

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500404

研究課題名(和文) 脱髄性疾患モデルマウスにおける脱髄の新たなメカニズムの探索

研究課題名(英文) Investigation for a New Mechanism of Demyelination in Demyelinating Model Mice

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究は髄鞘変化から脱髄への経過とプロテアーゼの機能を明らかにすることを目的とした。実験的自己免疫性脳炎では従来の観察で脱髄が生じる時期より、早くから髄鞘変化が生じており、KLK6の関与が示唆された。これに対し、クプリゾン投与による脱髄は異なるメカニズムによるもので、KLK6の関与は少ないものと考えられる。脊髄損傷による脱髄にもKLK6の関与はあるものと考えられる。培養細胞での結果から、これらはオリゴデンドロサイトの発達や形態によるものであることより、脱髄時のプロテアーゼの作用であることが考えられる。

研究成果の概要(英文)：The objective of the current study was to elucidate the mechanism of demyelination from the change of myelin condition and the function of the protease of oligodendrocytes. In experimental autoimmune allergic encephalitis, changes of the condition of myelin occurred earlier than previously thought. The involvement of KLK6 was also suggested. In contrast, demyelination by cuprizone administration was caused by different mechanism with less involvement of KLK6. KLK6 was also partially involved in demyelination after spinal cord injury. From the study of cultured oligodendrocytes, KLK6 may play a role during demyelination rather than development of oligodendrocytes.

研究分野：神経解剖学

キーワード：脱髄 オリゴデンドロサイト 多発性硬化症 EAE プロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) 中枢神経の多くの軸索にはオリゴデンドロサイトにより髄鞘が巻かれ、跳躍伝導を行っている。病的状態ではこの髄鞘が破壊され、それにより軸索の機能が損なわれ、さらには変性に至ることもしばしばである。これが脱髄である。多発性硬化症は脱髄を主とする代表的な疾患である。脱髄後に再び髄鞘が形成されるのが再髄鞘化であるが、再髄鞘化は容易に生じないこともしばしばである。これまでの脱髄のメカニズムは炎症細胞の浸潤と細胞障害性免疫細胞の作用により、髄鞘が破壊されて、脱髄とその後の軸索傷害が生じるというものである。

これに対し、脱髄が生じるよりも先にオリゴデンドロサイトがプロテアーゼを発現すること示されている¹⁻²。このことは、オリゴデンドロサイト自身による脱髄への関与の可能性が考えられ、さらに、このプロテアーゼによる蛋白分解が直接的に髄鞘破壊にはたらいっている可能性も考えられる。

(2)そこで、脱髄のメカニズムへのオリゴデンドロサイトの関与とオリゴデンドロサイトが発現するプロテアーゼの機能を明らかにすることは脱髄の抑制や再髄鞘化を目指した治療法の開発の上で重要であると考えられる。

2. 研究の目的

(1) そこで、今回の研究では髄鞘変化から脱髄への経過を明らかにすることを目的とする。また、オリゴデンドロサイトが発現するプロテアーゼの機能を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) EAE 作成 C57BL/6 (野生型) マウスと KLK6 遺伝子ノックアウトマウス (KLK6-KO) に対し、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (MOG) の 35-55 部分アミノ酸配列ペプチドを皮下注射により、実験的自己免疫性脳炎 (EAE) を生じさせた。免疫注射後、5, 7, 10, 14, 21, 42, 70 日後にマウスを 0.5% ホルムアルデヒド、0.5% グルタルアルデヒド溶液で灌流固定後、脊髄を採取した。1% オスミウム液で後固定後、ジメチルスルフォキシド液に浸漬後凍結し、切断試料を走査型電子顕微鏡にて観察をおこなった。

(2) Shiverer マウス ミエリン遺伝子の部分欠損により髄鞘不全を生じる shiverer マウスを灌流固定後、脊髄を採取し上記の方法により試料作製し、走査型電子顕微鏡による観察を行った。

(3) クプリゾン投与 野生型と KLK6-KO マウスに対し、0.2% クプリゾン含有飼料を投与した。4 週後に通常食にもどし、1 週後と 2 週後に 4%ホルムアルデヒド溶液で灌流固定後

に抗ミエリン塩基性タンパク質 (MBP、髄鞘タンパク質マーカー) 抗体にて免疫組織染色を行った。

(4) 脊髄損傷 脊髄損傷した後の髄鞘および軸索の変化の経時的に観察した。野生型と KLK6-KO マウスに対し、Th8 脊髄に荷重を落下することにより脊髄損傷を行った。このマウスを 4%ホルムアルデヒド、2%グルタルアルデヒド溶液で灌流固定後に脊髄を採取し常法により試料を作成し、透過型電子顕微鏡による観察を行った。また、脊髄を採取し、抗 MBP 抗体を用いてウェスタンブロット法により、髄鞘変化とプロテアーゼ発現の関連を観察した。

