開始当初の背景

組織プラスミノゲン活性化因子 (tPA) はプラスミノゲンをプラスミンに活性化し、活性化されたプラスミンはフィブリンを分解することにより血液凝固-線溶系で重要な役割を果たしている。一方、tPA は中枢神経系にも高発現しており、ラミニンなどの

細胞外マトリックスを分解し、発達期における神経突起の進展や細胞移動に重要な役割を果たしている。さらに、tPA はグルタミン酸受容体の一つである NMDA 受容体を活性化し、活動依存的なシナプス可塑性に直接関与する重要な生体分子であることが示唆されている。

我々は、モルヒネが脳内で tPA を誘導し、プラスミンを介してモルヒネ誘発性のドーパミン遊離を増強することによりモルヒネの報酬効果（モルヒネ摂取により生じる快感）に関与し、モルヒネ依存の形成に促進的に作用していることを証明した(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004)。さらに、覚せい剤であるメタンフェタミン(METH)やニコチン依存にも tPA が関与していることを明らかにした(J. Neurochem., 2005; J. Neurosci., 2006)。これらの研究結果より、我々は tPA-プラスミンシステムによるドーパミン遊離の制御機構について、以下のような仮説を提唱している。(1) 依存性薬物はドーパミン遊離を促進し、ドーパミン受容体を刺激することによりポストシナプス側から tPA 放出を誘発する。(2) 放出された tPA はプラスミノゲンプラスミンに活性化する。(3) プラスミンはプレシナプス側のドーパミン作動性神経終末部に存在する protease-activated receptor-1 (PAR-1) を活性化し、ドーパミン遊離を増強する。即ち、tPA-プラスミンシステムは PAR-1 を介してドーパミン遊離に対する positive-feedback 機構として機能していることが考えられる (図 1)。

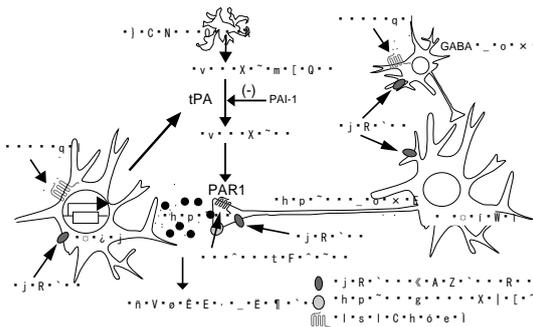


図 1. tPA-プラスミンシステムによるドーパミン遊離制御の仮説図

ドーパミン作動性神経系は、薬物依存の他、統合失調症、注意欠陥多動症(ADHD)、自閉症などの発達障害に関係しており、覚せい剤精神病や統合失調症の治療にはドーパミン受容体アンタゴニスト、ADHD の治療にはドーパミン遊離を増強するメチルフェニデートやメタンフェタミンが使用されている。一方、パーキンソン病は振戦、筋固縮、無動、姿勢反射障害などの症状を示す神経変性疾患であり、黒質-線条体系のドーパミン作動性神経系の変性・脱落が原因である。上述したように、tPA-プラスミンシステムがドーパミン遊離の制御に関与していることを考慮すると、統合失調症、発達障害あるいはパーキンソン病などのドーパミン関連神経精神疾患の病態生理・病因およびその治療薬の効果・副作用に tPA-プラスミンシステムが関与している可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、統合失調症、発達障害およびパーキンソン病の動物モデルを作製し、これらドーパミン関連神経精神疾患の病態生理・病因に tPA-プラスミンシステムが関与しているかどうか明らかにする。さらに、神経精神疾患に対する治療薬の効果や副作用に tPA が関与しているかどうかについても検討し、tPA 関連分子を標的とした新しい神経精神疾患治療薬の薬理学的コンセプトを確立する。

