

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 9 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23700436

研究課題名（和文） 脱髄関連因子 KLK6 を介した多発性硬化症発症機序の解析

研究課題名（英文） Critical role of KLK6 in the pathogenesis of Multiple Sclerosis

研究代表者

板東 良雄 (BANDO YOSHIO)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：20344575

研究成果の概要（和文）：脱髄関連因子である KLK6 のノックアウトマウスを用いて多発性硬化症モデル(EAE)を誘導したところ、発症が遅延し症状も軽減した。また、組織学的検討により KLK6 ノックアウトマウスでは血液脳関門が比較的維持されており、末梢からの炎症細胞の浸潤が抑制されていることが明らかとなった。さらに、血液脳関門の破綻や脱髄への関与が示唆されている MMP-9 の活性化に KLK6 が関与していることを見出した。これら一連の研究成果は KLK6 が多発性硬化症発症の鍵となる因子であり、治療戦略の標的分子となり得る可能性を示唆するものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS). It results in neurological impairments. One of animal model is myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)- induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), which is characterized by paralysis and immune cell infiltration in the CNS. We have previously reported that a serine protease, Kallikrein 6 (KLK6), is produced by exclusively mature oligodendrocytes in the CNS, and that KLK6 is up-regulated in oligodendrocytes after spinal cord injury and EAE. However, the function of KLK6 in the pathogenesis of MS has not been fully understood.

Here we report that KLK6 is involved in onset of EAE via BBB breakdown. To investigate the role of KLK6 in demyelination, we examined the effect of KLK6 on onset of EAE in KLK6 knock out (KO) mice. KLK6 KO mice exhibited an altered EAE progression characterized by delayed onset and progression of clinical symptoms as compared to wild-type mice. Histological study with luxol fast blue also revealed a decreased number of infiltrating inflammatory cells in spinal cord with EAE, suggesting that absence of KLK6 suppressed infiltration of peripheral inflammatory cells into the CNS with EAE. We next examined the effect of KLK6 on BBB permeability by Evans blue dye injection. KLK6 KO mice showed much suppression of BBB permeability compared to wild-type mice. Finally we found that activation of Matrix metalloproteinase-9 was inhibited in KLK6 KO mice with EAE. These results suggest that KLK6 play a crucial role of the pathogenesis of EAE.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経化学・神経薬理学

キーワード：多発性硬化症、セリンプロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症(Multiple Sclerosis: MS)は中枢神経系における炎症および脱髄を伴う再発・寛解を繰り返す自己免疫疾患であり、特定疾患に指定されている。本邦における罹患者数は増加傾向にあり、好発は20-30歳代の女性に多く、少子化にも少なからず影響を与えている。しかしながら、根治療法はなく、ステロイドなどによる対症療法が主流となっている。したがって、根治療法を目指した治療戦略を立てる上で、有効なターゲット分子の同定とともに発症機序の解明が望まれている。

2. 研究の目的

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(Kallikrein 6: KLK6)に着目し、KLK6を介した多発性硬化症の発症機序の解明を試みた。具体的には、野生型マウスおよびKLK6ノックアウトマウスにマウス多発性硬化症モデルであるExperimental Autoimmune Encephalomyelitis(EAE)を誘導し、EAE発症時におけるKLK6を介した脱髄分子機序の全貌の解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) 多発性硬化症モデル(Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: EAE)の作成

Freund's アジュバンドと Mycobacterium tuberculosis を混合した溶液と MOG35-55 のペプチドをよく混合し、C57Bl/6 雌マウス

(KLK6 野生型: 6-8 wks)およびKLK6 KO 雌マウス(同週齢)に定法により免疫し、経時的に脊髄を採取したものをサンプルとして用いた。

(2) 血液脳関門(BBB)脆弱性に関する検討

正常時には BBB を通過することがない Evans blue 色素を EAE 発症前にマウス尾静脈から注入し、BBB 破綻を間接的に可視化した。

(3) BBB 脆弱性に関与する因子の発現検討

BBB 破綻および脱髄に関係する分子 Matrix Metalloprotease-9(MMP-9)や細胞浸潤に関与する CCL2 などのケモカインに着目し、ウェスタンブロット法により野生型と KO マウス間で発現量の差を比較検討した。

(4) MMP-9 活性化における KLK6 の効果

KLK6 は理論上、MMP-9 を切断し活性化することが出来ると考えられたため、リコンビナント KLK6 とリコンビナント pro-MMP-9 を in vitro で反応させ、ウェスタンブロット法により MMP-9 の活性化を検討した。

(5) MMP-9 および PAR2 を発現する細胞の同定

EAE 発症時に MMP-9 および PAR2 を発現する細胞を免疫組織化学法にて同定した。

(6) KLK6-PAR2-MMP-9 経路の解析

PAR2 に対する特異的抗体をそれぞれ用い

たウェスタンブロット法にてPAR2の活性化を検討した。発現細胞種の同定には免疫組織化学法を用いた。次にPAR2の発現が認められたミクログリアに着目し、初代培養細胞系を用いてKLK6-PAR2を介したシグナル経路およびMMP-9の発現調節機構についても併せて検討した。さらに、PAR2を介したシグナル経路の下流に位置する炎症性サイトカイン(TNF- α , iNOS, IL-6およびIL-12)の発現変化についてRT-PCR法により検討を行った。

