

---

**脱髄関連プロテアーゼの作用機構**

---

18500260

**平成 18 年度～平成 19 年度科学研究費補助金  
(基盤研究 (C)) 研究成果報告書**

平成 20 年 5 月

研究代表者 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。現在、切断された軸索を再生すべく栄養因子の投与や遺伝子改変の試みがなされ、また、神経回路網再構築のために幹細胞を用いた研究も盛んに行われているが実用化にいたる過程にはまだ解決しなければならない問題も多い。これらの点を考慮すると、脊髄損傷や変性疾患において再生により機能を回復する事に加え、損傷を最小限にとどめ機能温存を図る事が重要になってくると考えられる。

我々はオリゴデンドロサイトが2種のセリンプロテアーゼを発現し、損傷等の傷害時にその発現が増強する事を見出してきた。今回の課題による研究ではこれらのプロテアーゼの機能に迫るために、野生型動物と遺伝子ノックアウト動物における神経損傷後の機能を比較、検討を行った。

## 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：村 上 公 一（旭川医科大学医学部助教）

## 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18年度	1,900	0	1,900
平成19年度	1,400	420	1,820
総計	3,300	420	3,720

## 研究発表

### （1）学会誌等

1. Bando Y, Ito S, Nagai Y, Terayama R, Kishibe M, Jiang YP, Mitrovic B, Takahashi T, Yoshida S., Implications of protease M/neurosin in myelination during experimental demyelination and remyelination. *Neurosci Lett.*, 405(3):175-180, 2006.

2. Murakami K, Namikawa K, Shimizu T, Shirasawa T, Yoshida S, Kiyama H, Nerve injury induces the expression of EXT2, a glycosyltransferase required for heparin sulfate synthesis. *Neuroscience*, 141: 1961-1969, 2006.

3. Kishibe M, Bando Y, Terayama R, Namikawa K, Takahashi H, Hashimoto Y, Ishida-Yamamoto A, Jiang Y-P, Mitrovic B, Perez D, Iizuka H and Yoshida S, Kallikrein 8 is involved in skin desquamation in cooperation with other kallikreins., *J Biol Chem*, 282, 5834-5841, 2007.

4. Terayama R, Bando Y, Murakami K, Kato K, Kishibe M and Yoshida S,

Neuropsin promotes oligodendrocyte death, demyelination and axonal degeneration after spinal cord injury, *Neuroscience*, 148, 175-187, 2007.

(2) 口頭発表

1. 村上公一、瀧川一彦、清水孝彦、白澤卓二、吉田成孝、木山博資、末梢神経損傷時における糖転移酵素EXT2の発現変動、第29回日本神経科学大会、京都、2007.7.21.

2. 村上公一、吉田成孝、末梢神経損傷時のシンデカン-1の発現変動、第30回日本神経科学大会、横浜、2007.9.10.

## 材料と方法

1. プロテアーゼ M 遺伝子ノックアウトマウスの表現型の解析を行った。

### (1) 行動観察による運動能力等の検討

ケージの中で1分間マウスの行動を観察した。

### (2) 組織学的検討

8週齢のプロテアーゼ M 遺伝子ノックアウトマウスおよび野生型のマウスをネンブータルにて深麻酔後、4% paraformaldehyde, 0.1M phosphate buffer (PB, pH 7.4)にて灌流固定を行い、脳と脊髄から厚さ 18 $\mu$ m の凍結切片を作成した。切片に対し Hematoxylin-eosin 染色および、Thionin による Nissl 染色を行った。電子顕微鏡による観察のために、マウスを 2% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde, 0.1 M PB (pH 7.4)にて灌流固定を行った。脳梁および脊髄のブロック片を切り出し、1% Osmium tetroxide により1時間固定を行い、Epoxy 樹脂包埋後超薄切片を作成した。1% Uranium acetate による染色および鉛染色を施し、電子顕微鏡 (Hitachi H-7650) にて観察した。

