

オリゴデンドロサイトが発現する脱髄関連プロテアーゼに関する研究

課題番号 13680830

平成13年度～平成14年度科学研究費補助金 基盤研究(c)(2) 研究成果報告書

平成15年 5月

吉田成孝

(旭川医科大学・医学部・教授)

は し が き

外傷などによる脊髄損傷はその後の機能的回復が多く望めないため、医学的、社会的にも大きな問題となっている。これは、切断された軸索の再生は中枢神経においてはほとんど生じないという事実によるところが大きい。実際、教科書的にも中枢神経の軸索伸長はないとされてきた。このdogmaは近年における様々な神経栄養因子の解析等により必ずしも事実でないことが明らかとなってきた。しかし、大きな障害の一つとなっているのがミエリンに含まれる軸索伸長阻害因子の存在である。これらとして、nogoやMAGなどの蛋白性の因子が同定されてきている。ミエリン関連糖蛋白(MAG)はオリゴデンドロサイトが発現するミエリン蛋白質で最初に分子同定された軸索伸長阻害因子である。この蛋白質は軸索のミエリン化の際に互いを認識しあうのに重要な分子であるが、生後の神経細胞の軸索伸長阻害を行うことが明らかとなってきている。nogoは1999年に同定された因子で、オリゴデンドロサイトが発現する因子であるが、非障害時にはたらきなどまだ不明な点が多い。さらに、中枢神経傷害後に損傷部位に集まるアストロサイト等から分泌される様々なプロテオグリカンにも軸索伸長を高度に阻害することがわかった。オリゴデンドロサイトの一部からも一種のプロテオグリカンが分泌されることも明らかとなっている。すなわち、ミエリタンパク質の分解は軸索再生において非常に重要なステップである。オリゴデンドロサイトは中枢神経系でのミエリン形成細胞であるが、中枢神経損傷時のミエリン分解にオリゴデンドロサイトがどのように関わっているかはこれまで明らかでなかった。私たちは、これまでオリゴデンドロサイトが中枢神経障害時に2種のセリンプロテアーゼ、ニューロプシンとプロテアーゼMを新たに発現することを見いだした^{2, 3)}。さらに、これらのプロテアーゼ発現誘導が傷害後2から8日目にピークを迎える。これは、脱髄が開始される時期と一致する。この事実はこれらのプロテアーゼが脱髄に関連した機能を持つ可能性を示唆する。

そこで、今回の研究は脊髄損傷や多発性硬化症のモデルであるexperimental

allergic encephalitis (EAE)によりニューロプシンとプロテアーゼMがどの様に発現変化し、これらの基質と想定される細胞外基質の変化および神経軸索の再生との関連を検討した。

研究組織

研究代表者：吉 田 成 孝（旭川医科大学医学部教授）

研究分担者：塩 坂 貞 夫（奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科教授）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成13年度	1,500	0	1,500
平成14年度	1,000	0	1,000
総計	2,500	0	2,500

研究発表

（1）学会誌等

1. Matsumoto-Miyai, K. et al., Decidualization induces the expression and activation of an extracellular protease neuropsin in mouse uterus. Biol. Reprod, 67, 1414-1418, 2002

2. Yoshida, S., Extracellular environment and extracellular serine proteases in the central nervous system Connective Tissue, 35, 37-43, 2003

3. Shimizu-Okabe, C., L-isoform but not S-isoform of myelin associated glycoprotein promotes neurite outgrowth of mouse cerebellar neurons. Neurosci. Lett. 311, 203-205, 2001

4. Kuwae, K., Epidermal expression of serine protease, neuropsin (KLK8) in normal and pathologic skin Molecular Pathology 55, 235-241, 2002

(2) 口頭発表

1. Yoshida, S., Terayama, R., He, XP, Otsuji, M., Yoshida K, Tsuchiya Y, Shiosaka S, Oligodendrocytes express serine proteases after injury to the CNS. 32th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Orlando, 2002. 11.
2. 吉田成孝、寺山隆司、中枢神経損傷後のプロテアーゼと細胞接着因子の発現、第107回日本解剖学会全国学術集会、浜松、2002 3/29-31.
3. 寺山隆司、吉田成孝、マウス脊髄損傷後のニューロプシンおよびプロテアーゼ M の発現の変化、第25回神経科学大会、横浜、2002 7/7-9.

研究の背景及び目的

外傷などによる脊髄損傷はその後の機能的回復が多く望めないため、医学的、社会的にも大きな問題となっている。これは、切断された軸索の再生は中枢神経においてはほとんど生じないという事実によるところが大きい。実際、教科書的にも中枢神経の軸索伸長はないとされてきた。このdogma は近年における様々な神経栄養因子の解析等により必ずしも事実でないことが明らかとなってきた。しかし、大きな障害の一つとなっているのがミエリンに含まれる軸索伸長阻害因子の存在である。これらとして、nogo やMAG などの蛋白性の因子が同定されてきている。ミエリン関連糖蛋白(MAG)はオリゴデンドロサイトが発現するミエリン蛋白質で最初に分子同定された軸索伸長阻害因子である。この蛋白質は軸索のミエリン化の際に互いを認識しあうのに重要な分子であるが、生後の神経細胞の軸索伸長阻害を行うことが明らかとなってきている。nogoは1999年に同定された因子で、オリゴデンドロサイトが発現する因子であるが、非障害時にはたらきなどまだ不明な点が多い。さらに、中枢神経傷害後に損傷部位に集まるアストロサイト等から分泌される様々なプロテオグリカンにも軸索伸長を高度に阻害することがわかった。オリゴデンドロサイトの一部からも一種のプロテオグリカンが分泌されることも明らかとなっている。すなわち、ミエリンタンパク質の分解は軸索再生において非常に重要なステップである。オリゴデンドロサイトは中枢神経系でのミエリン形成細胞であるが、中枢神経損傷時のミエリン分解にオリゴデンドロサイトがどのように関わっているかはこれまで明らかでなかった。私たちは、これまでオリゴデンドロサイトが中枢神経障害時に2種のセリンプロテアーゼ、ニューロプシンとプロテアーゼMを新たに発現することを見いだした^{2, 8)}。さらに、これらのプロテアーゼ発現誘導が傷害後2 から8 日目にピークを迎える。これは、脱髄が開始される時期と一致する。この事実はこれらのプロテアーゼが脱髄に関連した機能を持つ可能性を示唆する。

ニューロプシンは海馬を始めとする大脳辺縁系に特異的に発現するプロテア

ーゼである。我々はニューロプシンの遺伝子クローニング、神経可塑性に関連する生理的作用、蛋白分解酵素としての生化学的性質に関して様々な知見を見いだしてきた^{1, 5, 7)}。ニューロプシンは生後の海馬の神経細胞に発現するカリクレイン型のセリンプロテアーゼで比較的限局した基質特異性を持つ。このプロテアーゼは神経可塑性に関するはたらきには海馬における長期増強への促進効果が電気生理学的に認められた⁴⁾。また、ノックアウト動物の解析により海馬シナプス形成にも大きな役割を果たしていることが明らかとなった³⁾。ところが神経損傷後においては通常発現が見られない神経線維束においてニューロプシンが発現していることが明らかとなった⁸⁾。神経線維束のニューロプシンは損傷後1日から14日にかけてオリゴデンドロサイトが発現していた。さらに、ニューロプシンと近縁の遺伝子産物であるプロテアーゼMがオリゴデンドロサイトに発現していることが明らかとなった^{6, 9)}。オリゴデンドロサイトに関してはこれらのプロテアーゼを発現しているのはその一部のサブクラスに限られている。しかしそのサブクラスの特徴は全く明らかとなっていない。さらに、これらのプロテアーゼは細胞外に分泌され、細胞外の基質を分解することによりその機能を果たしていると考えられているが、現在のところその基質については不明な点が多い。

また、オリゴデンドロサイトが中枢神経障害時にどのような機能を果たしているのかについての検討も十分になされていない。

そこで、今回の研究は脊髄損傷や多発性硬化症のモデルであるexperimental allergic encephalitis (EAE)によりニューロプシンとプロテアーゼMがどのように発現変化し、これらの基質と想定される細胞外基質の変化および神経軸索の再生との関連を検討した。

