

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500322

研究課題名（和文） 脱髄関連プロテアーゼのオリゴデンドロサイト分化・成熟への作用

研究課題名（英文） Effects of proteases on differentiation and maturation of oligodendrocytes

研究代表者

吉田 成孝 (Yoshida Shigetaka)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：20230740

研究成果の概要（和文）：

KLK6はオリゴデンドロサイトに発現するプロテアーゼであるが、そのオリゴデンドロサイト成熟への関与は不明であった。KLK6 ノックアウト (KLK6-KO) マウスの解析により、脊髄でのオリゴデンドロサイト発達の一時的な遅延が見られた。KLK6-KO では脊髄損傷後のミエリン塩基性タンパク質の発現も少なかった。これらの結果から、KLK6はオリゴデンドロサイトの発達に一定の関与をしていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

KLK6 is a serine protease specifically expressed in oligodendrocytes. The function of the protease on the maturation of oligodendrocyte has been undetermined. We analyzed KLK6 gene knockout (KLK6-KO) mice and found that the development of oligodendrocytes was temporally delayed. We also found that the expression of myelin basic protein was smaller in KLK6-KO mice than that of wild-type mice. These results indicate that KLK6 plays a role in the development of oligodendrocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学 神経解剖学・神経病理学

キーワード：オリゴデンドロサイト、プロテアーゼ、KLK6、発達、ミエリン、脱髄

1. 研究開始当初の背景

オリゴデンドロサイトは中枢神経系で軸索に髄鞘を形成するグリア細胞であるが、軸索及び神経細胞の保護作用もあることが示されてきている。このオリゴデンドロサイトは成熟するとカリクレイン型プロテアーゼである KLK6 を発現する (Yamanaka et al. Mol Brain Res, 71, 217-224, 1999)。また、オリゴデンドロサイト前駆細胞である NG2 陽性細胞の一部にプロテアーゼ M/KLK6 は発現

するが、脊髄損傷時には発現が見られなくなる。また、脊髄損傷時および脱髄性疾患である多発性硬化症のモデルである experimental allergic encephalitis (EAE) においてオリゴデンドロサイトでの KLK6 発現が亢進する事も合わせて報告した。培養細胞において、RNAi により KLK6 発現を抑制すると、ミエリンタンパク質である PLP および MBP 発現が抑制されることも我々により報告してきた。

2. 研究の目的

以上の結果から以下の事が推論された。

1. **KLK6** は **NG2** 陽性オリゴデンドロサイト前駆細胞からオリゴデンドロサイトへの分化に関与し、さらに、ミエリン化にも関与している。

2. 脊髄損傷時と **EAE** におけるオリゴデンドロサイトにおける分子機構は異なる。

そこで、本研究の目的は以下の2つとした。

1. **KLK6** のオリゴデンドロサイト分化および成熟すなわちミエリン化へ関与する分子機構を明らかとすること。

2. **EAE** におけるオリゴデンドロサイト反応の分子機序を明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) 脊髄の組織

In vivo でノックアウト動物および野生型動物の胎児期後期および生後の各発達段階で野生型および **KLK6** 遺伝子ノックアウトマウス (**KLK6**-KO) を4%パラホルムアルデヒド含有リン酸バッファーにて灌流固定した。中枢神経の凍結切片を作成し、オリゴデンドロサイト前駆細胞および成熟細胞のマーカであるミエリン塩基性タンパク質 (**MBP**)、**Olig1**、**NG2**、**CNPase**、**APC** により免疫染色を行い、陽性細胞数をカウントした。

(2) オリゴデンドロサイトとミエリンの微細構造

生後の発達段階で野生型および **KLK6** ノックアウトマウスを2%グルタルアルデヒド、4%パラホルムアルデヒド含有リン酸バッファーにて灌流固定した。脳梁を含む前脳領域と脊髄を常法によりエポン包埋を行い、ミエリン発達を電子顕微鏡下で観察した。

オリゴデンドロサイトとミエリンの微細構造変化を電子顕微鏡にて観察した。

(3) ミエリン関連タンパク質の変化

生後の発達段階で **KLK6**-KO と野生型マウスの脊髄サンプルよりウエスタンブロットを行い、ミエリン関連タンパク質の発現を検討した。

(4) 培養細胞

KLK6-KO と野生型新生児マウス脳から細胞を分離し、オリゴデンドロサイト濃縮培養を行った。培養開始3日後に、オリゴデンドロサイトへの分化培地に交換し、3日間培養した。オリゴデンドロサイトの形態を顕微鏡下にて観察した。

野生型および **KLK6** ノックアウトマウスからオリゴデンドロサイト初代培養を行い、ミエリン関連タンパク質の発現をウエスタンブロット解析にて検討した。

(5) EAE

野生型と **KLK6**-KO マウスに **MOG** ペプチド免疫によるアレルギー性脱髄(**EAE**)を生じさせた。行動観察により、**EAE** による麻痺のスコア化した。

