

AMCoR

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

脳21 (2016.3) 19(2):105-112.

【切っても切れない細胞同士の縁-プロテアーゼが細胞ネットワークをつくる】カリクレイン関連プロテアーゼとグリア細胞

吉田 成孝

切っても切れない細胞同士の縁 —プロテアーゼが細胞ネットワークをつくる

カリクレイン関連プロテアーゼと グリア細胞

Kallikrein-related proteases and glial cells

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

カリクレインファミリー遺伝子はヒトでは 15 を数え、KLK1-KLK15 と命名された。これらのマウスホモログが存在するが、ニューロブシン/KLK8 とプロテアーゼ M/ニューロシン (KLK6) は中枢神経に発現する。ニューロブシン/KLK8 は正常マウス脳では神経細胞の一部に限局して発現するが、中枢神経が障害を受けるとオリゴデンドロサイトに発現し、脱髄を促進させるはたらきがあると考えられる。KLK6 はマウスでは白質のオリゴデンドロサイトに発現し、ミエリン形成や維持にはたらく一方、炎症性脱髄にも関与している。ヒト脳での KLK6 発現は研究者間での結果が一致していないが、アルツハイマー病や α -synuclein 関連の病態との関連が示唆されている。

I. カリクレインファミリー遺伝子

本号のまえがきにあるように、以前からカリクレインはキニノーゲンからブラッディキニンを切り出す (プロセッシングする) 酵素であることが知られていた。その後、前立腺癌のマーカーとなる前立腺特異抗原 (PSA, 遺伝子は KLK2 と命名) がカリクレインと相同性が高いことがわかり、また、機能が不明であるが前立腺に発現する KLK3 が同定された。その後、1990 年代にこれらに比較的相同性が高いセリンプロテアーゼが続々と見出された。著者も所属していた塩坂らのグループでは、セリンプロテアーゼの相同シークエンスをプライマーとして、マウス脳 cDNA などから複数の新規セリンプロテアーゼ mRNA を見出した。この中の三つの遺伝子はニューロブシン (KLK8)、プロテアーゼ M/ニューロシン (KLK6)、TLSP (KLK11) であった。その後、ヒトゲノムプロジェクトの進行とともに、ヒトのカリクレインファミリーは KLK1-3 に加えて 12 の遺伝子が、同一遺伝子座に連続して存在していることがわかり、これらの遺伝子名は KLK4-KLK15 と命名された¹⁾(図 1)。この中で、KLK1, KLK2 と KLK3 は相同性がきわめて高く

KEY WORDS

ニューロブシン/KLK8 (neuropsin/KLK8)
KLK6
オリゴデンドロサイト (oligodendrocyte)
脱髄 (demyelination)
 α -シヌクレイン (α -synuclein)

Author: Shigetaka Yoshida Affiliation: Department of Functional Anatomy and Neuroscience Asahikawa Medical University

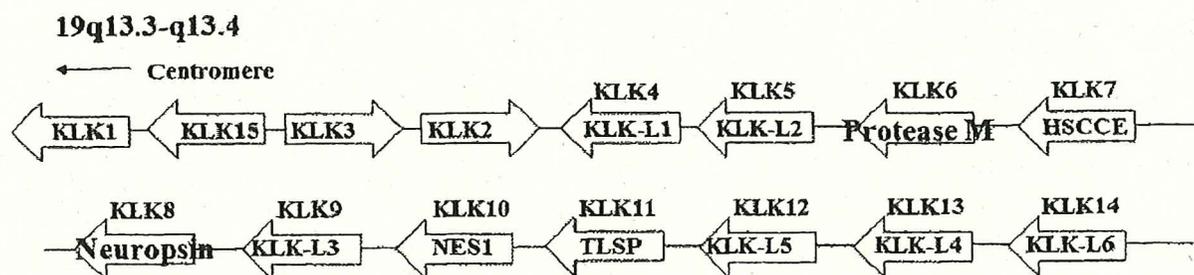


図1 ヒトカリクレイン遺伝子ファミリーの遺伝子座
矢印は遺伝子の方向を示す。

(アミノ酸の配列で60～80%)カリクレイン様プロテアーゼもしくはカリクレインとよばれるのに対し、KLK4-15は相同性がそれぞれに対して40～50%程度であり、カリクレイン関連遺伝子とよばれることが多い。