る。

### (3) 生化学的解析

プロテアーゼ M 遺伝子ノックアウトマウスと野生型マウスを頸椎脱臼にて安楽死ごとに視神経と脊髄を取り出した。RIPA buffer (1% Nonidet P-40, PMSF, EDTA in PBS)にてホモジナイズ後、polyacrylamide gel にて電気泳動を行い、PVDF 膜に転写後した。家兔抗プロテアーゼ M 抗体およびマウス抗ミエリン塩基性タンパク抗体にてインキュベート後、ECL chemiluminescence (Amersham) にて発光後 lumino image analyzer (LAS-3000; Fuji)にて観察を行った。

## 2. Experimental allergic encephalomyelitis (EAE)

6-8 週齢のプロテアーゼ M 遺伝子ノックアウトマウスと野生型マウスに対し EAE を生じさせた。Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) の 35-55 オリゴペプチド (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) を Genosys (Sigma)より購入した。このオリ

ゴペプチド 200 ng を phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) 100  $\mu$ l に溶解し、400  $\mu$ g の熱不活性化した *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (DIFCO, Detroit, MI) を含む 100  $\mu$ l の complete Freund' s adjuvant と共にネンブタールにて麻酔後のマウスの四肢に皮下注射した。続いて、200 ng の pertussis toxin を腹腔内注射した。2 日後に 200 ng の pertussis toxin を腹腔内に追加投与した。行動の観察には以下の 0-5 の 6 段階のスコアを用いた。

0、健常

1、尻尾の脱力、歩行の異常

2、後肢の部分麻痺

3、後肢の完全麻痺もしくは前肢の部分麻痺

4、後肢の完全麻痺かつ前肢の部分麻痺

5、瀕死の状態

MOG ペプチド免疫 3 週後の一部のマウスを深麻酔後、脊髄を摘出し RIPA buffer にてホモジェナイズし、電気泳動およびウェスタンブロットを行った。抗 MMP9 抗体 (Sigma) および抗 MBP 抗体を用いて免疫反応を行った。また、ゼラチン-ポリアクリルアミドゲルを用いてザイモグラフィーを行った。

他の一部のマウスは MOG ペプチド免疫 3 週後に深麻酔後、4% paraformaldehyde, 0.1M PB (pH 7.4) にて灌流固定を行い、脊髄の凍結切片を作成し、Luxol Fast Blue と Thionin 染色を行って検鏡した。

## 結果

### 1. 行動観察

マウスの行動を肉眼にて観察したところ、野生型と比べて行動様式には差を認めなかった。

### 2. 組織学的検討

光学顕微鏡による組織観察

(図 1)

超微細構造

基本的な構造には大きな差はなく、ミエリンも野生型と大きな差は認められなかった (図 2)。

3. ウェスタンブロットにより、ノックアウト動物脊髄での MBP 量は多少少ない傾向にあったが有意な差は認められなかった。CNPase の発現量に関しても差は認められなかった。(図 3)

### 4. EAE

EAE を生じさせたところ、ノックアウトマウスは野生型に比べ発症が遅く、行動学的な症状も軽かった。(図 4)

組織学的観察ではノックアウトマウスでは脊髄内への細胞浸潤が少なく、また、拡散しない傾向にあった。(図 5)

MMP9 は野生型マウスでは EAE により、ウェスタンブロットによる発現量とザイモグラフィによる活性化のいずれも大きな増加を示したが、ノックアウトマウスではこれが見られなかった。(図 6)

### 5. 脊髄損傷

ノックアウト動物では行動学的な回復が野生型よりも良好であった (図 7)。ミエリン塩基性タンパク質 (MBP) 発現を検討した結果、ノックアウト動物では、

傷害部位より頭側では量が少なく、尾側では多かった（図 8）。

6. ニューロブシンノックアウトマウスでプロテアーゼ M の発現を測定したところ皮膚における発現量の低下は観察されたが脳においては有意な差は認められていない (Kishibe et al., 2007)。

