

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

脳21 (2010.01) 13巻1号:9～14.

【プロテアーゼ依存性細胞シグナリングと生理・病態】
オリゴデンドロサイトの生死とプロテアーゼ

吉田成孝

プロテアーゼ依存性細胞 シグナリングと生理・病態

オリゴデンドロサイトの生死と プロテアーゼ

よしだ しげたか | 旭川医科大学解剖学講座機能形態学分野 (〒078-8510 北海道旭川市緑が丘東2条1-1-1)
吉田成孝 | E-mail: syoshida@asahikawa-med.ac.jp

SUMMARY

カリクレイン関連プロテアーゼの中で、神経系には KLK6 と KLK8 (ニューロプシン) の発現が豊富に見られる。KLK8 は胎生期から中枢神経系に発現しており、生後は大脳辺縁系の神経細胞に発現が限局してくる。KLK6 は一貫して成熟したオリゴデンドロサイトに発現が認められる。中枢神経が損傷されると、KLK6 に加え、KLK8 もオリゴデンドロサイトに発現する。脊髄損傷後では KLK8 遺伝子ノックアウトマウスでは野生型に比べてオリゴデンドロサイトの細胞死の減少がみられ、軸索の損傷も少なかった。多発性硬化症のモデルである experimental allergic encephalitis (EAE) においても、KLK8 ノックアウトマウスでの症状が軽いなど類似の所見が得られた。これらの結果から KLK6 や KLK8 は不用なオリゴデンドロサイトの除去に関与していると考えられる。

I. カリクレイン関連プロテアーゼ

カリクレインはキニノーゲンを切断しブラッディキニンなどのキニンを切り出す酵素として同定された。酵素の型としてはトリプシンやキモトリプシンのようにアミノ酸残基セリンを活性中心に持つセリンプロテアーゼである。カリクレイン活性をもつ酵素としては組織内に存在する腺性カリクレイン (glandular kallikrein) と血漿内に存在する血漿カリクレイン (plasma kallikrein) があるが、分子としては全く異なるものである。腺性カリクレイン遺伝子座に多くのセリンプロテアーゼ遺伝子が存在することが近年明らかとなった。

ヒト腺性カリクレイン (以下本稿ではカリクレインと表記する) 遺伝子座は 19q13.3-q13.4 にあり遺伝子名を KLK1 と命名された。また、染色体上の同じ領域にカリクレインと相同性が非常に高いカリクレイン様プロテアーゼ遺伝子が2つ存在し、それぞれ、KLK2 と KLK3 である。この KLK3 は前立腺に豊富に存在し、前立腺癌のマーカーとしても用いられる前立腺特異抗原 (prostate-specific antigen : PSA) である。これら、カリクレインおよびカリクレイン様プロテアーゼはヒトを含む霊長類ではこれらの3種の遺伝子であるが、げっ歯類では20以上の多くの遺伝子が存在することが知られている。しかし、これらの生物学的意義は全

KEY WORDS

オリゴデンドロサイト
KLK6
KLK8/ニューロプシン
脱髄
ミエリン

く不明である。これらのカリクレイン遺伝子とは異なり、カリクレインと相同性はやや低いが、一定の相同性を持つ一連のセリンプロテアーゼ cDNA が相次いで見出され、カリクレイン遺伝子座に連続して並んでいることが明らかとなった。これらの遺伝子は KLK4-KLK15 と命名され、それぞれヒトとマウスの遺伝子ホモログが存在する¹⁾。これらのプロテアーゼは酵素としての活性には一定の類似性が認められるが、多くのものでは基質や活性化のプロセスを含む生物学的意義はまだ不明な点が多い。これらのプロテアーゼ（以下本稿ではカリクレイン関連プロテアーゼと表記する）の発現が豊富で、盛んに研究されているのが悪性腫瘍細胞である。悪性腫瘍においては同一細胞において複数のカリクレイン関連プロテアーゼ発現が上昇し、腫瘍マーカーとしての可能性や予後との関連も盛んに研究されている²⁾。マウスの神経系においては KLK6 と KLK8（ニューロプシン）の2つのカリクレイン関連プロテアーゼが発現しており、その機能に関する様々な検討がなされている。KLK6 と KLK8 は共に、タンパク質の Arg 残基と Lys 残基の C 端を切断する活性があり、この点ではトリプシンと共通であるが、トリプシンと異なり、基質選択性が強い。すなわち、切断端の Arg 残基や Lys 残基の N 末端側の 2 残基の種類により、切断活性が大きく異なる^{3,4)}。