## 3. 研究の方法

全ての動物実験はマウス (ICR 系および C57/BL6 系) で行い、tPA 遺伝子欠損マウス (tPA-KO) マウス、PAR-1-KO マウス、亜鉛要求性マトリックスメタロプロテアーゼ-2 遺伝子欠損 (MMP-2-KO) マウス、MMP-9-KO マウスを用いた。ドーパミン関連神経精神疾患の動物モデルとして、(1) METH (1-2 mg/kg) を連続投与して作製した覚せい剤精神病モデル、(2) 合成 2 本鎖 RNA アナログである polyribonucleic polyribocytidilic acid (polyI:C) を生後 2 日目から 5 日間連続投与した神経発達障害モデル、(3) 離乳直後 (生後 3 週齢) から長期隔離飼育 (4 週間) を負荷した幼弱期長期隔離飼育モデルマウス、(4) 離乳直後 (生後 3 週齢) から 1 日 6 時間の拘束ストレスを連続 4 週間負荷した慢性拘束ストレスモデル、(5) パーキンソン病モデルとしてドーパミン神経毒である 6-OHDA を片側の中脳に微量注入したマウスあるいは大量の METH を連続投与したマウスを用いた。

本研究計画で用いた発現ベクターおよび遺伝子改変動物はこれまでにヒトに対する安全性が確認されており、金沢大学および名古屋大学医学部組換え DNA 実験安全委員会において実験計画の承認を受けた。遺伝子改変動物の飼育維持に係る安全管理については、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に従った封じ込め措置を講じた。さらに、本研究計画に関連する動物実験は金沢大学および名古屋大学動物実験委員会で承認を受け、動物愛護および生命倫理に十分に配慮して実施した。

## 4. 研究成果

(1) 平成 19 年度は、脳内における tPA 放出の制御機構について、*in situ zymography* 法を用いて解析した。ドーパミン D1 受容体刺激により側坐核において tPA 放出が誘発され、その反応はドーパミン D1 受容体アンタゴニストおよび PKA 阻害剤により拮抗された。したがって、ドーパミン D1 受容体-PKA シグナルがポストシナプス側からの tPA 放出に

重要であることが示唆された (図 2)。

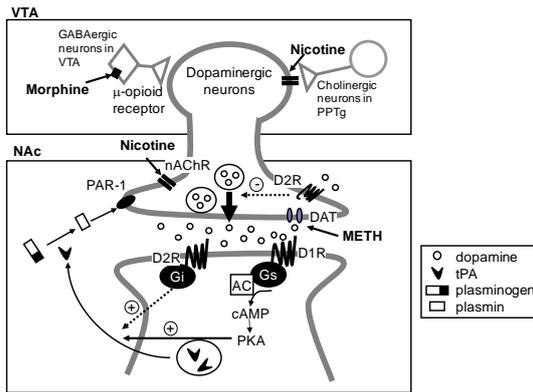


図 2. ドーパミン受容体刺激による tPA の放出

さらに、MAP を連続投与した覚せい剤精神病モデルマウスにおけるドーパミン神経伝達の異常に tPA-プラスミンシステムが関与しているかどうか検討した。野生型マウスでは METH 連続投与により側坐核における METH 誘発性ドーパミン遊離に逆耐性が観察されたが、tPA-KO マウスではドーパミン遊離の逆耐性現象は認められなかった (図 3)。したがって、覚せい剤精神病モデルにおけるドーパミン神経伝達の異常亢進に tPA が重要な役割を果たしていることが示唆された。

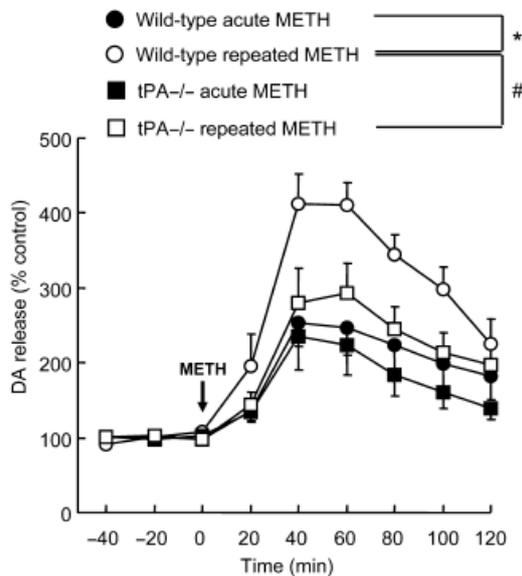


図 3. tPA-KO マウスにおける METH 誘発性ドーパミン遊離の逆耐性の変化

(2) 平成 20 年度は覚せい剤精神病および発達障害動物モデルを作製し、脳内における tPA 関連分子の動態を解析することにより、その病態生理・病因に tPA-プラスミンシ