これらの新たなプロテアーゼは癌組織に多く見出されており、その役割に関する研究は盛んに行われている。一方、神経系にも発現しているものも多く、神経系における機能が注目された。この中で、本号の他稿にある通り、ニューロプシン (KLK8) に関しては大脳辺縁系の神経細胞での機能解析が進んでいるが、グリア細胞にもニューロプシン/KLK8とプロテアーゼM/ニューロシン (KLK6) が発現することが知られている。

II. ニューロプシン/KLK8

本号の田村らの稿にあるように、ニューロプシン/KLK8は正常マウス脳では海馬をはじめとする神経細胞の一部に限局して発現し、シナプス可塑性に対して重要な役割がある。ところが、中枢神経が障害を受けるとオリゴデンドロサイトに発現するようになることを著者らは見出した²⁾。そこで、脱髄疾患である多発性硬化症の動物モデルである experimental allergic encephalomyelitis (EAE) において発現を検討した³⁾。これは、ミエリン蛋白質の一つである myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) ペプチドを皮下注射することにより、MOGに対する自己抗体を生じさせ、炎症性の脱髄を起こすものである。コントロールの脊髄ではほとんどニューロプシン/KLK8の発現が認められないが、EAEの脱髄病変周囲のオリゴデ

ンドロサイトにニューロプシン/KLK8 mRNA が豊富に発現するようになる (図2)。この場合の基質は同定できていないが、軸索-ミエリン間の結合やミエリン蛋白質の切断を行っていることは予想できる。次に、ニューロプシン/KLK8ノックアウト動物を用いて脱髄に変化が生じるかどうかを検討した³⁾。その結果、ノックアウト動物ではEAEの発症が有意に遅れ、麻痺の症状のピークも有意に低くなっていることが明らかとなった。これらの結果はニューロプシン/KLK8が脱髄を促進させるはたらきがあるプロテアーゼであることを示している。

III. マウスとラットでの KLK6

KLK6はヒト癌組織からcDNAが単離されたが、その後、中枢神経への豊富な発現が認められ^{4,5)}、また、げっ歯類においてもcDNAクローニングと中枢神経での発現が確かめられ^{6,7)}、白質のオリゴデンドロサイトに発現している点では各研究者の結果は一致している。Scarlsbrickらのグループはラットでは正常な脊髄ではオリゴデンドロサイトに加え、運動ニューロンにもmRNA発現が発現することを認め⁸⁾、さらに、カニン酸投与により、運動ニューロンでの発現が著明に増加した。一方、筆者らもマウスからcDNAクローニングを行い、脳でのmRNA発現を網羅的に検討した⁷⁾。マウスの脳では白質を中心にPLP陽性のオリゴデンドロサイトに発現がみられ、ニューロンなどの他の細胞には発現は認められなかった (図3)。また、脊髄ではCNPase陽性のオリゴデンドロサイトに加え、NG2陽性のオリゴデンドロサイト前駆細胞にも発現がみられた⁸⁾。CNPase陽性オリゴデンドロサ