II. 神経系の発生と KLK

KLK8 は成獣マウスにおいては海馬を始めとする大脳辺縁系の神経細胞の一部に発現が限局しているが、胎生期から成長期のマウスでは中枢神経系に広範な発現が見られる。図 1 に示すように胎生 16 日では、脳と脊髄に広範な発現が認められる。免疫組織化学によるデータがないので発現細胞の詳細は不明であるが、神経細胞に発現している可能性が高い。続いて、生後早期においても広範な発現が認められる。中脳を始めとする神経回路形成が完結していない領域において神経細胞に mRNA が発現する⁵⁾。この後 KLK8 発現細胞は海馬などの終脳の一部にのみ認められるようになる。この様に、KLK8 は中枢神経の発生、回路形成に一致して発現が認められ、成獣では神経可塑性に最も

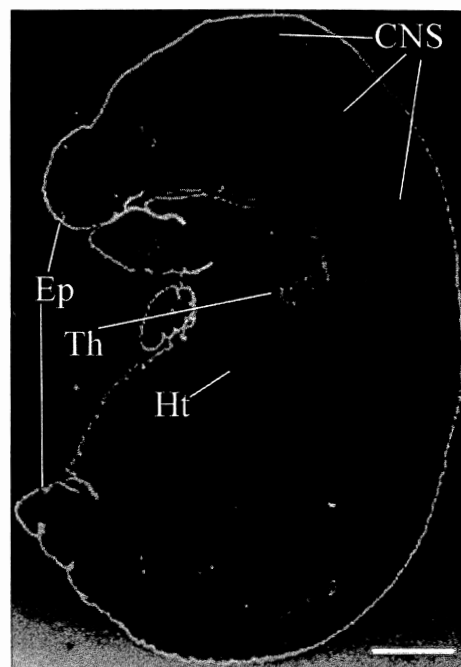


図1 胎生 16.5 日における KLK8 mRNA 発現
中枢神経系 (CNS)、胸腺 (Th)、心臓 (Ht) と表皮 (Ep) に発現が認められる。

富む領域に発現する。この事実は KLK8 が神経系のダイナミックな変化に関連する機能を有していることを示唆している。

KLK6 は一貫して成熟オリゴデンドロサイトに発現が認められる (図 2)。中枢神経系では脊髄や延髄などの下位中枢からオリゴデンドロサイトが成熟し、ミエリン化が開始される。脊髄と延髄では生直後に PLP mRNA が発現する、すなわち、オリゴデンドロサイトが成熟し、ミエリンを形成し始めるのに対し、KLK6 mRNA は生後 2 日目から発現を始める⁶⁾。マーカーとの二重染色でこれらの細胞のほとんどはミエリン塩基性タンパク (MBP) や proteolipid protein (PLP) 陽性のオリゴデンドロサイトである。PLP mRNA と KLK6 mRNA 共、発現が上位中枢に広がっていき、生後 2 週間で KLK6 mRNA は最上位中枢にあたる脳梁でも認められるようになる。この発現パターンから、KLK6 はオリゴデンドロサイトが成熟した後のミエリン形成とその維持に関連しているものと考えられる。