材料と方法

動物と手術

本研究での動物実験は本学動物実験委員会により承認された。

脊髄損傷モデル作成

BALB/cマウス10週齢から12週齢にethylcarbonate (1.5g / kg b.w.) の腹腔内投与で麻酔後、脳定位固定装置で固定した。Bregmaから後方に2.5 mm、側方1.7 mm、背腹に2.5 mmの位置にハミルトンシリンジを用いて、5 nM kainic acid, その反対側に0.1 M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4), をそれぞれ0.3 lずつ30秒以上かけて注入した。脊髄損傷モデル作成のために、マウスを麻酔後に椎弓切除を行い脊髄のL4レベルをナイフにて半切した。手術後経時的に灌流固定し脳または脊髄を摘出した。

多発性硬化症モデルマウス作成

マウスの足底に100 l PBS に溶解した200 g の mouse oligodendrocyte glycoprotein (MOG) の部分シーケンス35-55 (アミノ酸配列 MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) と100 l complete Freund adjuvant (CFA) と共に皮下注を行った。また、同日と2日後に200 ngの百日咳毒素を腹腔内投与を行った。マウスの臨床症状を35日後まで観察を行い、6段階のスコアとして記録した。0は臨床症状なし；1は尾が垂れているか歩行異常がある；2は後肢の部分麻痺；3は後肢の部分麻痺か前肢の完全麻痺；4は後肢の完全麻痺と前肢の部分麻痺；5は四肢の完全麻痺もしくは死亡

灌流固定と切片作成

Ethyl carbonateの腹腔内投与 (1.5g / kg b.w.) の麻酔下で心臓から0.85% NaCl、続いて4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4) で灌流し、脳または脊髄を摘出した。脳及び脊髄は同じ固定液で一晩後固定し、さらに30% sucrose in 0.1 M PBに4℃で浸漬し、置換後ただちにドライアイスで凍結し、クリオスタットにて厚さ30 mの前額断切片を作成した。また電子顕微鏡観察用には、4% paraformaldehyde, 0.05% glutaraldehyde in PBで灌流し、4% paraformaldehyde / 0.1 M PBに4℃で一晩浸漬し、ビブラトームを用いて厚さ50 μmの前額断切片を作成した。

In situ hybridization

ニューロプシン遺伝子フラグメント挿入プラスミドおよびプロテアーゼM遺伝子フラグメント挿入プラスミドを用い、制限酵素処理によって開環させたDNA鎖を鋳型とし、DIG-RNA labelling mixを用いたin vitro transcriptionによって、DIG標識RNAのラベリングを行った。切片を室温で乾燥後、室温で20分間、4% formaldehyde / 0.1 M PB (pH 7.4)で後固定し、その後、protease K処理およびアセチル化処理した。続いて、切片を脱水および脱脂処理した。

Hybridization bufferにて1時間prehybridizationさせた後、DIG標識プローブをhybridization bufferに混合し、切片にhybridizationを行った。

Hybridization終了後、high stringency solution (50% formamide、2×SSC)に57℃で30分間洗浄後、RNase A酵素処理を行った。Blocking後、alkaline phosphatase (AP)-anti digoxigenin抗体にて抗体反応を行った。抗体反応後、AP発色基質 (NBT、BCIP)にて発色後反応を停止させた。50% glycerolで封入した後、光学顕微鏡下による検鏡及び写真撮影を行った。

免疫組織化学

一次抗体として抗ニューロプシン抗体(B5)、抗プロテアーゼM血清（北海道大学、高橋孝行教授より供与 (Matsui et al., 2000)）、抗L1抗体を用いた。凍結切片を0.1 M PBで洗浄し、5% bovine serum albumin (BSA)/PBSで室温1時間ブロッキングを行い、一次抗体を5% BSA / PBSで1000倍希釈し、4℃で16–20時間反応させた。二次抗体として、biotynilated anti rabbit IgGを5% BSA / PBSで1000倍希釈し、4℃で16–20時間反応させた。ABC試薬 (Vectorstein ABC kit, Vector Labs) で室温2時間反応させた。PBSでの洗浄後、50 mM Tris Cl (pH 7.6)で浸漬し、可視化するために、0.05% diaminobenzidine (DAB), 0.03% H2O2, 0.4% ammonium nickel in 50 mM Tris-HCl (pH 7.6)で5分間反応させた。切片を乾燥させエタノール脱水しEntellanで封入し、鏡検した。

前包埋法

ビブラトーム切片を0.1 M PBで洗浄し、30% sucrose in 0.1 M PBに浸漬し、液体窒素で凍結、解凍後、0.1 M PBで洗浄した。上記のように免疫反応後エポン包埋した。また二次抗体として、1 nm colloidal gold conjugated を用い、5% BSA / PBSで400倍希釈し、室温で1-4時間反応させ、銀増感液 (IntensEM, Amersham) を用いて22℃で6-8分間反応させ、超純水で洗浄後エポン包埋した。ウルトラミクロトームで1 μmのsemi-thin切片と75 nmの超薄切片を作成した。semi-thin切片は、トルイジンブルーで染色し、水洗・乾燥して鏡検した。超薄切片は、formvarでコートした銅グリッド (日新EM) にのせ、2% uranyl acetate およびlead citrateで染色し、透過型電子顕微鏡で観察した。

後包埋法

ビブラトーム切片を0.1 M PBで洗浄し、エタノール系列で脱水後、LR White に1時間浸漬し、平板包埋後で2日間重合した。ウルトラミクロトームで80 nmの超薄切片を作成しformvarでコートしたニッケルグリッド (日新EM) にのせた。PBSで洗浄後、5% BSA / PBSで室温1時間ブロッキングを行い、一次抗体を1000倍希釈し、4℃で16-20時間反応させた。続いてPBSで洗浄し、二次抗体として10 nm colloidal gold conjugated (Amersham) を用い、5% BSA / PBSで100倍希釈し、室温で1時間反応させた後、PBSで洗浄、1% glutaraldehyde / PBSで10分後固定した。超純水で洗浄後、1% glutaraldehyde in PBSで固定、2% uranyl acetateおよびlead citrateで染色し、透過型電子顕微鏡で観察した。

ニューロプシンの酵素活性

マウス脳脊髄をホモジネートし、NortonとPodusloの方法に従いショ糖濃度勾配法によりミエリン分画を粗精製した(Norton and Poduslo, 1973)。ミエリン分画を含むペレットに10 mM Tris HCl (pH 7.0)を加え超音波処理を行った。この溶液にリコンビナントニューロプシンを加え、2-8時間反応させた。これをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびウエスタンブロットを行い、抗ミエリン塩基性蛋白質(MBP)抗体を用いて免疫反応を行った。

結果

1. 脊髄損傷によるプロテアーゼmRNAの発現変化

無処置マウスではニューロブシンは前角の運動ニューロンにmRNA発現が見られた。しかし、白質線維束にはニューロブシンmRNA発現細胞は認められなかった(図1A)。これに対し、プロテアーゼM mRNA発現細胞は脊髄の白質に豊富に認められたが灰白質にはほとんど発現していなかった(図2A)。これらの事実より、無処置のマウスではニューロブシンは神経細胞の一部に、プロテアーゼMはオリゴデンドロサイトに発現していることが明らかとなった。

脊髄損傷後のマウスでニューロブシンmRNAの発現は白質に多く認められた(図1B-C)。ここは無処置マウスでは発現が全く認められなかった部位である。発現細胞は比較的小型のオリゴデンドロサイト様の細胞であった。発現細胞は側索と前索に多く分布しているのが見られ、皮質脊髄路を含む後索には少なかった。これに対し、脊髄損傷後でプロテアーゼM mRNA発現細胞は白質及び灰白質共に増加した(図2B-C)。両プロテアーゼmRNA発現細胞共に、損傷後1日から発現上昇が見られ、4日後をピークとして14日後にはほとんど無処置の発現レベルにまで減少した(図3)。