(5) 培養細胞 胎生 18 日の KLK6-KO マウスから脳を取り出し、オリゴデンドロサイトの培養を行った。この細胞に対して、リコンビナント KLK6 を投与して、形態変化を観察した。

4. 研究成果

(1) 無処置の野生型マウスでは走査型電子顕微鏡による観察で、髄鞘はコンパクトな形態で観察され (図 1A) 透過型電子顕微鏡により見られるようなルースな形態はほとんど認められなかった。免疫注射後 20 日で EAE 発症による、四肢麻痺は最大となった。この時期の野生型マウスでは、第 4 腰髄で髄鞘の様々な異常が認められた。特徴的なものは、髄鞘がコンパクトな形態を保ったまま髄鞘から離れている像 (図 1B)、髄鞘の中に髄鞘が 1 つ以上ある重複髄鞘 (図 1C) や髄鞘の中が完全に閉じている閉塞髄鞘などが見られた。KLK6-KO では同様の像は観察されるものの、野生型に比べると変性髄鞘は少なかった。さらに、早期の段階で、麻痺などの症状が全く観察されない免疫注射後 4 日の腰髄野生型マウスで髄鞘の軸索からの解離や変性した髄鞘が多く観察された。KLK6-KO ではこのような変化は殆んど観察されなかった。

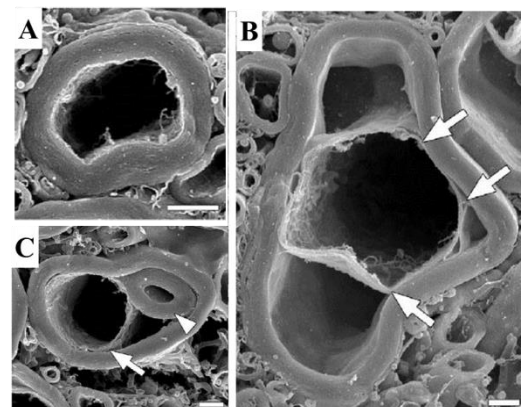


図 1 髄鞘の異常 スケールバー=1 μm

(2) shivere マウスでは髄鞘が殆んど見られないが、髄鞘がある軸索においても、ランビ

エの絞輪部においてミクログリアと思われるグリア細胞の突起が軸索に密に接触している像が観察された (図2A)。また、軸索内においてはよく発達した滑面小胞体とミトコンドリアが多く見られた (図2B)。

(3) クプリゾン投与後、抗 MBP 抗体により染色を行ったところ、染色性の変化は殆んど生じず、遺伝子型による差も認められなかった。(図3)

