

依頼稿 (報告)

平成 21 年度「独創性のある生命科学研究」プロジェクト課題 Kallikrein を標的とした新規診断薬および治療薬の開発 － 神経および皮膚疾患への臨床応用に向けて －

研究代表者： 板 東 良 雄 (解剖学講座 機能形態学分野)
共同研究者： 岸 部 麻 里 (2 輪草センター・皮膚科学講座)
鈴 木 康 博 (国立病院機構 旭川医療センター)

[研究の背景]

(1) 多発性硬化症 (Multiple Sclerosis: MS)

多発性硬化症 (MS) は中枢神経系における炎症性脱髄性疾患であり、再発および寛解を繰り返す自己免疫疾患と考えられている。中枢神経系において髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトが炎症などによって傷害されると脱髄および軸索障害が惹起され、麻痺などの様々な神経症状が現れると考えられているが、発症機序の解明には至っていない。また、根治療法と呼べる治療はなく、急性期の対症療法しか存在しない。

本症の罹患者数は年々増加傾向にあり、最近では約 8-9 人 /10 万人と推定されている。特記すべきは旭川・十勝地方の罹患者率が極めて増加していることである¹⁾。さらに発症年齢が 20-30 歳代と若く、女性に好発することから患者の QOL のみならず、出産や子育てへの不安から少子化などの社会的な問題にも影響を及ぼしている。したがって、早期発見につながる診断薬ならびに効果的な治療法の開発は切に望まれている。

(2) カリクレイン (Kallikreins: KLKs) と KLK6

現在 15 種類程度のカリクレイン分子が同定されており、ファミリーを形成している。そのうち、KLK6 および KLK8 はともに本学解剖学講座の吉田成孝教授らによって同定されたものである^{2,3)}。KLK6 は中枢神経系に特異的に発現するカリクレインファミリーに属する因子であるが²⁾、マウス実験的自己免疫性脳脊髄炎モデル (EAE) や脊髄損傷モデルにおいて脱髄時をピークとしてオリゴデンドロサイトから KLK6

が分泌されることを現在までに我々は明らかにしてきた^{4,5,6)}。また、KLK6 がミエリン構成蛋白質である MBP を分解する活性を持つことも報告されており^{7,8)}、KLK6 が多発性硬化症における脱髄の標的分子となる可能性も示唆されている。一方、皮膚においても KLK6 の発現は認められおり⁹⁾、乾癬のような皮膚疾患への関与も示唆されている。

[目 的]

KLK6 を標的分子とした多発性硬化症ならびに乾癬に対する新規治療法および診断法の技術シーズを開発することを目的とし、臨床応用を実現するために連携企業を獲得することを本プロジェクトの達成目標とした。

[プロジェクト期間とプラン]

本プロジェクトの目標達成までの期間を平成 21 年から平成 24 年までの 3 年程度に設定した。まず、最初の 2 年を、多発性硬化症や乾癬における KLK6 の基礎研究を中心に展開し、3 年目は産学連携共同研究に発展させるというプロジェクトを提案した。

[研究方法]

本稿では誌面の関係により、代表者が中心となって展開した研究成果のみを報告する。

(1) KLK6^{-/-} マウスの作成

KLK6 の多発性硬化症の病態への関与を検討するために、KLK6^{-/-} マウスを作成した。

(2) 多発性硬化症モデル(EAEモデル)の作成と臨床評価

Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) は多発性硬化症のマウスモデルとして確立されており、本研究では6-8週齢のKLK6野生型雌マウス(KLK6+/+)およびKLK6-/-雌マウスにミエリン構成蛋白の一つであるMOG₃₅₋₅₅のペプチドをアジュバンドとともに皮下注射により免疫することによって多発性硬化症様の病態を作成した。臨床的評価は麻痺の程度を指標に以下のようにスコア化した(0:症状なし 1:尻尾の緊張消失 2:片側後肢の麻痺 3:両側後肢の麻痺 4:自力歩行不可 5:致死)。