2. 無処置マウスにおけるプロテアーゼMタンパク質の発現細胞とその局在

抗プロテアーゼM抗体を用いて免疫組織化学法による染色を行い、光学顕微鏡および電子顕微鏡での観察を行った。

プロテアーゼMの陽性細胞は、下位脳幹では三叉神経脊髄路、錐体路、顔面神経および内耳神経等の線維束にみられた。オリゴデンドロサイト様の小型の細胞の細胞体および突起に陽性反応がみられた。上位脳では、脳梁、海馬白板、外包および内包等の線維束に陽性反応がみられた。下位脳とは異なり突起には強い免疫陽性構造は観察されなかった。またこれらのプロテアーゼMタンパク質発現パターンは、プロテアーゼM mRNAの発現パターンと一致していた。

この発現細胞を同定するために様々な細胞マーカーとの2重染色を行った。

この結果、神経細胞のマーカーであるMAP2との共存は観察されなかった (data not shown)。アストロサイトのマーカーであるGFAPとの共存も観察されなかった (図4 A-C)。成熟したオリゴデンドロサイトのマーカーであるCNPaseとはほとんどのプロテアーゼM陽性細胞で共存が観察された (図4 D-F)。この結果からプロテアーゼMは成熟オリゴデンドロサイトに発現することが明らかとなった。

前包埋法によると、上位脳および下位脳においてプロテアーゼM陽性反応は、オリゴデンドロサイトおよびミエリンにみられた (図7)。オリゴデンドロサイトは、低電子密度型 (L0)、中電子密度型 (M0) および高電子密度型 (D0) に分類される。L0型オリゴデンドロサイトは大きな細胞で核は大きく、核染色質塊は少なく、胞体には遊離リボソームが散在し、粗面小胞体やGolgi装置の発達が悪い。M0型オリゴデンドロサイトは低電子密度オリゴデンドロサイトより小さく、染色質塊は核の周辺部によくみられる。D0型オリゴデンドロサイトは細胞体も核も小さく、また粗面小胞体やゴルジ装置はよく発達している。この中で、プロテアーゼM陽性のオリゴデンドロサイトはL0型 (図6 A) およびM0型 (図6 B) であり、D0型で免疫陽性であるものはほとんど認めなかった (図6 C)。金コロイド標識した二次抗体を用いた検討により、ミエリンに高い陽性反応が観察された。その反応は、ミエリンの圧密部位、弛緩部位を問わずミエリン鞘全体に広範にみとめられた。また弛緩部位により高い反応性がみられた。

3. 上位脳と下位脳におけるプロテアーゼM発現様式の違い

上位脳と下位脳でもプロテアーゼM発現様式の違いがオリゴデンドロサイトの微細構造の差異によるものであるかを検討した。

トルイジンブルー染色方法でオリゴデンドロサイトは3種類の染色パターンを示し、それぞれの電子密度の違いから上記のL0、M0、D0に分類した。上位脳ではD0が多く、下位脳ではL0が多く分布しており上位脳と下位脳でオリゴデンドロサイトの分布の違いがみられた

上位脳および下位脳でプロテアーゼMタンパク質のミエリンでの染色性が異

なっていた。金コロイド標識したプロテアーゼMの免疫電子顕微鏡観察において、下位脳が上位脳よりもミエリンに高い陽性反応を示し、これは光学顕微鏡による観察で下位脳では突起により高いプロテアーゼM陽性反応がみられた結果と関連があると考えられる。

4. 中枢神経系障害時におけるプロテアーゼMタンパク質の発現細胞とその局在

中枢神経系障害時におけるプロテアーゼMの機能を検討するために、海馬内カイニン酸投与4日後のマウス脳を用いてプロテアーゼMタンパク質の免疫組織化学を行い、光学顕微鏡および電子顕微鏡による観察を行った。

チオニン染色によって、カイニン酸注入側では海馬CA1領域の錐体細胞が細胞死を起こしているのを確認した。脳梁と海馬白板においてコントロール側

(PBS注入)より陽性細胞数が増えていた。免疫組織化学の結果、脳梁、海馬白板および外包でコントロールより強い陽性反応が認められた。これは、カイニン酸投与後、海馬白板においてプロテアーゼM mRNAの発現誘導がみられることに一致する。また1 μ mのsemi-thin切片を作成しトルイジンブルー染色したところ、海馬白板に明調の核をもった細胞が集合しているのがみられ、これは無処置マウス脳およびコントロール側ではみられないものであった。さらに、脊髄損傷によってもプロテアーゼM発現が増強した。陽性細胞はCNPase陰性のもも観察され、損傷時には成熟オリゴデンドロサイト以外の細胞も発現していることが明らかとなった(図9)。

前包埋法による免疫電子顕微鏡観察において、光学顕微鏡観察でみられた海馬白板における細胞集合はL0のオリゴデンドロサイトであり、プロテアーゼM陽性であることが認められた。またミエリン鞘においても無処置マウスと同じようにプロテアーゼM陽性反応を観察できたが、カイニン酸投与により変性した軸索周囲のミエリン鞘にはより強い陽性反応がみられた(図8)。また軸索が変性しミエリン鞘との接触がなくなったものもあり、それを取り巻いていたミエリン鞘にも陽性反応が認められた。後包埋法による免疫標識を行った結果、

プロテアーゼM陽性反応はミエリン鞘およびオリゴデンドロサイトの細胞質にみられた。

5. ニューロプシンの基質

ミエリン分画の蛋白質をリコンビナントニューロプシンと反応させたところ、MBPと同一の分子量のバンドである蛋白質の減少が認められた。そこで、抗MBP抗体を用いて検討したところ、ニューロプシンによりMBP蛋白質の減少が認められた(図10)。これにより、ニューロプシンはMBPを切断することができることが明らかとなった。

6. L1発現の変化

脊髄損傷により脊髄白質の前索と側索においてL1免疫陽性構造の増加が観察された。また、L1 mRNA発現細胞の増加も観察された。

7. EAEの進行とプロテアーゼ発現

EAEはMOGの皮下注後3週から4週間後にスコアがピークに達した(図11)。この時期の脊髄におけるプロテアーゼmRNAの発現を炎症部位と比較検討を行った。EAE発症マウスでは軟膜からの炎症性細胞が浸潤しているのが観察された(図12)。ニューロプシンmRNA発現細胞はこの炎症部位の周辺に多く存在していた。プロテアーゼM mRNA発現細胞も炎症細胞浸潤部位の周辺に多く存在しており、ニューロプシンmRNA発現細胞よりも数が多かった(図13、14)。また、ニューロプシンノックアウトマウスでEAEの進行を観察したところ、重症化が遅延する傾向にあった。

考察と今後の展望

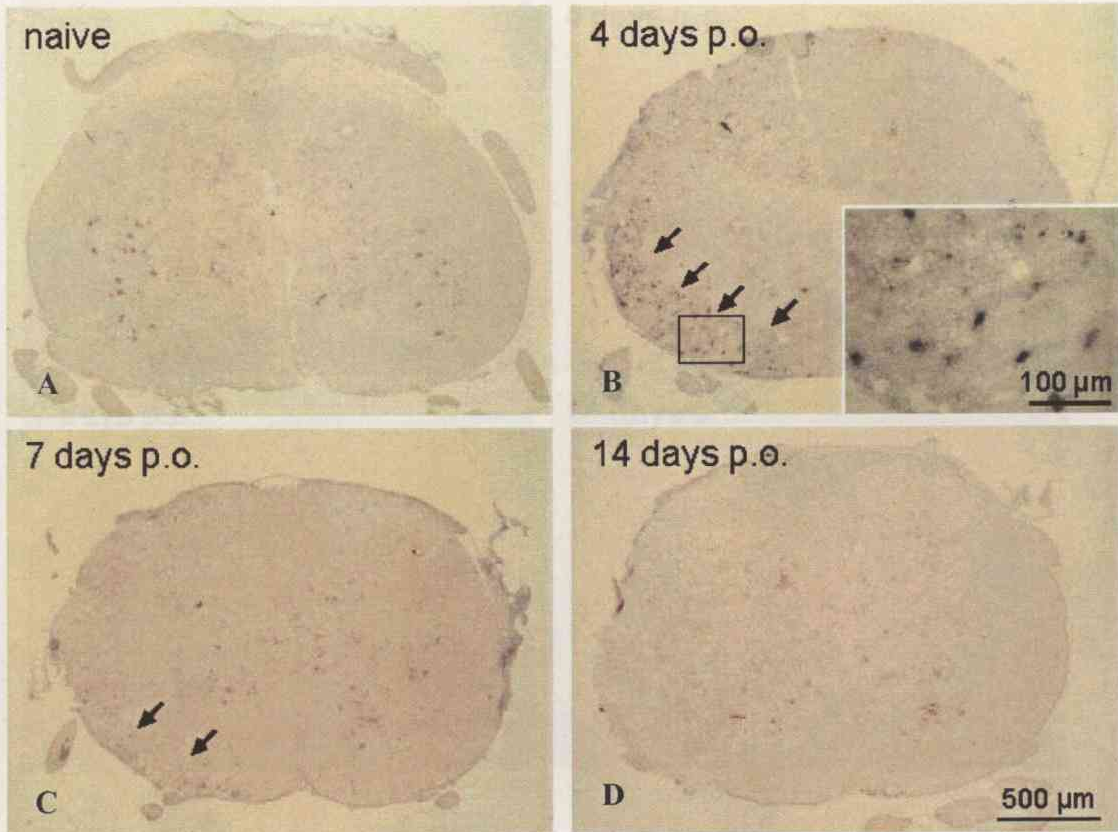
今回の研究により中枢神経の障害によりオリゴデンドロサイトにプロテアーゼが発現誘導され、これらはミエリンにも局在しており、また、ミエリン蛋白