テムが関与しているかどうか検討した。

METH を連続投与した野生型マウス (覚せい剤精神病動物モデル) においては、METH 誘発性ドーパミン遊離の増強とドーパミン作動性神経系のマーカーであるチロシンヒドロキシラーゼ (TH) の減少が認められた。一方、tPA-KO マウスではドーパミン遊離の増強は消失したが、TH タンパクの減少は野生型マウスと同程度であった。以上より、tPA は覚せい剤精神病におけるドーパミン作動性神経系の機能亢進に関与していること、METH のドーパミン作動性神経系に対する神経毒性には関与が少ないことが示唆された。

次に、離乳直後より隔離飼育を施した長期隔離飼育マウスの学習記憶・情動の変化と海馬における遺伝子発現の変化を調べた。長期隔離飼育マウスは学習記憶障害、情動異常および海馬における神経新生の低下を示した。しかし、海馬における tPA 遺伝子の発現には変化は認められなかった。

(3) 平成 21 年度は、前頭葉皮質のドーパミンが長期記憶に重要な役割を果たしていることから、長期記憶における前頭葉皮質の tPA の役割について行動薬理学的および神経化学的に解析し、認知症との関連性を検討した。ドーパミン D1 受容体アゴニスト SKF38393 の投与により、マウス前頭葉皮質において長期記憶形成およびタンパク合成に重要なシグナルタンパク ERK1/2 のリン酸化が用量依存的に増加した。SKF38393 の投与により、マウス前頭葉皮質における tPA のタンパク発現が増加した。tPA-KO マウスでは、新奇物体認知試験における認知記憶に障害が認められた。tPA と同様に、細胞外マトリックス分解活性を有する分泌型の MMP-9 の遺伝子欠損マウスにおいても、認知記憶障害が認められた。以上の結果より、前頭葉皮質における ERK1/2 の活性化および tPA の合成にはドーパミン D1 受容体に関与していることが示唆された。さらに、前頭葉皮質における細胞外マトリックスの再構成が長期記憶に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

本研究において、tPA-プラスミンシステムがモルヒネやニコチン依存だけでなく、覚せい剤依存あるいは覚せい剤精神病の形成に重要な役割を果たしていることを明らかにした。さらに、脳内における tPA の放出にドーパミン D1 受容体刺激が重要であり、ドーパミン D1 受容体-tPA シグナルが記憶形成に関与していることも明らかにした。したがって、依存症、統合失調症あるいは認知症の治療薬の新しい標的分子として tPA が有望であることを示すことができた。さらに、MMP-9 も新しい中枢作用薬の標的分子となりうることを明らかにした。

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 25 件)