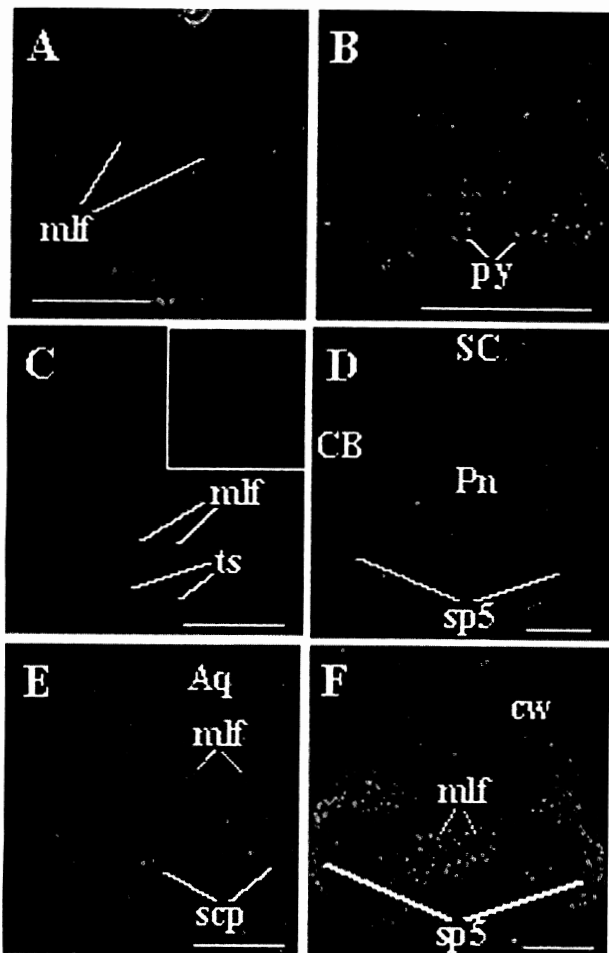


図2 下位脳幹における生後のKLK6 mRNA発現

A: 生後2日延髄の矢状断で内側縦束 (mlf) に発現がみられる。B: 生後2日の延髄の前頭断で錐体路 (py) に発現がみられる。C, D: 生後7日の中脳 (C) と橋 (D)。内側縦束, 被蓋脊髄路 (ts), 橋核 (Pn), 三叉神経脊髄路 (sp5) に発現がみられる。E, F: 生後9日の中脳 (E) と延髄 (F)。発現が増強し, 上小脳脚 (scp) と小脳の白質 (cw) にも発現が認められる。

III. オリゴデンドロサイトとKLK

KLK6は上述のように成熟オリゴデンドロサイトに発現するのであるが, 細胞マーカーを用いて検討したところ, NG2陽性細胞にも発現する⁷⁾。NG2陽性の細胞はオリゴデンドロサイト前駆細胞と第4のグリアと想定される, いわゆるNG2グリア細胞があるが, 後述する傷害時での発現パターンからオリゴデンドロサ

イト前駆細胞であろうと考えている。個体発生の発現パターンから, KLK6とミエリン形成との関係が考えられたので, MBP遺伝子欠損でミエリンが不完全にしか形成されない shiverer 変異マウスでの発現を検討した。その結果, shiverer 変異マウスでのKLK6 mRNA発現は野生型に比べるとはるかに少ないことが見出された。この変異ではオリゴデンドロサイト自身は野生型に比しても同じか, やや多く存在し, PLP mRNAも野生型と同程度以上に発現している。これより, KLK6の転写には機能的なミエリンが必要であることが考えられ, KLK6がミエリン形成および維持に関与している可能性が示唆される。また, KLK6発現をRNAiにて抑制したところ, MBP発現が有意に減弱した⁸⁾。逆に, 脱髄が生じた時のKLK6発現を検討した。食餌中に0.7% cuprizoneを加えると2週間以内に脱髄が生じ, その後通常食に戻すと2週間で再ミエリン化が生じる。この経過中, cuprizone投与開始後速やかにKLK6発現は減少し, 1週間後には発現量が激減する。また, 通常食による再ミエリン化により, KLK6発現も回復し2週間後には以前の発現量にもどる⁹⁾。ちなみに, オリゴデンドロサイトのミエリン関連分子発現も似たような経過をたどるが, KLK6の減少が先行して起こり, 発現回復はミエリン関連分子が先行する。これらの結果より, KLK6が発現するのはミエリン化が生じているときに限られることが明らかとなった。

IV. 中枢神経損傷時のオリゴデンドロサイトのプロテアーゼ

中枢神経の損傷によっても脱髄が生じる。マウスの脊髄を損傷したところ, 損傷部位の周辺においてKLK6発現細胞が増加し, さらに, 細胞当りのKLK6発現量も著しく増加した (図3)。マーカーとの二重染色ではオリゴデンドロサイトに見られるCNPaseやPLPとの共存が見られるが, NG2陽性細胞での発現は認められなくなった⁹⁾。この解釈は簡単ではないが, 損傷からの回復において, 前駆細胞からオリゴデンドロサイトに分化が進んだことによるものと考えられ, 現在この点を解析中である。これらの変化は損傷後の急性期に生じ, 損傷2週間後では, 発現はほぼ損傷以前と同様となる。また, KLK8も損傷後に発現が認め