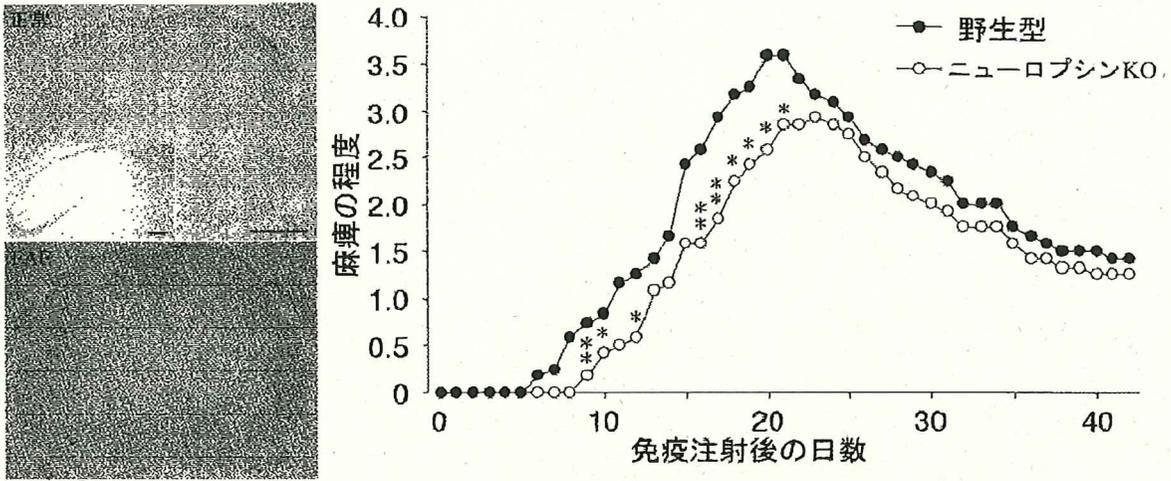


図2 マウス脊髄のニューロブシン/KLK8

正常脊髄での mRNA 発現と EAE でのニューロブシン/KLK8 mRNA 発現。Box 内は正常海馬ニューロンでの発現。Bar=200 μ m。右のグラフは野生型マウスとニューロブシン/KLK8 ノックアウトマウスでの麻痺の程度を経時的にみたもの。
([p.3](#) カラー図参照)

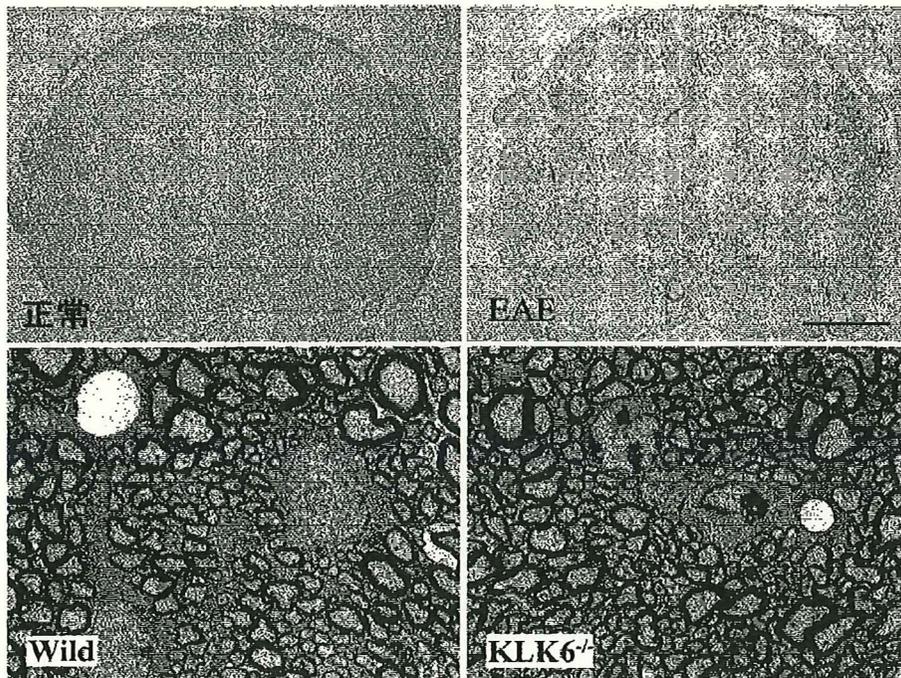


図3 マウス正常脊髄と EAE での KLK6 mRNA 発現およびマウス野生型と KLK6^{-/-} 脊髄での電顕像
光顕の Bar=200 μ m, 電顕の Bar=2 μ m

([p.3](#) カラー図参照)

イトの約3分の1がKLK6 mRNA 強陽性を示した⁸⁾。これらの結果から、マウス正常脳での mRNA はオリゴデンドロサイトおよびその前駆細胞に限局していると考えてよいだろう。その後、免疫組織化学の結果でも、KLK6 の発現はオリゴデンドロサイトに限局していた⁹⁾。これらの結果を合わせると、蛋白質レベルでも、マウスの KLK6 はオリゴデンドロサイトに限局していると断定できそうである。以上より、マウスとラットではオリゴデンドロサイトに発現するという点では共通であるが、ラットは運動ニューロンにも発現するようである。