免疫組織化学により **EAE** の各ステージでのオリゴデンドロサイト由来の分子発現を観察した。さらに、電子顕微鏡を用いて、脱髄の進行を観察した。

(6) 脊髄損傷

野生型と **KLK6**-KO マウスを麻酔後、背部の皮膚の正中切開を行い、第8腰椎の椎弓切除と硬膜切開を行った。露出した脊髄に対し3gの重りを5cmの高さより落下させ、脊髄損傷を行った。創部を縫合後12週間にわたり行動観察を行い **Basso Mouse Scale (BMS)** により麻痺の程度を評価した。また、傷害後4日と14日において一部のマウスを屠殺後、脊髄よりウエスタンブロット解析により、**MBP** の発現を定量した。

4. 研究成果

(1) 脊髄の組織

NG2 陽性のオリゴデンドロサイト前駆細胞は野生型と **KLK6**-KO マウス共に生後1日をピークに生後10週まで漸減していった。生後1日から4日にかけて **NG2** 陽性細胞が野生型マウスよりも、**KLK6**-KO で細胞数が多かったが、統計的な有意差は認めなかった。成熟オリゴデンドロサイトマーカである **APC** 陽性細胞数は生後4日をピークに減少していったが、生後7日では野生型マウスの陽性細胞数が **KLK6**-KO よりも統計学的有意差をもって多かった (図1)。 **MBP** および **CNPase** 陽性細胞数の両遺伝子型間での統計的な差はなかった。

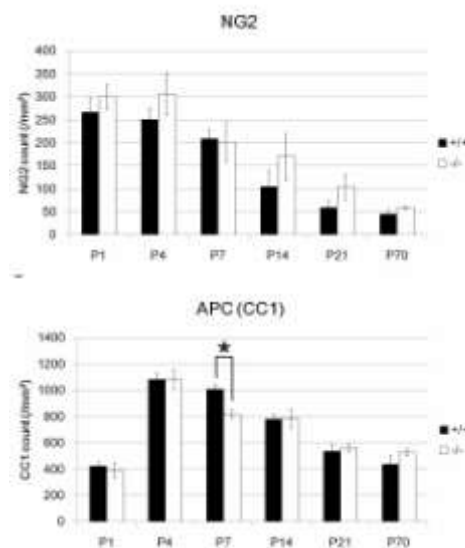


図1

BrdU を投与して、BrdU 陽性細胞と各種マーカーの2重染色を行い、細胞増殖に差があるかも観察したが、陽性細胞数には差はなかった。

(2) オリゴデンドロサイトとミエリンの微細構造

電子顕微鏡によりミエリンの形態を観察したところ、顕著なミエリンの形態的な差は認められていない。また、ミエリンの層構造を結び付けている radial component についても検討を行ったが、両遺伝子型間での差は認められなかった。

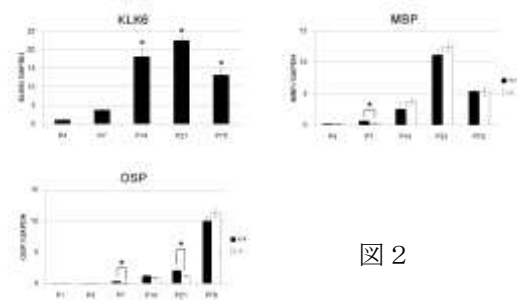


図 2

(3) ミエリン関連タンパク質の変化

ウェスタンブロットにより、脊髄におけるミエリン関連タンパク質の発現量を定量した。野生型マウスでの KLK6 発現は生後 21 日をピークとした発現パターンを示した。MBP も生後 21 日が発現のピークであったが、生後 7 日において、野生型での発現が KLK6-KO よりも有意に多かった。oligodendrocyte specific protein は生後 7 日と 21 日において、野生型の発現が有意に多かった (図 2)。

(4) 培養細胞

野生型マウスからのオリゴデンドロサイトには CNPase と OSP が豊富にみられ、オリゴデンドロサイトへの成熟が見られた。これに対し、KLK-KO からの培養ではこの 2 種の分子の発現が有意に低かった。

(5) EAE

野生型マウスでは protease-activated receptor 2 (PAR2) 発現が大きく増加した。これに対し、KLK6-KO では野生型に比べると発現量は低かった。これらの結果から、KLK6 はオリゴデンドロサイトの分化に重要な役割を果たすとともに、脱髄とその修復過程にも大きく関与していることが考えられる。

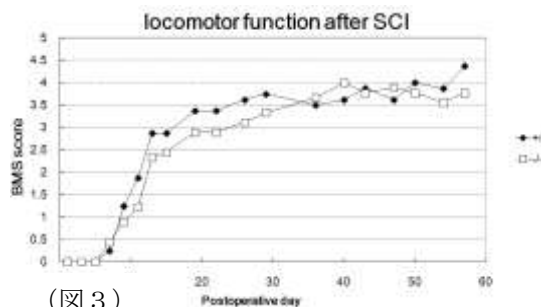
MMP 9 の発現が野生型に比べ、KLK6 ノックアウトマウスでは少ないことが明らかとなった。