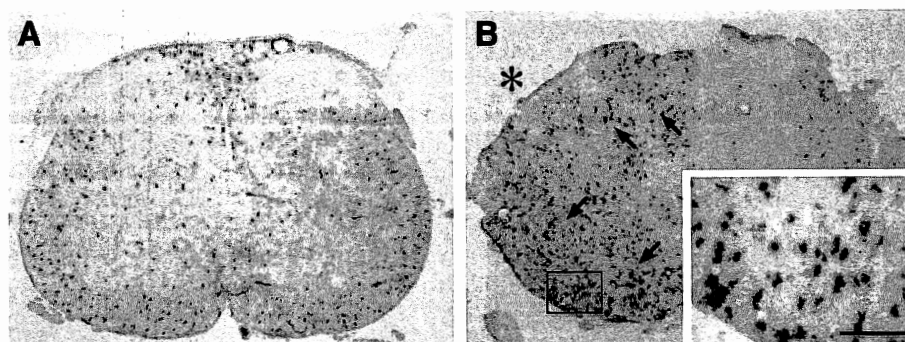


図3 脊髄損傷後のKLK6 mRNA 発現

損傷前 (A), 損傷4日後 (B) のKLK6 mRNA 発現. insetのスケールバー=100 μm

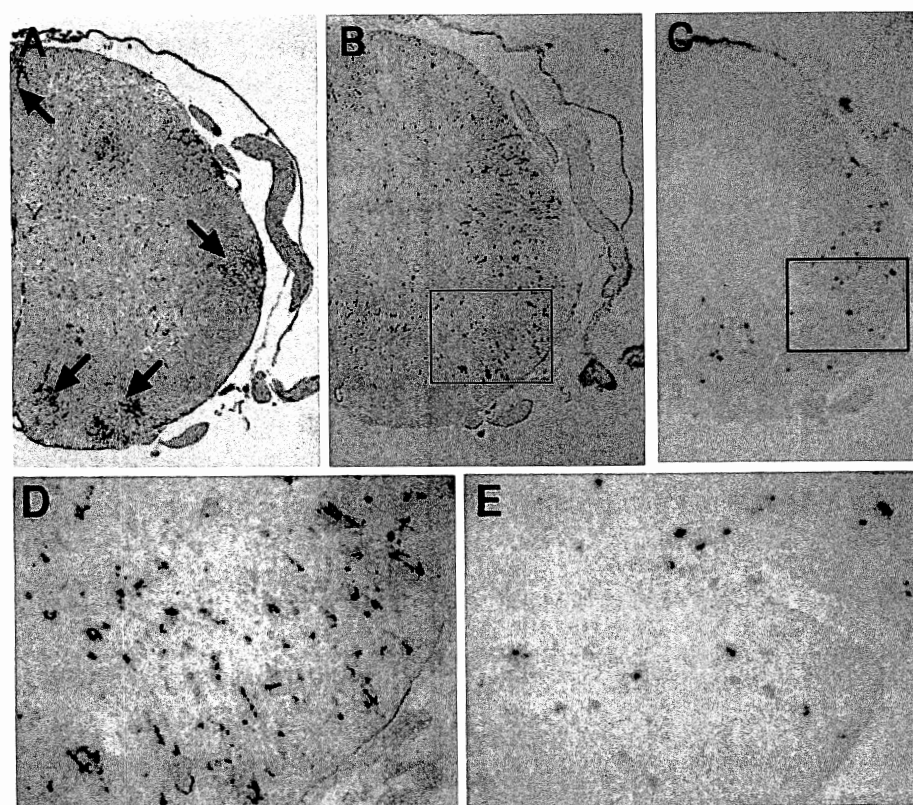


図4 EAEにおけるKLK6 mRNAとKLK8 mRNA 発現

A : MOGでの免疫21日後脊髄のニッスル染色とLuxol fast blue染色. 矢印は炎症細胞の浸潤を示す. B : Aの隣接切片におけるKLK6 mRNA発現. boxの拡大がD. C : Aの隣接切片でのKLK8 mRNA発現. boxの拡大がE.