質を分解する能力があることが明らかとなった。これらの結果より、ニューロプシンやプロテアーゼMなどのプロテアーゼが中枢神経損傷時に発現してミエリン蛋白質等を分解することにより損傷後の修復、再生の一連の過程に関連していることを示している。この知見は中枢神経の損傷に関するオリゴデンドロサイトの役割を明らかにするのみならず、損傷後の治療に向けての方策としてプロテアーゼもしくはその阻害剤が検討されうることを示唆している。

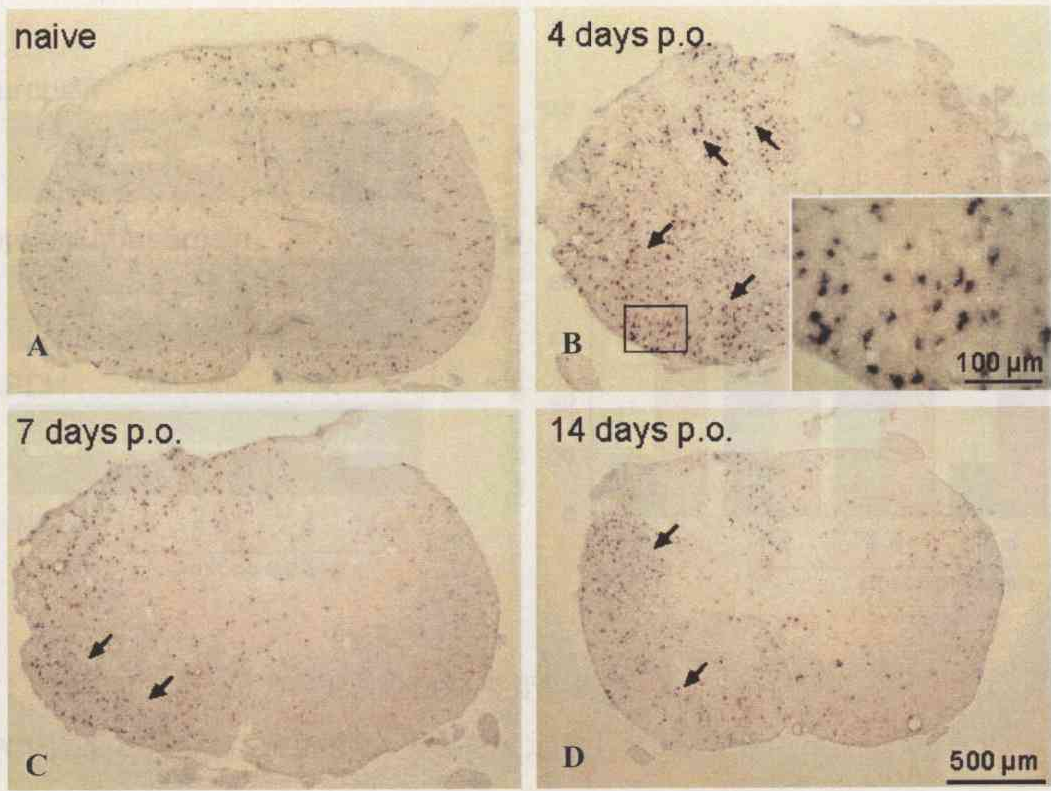
今後は、オリゴデンドロサイトの機能をさらに追求するためにオリゴデンドロサイトを障害した際の神経細胞の生存維持等に関して検討していく予定である。

参考文献

- 1) Chen ZL, Yoshida S, Kato K, Momota Y, Suzuki J, Tanaka T, Ito J, Nishino H, Aimoto S, Kiyama H, Shiosaka S (1995) Expression and activity-dependent changes of a novel limbic-serine protease gene in the hippocampus. *J Neurosci* 15: 5088-5097.
- 2) He XP, Shiosaka S, Yoshida S (2001) Expression of neuropsin in oligodendrocytes after injury to the CNS. *Neurosci Res* 39: 455-462.
- 3) Hirata A, Yoshida S, Inoue N, Matsumoto-Miyai K, Ninomiya A, Taniguchi M, Matsuyama T, Kato K, Iizasa H, Kataoka Y, Yoshida N, Shiosaka S (2001) Abnormalities of synapses and neurons in the hippocampus of neuropsin-deficient mice. *Mol Cell Neurosci* 17: 600-610.
- 4) Komai S, Matsuyama T, Matsumoto K, Kato K, Kobayashi M, Imamura K, Yoshida S, Ugawa S, Shiosaka S (2000) Neuropsin regulates an early phase of schaffer-collateral long-term potentiation in the murine hippocampus. *Eur J Neurosci* 12: 1479-1486.
- 5) Momota Y, Yoshida S, Ito J, Shibata M, Kato K, Sakurai K, Matsumoto K, Shiosaka S (1998) Blockade of neuropsin, a serine protease, ameliorates kindling epilepsy. *Eur J Neurosci* 10: 760-764.
- 6) Scarisbrick IA, Towner MD, Isackson PJ (1997) Nervous system-specific expression of a novel serine protease: regulation in the adult rat spinal cord by excitotoxic injury. *J Neurosci* 17: 8156-8168.
- 7) Shimizu C, Yoshida S, Shibata M, Kato K, Momota Y, Matsumoto K, Shiosaka T, Midorikawa R, Kamachi T, Kawabe A, Shiosaka S (1998)