以上の結果より、KLK6 が EAE 発症に重要な関与をしている事が示唆された。



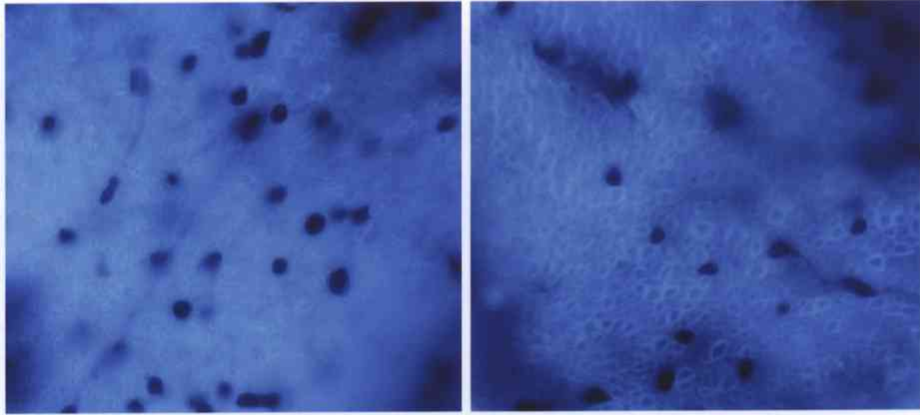


図1 脊髄後索の顕微鏡写真

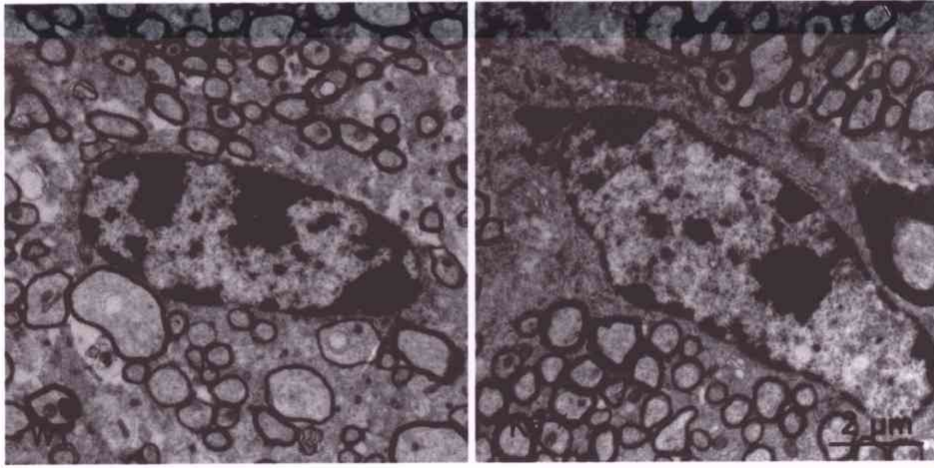


図2 電子顕微鏡による野生型(WT)とKlk6ノックアウトマウス(K6<sup>-/-</sup>)の脳梁

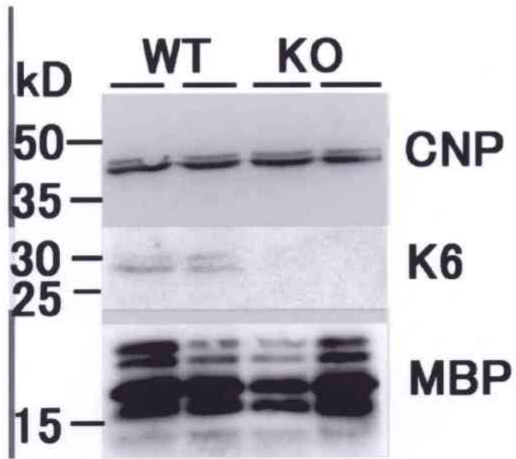