られる^{9,10}. KLK8はKLK6と異なり、通常はオリゴデンドロサイトでの発現はないが、中枢神経が損傷を受けた後にだけ、発現が認められる。KLK8発現細胞にはKLK6も発現しており、これら2種のプロテアーゼ

が協調して働いている可能性もある。KLK8の発現も損傷2週間後までの急性期のみに見られる。

脱髄性疾患の代表である多発性硬化症の動物モデルとして experimental allergic encephalitis (EAE) がある。

EAE作成でよく用いられるのは、ミエリンタンパク質の一つである myelin oligodendrocytic protein (MOG) の部分アミノ酸配列をマウスに注射することにより、自己抗体を生じさせ、中枢神経系内に炎症反応を起こす方法である。これにより、MOGによる免疫から3週間後をピークとする四肢麻痺などの症状が生じる。また、組織学的には症状に並行して脊髄には炎症細胞の浸潤と脱髄が認められる。EAE発症によっても、KLK6の発現上昇とKLK8の新たな発現が認められる。図4に示すように、炎症細胞が浸潤して脱髄が生じている周辺部位に特に発現細胞が多い。ラットにおいてもEAEにより、KLK6の発現上昇が認められている。また、ヒトの多発性硬化症の組織での発現がみられるという報告もある¹¹⁾。

V. オリゴデンドロサイトとプロテアーゼ Good or bad?

KLK8ノックアウトマウス (KLK8-KO) に対して、脊髄損傷とEAE発症実験を行った。脊髄損傷により、オリゴデンドロサイトの細胞死、脱髄、軸索の損傷と断裂が生じる。野生型に比べ、KLK8-KOの脊髄ではオリゴデンドロサイトの細胞死が受傷後早期の段階では有意に少なく、その結果、生存しているオリゴデンドロサイトの数は、有意に多かった。また、MBPの量もKLK8-KOでは野生型より多く、脱髄の程度は軽度であった。さらに、野生型マウスにおいては損傷部位以下では皮質脊髄路が完全に途絶していたのに対し、KLK8-KOでは少数ながら残存している軸索があ

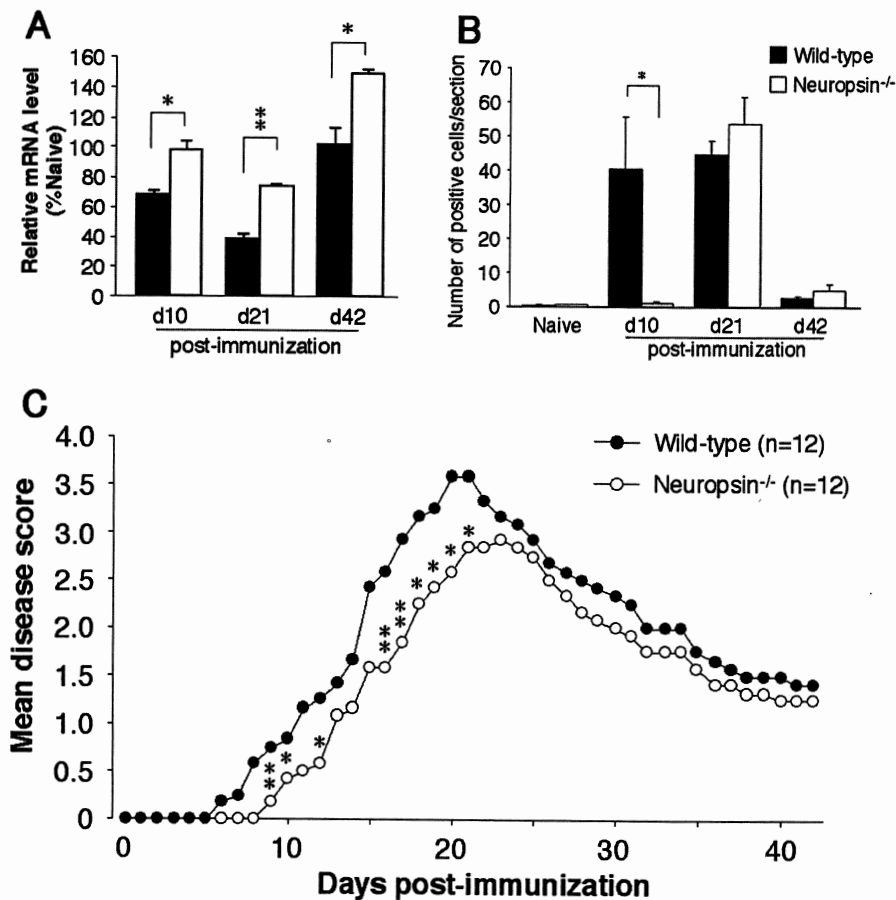


図5 KLK8-KOとWTでのEAEの進行

A: MOGでの免疫後のMBP mRNA発現量の変化。B: MOGでの免疫後のTUNEL陽性細胞数。C: 四肢麻痺を評価するEAEスコアの変動。

った。興味深いことに損傷部位よりも2mm近位部においても野生型では、軸索の減少が認められるのに対し、KLK8-KOでは減少していなかった。この事実は、損傷後においてミエリンがある程度保たれることにより、浮腫や炎症などの軸索の二次的な損傷を防ぐことができる事を意味する。この損傷の差の機能的な意義を検討するためにrotarodおよび四肢運動の観察により、運動能力を測定した。その結果いずれのテストにおいても、KLK8-KOは野生型よりも良好な成績を示した¹²⁾。