- ① Yun J, Koike H, Ibi D, Toth E, Mizoguchi H, Nitta A, Yoneyama M, Ogita K, Yoneda Y, Nabeshima T, Nagai T and Yamada K: Chronic restraint stress impairs neurogenesis and hippocampus-dependent fear memory in mice: a possible involvement of a brain specific transcription factor Npas4. *J. Neurochem*, 114, 1840-1851, 2010. 査読有
- ② Mizoguchi H, Takuma K, Fukuzaki E, Ibi D, Someya E, Akazawa K, Alkam T, Tsunekawa H, Mouri A, Noda Y, Nabeshima T and Yamada K: Matrix metalloproteinase-9 inhibition improves amyloid  $\beta$ -mediated cognitive impairment and neurotoxicity in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 331, 14-22, 2009. 査読有
- ③ Mizoguchi H, Arai S, Koike H, Ibi D, Kamei H, Nabeshima T, Kim HC, Takuma K and Yamada K: Therapeutic potential of nicotine for methamphetamine-induced impairment of sensorimotor gating: involvement of pallidum neurons. *Psychopharmacology*, 207, 235-243, 2009. 査読有
- ④ Ibi D, Nagai T, Kitahara Y, Mizoguchi H, Koike H, Shiraki A, Takuma K, Kamei H, Noda N, Nitta A, Nabeshima T, Yoneda Y and Yamada K: Neonatal polyI:C treatment in mice results in schizophrenia-like behavioral and neurochemical abnormalities in adulthood. *Neurosci. Res.*, 64, 297-305, 2009. 査読有
- ⑤ Fukakusa A, Nagai T, Mizoguchi H, Otsuka N, Kimura H, Kamei H, Kim H-C, Nabeshima T, Takuma K and Yamada K: Role of tissue plasminogen activator in the sensitization of methamphetamine-induced dopamine release in the nucleus accumbens. *J. Neurochem*. 105, 436-444, 2008. 査読有
- ⑥ Nagai T, Nabeshima T and Yamada K: Basic and translational research on proteinase-activated receptors: Regulation of nicotine reward by the tissue plasminogen activator (tPA)-plasmin system via proteinase-activated receptor 1. *J. Pharmacol. Sci.* 108, 408-414, 2008. 査読有
- ⑦ Ibi D, Takuma K, Koike H, Mizoguchi H, Tsuritani K, Kuwahara Y, Kamei H, Nagai T, Yoneda Y, Nabeshima T, Yamada K: Social isolation rearing-induced impairment of the hippocampal neurogenesis is associated with deficits in spatial memory and emotion-related behaviors in juvenile mice. *J. Neurochem*. 105, 921-932, 2008. 査読有
- ⑧ Fukakusa A, Mizoguchi H, Koike H, Nabeshima T, Takuma K and Yamada K: Tissue plasminogen activator is not involved in methamphetamine-induced neurotoxicity. *J. Pharmacol. Sci.* 106, 321-324, 2008. 査読有
- ⑨ Ito M, Nagai T, Mizoguchi H, Sato K, Hayase M, Otsuka N, Fukakusa A, Kumagai N, Kim H-C, Nabeshima T, Takuma K and Yamada K: Activation of post-synaptic dopamine D1 receptors promotes the release of tissue plasminogen activator in the nucleus accumbens via PKA signaling. *J. Neurochem*. 103, 2589-2596, 2007. 査読有
- ⑩ Takuma K, Hoshina, Y, Arai S, Himeno Y, Matsuo, A, Funatsu Y, Kitahara Y, Ibi, D, Hayase M, Kamei H, Mizoguchi H, Nagai T, Koike K, Inoue M and Yamada K: Ginkgo biloba extract EGb761 attenuates hippocampal neuronal loss and cognitive dysfunction resulting from chronic restraint stress in ovariectomized rats. *Neuroscience* 149, 256-262, 2007. 査読有

[学会発表] (計 41 件)

- ① Yamada K, et al. Influence of chronic restraint stress on hippocampal neurogenesis and hippocampus-dependent fear memory in mice. Society for Neuroscience 2009. 2009.10.17-21, Chicago, USA.
- ② Yamada K, et al. Perinatal immune activation impairs emotional and cognitive functions with altered hippocampal glutamatergic neurotransmission in adult mice. 9th World Congress of Biological Psychiatry. 2009.6.28-7.2, Paris, France.

- ③ 山田清文：tPA-プラスミンシステムによるニコチンの報酬効果の制御：PAR-1の関与。（シンポジウム「プロテイナーゼ活性化型受容体の基礎と臨床：新たな治療標的としての可能性を探る」）第81回日本薬理学会年会，2008.3.17-19，横浜
- ④ 山田清文，永井拓，溝口博之，鍋島俊隆，田熊一徹：覚せい剤による依存・精神病性障害と認知機能障害における組織プラスミノゲン活性化因子の関与（シンポジウム「アルコール・薬物依存の基礎研究の動向」）．第42回日本アルコール・薬物医学会，第19回日本アルコール精神医学会，第10回ニコチン・薬物依存研究フォーラム平成19年度合同学術総会，2007.9.28-29，大津

〔図書〕（計2件）

- ① 永井拓，鍋島俊隆，山田清文：依存性薬物による精神障害の分子機序．実験薬理学実践行動薬理学（日本薬理学会編）pp272-281，金芳堂、京都，2010.

〔産業財産権〕

- 出願状況（計0件）  
○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/pharmacy/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 清文 (YAMADA KIYOFUMI)  
名古屋大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号：30303639

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

永井 拓 (NAGAI TAKU)  
名古屋大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号：10377426

(H19：研究分担者)

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

(H19：研究分担者)

田熊 一浩 (TAKUMA KAZUHIRO)  
大阪大学・大学院薬学研究科・准教授  
研究者番号：90289025

(H19：研究分担者)