4. 研究成果

(1) KLK6 KO マウスではEAEの発症が遅延し(WT: 12.04 \pm 0.4 vs. KLK6 KO: 14.42 \pm 0.67, p<0.05)、症状も軽減した(WT: 2.54 \pm 0.21 vs. KLK6 KO: 1.74 \pm 0.22, p<0.05)。

(2) KLK6 KO マウスでは血液脳関門はEAE誘導時でも比較的維持されていた。

Evans blue 色素をEAE発症前(EAE d10-12)にマウス尾静脈より注入したところ、KLK6 KO マウスの脊髄は肉眼的には色素で染色されなかった。

(3) KLK6 KO マウスではEAE誘導時においてもMMP-9 および CCL2 の発現誘導は認められない。

KLK6 野生型マウスではEAE発症とともにMMP-9 および CCL2 の発現が増強したが、KLK6 KO マウスでは野生型に比べて両因子の発現はEAE誘導時においてもほとんど認められなかった。

(4) KLK6 はMMP-9 を *in vitro* で活性化する。

リコンビナント KLK6 とリコンビナント pro-MMP-9 を *in vitro* で反応させ、ウェスタンブロット法によりMMP-9の活性化を検討したところ、MMP-9の活性化が認められた。

(5) MMP-9 および PAR2 は主にミクログリアに発現する。

EAE発症時にMMP-9 および PAR2 を発現する細胞を免疫組織化学法にて同定したところ、MMP-9 は炎症部位においてミクログリアと一部のオリゴデンドロサイトに発現が認められ、アストロサイトの一部にも発現が認められた。一方、KLK6の基質候補であるPAR2の発現は主にミクログリアおよびアストロサイトであった。

(6) KLK6-MMP-9 経路の解析

PAR2に対する特異的抗体を用いたウェスタンブロット法にてPAR2の活性化を検討したところ、PAR2の分子量に相当するバンドが複数本検出され、実際に発現変化を起こしているか否かについての解析は難航した。別の特異的抗体を用いて行ってみたが、同様の結果となり、PAR2を直接介したシグナル伝達経路を明らかにするためにはPAR2 KOマウスの入手などさらなる工夫が必要と考えられた。

一方、PAR2を介したシグナル経路の下流に位置する炎症性サイトカイン(TNF- α , iNOS, IL-6およびIL-12)の発現変化についてRT-PCR法により検討を行ったところ、KLK6 KOマウスではEAE誘導時においても炎症性サイトカインの発現は野生型に比べて抑制されていた。

さらに、マウス初代培養ミクログリアにリコンビナント KLK6 を添加することによってMMP-9の発現変化について検討した。しかしながら、KLK6 そのものを静止型ならびに活性化ミクログリアに添加してもMMP-9の発現変化は誘導されなかったことから、おそらくPAR-2-MMP-9の経路は我々の実験系では直接的に関係しないのではないかと考えられた。

(7) まとめ

本研究において、炎症部位においてオリゴデンドロサイトから **KLK6** が分泌され、近隣のマクログリアから産生された **MMP-9** と出会うことによって **KLK6** が **MMP-9** を活性化し、活性化した **KLK6** および **MMP-9** が脱髄や血液脳関門の破綻に関与している可能性を示唆する所見が得られた。これら一連の成果は **KLK6** が MS 治療の標的分子として有効性を示すものであり、多発性硬化症治療戦略ひいては社会的にも貢献するものと考えられる (論文投稿中)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) Tanaka T., Murakami K., Bando Y., Yoshida S., Minocycline reduces remyelination by suppressing ciliary neurotrophic factor expression after cuprizone-induced demyelination. *Journal of Neurochemistry* (in press)

(2) Nomura T., Bando Y., Bochimoto H., Koga D., Watanabe T., Yoshida S. Three-dimensional ultra-structures of myelin and the axons in the spinal cord: application of SEM with the osmium maceration method to the central nervous system in two mouse models. *Neuroscience Research* 2013; 75: 190-197. First three authors equally contributed to this work.

(3) Murakami K., Jiang YP., Tanaka T., Bando Y., Mitrovic B., Yoshida S. In vivo analysis of kallikrein-related peptidase 6 (KLK6) function in oligodendrocyte development and the expression of myelin proteins. *Neuroscience* 2013; 236: 1-11.

[学会発表] (計 2 件)

(1) 板東良雄、脱髄性疾患モデルマウスを用いた脱髄機構の解析、第 14 回 ORIGIN 神経科学研究会、平成 24 年 8 月 31 日-9 月 2 日 (金沢)

(2) Bando Y., Nomura T., Bochimoto H., Watanabe T., Yoshida S. CNS myelin and axon morphology in demyelination and dysmyelination in mouse models. 第 35 回日本

神経科学大会、平成 24 年 9 月 18 日-9 月 23 日 (名古屋)

[その他]

ホームページ等

<http://www.asahikawa-med.ac.jp/dept/mc/anato1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

板東 良雄 (BANDO YOSHIO)
旭川医科大学・医学部・講師
研究者番号：20344575

(2) 連携研究者

吉田 成孝 (YOSHIDA SHIGETAKA)
旭川医科大学・医学部・教授
研究者番号：20230740