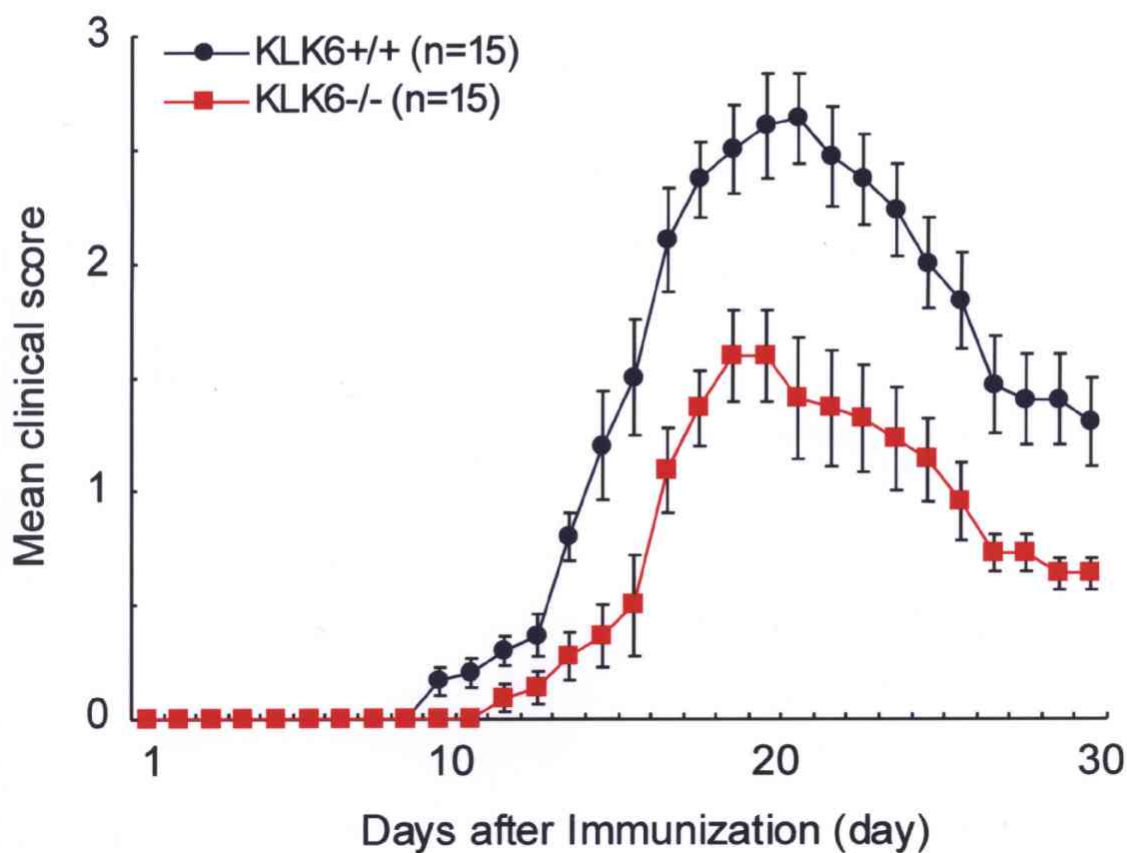


図3 ウェスタンブロットによるCNPaseとMBPの発現



	Incidence	Mortality	Day of onset	Mean max grade
KLK6 +/+	15/15	-	12.2 ± 0.5	2.7 ± 0.2
KLK6 -/-	15/15	-	15.7 ± 0.6*	1.9 ± 0.2*

\*P < 0.01 vs WT mice.

