

脱髄性神経変性疾患における細胞外プロテアーゼの役割

寺山 隆司 [旭川医科大学解剖学第一講座/助手]

背景・目的

多発性硬化症は中枢神経系における炎症と脱髄を特徴とする自己免疫性疾患と考えられているが、その病因および根治的治療法はまだ確立されていない。一方ニューロプシンやプロテアーゼMは中枢神経系において発現するセリンプロテアーゼであり、種々の生理的・病理的環境下で発現が変化することが報告されている。そこで本研究では、多発性硬化症の実験モデルを用いて、発症前後の中枢神経系におけるセリンプロテアーゼの発現変化について検討し、脱髄疾患におけるセリンプロテアーゼの役割を明らかにすることを目的とした。

内容・方法

1. 実験モデル作製と臨床的評価：アジュバントに混濁した Myelin oligodendrocyte glycoprotein の皮下注射および百日咳トキソンの腹腔内投与による免疫で多発性硬化症様の症状を発症させ、臨床的評価を6週間行った。
2. RT-PCR法：免疫後10,21,42日で脊髄を採取し、オリゴプライマーを用いたRT-PCR法を行い、発症前後でのニューロプシンおよびプロテアーゼM mRNAの発現変化を定量的に検討した。
3. 組織学的検索：免疫後10,21,42日で灌流固定した後、脊髄を採取しクリオスタットを用いて前頭断の連続切片を作製した。ニューロプシンおよびプロテアーゼM mRNAの発現変化を切片上で検討するためin situハイブリダイゼーションを行い、さらに発現細胞を同定するため、同一切片上で各細胞特異性マーカー抗体を用いた免疫組織化学を行った。

結果・成果

1. 実験モデルにおける症状の経過：MOGペプチドによる免疫を行ったマウスの全例において、四肢麻痺をはじめとする症状が10日前後で認められ、21日前後に症状はピークとなった。組織学的に検討すると、脊髄白質において炎症細胞の浸潤と脱髄が顕著に認められ、組織学的評価における重篤度は臨床的評価と一致していた。
2. セリンプロテアーゼの発現変化：in situハイブリダイゼーションによる検討で、プロテアーゼの発現が脱髄性病変により増加することが示された。ニューロプシンは正常な脊髄ではほとんど発現していなかったが、脱髄病変を発症させると病変部周囲の白質に局限してその発現が誘導された。一

方プロテアーゼMは正常な脊髄において主に白質に内在性の発現が認められたが、脱髄病変により白質および灰白質においてより広範な発現の増加が認められた。RT-PCR法によりこれらのプロテアーゼの発現変化を定量的に検討したところ、ニューロプシンは免疫後21日で有意な増加が認められ($p<0.01$)、その後減少する傾向が認められた。プロテアーゼMに関しても免疫後21日で有意な増加が認められ($p<0.05$)、その後わずかに減少傾向が認められたが、42日後においても有意に増加した状態が持続していた($p<0.05$)。

3. ニューロプシンとプロテアーゼMの発現細胞：脱髄病変周囲におけるニューロプシン発現細胞のほとんどに、オリゴデンドロサイトの細胞特異的マーカーであるCNPaseに対して陽性反応が認められた。一方ニューロプシン発現細胞はニューロン、アストロサイトまたマイクログリアのマーカーの免疫染色とは一致しなかった。また、ニューロプシン発現細胞のほとんどがプロテアーゼMタンパク陽性であった。正常な脊髄においてプロテアーゼM発現細胞の大多数がCNPase陽性であり、またオリゴデンドロサイトの前駆細胞のマーカーであるNG2陽性細胞の一部においてもプロテアーゼMの発現が認められた。その他の細胞マーカーと一致する所見は得られなかった。脱髄病変発症後、CNPase陽性細胞におけるプロテアーゼMの発現変化は認められなかったが、NG2陽性細胞におけるプロテアーゼMの発現はほとんど認められなくなった。さらにフィブロネクチン陽性の線維芽細胞においてプロテアーゼMの発現が認められるようになった。これらの結果から、脱髄性病変の進行に伴いニューロプシンとプロテアーゼMの発現がオリゴデンドロサイト、その前駆細胞、また線維芽細胞において変化していることが示され、これらの変化が多発性硬化症をはじめとする脱髄性疾患の病態に関与していることが示唆された。

今後の展望

本研究によりニューロプシンとプロテアーゼMが脱髄疾患の病態に関与していることが示唆されたが、これらの機能的役割についてはまだ不明である。現在、本研究室ではニューロプシンノックアウトマウスを用いて脱髄疾患を発症させる研究を行い、ノックアウトマウスでは脱髄疾患の発症の時期が遅く、また症状も軽度であることが分かってきた。今後、ニューロプシンやプロテアーゼMが多発性硬化症に対する有用な治療のターゲットとして認識され、特異的な抑制剤の開発・応用へと展開し、新しい治療法に寄与する可能性がある。