(3) 血液脳関門破綻の評価

免疫後10-12日後の尾静脈からEvans Blueを注入し、2時間後に脊髄を取り出し、Evans Blueの脊髄への取り込みを吸光計にて測定し、定量化した。

(4) 蛋白抽出およびウェスタンブロッティング

EAE発症ピーク時(免疫後20日目)のマウス脊髄を採取し、蛋白を抽出した。抽出した蛋白はアクリルアミドゲルにて展開し、PVDF膜に転写した後、各種抗体を用いてウェスタンブロットを行った。ゼラチンゼイモグラフィはゼラチンを含むアクリルアミドゲルにて蛋白抽出液を展開し、定法にしたがってMMP-2およびMMP-9の活性化を可視化した。また、MMP-9活性化アッセイはpro-MMP-9のリコンビナント蛋白をリコンビナントKLK6(rKLK6)あるいは不活性化型KLK6(mutant KLK6)と37℃で反応させ、反応液をアクリルアミドゲル上で展開した。PVDF膜に転写した後、MMP-9抗体を用いてウェスタンブロットを行った。

[研究結果]

(1) KLK6がEAE発症に及ぼす影響

KLK6+/+マウスおよびKLK6-/-マウスをMOGペプチドにて免疫し、EAEを発症させたところ、KLK6-/-マウスにおいてEAE発症が遅延し、症状も軽減した(図1)。また、髄鞘染色によっても臨床症状と一致した形態学的変化が認められた(data not shown)。つまり、KLK6+/+マウスでは脊髄白質においてEAE発症により脱髄が認められたが、KLK6-/-マウスでは脱髄が抑制されていた。さらに、組織学的検討によりEAE発症時に炎症細胞の脊髄内への浸潤や炎症部位へのマイ

クログリア/マクロファージの集積がKLK6-/-マウスでは認められなかった(data not shown)。

(2) Evans Blueによる血液脳関門(BBB)破綻の評価

KLK6-/-マウスではEAE発症が少し遅延したことから、末梢から脊髄内への炎症細胞の浸潤にKLK6が何らかの影響を及ぼす可能性が考えられたため、BBB破綻について検討した。Evans Blueは通常、BBBを超えることが出来ないため、脊髄が染色されることはない。そこで、発症前にマウス尾静脈から色素を注入し、脊髄を観察した。KLK6+/+マウスではEvans Blueの色素が脊髄に浸透し、脊髄が青色を呈しているが、KLK6-/-マウスでは青色を呈していなかった(図2)。つまり、KLK6-/-マウス脊髄におけるBBB破綻が抑制されていることが示唆された。

(3) KLK6を介したBBB破綻のメカニズムの検討

MSやEAEモデルにおいてBBB破綻を誘導する分子としてMatrix Metalloprotease-9(MMP-9)が同定されている。そこで、EAEモデルにおけるMMP-9の活性化について検討した(図3)。KLK6+/+マウスにおいてはMMP-9、MMP-2およびMMP-12がEAE発症とともにそれぞれ誘導されたが、KLK6-/-マウスでは認められなかった(図3A)。また、MMP-9の基質であるゼラチンを含んだアクリルアミドゲルを用いてゼラチンゼイモグラフィにてMMP-9の活性化を検討したと

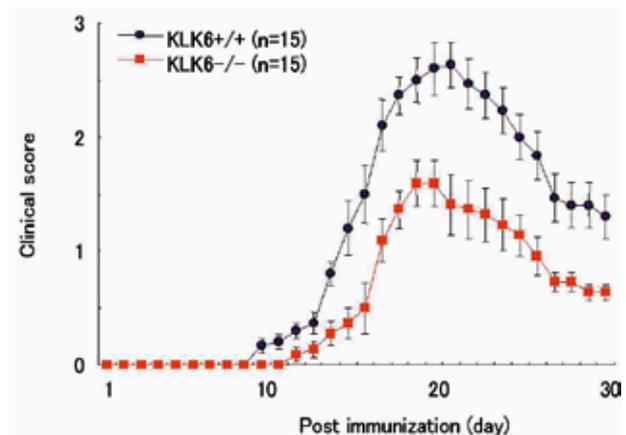


図1 KLK6がEAE発症に及ぼす影響

KLK6+/+およびKLK6-/-マウスにEAEを発症させ、その臨床症状を記録した。KLK6-/-マウスではEAE発症が有為遅延し、EAEの症状も軽減した。

ころ、KLK6+/+ マウスの EAE 発症時の脊髄サンプルでのみ MMP-9 の活性化が認められた(図 3B)。次に、KLK6 が MMP-9 に直接作用するか否かについて、リ