IV. 脱髄への KLK6 の関与

このプロテアーゼもオリゴデンドロサイトに発現するという点で、研究者の興味は脱髄疾患に向かった。著者らも脊髄損傷と上述の EAE の二つの病態での KLK6 の発現をみた^{8, 10)}。脊髄を部分的に損傷すると KLK6 発現が著明に増強する。正常の脊髄ではオリゴデンドロサイトの一部では発現が無い～弱い、損傷4日後にはほとんどのオリゴデンドロサイトが KLK6

mRNA 強陽性となる。さらに、マウス EAE においても、オリゴデンドロサイトで著明に増加していることが観察できる (図3)¹⁰⁾。著者らの観察では浸潤している炎症細胞での発現はなかった。さらに、KLK6 ノックアウトマウスを用いて検討を行った⁹⁾。予想に反して、オリゴデンドロサイトの数やミエリンの形態には大きな異常は認められなかった (図3)。しかし、軸索と髄鞘が大きく変化する発達期と損傷時においてはノックアウトの影響が認められた。生後4日のマウスにおいては、オリゴデンドロサイトの前駆細胞である NG2 陽性細胞の数が KLK6 ノックアウト動物では野生型より約20%多く、生後7日になると成熟オリゴデンドロサイトの数が約20%少なかった。これは、NG2 陽性の前駆細胞からの成熟が遅れていることを示す結果であると解釈できる。脊髄の後索損傷により、損傷14日後のノックアウト動物のミエリンが有意に少なかった。このことは、KLK6 がオリゴデンドロサイトにおいてミエリンの維持に何らかの役割があることを示唆している (図4)。

ところが、炎症性の脱髄時には異なる機能を有するようである。Scarlsbrickらは、EAEをマウスで作成

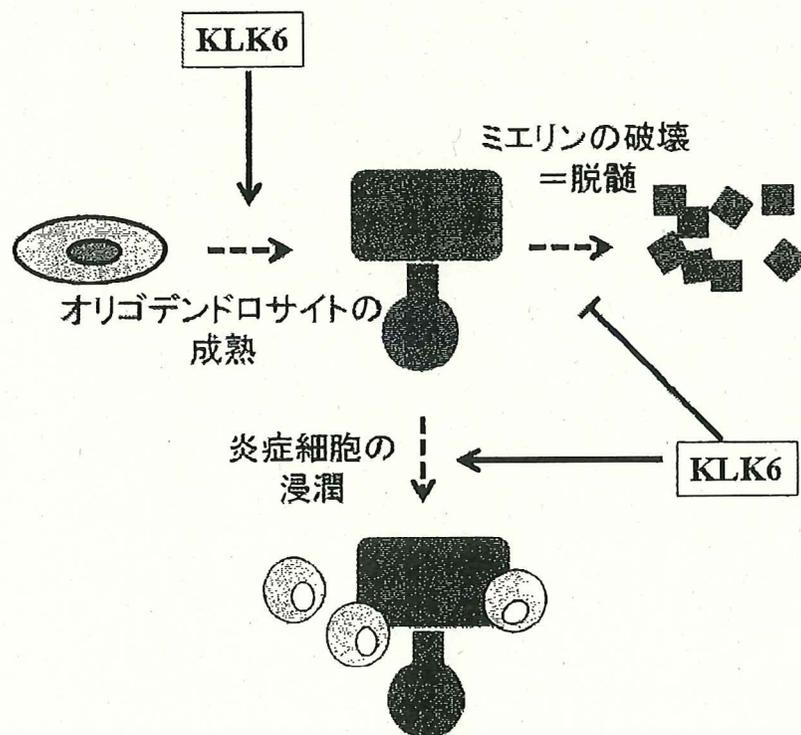


図4 マウス KLK6 のはたらき

したところ、KLK6はオリゴデンドロサイトでの発現が上昇し、さらに炎症細胞での発現もみられた¹¹⁾。前者は著者らの所見どおりであるが、炎症細胞の発現は著者らの所見とは一致しない。さらに、ScarlsbrickらはKLK6の中和抗体により脱髄が緩和されることを示した¹²⁾。著者らもKLK6ノックアウトで脱髄が軽減していることを見出している(板東ら、未発表データ)ので、この点では一致している。これらをまとめると、KLK6はオリゴデンドロサイトの成熟と維持に関与しているが、炎症細胞の浸潤にも関与しているようである。これにより、炎症性の脱髄では複雑な関与をしていると考えられる(図4)。

KLK6の基質や脱髄へ関与している機序はまだ不明である。Scarlsbrickらは、protease-activated receptors (PARs)であるPAR1とPAR2が関与している可能性を示唆しているが^{13, 14)}。これらは培養細胞へのKLK6実験であるので、実際に*in vivo*でこのような現象がみられるかどうかは、はっきりしていない。これ以外の基質の探索を含めたさらなる研究が必要である。

