

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23790289

研究課題名(和文) 組織型プラスミノゲン活性化因子とマトリックスメタロプロテアーゼの認知症での役割

研究課題名(英文) Role of tissue-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase in dementia

研究代表者

鈴木 康裕 (Suzuki, Yasuhiro)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：00324343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：血管性認知症の病態解明のために組織型プラスミノゲン活性化因子(t-PA)遺伝子欠損マウスを用いて検討を行った。t-PA投与によって、脂質代謝に関連する受容体に結合し内皮の活性化、血管内皮増殖因子の産生誘導し、脳防御機能を変化させ、細胞死によって曝露される活性酸素によってさらに細胞を分解する酵素が増加し活性化された。血管性認知症に内因性t-PAが潜在的な逃避行動すなわち歩行へのモチベーションに対して関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We studied on vascular dementia by using mice with deficient of tissue-type plasminogen activator (t-PA). t-PA bound to a receptor of lipid metabolism, activated the endothelial cells, induced the vascular endothelial growth factor, changed the defense function of brain, induced and activated catabolic enzymes to cerebral cells by the synergistic action with reactive oxygen species induced by cell death. Endogenous t-PA may contribute to potential escape response and modulation of motivation in vascular dementia.

研究分野：中枢神経薬理

キーワード：組織型プラスミノゲン活性化因子

1. 研究開始当初の背景

認知症は要介護疾患であり、患者本人のみならず介護者の生活の質 (QOL) を低下させる。このため、長年にわたり根本的な治療薬が切望され多くの研究がなされてきた。しかし、未だ十分な治療・予防薬の開発に至っていないばかりか、発症機構にも不明な点が数多く残されている。今後ますます加速する高齢化社会にあって、認知症の克服は極めて重要な課題となっている。

認知症の多くは、タンパク質代謝異常に起因すると考えられており、最も発症頻度の高いアルツハイマー型 (AD) では、アミロイド (A β) の分解異常による沈着が認められる。また、ドパミン欠乏状態によるパーキンソン病においてもタンパク質代謝異常の関与が示唆されている。AD に次いで多い血管型は、今後国内でも発症頻度上昇が予想されており、早急な対応が望まれている。本症は古くより脳血管閉塞による脳神経細胞死が原因とされてきたが、画期的な治療・予防薬の開発には分子レベルでの発症機序の解明が不可欠である。

生体機能の維持には多数の機能タンパク質が複雑に関与しており、それらの機能異常が重篤な疾患の引き金となる場合も少なくない。このため、疾患の原因や発症機序の解明、血液中のサロゲートマーカーの探索、病態解析におけるプロテオミクスへの期待は極めて大きなものとなっていた。ゲノムに記された遺伝情報の多くはタンパク質に翻訳され、それらが細胞や個体の機能を制御する。これらタンパク質が状況に応じ、産生細胞とは異なる適切な場所で適切に分解され活性化されることも、細胞や個体の機能制御上で非常に重要である。

マトリックスメタロプロテアーゼファミリー (MMPs) は組織のリモデリングに関わることが知られ、病態下で誘導される個々の MMPs の発現細胞は限局されていることから、それぞれ細胞によって役割の異なる可能性がある。研究代表者は、tPA による脳血液関門 (BBB) の破綻には血管内皮細胞で誘導されるストロムライシン - 1 (MMP-3) が重要であることを示し、虚血により内皮細胞で誘導される Low Density Lipoprotein

Receptor-related protein (LRP) が反応点となり、tPA が LRP に結合し、Pli および MMP-3 が活性化されることが示した。これらの中で、脳梗塞治療における線溶薬 tPA の有害事象である脳内出血発症つまり BBB の破綻についての新規のメカニズムを示した。また、LRP が局所での機能タンパク質の反応点を示す可能性を新たに示唆した。さらに、Pli は A β の分解に関わること、また LRP が神経細胞から血液への A β の排出に関与することが知られている。さらに、tPA 遺伝子欠損マウスには学習障害などの神経異常が認められる。これらことから、線溶因子である tPA とそれに関わる極微量な機能タンパクの動態解析によって急性期から慢性期における血管性認知症の発症機構が解明できると考えた。

2. 研究の目的

病態不明疾患である血管性認知症の病態解明と治療効果の判定ならびに病態の進行に対するサロゲートマーカーの発見を目的とした。

線溶系は血栓の主成分であるフィブリンを分解する細胞外プロテアーゼカスケードの名称である。その中で組織型プラスミノゲン活性化因子 (tPA) は、プラスミノゲン (Plg) をプラスミン (Pli) に活性化し血栓溶解することから脳梗塞治療薬としても使用されている。神経細胞内でも tPA の発現が確認されているが、その生理機能は未だ不明であり、従来の凝固・線溶領域とは異なる機能を兼ね備えていると考えられる。