図4 EAEによる行動学的変化

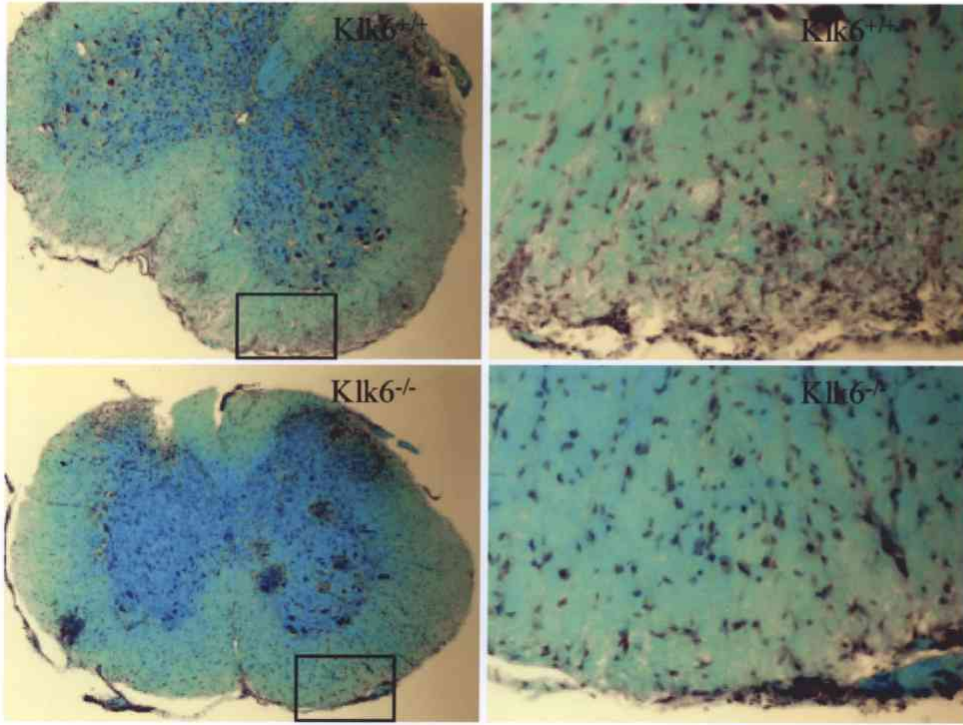
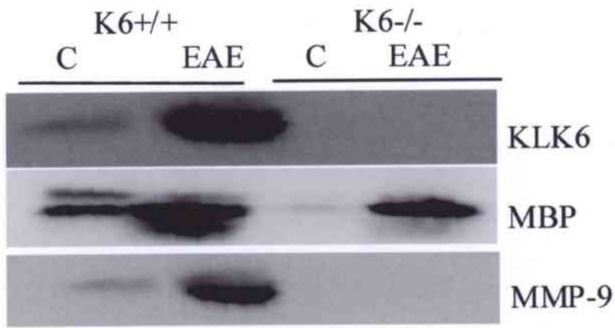


図5 EAEによる細胞浸潤と脱髄

A)



B)