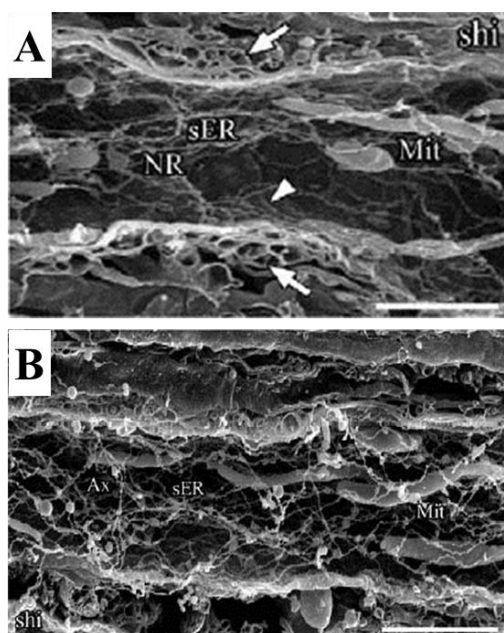


図2 shivere の軸索と髄鞘
矢印がグリア細胞の突起、矢頭が小胞体構造、Mit はミトコンドリア

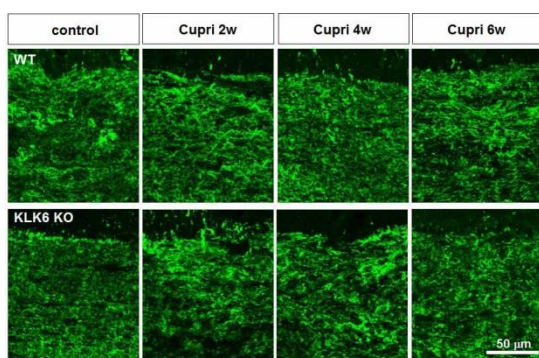
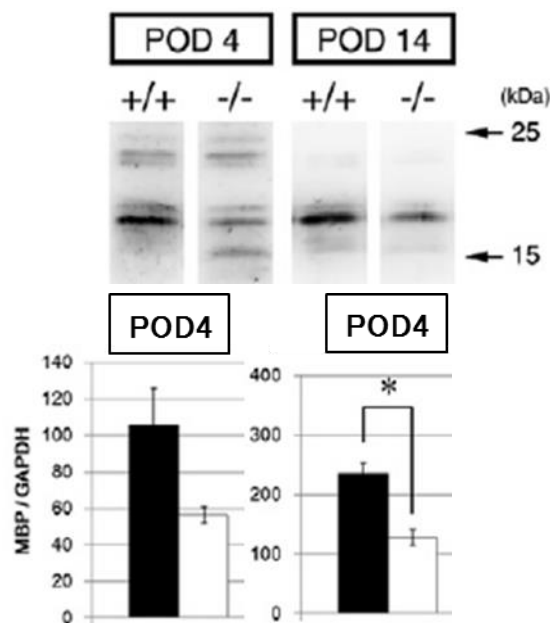


図3 クプリゾン投与後の野生型 (WT) と KLK6-KO マウスの脳梁の MBP 染色像

(4) 脊髄損傷後の透過型電子顕微鏡による観察では、遺伝子型による顕著な差は認められなかった。

抗 MBP 抗体を用いたウェスタンブロット法による解析で、損傷後4日と14日後において、損傷部位の吻側領域で KLK6-KO では MBP 量が野生型より有意に低かった。



(5) KLK6-KO マウスの培養オリゴデンドロサイトに KLK6 を投与したが、形態には顕著な変化は認められなかった。

(6) 以上の結果より EAE では従来の観察で脱髄が生じる時期より、早くから髄鞘変化が生じており、KLK6 の関与が示唆された。これに対し、クプリゾン投与による脱髄は異なるメカニズムによるもので、KLK6 の関与は少ないものと考えられる。脊髄損傷による脱髄にも KLK6 の関与はあるものと考えられる。培養細胞での結果から、これらはオリゴデンドロサイトの発達や形態によるものであることより、脱髄時のプロテアーゼの作用であることが考えられる。

<引用文献>

1) 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.

2) Terayama R, et al.: Differential expression of neurosin and protease M/neurosin in oligodendrocytes after injury to the spinal cord. *Glia* 48: 91-101, 2004.

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5件)

- ① Bando Y, Nomura T, Bochimoto H, Murakami K, Tanaka T, Watanabe T, Yoshida S, Abnormal Morphology of Myelin and Axon Pathology in Murine

Models of Multiple Sclerosis.
Neurochem Int. 査読有 81, 16-27, 2015.
Doi: 10.1016/j.neuint.2015.01.002.

- ② Murakami K, Tanaka T, Bando Y, Yoshida S, Differences in Kallikrein-Related Peptidase mRNA Sequences and KLK6 Enzyme Activity between Mouse Strains. Protein Pept Lett, 査読有 22, 204-211, 2015.
- ③ Tanaka T, Murakami K, Bando Y, Yoshida S, Minocycline reduces remyelination by suppressing ciliary neurotrophic factor expression after cuprizone-induced demyelination. J Neurochem, 査読有 127, 259-270, 2013.
Doi: 10.1111/jnc.12289.
- ④ Murakami K, Jiang Y-P, 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, 査読有 236, 1-11, 2013.
Doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.12.073
- ⑤ 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. Neurosci Res, 査読有 75, 190-197, 2013.

[学会発表] (計2件)

- ① 板東良雄、野村太一、村上公一、田中達英、暮地本宙己、渡部剛、吉田成孝、板東良雄、野村太一、暮地本宙己、渡部剛、Neuro2013, 2013年6月18日、京都
- ② 板東良雄、野村太一、暮地本宙己、渡部剛、吉田成孝、マウス脱髄モデルを用いた脱髄および髄鞘形成不全における髄鞘と軸索の形態変化、第35回日本神経科学大会、2012年9月18日、名古屋

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・准教授
研究者番号：20344575

田中 達英 (TANAKA, Tatsuhide)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号：80567032

村上 公一 (MURAKAMI, Koichi)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号：90400085