病態に多くのタンパク質が関わっていると考えられるが、MMPs は組織のリモデリングに関わることが知られ、病態下によって誘導される個々の MMPs の発現細胞は限局されてことから中枢神経内における凝固線溶系の新しい反応系として、これらタンパク質の反応連環に着目し、多角的アプローチにより血管性認知症の病態解明と早期診断に向けたブレークスルーを図り、凝固線溶系を含めたプロテアーゼの神経細胞回路形成および神経再生に研究を進展させていくことを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 血管性認知症病態動物モデルによる行動薬理的解析
- (2) tPA/Pli/LRP/MMPs 産生機構における線溶因子の基質の解明 (培養細胞・動物モデル)
- (3) MMPs の組織リモデリングにおける基質となる機能タンパクの解明 (培養細胞・動物モデル)

(4) LRP における機能タンパクの輸送の解明 (培養細胞)

4. 研究成果

血管性認知症の病態解明のために組織型プラスミノゲン活性化因子 (t-PA) 遺伝子欠損マウスを用いて血栓性閉塞モデルを作製した。行動薬理的観察により選択的ノルアドレナリン再取り込み薬を投与により、シナプス間隙のノルアドレナリン濃度を上昇させることで欠損型の多動性障害を抑制することを見出した。

さらに肝臓障害修復時に貪食細胞の集積にウロキナーゼ型 PA が障害周囲で重要である点を示し、脳虚血において虚血境界領域にてにおいても貪食細胞での t-PA の産生が上昇する点と似ていることを示した。

電子顕微鏡観察により、t-PA に投与すると一過性の BBB の透過性の増大を認め、虚血開始 24 時間後までにアルブミンの内皮細胞への取り込みは観察されたが、貪食細胞の集積は認めなかった。

さらに脳血管内皮培養細胞系にて、血管内皮増殖因子 (VEGF) の産生が t-PA の酵素活性によって促進されることを見出した。この VEGF の上昇は、低密度リポタンパク質受容体ファミリー (LDLRs) 阻害薬で抑制され、脳動物モデルにおいても VEGF 阻害により BBB の透過性を抑制した。また、活性酸素の相乗効果により I-kB が分解されており、MMP-9 の産生が増加することを見出した。

これらのことから、虚血 4 時間以上の t-PA 投与によって、LDL 受容体に結合し内皮の活性化、VEGF の産生誘導し、その産生された VEGF が VEGFR-2 を介して BBB の透過性を上昇させ、細胞死によって曝露される活性酸素によって MMP-9 産生が増加し活性化されることが、脳障害後のマウスの潜在的な逃避行動すなわち歩行へのモチベーションに対して関わっており、さらに、脱抑制あるいは衝動性にも内因性 t-PA が関与している可能性が示唆された。

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 2 件)

(1) Kawao N, Nagai N, Tamura Y, Horiuchi Y, Okumoto K, Okada K, Suzuki Y, Umemura K, Yano M, Ueshima S, Kaji H, Matsuo O. Urokinase-type plasminogen activator and plasminogen mediate activation of macrophage phagocytosis during liver repair in vivo. Thromb Haemost. 査読あり、107 巻、2012 P749-759. DOI: 10.1160/TH11-08-0567.

(2) Harada K, Suzuki Y, Yamakawa K, Kawakami J, Umemura K. Combination of reactive oxygen species and tissue-type plasminogen activator enhances the induction of gelatinase B in brain endothelial cells. Int J Neurosci. 査読あり、122 巻、2012, P53-59. DOI: 10.3109/00207454.2011.623808.

[学会発表](計 4 件)

(1) 鈴木康裕、村中祥吾、外村和也、山川花朱美、永井信夫、梅村和夫、マウス中大動脈閉塞後の血液脳関門の加圧凍結法による電子顕微鏡観察、第 88 回日本薬理学会年会、2015 年 3 月 18~20 日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

(2) 鈴木康裕、永井信夫、山川花朱美、外村和也、梅村和夫、プラスミノゲン活性化因子は虚血培養内皮細胞において血管内皮細胞増殖因子を誘導した、第 87 回日本薬理学会年会、2014 年 3 月 19~21 日、東北大学百周年記念館川内萩ホール、仙台国際センター(宮城県・仙台市)

(3) 鈴木康裕、Tissue-type plasminogen activator modulates adrenergic nerve function、第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 21~23 日、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

(4) 鈴木康裕、Malgorzata Zajda, 永井信夫、梅村和夫、脳梗塞後の行動障害における内因性組織型プラスミノゲン活性化因子の役割、第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 14 日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

[その他]

ホームページ等

<https://kaken.nii.ac.jp/d/p/23790289.ja.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 康裕 (Suzuki Yasuhiro)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：00324343

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

永井 信夫 (Nagai Nobuo)

長浜バイオ大学・アニマルバイオサイエンス学科・教授

研究者番号：90260281

山川 花朱美 (Yamakawa Kasumi)
浜松医科大学・医学部附属病院・薬剤師
研究者番号： 70563287