EAEを起こした場合も脊髄損傷と似た結果が得られた。すなわち、KLK8-KOにおいてはオリゴデンドロサイト細胞死と脱髄が少なく、EAE症状の程度を示すEAEスコアが小さかった（症状が軽かった）¹³⁾（図5）。

KLK6ノックアウトマウスにおける解析も行っているが、preliminaryな研究ではKLK8-KOに似たphenotypeを示すようである。

これらのオリゴデンドロサイトのプロテアーゼの基質に関する解析は十分に進んではいないが、メタロプロテアーゼの活性化にこれらのプロテアーゼが関与しているという結果は得られている。しかし、KLK6とKLK8がカスケード反応を行っているのかという点も含めて、これからの課題である。

以上の知見を総合すると、中枢神経に傷害が生じると、KLK6とKLK8がそれぞれ発現上昇と新たな発現を起こして、自らを細胞死に導き、脱髄を促進しているといえそうである。それでは、これらのプロテアーゼはこのためだけにオリゴデンドロサイトに発現するのであろうか。以下はまだ根拠がないspeculationであるが、筆者はこう考えている。オリゴデンドロサイトはミエリン化を行った後も一定量のミエリタンパク質を発現している。この事実から、いったん軸索に巻かれたミエリンにもターンオーバーが生じていると考えられる。また、軽度の障害が生じた場合には機能不全に陥ったオリゴデンドロサイトを除去して、新た

に分化したオリゴデンドロサイトによる再ミエリン化も必要となるだろう。一見単なる自己破壊的役割もプロテアーゼもこのようなミエリターンオーバーや不用の細胞の除去等に関連した働きがあるのではないかというのが、現在の仮説である。

参考文献

- 1) Diamandis EP, et al : New nomenclature for the human tissue kallikrein gene family. *Clin Chem* **46** : 1855-1858, 2000.
- 2) Singh J, et al : Expression of kallikrein-related peptidases (KRP/hK5, 7, 6, 8) in subtypes of human lung carcinoma. *Int Immunopharmacol* **8** : 300-306, 2008.
- 3) Shimizu C, et al : Characterization of recombinant and brain neuropsin, a plasticity-related serine protease. *J Biol Chem* **273** : 11189-11196, 1998.
- 4) Matsui H, et al : Molecular and biochemical characterization of a serine proteinase predominantly expressed in the medulla oblongata and cerebellar white matter of mouse brain. *J Biol Chem* **275** : 11050-11057, 2000.
- 5) Suzuki J, et al : Ontogeny of neuropsin mRNA expression in the mouse brain. *Neurosci Res* **23** : 345-351, 1995.
- 6) Yamanaka H, et al : Protease M/neurosin mRNA is expressed in mature oligodendrocytes. *Brain Res Mol Brain Res* **71** : 217-224, 1999.
- 7) Terayama R, et al : Differential expression of protease M/neurosin in oligodendrocytes and their progenitors in an animal model of multiple sclerosis. *Neurosci Lett* **382** : 82-87, 2005.
- 8) Bando Y, et al : Implications of protease M/neurosin in myelination during experimental demyelination and remyelination. *Neurosci Lett* **405** : 175-180, 2006.
- 9) Terayama R, et al : Differential expression of neuropsin and protease M/neurosin in oligodendrocytes after injury to the spinal cord. *Glia* **48** : 91-101, 2004.
- 10) Tomizawa K, et al : Injury induces neuropsin mRNA in the central nervous system. *Brain Res* **824** : 308-311, 1999.
- 11) Scarisbrick IA, et al : Activity of a newly identified serine protease in CNS demyelination. *Brain* **125** : 1283-1296, 2002.
- 12) Terayama R, et al : Neuropsin promotes oligodendrocyte death, demyelination and axonal degeneration after spinal cord injury. *Neuroscience* **148** : 175-187, 2007.
- 13) Terayama R, et al : Involvement of neuropsin in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia* **52** : 108-118, 2005.