1 脊髄損傷後のニューロトロフィンmRNA発現変化
傷後4日と7日の前索と側索にmRNA発現細胞がみられる。



2 脊髄損傷後のプロテアーゼMmRNA発現変化
傷後4日から14日にかけてmRNA発現細胞がみられる。

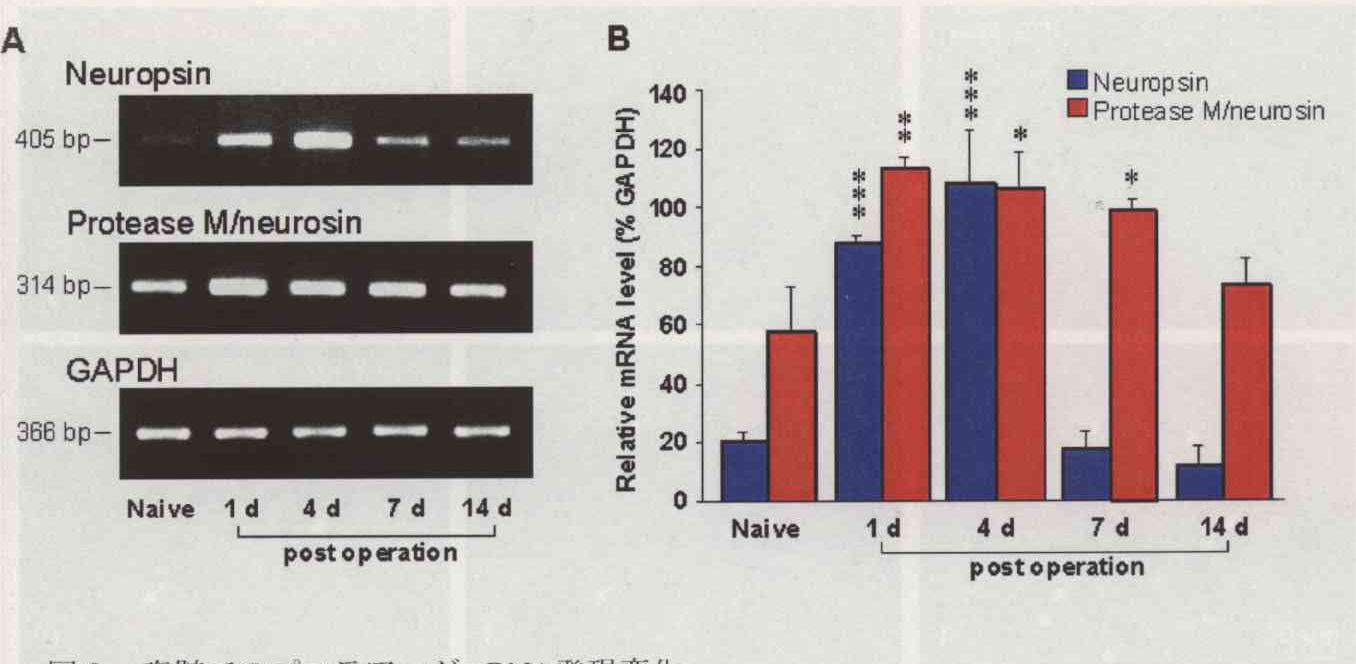


図3 脊髄でのプロテアーゼmRNA発現変化

RT-PCRにより、脊髄でのmRNA発現を反定量した。

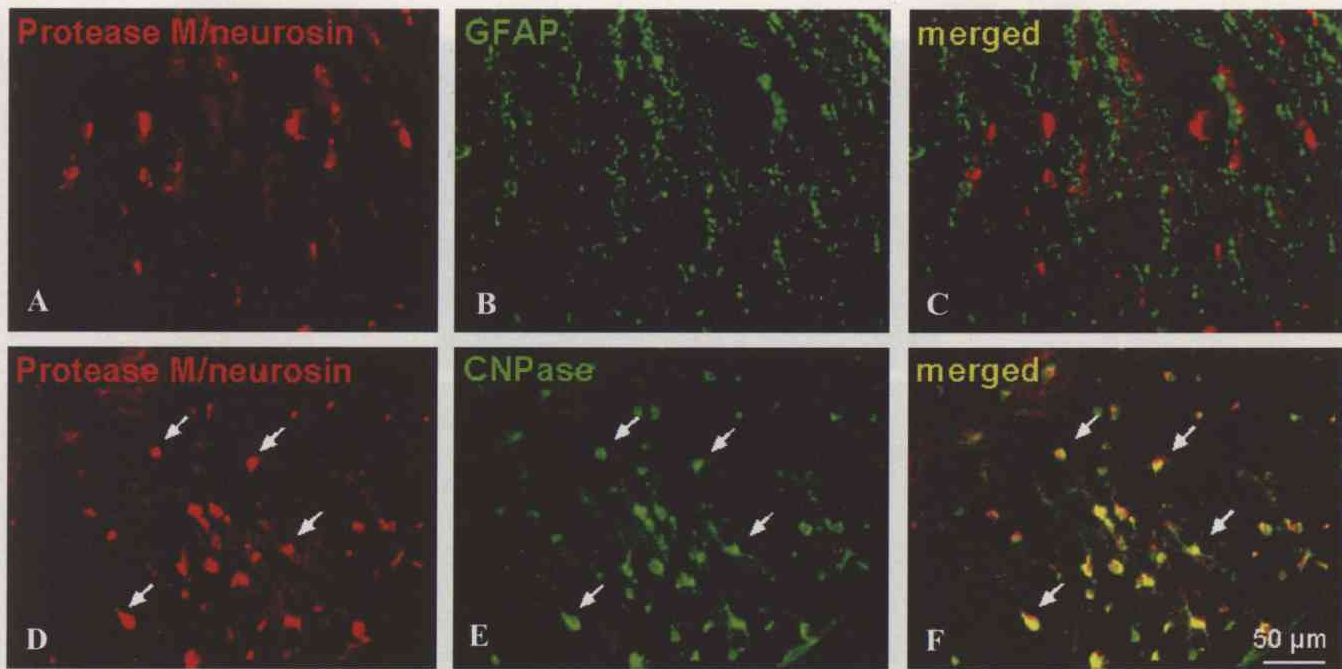


図4 非損傷時の脊髄でのプロテアーゼM発現細胞
オリゴデンドロサイトマーカーのCNPaseと共存する。

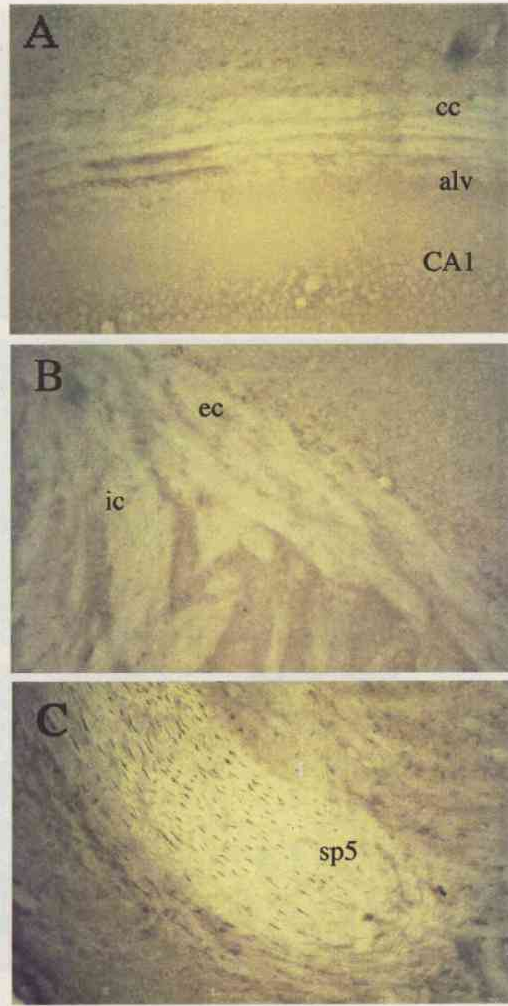


図5 プロテアーゼMタンパク質の発現
A、脳梁；B、外包と内包；C、三叉神経脊髄路。

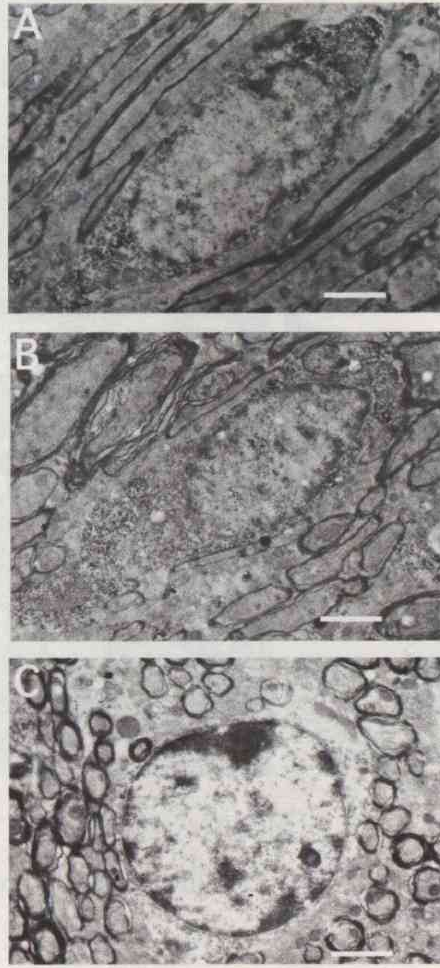


図6 オリゴデンドロサイト形態の相違とプロテアーゼM発現
A、プロテアーゼM陽性のLO。B、プロテアーゼM陽性のMO。C、プロテアーゼM陰性のDO
scale bar, 2 μm 。