V. ヒト正常脳でのカリクレイン発現

ヒトの各組織でのmRNA発現をみた研究では正常の脳と脊髄ではKLK6が断然多く、次いでKLK10とKLK5そしてKLK7というものである。ニューロブシン/KLK8の発現量はあまり多くはないという報告はあるが、マウスでの発現では一部の神経細胞に限局している。ヒトのサンプルの採取部位の問題も考えられる。また、免疫系での発現では脾臓にKLK1が、胸腺ではKLK10が比較的多く発現し、KLK6も一定量発現しているという¹⁵⁾。

組織での発現細胞は研究者間での結果が一致していない。Scarlsbrickらは免疫組織化学で脊髄前角、黒質、大脳皮質などのニューロンとオリゴデンドロサイトに発現するとした¹⁶⁾。京都府立医大の山口らのグループは、コントロール脳では神経細胞の核に広く発現し、一部の神経細胞の細胞質にも発現するという所見を発表した¹⁷⁾。一方、英国のLoveらのグループの、KLK6が脳内の血管内皮細胞に限局し、神経細胞を含む他の細胞には発現しないという報告もある¹⁸⁾。

VI. KLK6とアルツハイマー病との関連

Diamandisらは10例ずつの定量で、アルツハイマー一患者では、KLK6は脳実質では減少するものの、CSFと血中では増加したとする結果を報告した¹⁹⁾。京都府立医大の山口らは、アルツハイマー患者CSFでのKLK6発現検討を59例の検体を用いて行い、病態による有意な変化は認められなかったという報告した²⁰⁾。著者らがカナダMcMaster大学のFahnestockらと行った共同研究では、アルツハイマー病脳でコントロール脳よりもKLK8 mRNAが高値を示したが、KLK6 mRNAでは差がなかった²¹⁾。これらの研究を受け、スペインのグループがアルツハイマー病患者199例を含む認知障害患者血中のKLK6を測定した²²⁾。この結果、60歳以上ではアルツハイマー病患者血中のKLK6は健常コントロール血中より統計学的に有意に低値を示した。興味深い点はコントロールの健常者でも加齢に伴いKLK6の血中値が上昇するという点である。アルツハイマー病の患者血中濃度は逆に低値になるわけで、このメカニズムがどうなっているのかは興味深い。

以上の様にアルツハイマー病脳での発現は研究者により一致した見解はないが、血中のKLK6値は健常者より少ないようである(図5)。

VII. KLK6と α -synucleinとの関連

理研の研究グループと山口らのグループからKLK6と α -synucleinの関連を検討した論文が発表されたことを受け、京都府立医大のグループから、KLK6が α -synucleinを分解する活性があるという報告が出た²³⁾。また、英国LoveらがLewy小体型認知症では脳内のKLK6が低値を示すという結果を発表し、カリフォルニアのグループがマウスでのシヌクレイノパチーモデルに対するKLK6の効果を検討した。KLK6により、 α -synuclein量の減少と神経細胞死の減少を認め、多系統萎縮症のモデルにKLK6を発現させると、脳内の α -synuclein量は減少し、行動学的にもよい結果を得たという²⁴⁾。

以上をまとめると、Lewy小体にKLK6は存在し、

KLK6 のヒト脳での発現



神経細胞?



オリゴデンドロサイト?



血管?

アルツハイマー

神経細胞での発現?

血中↓

α -シヌクレイノパチー

● Lewy 小体に存在

✂ α -シヌクレインを分解

図5 ヒト KLK6 の発現

α -synuclein を分解する能力はあるといえる。実際に病態でどのように関与しているかは、これからの課題であろう (図5)。

まとめ

げっ歯類ではニューロプシン/KLK8 と KLK6 はオリゴデンドロサイトに発現して、脱髄に深く関与している。これらの分子のヒトでの発現は、研究者による不一致点が多く不明な点が多く、これからの課題も多いが、脱髄疾患や α -シヌクレイノパチーをはじめとするさまざまな病態への関連があることは間違いないと思われる。

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) Tomizawa K, et al : Injury induces neuropsin mRNA in the central nervous system. *Brain Res* 824 : 308-311, 1999.
- 3) Terayama R, et al : Involvement of neuropsin in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia* 52 : 108-118, 2005.
- 4) Yamashiro K, et al : Molecular cloning of a novel