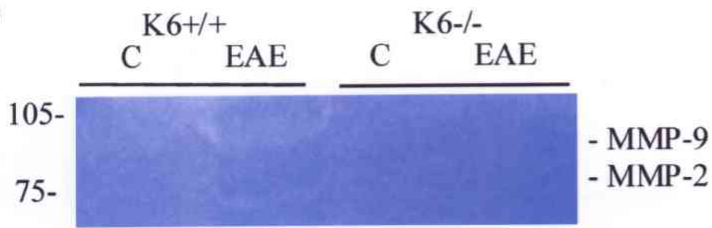


図6 EAE脊髄のMBPとMMP-9発現

A, ウェスタンブロット解析。B, ザイモグラフィーによる解析。

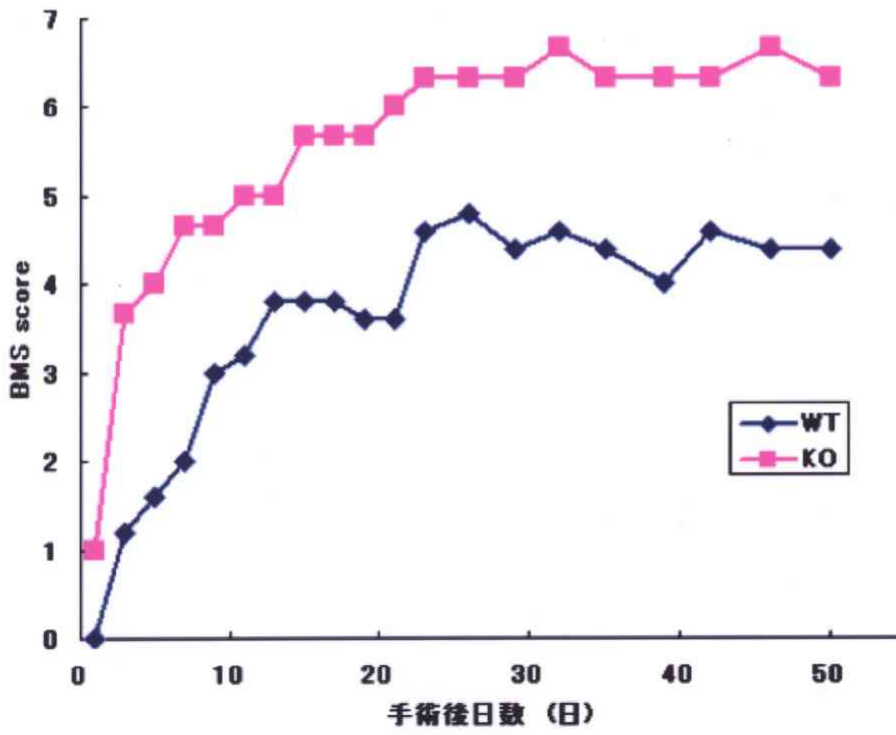


図7 脊髄損傷後の行動学的評価

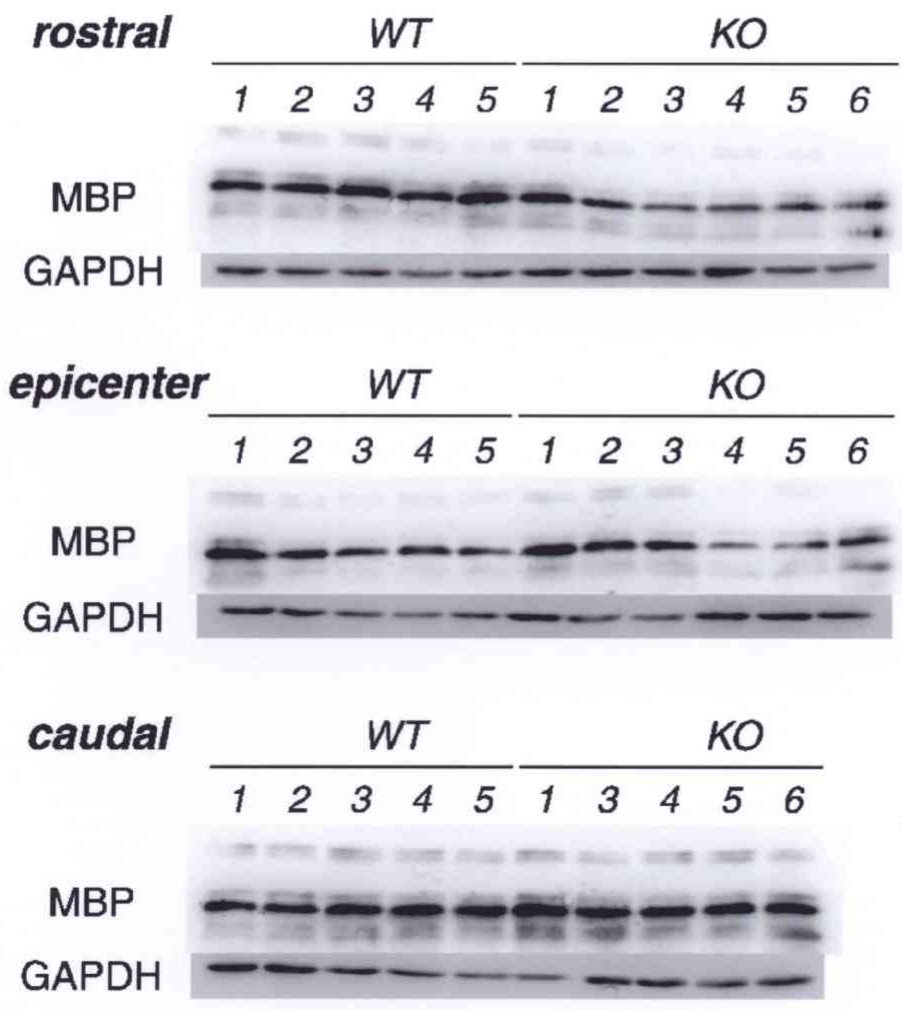


図8 脊髓損傷後のMBP発現