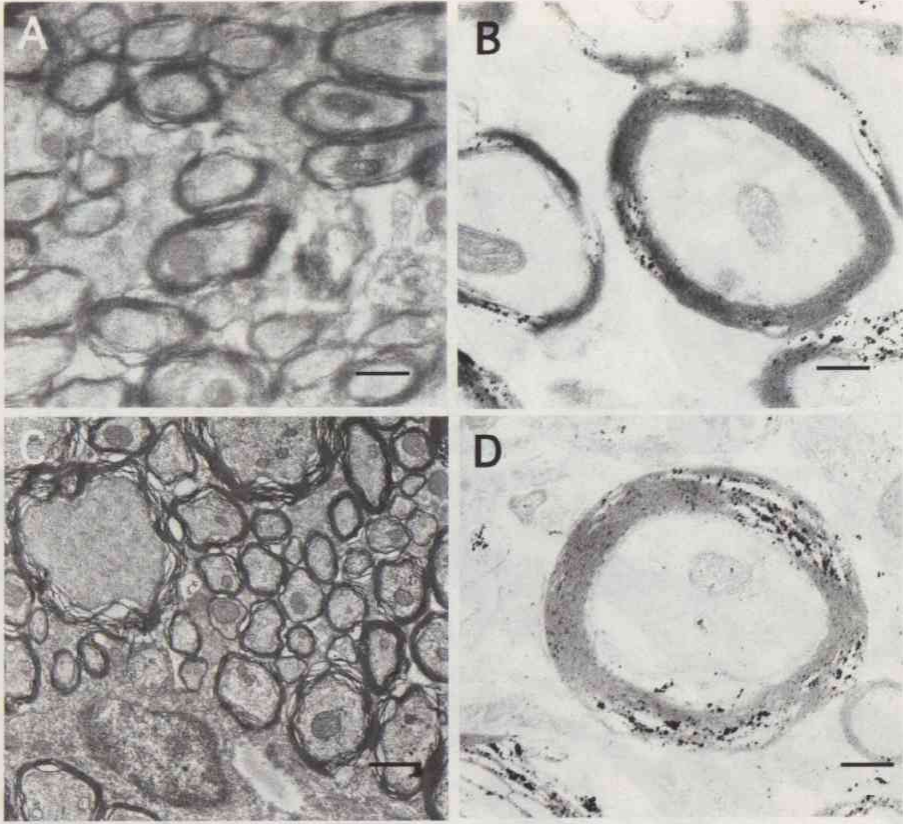


図7 プロテアーゼM陽性の微細構造
scale bars, 1.5 μ m (A, C); 300 nm (B, D).

図8 添加剤後のプロテアーゼM陽性の微細構造
scale bars, 300 nm (A, B, D); 1 μ m (C).

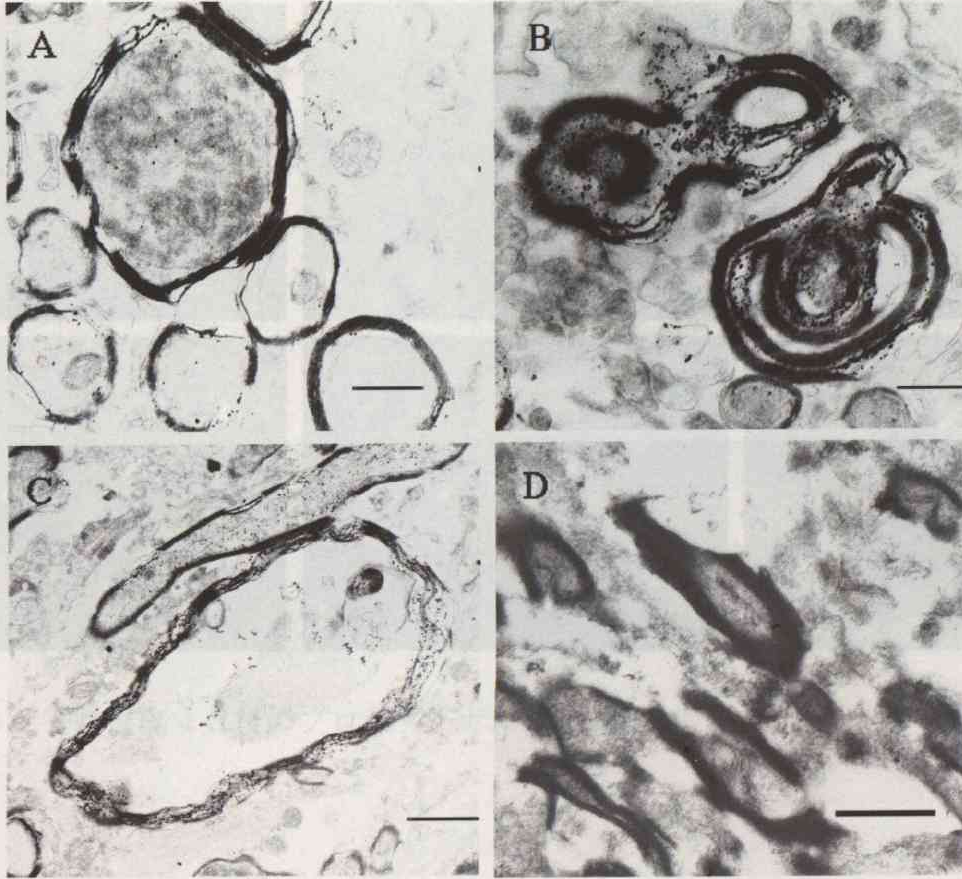


図8 脳損傷後のプロテアーゼM陽性の微細構造
scale bars, 500 nm (A, B, D); 1 μ m (C).

