



Title	Timp-3 Deficiency Impairs Cognitive Function in Mice
Author(s)	馬場, 義親
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/54128">https://hdl.handle.net/11094/54128</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	馬場 義親
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 23431 号
学位授与年月日	平成21年11月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Timp-3 Deficiency Impairs Cognitive Function in Mice (Timp-3欠損はマウスにおける認知機能を障害する)
論文審査委員	(主査) 教授 楽木 宏実 (副査) 教授 武田 雅俊 教授 遠山 正彌

### 論文内容の要旨

[ 目的 ]Timpには、35~50%のアミノ酸配列の相同性を有する Timp-1 から Timp-4 までの4種類が現在までに報告されている。

中枢神経系 (CNS) では、MMP/Timp のバランスの破綻が多くの病気の進行に関わっている。MMP はミエリン鞘の構造変化、血液脳関門 (BBB) を破裂、悪性グリオーマ細胞の侵入、アルツハイマー病においてはアミロイドβ蛋白質の堆積、血管新生を制御している。最近、記憶や学習への ECM のリモデリングの寄与は少しずつわかってきた。Timp/MMP のバランスの破綻が CNS 内での細胞-細胞間もしくは、細胞外基質-細胞間シグナリングで重要であり、Timp-1, Timp-2 欠損マウスは認知機能に障害が起こることが報告されている。Timp-1 は Timp/MMP による神経可塑性の調節をしており、海馬依存の記憶と学習のプロセスに関与していると示唆されている。虚血によって誘導された海馬の Timp-1 は、ニューロン新生における可塑性を刺激すると同時に神経保護作用能を補助するということが示唆されている。Timp-2 欠損マウスは高められた扁桃体の機能と関係している驚愕反射の機能低下が見られる。しかし、Timp-3 については報告されていない。

そこで今回我々は、Timp-3 欠損マウスを用いて試験などの様々な行動試験を行い、Timp-3 と認知機能の関係を検討した。また、Timp-3 が脳内でどこに発現しているか、Timp-3 欠損が脳内の組織においてどのような影響を与えているのかを知るために、RT-PCR 法、免疫染色法、Zymography を用いて同様に認知機能との関係を検討した。

[ 方法ならびに成績 ]

#### 1. オープンフィールドテスト

マウスの記憶試験の評価を行うためには、活動性試験が不可欠である。そこで情動性・運動性の評価を行うために、移動反応と立ち上がり反応を、1日1セッション10分間×3日間で、チャンバーの側面にあるセンサーを用いて得点化した。移動反応と立ち上がりの得点、得点の変化率、一分毎の得点の推移より Timp-3 欠損マウスでは、(空間的)環境に馴化する能力が低下している事が判った。また、Timp-3 欠損による活動能力の低下は認めなかった。

#### 2. 水迷路学習 (①WM, ②WM-V)

空間認知能力の評価を行うために Timp-3欠損マウス、野生型マウスを用いて水迷路学習を行った。1日1セッション5試行×5日間の獲得訓練を行い、①invisible, ②visible ともプラットホームに到達するまでの時間を逃避潜時として測定した。①逃避潜時は、1日目には有意な差は見られなかったが、2日目には有意差をもってノックアウトマウスで延長していた。さらに3、4日目でも差はあるが、その差は次第に減少した。また、獲得訓練終了の翌日(6日目)に1分間のプローブテストを実施し、プラットホーム設置象限への滞在時間を測定した。その結果、Timp-3欠損マウスと野生型マウスのプローブテスト時のプラットホーム象限滞在時間は、ともに他の象限滞在時間より有意に長かった。②プラットホームを固定した fixed(1日~5日)、プラットホームの場所を移動させる varied(7日~11日)とも、逃避潜時は両群間で有意差はなく、またプラットホーム象限滞在時間は両群とも他の象限滞在時間と同等であった。以上のことより、最終的には Timp-3欠損マウスも覚えることができるが、覚える速度が遅いことが原因で invisible 条件での水迷路学習の逃避潜時に差が出たこと、Timp-3欠損マウスで視覚に障害がないことが明らかとなった。

#### 3. RT-PCR

ISOGEN(Nippon Gene)を用いて RNA を分離し、Takara RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 (TaKaRa) を用いて逆転写反応、PCR を行った。その結果、野生型マウスの海馬では Timp-3 の発現を認めた。コントロールとして、Timp-3 欠損マウスの小脳を用いた。

#### 4. 免疫染色

野生型マウスから脳を取り出し、4%パラホルムアルデヒド固定後、パラフィンに包埋した。切片を作成後、確立された手順に則り免疫染色を行ない、脳内における Timp-3 発現を免疫染色で調べた。その結果、Timp-3 は、野生型マウスの海馬の網状・分子層、脳室上衣細胞、脈絡叢乳頭において発現していた。

#### 5. Zymography

8 μm の厚さの凍結切片を10分間空気乾燥させ、その後 1mg/ml の DQ-gelatin を切片上に滴下した。そして38度で1hr 反応させ、PBS で洗浄後4%PFA で固定した。それにより海馬での MMP のゼラチナーゼ活性について検討した。その結果、Timp-3 欠損マウスでは海馬領域(特に上昇層)で有意にゼラチナーゼ活性の亢進が認められた。

## [ 総 括 ]

本研究により、Timp-3の欠損が記憶の中樞である海馬領域での MMP 活性を更新させ、神経の伝達に障害を来すことにより認知機能が低下したことが示された。これは、Timp-3 に関しては初めてのエビデンスである。また、他のTimps によって Timp-3 の機能は代償されないことが知られているので、今回の認知機能の低下はTimp-3 単独の欠損が原因であると言える。今後は、さらに詳しい機序の解明が必要であるとともに、認知症の治療への応用も期待される。

## 論文審査の結果の要旨

マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) は細胞外基質の構造維持と構造変換に重要なタンパク質消化酵素のファミリーである。MMPの活性による基質の分解は、恒常性を保つために多くの生物学的なプロセスによって調節されている。このMMPの活性は、MMPと強固に非共有結合するTissue inhibitor of metalloproteinases (Timp) により制御されている。Timpには、35~50%のアミノ酸配列の相同性を有する Timp-1からTimp-4までの4種類が現在までに報告されている。Timp-1、Timp-2、Timp-4は可溶性であり、生体内で動いているが、Timp-3は、細胞外基質と強固に結合するなどしてユニークな特徴を持つ。Timp-3の機能としては、細胞増殖、細胞増殖の阻害、アポトーシス、血管新生の阻害などが報告されている。中枢神経系 (CNS) では、MMP/Timpのバランスの破綻が多くの病気の進行に関わっているがTimp-3の役割については不明である。そのため今回、Timp-3の認知機能に対する役割の解明を行った。野生型マウスおよびTimp-3欠損マウスを用いて各種行動試験を行い、Timp-3と認知機能の関係を検討した。またTimp-3の脳内での発現および脳内の組織への影響を、RT-PCR法、免疫染色法、Zymographyを用いて検討した。行動試験においては、水迷路試験とオープンフィールド試験において、野生型マウスに比べてTimp-3欠損マウスでは有意に認知機能の低下が認められた。また、組織学的にTimp-3は野生型マウスの海馬に発現していることが確認された。また、Timp-3欠損マウスでは野生型マウスに比べて海馬領域でのMMP活性の亢進が認められた。

本研究は、Timp-3が海馬領域のMMP活性に関与し、認知機能に影響を及ぼすことを明らかにしたものであり、学位の授与に値するものと認める。