電子顕微鏡による観察で、脱髄の過程には

T 細胞等の浸潤が認められない部位においても脱髄が進行していることが明らかとなった。

(6) 脊髄損傷

マウスの行動観察による麻痺の評価を行った。受傷後 7 日までは完全な後肢麻痺であったが、徐々に回復し、スケール 4/9 程度 (時として後肢の足踏み運動がおこる) となった。



(図 3)

野生型と KLK6-KO との間の有意な差はなかった。(図 3)

脊髄を損傷部位の頭側、損傷中心、尾側に分けてミエリン関連タンパク質発現を検討した。傷害後 4 日で、頭側部位において、KLK6-KO マウスの MBP 量は野生型の 53% であった。損傷中心と尾側部位においては、MBP はほとんど発現していなかった。損傷後 14 日でも KLK6-KO マウスの MBP 量は野生型の 54% (頭側部位)、64% (損傷中心) であったが尾側においては両者に差はなかった。

(図 4、ウェスタンブロットの結果。図 5 は定量の結果)

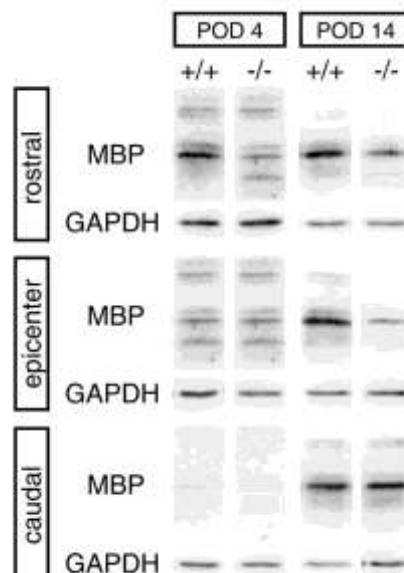


図 4

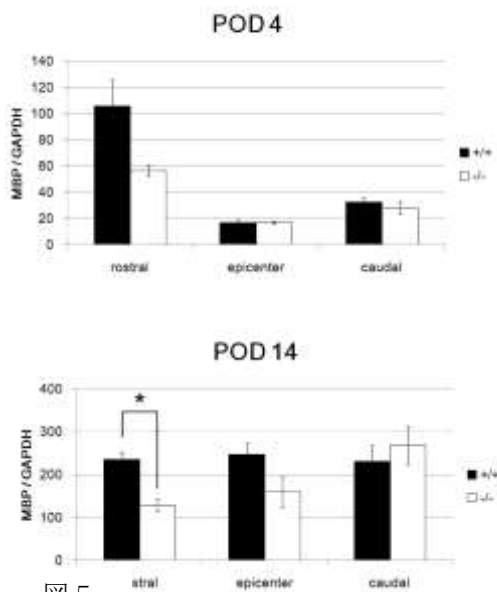


図 5

これらの結果から、KLK6 はオリゴデンドロサイトの成熟に対し促進的なはたらきがあることがわかった。さらに、脊髄損傷後のオリゴデンドロサイトの新たな成熟にも促進的なはたらきがあることが明らかとなった。

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 Kishibe M, Bando Y, Tanaka T, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H, Yoshida S, Kallikrein-related peptidase 8-dependent skin wound healing is associated with upregulation of kallikrein-related peptidase 6 and PAR2. *J Invest Dermatol*, 査読有 2012 印刷中.
doi:10.1038/jid.2012.18

② Yoshida S, Klk8, a Multifunctional Protease in the Brain and Skin: Analysis of Knockout Mice. *Biol Chem*, 査読有 391, 375-380, 2010.

③ 吉田成孝, オリゴデンドロサイトの生死とプロテアーゼ、*脳* 21、査読無、13, 9-14, 2010.

[学会発表] (計 7 件)

① 野村太一, 板東良雄, 暮地本宙己, 渡部剛, 吉田成孝, 実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルを用いた脱髄の形態学的解析、日本解剖学会 第 57 回東北・北海道連合支部学術集会、2011 年 9 月 11 日、盛岡

② Murakami K, Jiang Y-P, Tanaka T, Bando Y, Yoshida S, The delay of oligodendrocyte development and myelination in KLK6 deficient mouse., 4th International Symposium on

Kallikrein-Related Peptidases (ISK2011), 2011 年 9 月 2 日, Rhodes Island, Greece

③ Bando Y, Nomura T, Bochimoto H, Kouga D, Watanabe T, Yoshida S, Morphological changes of axons and myelin in experimental autoimmune encephalomyelitis., 10th Biennial ISN Satellite Meeting on Myelin Biology, 2011 年 8 月 24 日, Kolymvri, Crete, Greece.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 成孝 (Yoshida Shigetaka)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 20230740

(2) 研究分担者

板東 良雄 (Bando Yoshio)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 20344575

村上 公一 (Murakami Koichi)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 90400085

(3) 連携研究者

無 ()