コンビナント蛋白を用いた *in vitro* の系で検討を行ったところ、リコンビナント KLK6 は pro-MMP-9 を活性化したが、不活性化型の mutant KLK6 では MMP-9 の活性化型を検出できなかった(図 3C)。このことから、少なくとも *in vitro* の系においては、KLK6 が MMP-9 を活性化する可能性があることが示唆された。つまり、KLK6 が MMP-9 を活性化し BBB の破綻を促進している可能性が示唆された。

(4) 活性化型 KLK6 検出法の開発

本研究において、炎症反応を伴った脱髄に KLK6 が極めて敏感に反応する可能性が示唆された。また、オリゴデンドロサイトから分泌されるという極めてユニークなプロテアーゼであることから、検出システムの感度を上げることによって診断薬へ応用出来る可能性も考えられる。しかしながら、現状では活性化型 KLK6 を特異的に検出する方法はなく、非活性化型と活性化型をともに検出せざるを得ない。そこで、実際に病態形成に関与していると思定される活性化型 KLK6 のみを特異的に認識する抗体の作成ならびに検出法の開発に関して(株)免疫生物学研究所と共同研究を開始した。KLK6 は N 末端の一部が切断されることにより活性化型 KLK6 となることが知られているため、N 末端の切断部位近辺の配列を用いたペプチド抗体を作成している。ヒトおよびマウス活性化型 KLK6 の検出システムは早ければ来年早々にはプロトタイプが開発され、動物モデルおよび臨床サンプル(MS 患者の脳脊髄液等)を用いて、このシステムの評価および改良を行っていくことを予定している。

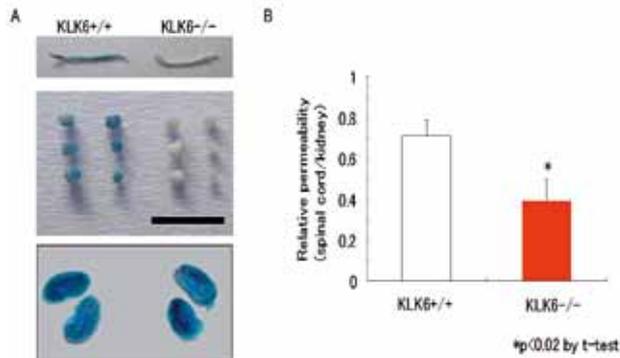


図2 KLK6 の血液脳関門 (BBB) に及ぼす影響
EAE 作成後 10-12 日 (pre-clinical stage) において、マウス尾静脈より evans blue 色素を注入した (A)。KLK6+/+ マウス脊髄では BBB が破綻しているが、KLK6-/- マウスでは BBB の破綻が抑制されていた (B)。

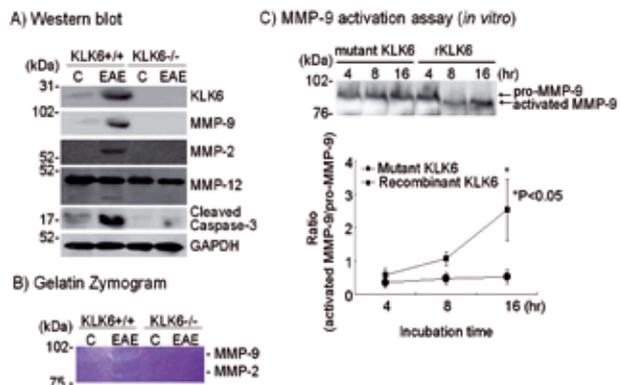


図3 KLK6 は Matrix Metalloprotease-9 (MMP-9) を基質とし、脱髄病態を増悪させる。
A: MMP-2, MMP-9 および MMP-12 は脱髄の病態に関与していることが示唆されており、EAE 発症時にも発現は誘導される。しかしながら、KLK6-/- マウスにおいては、これら分子の活性は認められない。B: MMP-2 および MMP-9 の活性化を示すゼラチンザイモグラフィ。KLK6-/- マウスでは EAE による活性化が認められない。C: リコンビナント KLK6 蛋白によるリコンビナント pro-MMP-9 の活性化。KLK6 は *in vitro* において MMP-9 を切断する活性があることが示唆された。

[まとめ]

