

# 中枢神経損傷時における細胞外蛋白分解酵素の機能解析

吉田 成孝 [旭川医科大学／教授]

## 背景・目的

中枢神経系に対する損傷は、四肢麻痺を始めとする多くの後遺症が生じる。その大きな原因の一つが、切断された軸索がほとんど再生しないことにある。損傷された神経軸索はオリゴデンドロサイトをはじめとするグリア細胞が発現する細胞外の因子によりその軸索伸長が阻害されていることが明らかとなってきた。また、我々はオリゴデンドロサイトに発現するプロテアーゼを同定してきた。今回の研究の目的はこれらのプロテアーゼを発現するオリゴデンドロサイトの特徴を明らかとし、損傷時のこれらのプロテアーゼの機能に関しての知見を得ることにある。

## 内容・方法

1. BALB/cマウスに対して麻酔後にカイニン酸を海馬内投与もしくは脊髄損傷モデルを作成した。深麻酔後、灌流固定し脳または脊髄を摘出し、クリオスタットにて厚さ30 $\mu$ mの、ビブラトームを用いて厚さ50 $\mu$ mの前額断切片を作成した。
2. ニューロブシン遺伝子フラグメント挿入プラスミドおよびプロテアーゼM遺伝子フラグメント挿入プラスミドを用い、in situ hybridizationを行った。また、抗プロテアーゼM血清を用いて免疫組織学法による染色を行った。さらに、細胞内局在の検討のために免疫電顕法を用いた。これには、前包埋法および後包埋法によるプロテアーゼMの免疫標識を行った。
3. ニューロブシンの酵素活性を検討するためにマウス脳脊髄をホモジネートし、ミエリン分画を粗精製した。ミエリン分画にリコンビナントニューロブシンを加え、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびウエスタンブロットを行い、抗ミエリン塩基性蛋白質(MBP)抗体を用いて免疫反応を行った。

## 結果・成果

1. 脊髄損傷によるプロテアーゼの発現変化  
無処置マウスではニューロブシンは前角の運動ニューロンにmRNA発現が見られた。しかし、白質線維束にはニューロブシンmRNA発現細胞は認められなかった。これに対し、プロテアーゼM mRNA発現細胞は脊髄の白質に豊富に認められたが灰白質にはほとんど発現していなかった。脊髄損傷後のマウスでニューロブシンmRNAの発現は白質に多く認められた。発現細胞は比較的小型のオリゴデンドロサイト様の細胞であった。発現細胞は側索と前索に多く分布しているのが見られ、皮質脊髄路を含む後索には少

なかった。これに対し、脊髄損傷後でプロテアーゼM mRNA発現細胞は白質及び灰白質共に増加した。

2. 無処置マウスにおけるプロテアーゼMタンパク質の発現細胞とその局在

プロテアーゼMの陽性細胞は、下位脳幹では三叉神経脊髄路、錐体路、顔面神経および内耳神経等の線維束にみられた。オリゴデンドロサイト様の小型の細胞の細胞体および突起に陽性反応がみられた。上位脳では、脳梁、海馬白板、外包および内包等の線維束に陽性反応がみられた。前包埋法によると、上位脳および下位脳においてプロテアーゼM陽性反応は、オリゴデンドロサイトおよびミエリンにみられた。プロテアーゼM陽性のオリゴデンドロサイトは低電子密度型(LO)型および中電子密度型(MO)型オリゴデンドロサイトであり、高電子密度型(DO)型で免疫陽性であるものはほとんど認めなかった。ミエリンに高い陽性反応が観察された。

3. 上位脳と下位脳におけるプロテアーゼM発現様式の違い  
上位脳ではDOが多く、下位脳ではLOが多く分布しており上位脳と下位脳でオリゴデンドロサイトの分布に違いがみられた。金コロイド標識したプロテアーゼMの免疫電子顕微鏡観察において、下位脳が上位脳よりもミエリンに高い陽性反応を示した。

4. 中枢神経系障害時におけるプロテアーゼMタンパク質の発現細胞とその局在

カイニン酸注入側で免疫組織化学の結果、脳梁、海馬白板および外包でコントロールより強いプロテアーゼM陽性反応が認められた。またミエリン鞘においても無処置マウスと同じようにプロテアーゼM陽性反応を観察できたが、カイニン酸投与により変性した軸索周囲のミエリン鞘にはより強い陽性反応がみられた。

5. ニューロブシンの基質

ミエリン分画の蛋白質をリコンビナントニューロブシンと反応させたところ、MBPと同一の分子量のバンドである蛋白質の減少が認められた。そこで、抗MBP抗体を用いて検討したところ、ニューロブシンによりMBP蛋白質の減少が認められた。

## 今後の展望

今回の研究により中枢神経の障害によりオリゴデンドロサイトにプロテアーゼが発現誘導され、これらはミエリンにも局在しており、また、ミエリン蛋白質を分解する能力があることが明らかとなった。この知見は中枢神経の損傷に関するオリゴデンドロサイトの役割を明らかにするのみならず、損傷後の治療に向けての方策としてプロテアーゼもしくはその阻害剤が検討されうことを示唆している。

今後は、オリゴデンドロサイトの機能をさらに追求するためにオリゴデンドロサイトを障害した際の神経細胞の生存維持等に関して検討していく予定である。