- trypsin-like serine protease (neurosin) preferentially expressed in brain. *Biochim Biophys Acta* 1350 : 11-14, 1997.
- 5) Little SP, et al : Zyme, a novel and potentially amyloidogenic enzyme cDNA isolated from Alzheimer's disease brain. *J Biol Chem* 272: 25135-25142, 1997.
- 6) Scarisbrick IA, et al : Nervous system-specific expression of a novel serine protease: regulation in the adult rat spinal cord by excitotoxic injury. *J Neurosci* 17 : 8156-8168, 1997.
- 7) Yamanaka H, et al : Protease M/neurosin mRNA is expressed in mature oligodendrocytes. *Brain Res Mol Brain Res* 71 : 217-224, 1999.
- 8) 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.
- 9) Murakami K, et al : In vivo analysis of kallikrein-related peptidase 6 (KLK6) function in oligodendrocyte development and the expression of myelin proteins. *Neuroscience* 236 : 1-11, 2013.
- 10) 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.
- 11) Scarisbrick IA, et al : Activity of a newly identified serine protease in CNS demyelination. *Brain : a journal of neurology* 125 : 1283-1296, 2002.
- 12) Blaber SL, et al : Targeting kallikrein 6 proteolysis attenuates CNS inflammatory disease. *Faseb J* 18 : 920-922, 2004.

- 13) Burda JE, et al : Critical role for PAR1 in kallikrein 6-mediated oligodendroglipathy. *Glia* 61 : 1456-1470, 2013.
- 14) Yoon H, et al : Kallikrein 6 signals through PAR1 and PAR2 to promote neuron injury and exacerbate glutamate neurotoxicity. *Neurochem* 127 : 283-298, 2013.
- 15) Scarisbrick IA, et al : Potential scope of action of tissue kallikreins in CNS immune-mediated disease. *J Neuroimmunol* 178 : 167-176, 2006.
- 16) Scarisbrick IA, et al : MSP, a trypsin-like serine protease, is abundantly expressed in the human nervous system. *J Comp Neurol* 431 : 347-361, 2001.
- 17) Ogawa K, et al : Localization of a novel type trypsin-like serine protease, neurosin, in brain tissues of Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Psychiatry Clin Neurosci* 54 : 419-426, 2000.
- 18) Ashby EL, et al : Kallikrein-related peptidase 6 in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Brain Res* 1363 : 1-10, 2010.
- 19) Diamandis EP, et al : Human kallikrein 6 as a biomarker of alzheimer's disease. *Clin Biochem* 33 : 663-667, 2000.
- 20) Mitsui S, et al : Decreased cerebrospinal fluid levels of neurosin (KLK6), an aging-related protease, as a possible new risk factor for Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 977 : 216-223, 2002.
- 21) Shimizu-Okabe C, et al : Expression of the kallikrein gene family in normal and Alzheimer's disease brain. *Neuroreport* 12 : 2747-2751, 2001.
- 22) Menendez-Gonzalez M, et al : Value of measuring plas-matic levels of neurosin in the diagnosis of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 14 : 59-67, 2008.
- 23) Tatebe H, et al : Extracellular neurosin degrades alpha-synuclein in cultured cells. *Neurosci Res* 67 : 341-346, 2010.
- 24) Spencer B, et al : A brain-targeted, modified neurosin (kallikrein-6) reduces alpha-synuclein accumulation in a mouse model of multiple system atrophy. *Mol Neurodegener* 10 : 48, 2015.

すべての脳神経外科医のバイブル!

NEUROSURGERY

脳神経外科学 改訂 12版

総編集

太田富雄

(公財)唐澤記念会・大阪脳神経外科病院名誉院長・脳ドックセンター長
大阪医科大学名誉教授

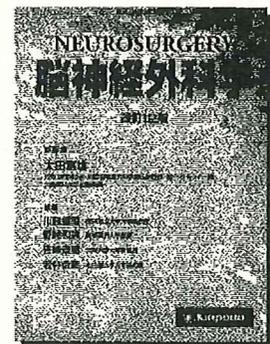
編集

川原信隆 横浜市立大学大学院教授

野崎和彦 滋賀医科大学教授

吉峰俊樹 大阪大学大学院教授

若林俊彦 名古屋大学大学院教授



A5変型判・2962頁・3分冊・ケース 定価(本体34,000円+税) ISBN978-4-7653-1667-5

株式会社金芳堂 京都市左京区麩ヶ谷西寺ノ前町 34 番地 〒606-8425
Tel 075-751-1111 Fax 075-751-6858

E-mail (営業部) : elgyo@kinpodo-pub.co.jp
<http://www.kinpodo-pub.co.jp/>