本研究結果において、オリゴデンドロサイトから分泌される KLK6 が病変周囲の炎症細胞やグリア細胞に影響を及ぼし、炎症細胞の中枢神経内への浸潤を促すことによって脱髄病態を増悪させる可能性を示唆された。このように本プロジェクトによって KLK6 を介した脱髄機序が少しずつ明らかになりつつあるが、まだまだ未解明な部分も多く残されており、今後の研究によってその全貌を明らかにしていきたい。

また、患者様の同意のもとに脳脊髄液などのサンプルの保存も同時に進めている。特に旭川医療センター(道北病院)院長の箭原修先生や脳神経内科部長の木村隆先生には全面的に御協力頂いている。同院内での倫

理委員会での審査を経て順調に保存サンプル数も増えてきている。

本プロジェクトの最終目標はKLK6を標的とした診断薬ならびに治療薬の開発への応用であるが、これらの目標を達成するためには企業との連携が必須であると考えられる。幸いにも連携企業を獲得出来たことにより、当初の研究計画よりも早期に活性化型KLK6の特異的検出法を確立できるかも知れない。また、先に行われた神経科学・神経化学合同学会（Neuro2010）の発表においても、数社の製薬会社の研究開発の方々が関心を示してくれており、今後このような企業と創薬に向けた共同研究を展開できればと考えている。

本プロジェクトもまだまだスタートしたばかりであり、今後の展開が重要になってくると考えられるが、共同研究者とより一層の連携を深めつつ、関係講座の諸先生方にもご指導を頂きながら、プロジェクト達成に向けて研究開発に邁進していきたいと考えている。

[謝 辞]

このような大変貴重な機会を与えて頂きました吉田晃敏学長ならびに本研究を採択して頂きました研究戦略・教育支援室および教育研究評議会の諸先生方にこの場を借りて深謝申し上げます。また、本研究プロジェクトを温かく見守って下さり、的確なアドバイスを頂いている解剖学講座の吉田成孝教授に感謝申し上げます。さらに(株)免疫生物学研究所との共同研究を開始するにあたり、知財センターの尾川直樹先生、産学連携係の長谷川幸江様をはじめ事務局の多くの方々にもご尽力頂きました。共同研究をこのようにスムーズに開始出来たのはひとえに大学を挙げてサポートして頂いたからと感じております。この場を借りて感謝申し上げます。

[参考文献]

- 1) Kira J., Multiple Sclerosis in the Japanese Population. *Lancet Neurol.* 2(2): 117-27, 2003.
- 2) Yamanaka H., He XP., Matsumoto K., Shiosaka S., Yoshida S. Protease M/neurosin mRNA is expressed in mature oligodendrocytes. *Mol Brain Res.* 71: 217-224, 1999.
- 3) Yoshida S., Taniguchi M., Hirata A., Shiosaka S. Sequence analysis and expression of human neuropsin cDNA and gene. *Gene* 213: 9-16, 1998.
- 4) Terayama R., Bando Y., Takahashi S., Yoshida S. Differential Expression of neuropsin and protease M/neurosin in oligodendrocytes after injury to the spinal cord. *Glia* 48: 91-101, 2004.
- 5) Terayama R., Bando Y., Jiang YP., Mitrovic B., Yoshida S. Differential expression of protease M/neurosin in oligodendrocytes and their progenitors in an animal model of multiple sclerosis. *Neurosci. Lett.* 382: 82-87, 2005.
- 6) 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: 175-180, 2006.
- 7) Blaber SI., Scarisbrick IA., Bennett MJ., Dhanarajan P., Sceavy MA., Jin Y., Schwartz MA., Rodriguez M., Blaber M. Enzymatic properties of rat encephalon-specific protease. *Biochemistry* 41: 1165-1173, 2002.
- 8) Scarisbrick IA., Blaber SI., Lucchinetti CF., Genain CP., Blaber M., Rodriguez M. Activity of a newly identified serine protease in CNS demyelination.
- 9) Kishibe M., Bando Y., Terayama R., Nishikawa K., Takahashi H., Hashimoto Y., Ishida-Yamamoto A., Jiang YP., Mitrovic B., Perez D., Iizuka H., Yoshida S., Kallikrein 8 is involved in skin desquamation in cooperation with other kallikreins. *J. Biol. Chem.* 282, 8, 5834-5841, 2007.