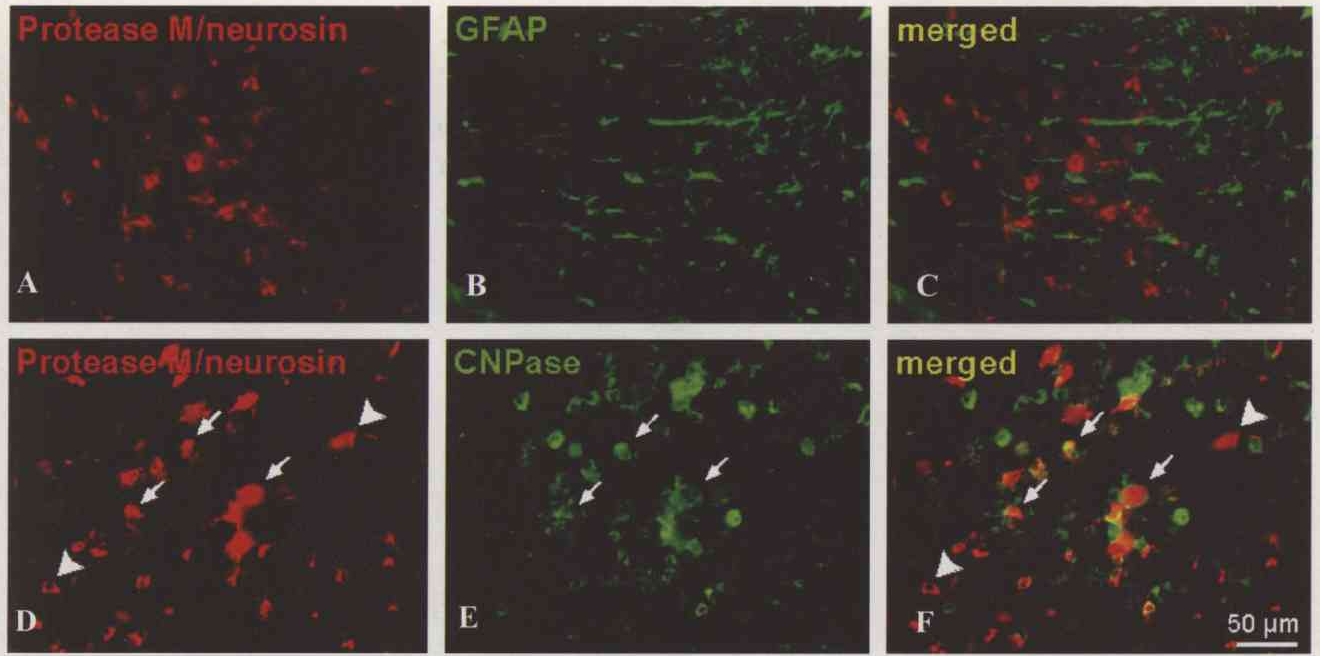


図9 脊髄損傷4日後のプロテアーゼM陽性細胞

図10 脊髄損傷4日後のMBP陽性細胞

A. カマフラクサー染色、B. 抗MBP抗体を用いたウエスタンブロット

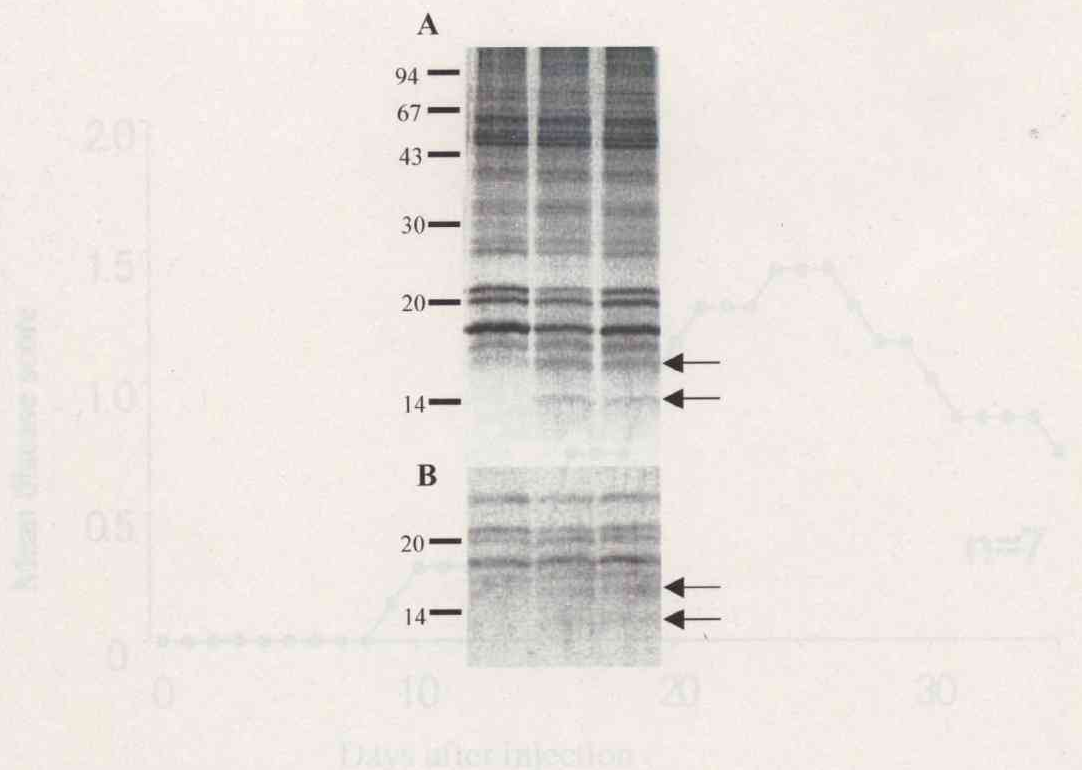


図10 ニューロプシンによるMBPの切断

A、クマシーブルー染色；B、抗MBP抗体を用いたウエスタンブロット。

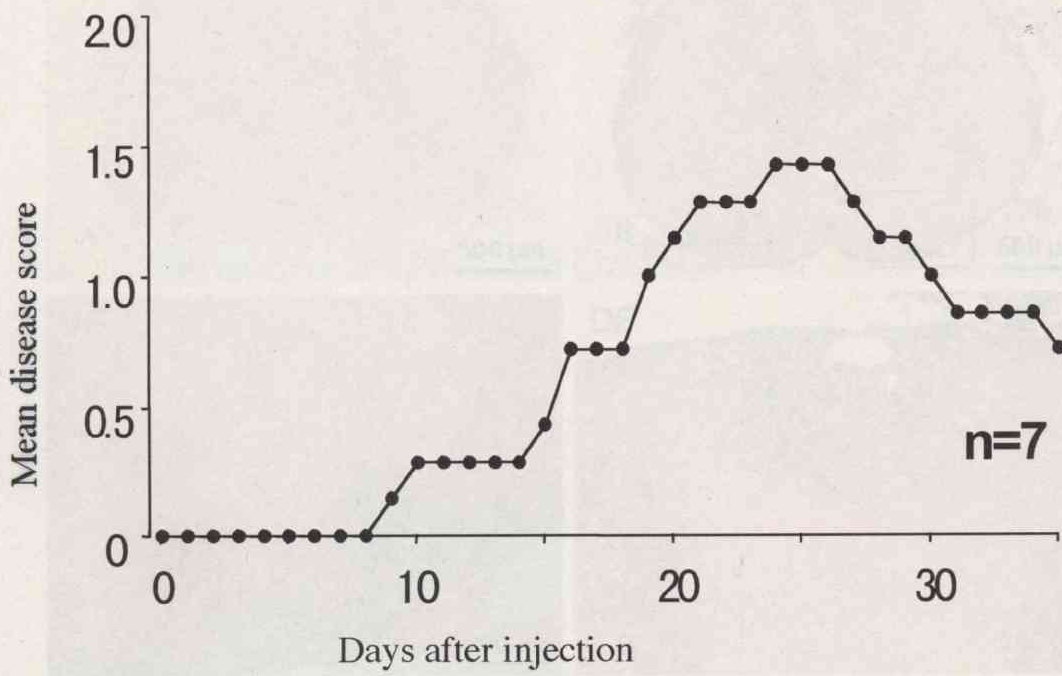


図 1 1 EAEの進行

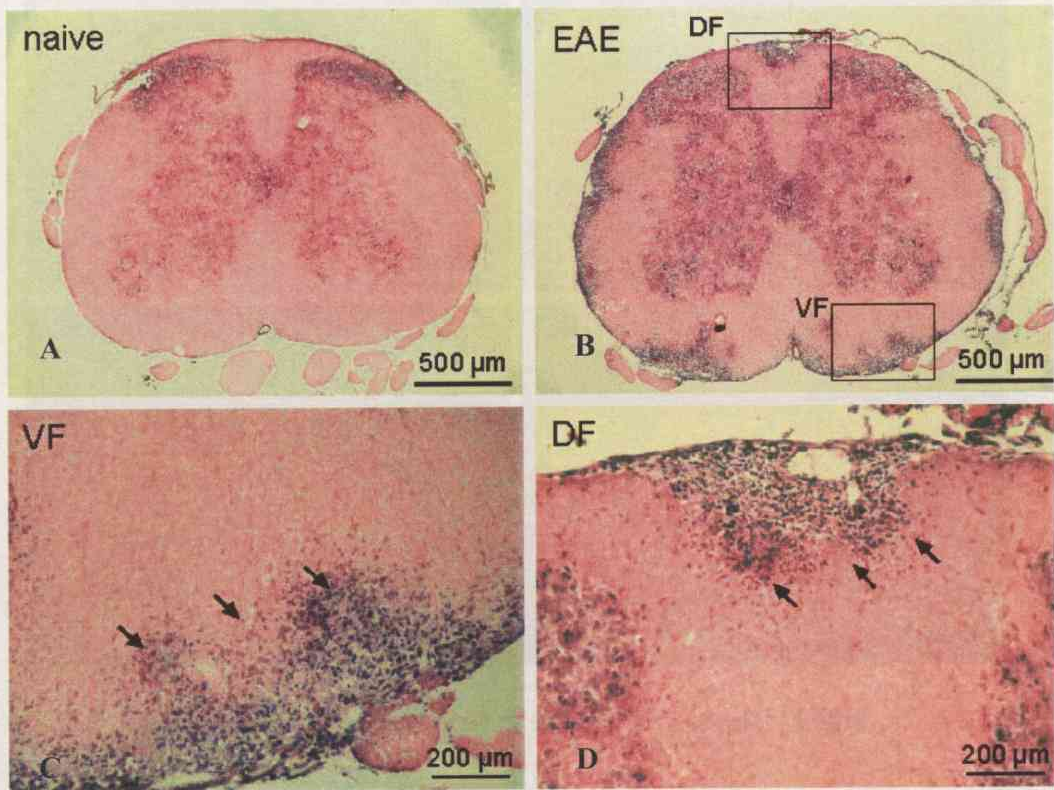


図 1 2 EAEでの細胞浸潤

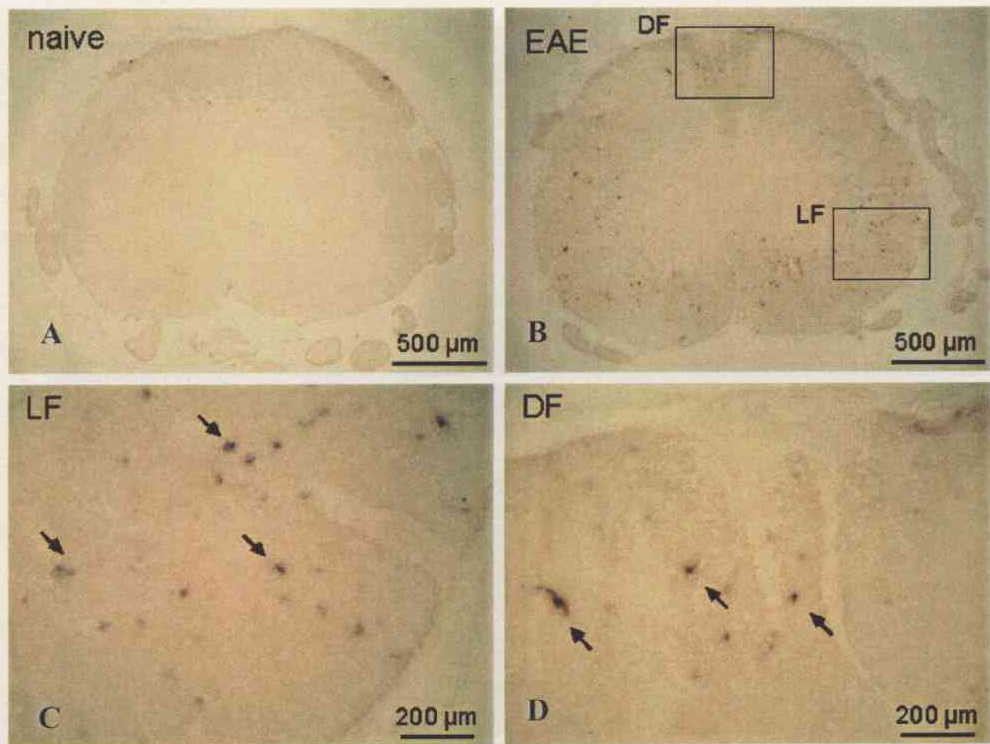


図 13 EAEによる脱髄領域でのニューロトロフィンmRNA発現

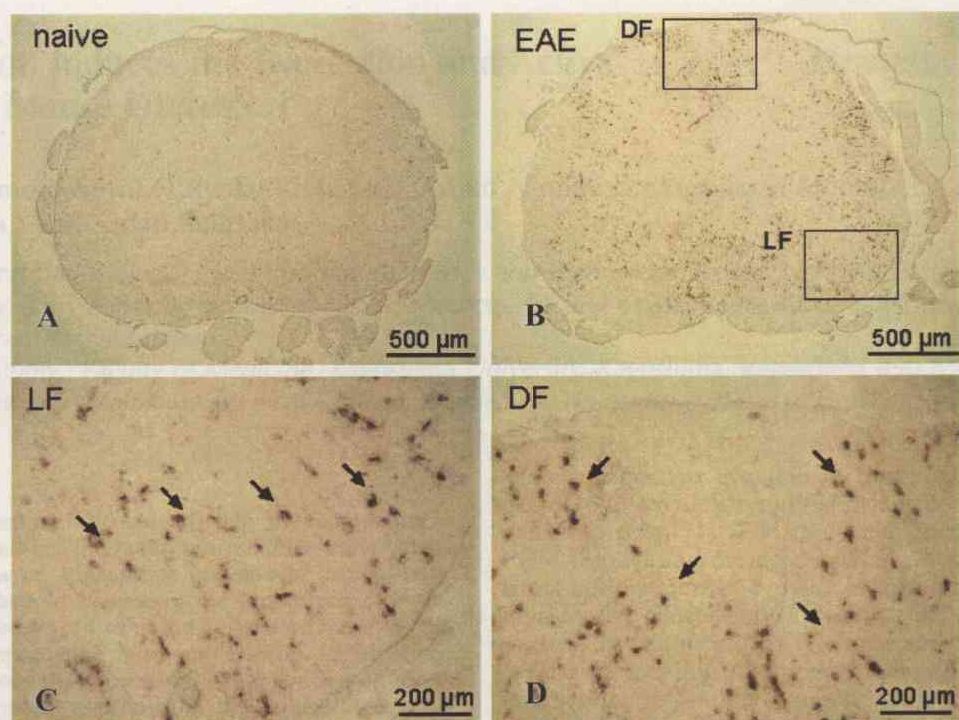


図 14 EAEによる脱髄領域でのプロテアーゼMmRNA発現

DISCUSSION

During pregnancy, maternal and fetal tissues interact locally, biochemically, and hormonally. Only during pregnancy does such an interaction occur between two different species under normal physiological conditions. In non-adaptively selected and humans, the maternal uterine wall undergoes extensive growth, differentiation, and transformation of endometrial stromal cells to decidual cells following the implantation of an embryo [1]. This process, known as decidualization, involves extracellular matrix (ECM) remodeling from uterine to fetal blood invasion, no components control the embryo [2-5] and a dynamic change of cell-cell adhesion [6]. Because decidual cells are strategically placed to surround the invasive of the fetal trophoblast, decidualization accompanied by this remodeling of uterine to cell-cell adhesion serves as protection

This work was supported by a Specialized Collaborative Program of Living Science and Technology for the Promotion of Science (S-1999-0001), Japanese Government (Ministry of Education, Culture and Sports), Grant-in-Aid for Scientific Research (14540019) from the Japanese Ministry of Education, Culture and Sports, and Grant-in-Aid for Scientific Research (14540019) from the Japanese Ministry of Education, Culture and Sports.

Received 1 April 2002

Accepted 20 April 2002

Published 1 June 2002

© 2002 The Society for Reproductive Biology. All rights reserved. DOI: 10.1093/rp/97.1.144

of the fetus. Neurotrophin is a secreted protein that is a member of the nerve growth factor (NGF) family [14] and is a candidate for these processes for the following reasons: (1) neurotrophin mRNA was expressed in the decidual cells of pregnancy-rich and nonpregnant regions during implantation, whereas its expression was detected in nonpregnant state [12]; and (2) neurotrophin was activated after release into the extracellular space and cleaved an ECM protein, fibronectin [13]. However, the precise mechanism of neurotrophin in the pregnant uterus remains poorly understood. In addition, the spatiotemporal pattern of mRNA and protein expression of proteases is not necessarily consistent with the expression of their proteolytic activity owing to the tight regulation of their activity by their specific activator and inhibitor. Neurotrophin activity itself is strictly regulated by an activation process that requires [13] and by its specific inhibitors [14]. To gain an insight into the neurotrophin function in pregnant uterus, we analyzed the spatiotemporal pattern of neurotrophin in addition to its expression. We first investigated the temporal change in the content of total and active neurotrophin protein during normal pregnancy. Neural activity regulates the expression and activity of neurotrophin in the brain [15-18], but the mechanisms regulating neurotrophin in the uterus are unknown. We then examined the expression and cell activity of neurotrophin in pregnant pregnant uterus and conditionally induced decidualization to identify the stimulus that most regulates decidualization by signals from the conceptus inducing its upregulation.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of Uterine Tissues

Female Wistar-Kyoto mice were raised and housed for 4 weeks prior to the mating period (12 h light/12 h dark cycle). Mice were killed when deeply anesthetized, and mice were divided into the groups. Uterine resection of 10-day-old pregnant mice was performed under anesthesia. Uterine tissue was divided into 10-day-old pregnant mice. At 4.5 dpc, mice were induced to decidualize by withdrawing the uterine