4400-2985

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に関する研究

課題番号　１３６８０８３０

平成１３年度～平成１４年度科学研究費補助金　基盤研究（ｃ）（２）研究成果報告書

平成１５年　５月

吉田成孝

(旭川医科大学・医学部・教授)

はしがき

外傷などによる脊髄損傷はその後の機能的回復が多く望めないため、医学的、社会的にも大きな問題となっている。これは、切断された軸索の再生は中枢神経においてはほとんど生じないという事実によるところが大きい。実際、教科書的にも中枢神経の軸索伸長はないとされてきた。このdogma は近年における様々な神経栄養因子の解析等により必ずしも事実でないことが明らかとなってきた。しかし、大きな障害の一つとなっているのがミエリンに含まれる軸索伸長阻害因子の存在である。これらとして、nogo やMAG などの蛋白性の因子が同定されてきている。ミエリン関連糖蛋白(MAG)はオリゴデンドロサイトが発現するミエリン蛋白質で最初に分子同定された軸索伸長阻害因子である。この蛋白質は軸索のミエリン化の際に互いを認識しあうのに重要な分子であるが、生後の神経細胞の軸索伸長阻害を行うことが明らかとなってきている。nogoは1999年に同定された因子で、オリゴデンドロサイトが発現する因子であるが、非障害時のはたらきなどまだ不明な点は多い。さらに、中枢神経傷害後に損傷部位に集まるアストロサイト等から分泌される様々なプロテオグリカンにも軸索伸長を高度に阻害することがわかった。オリゴデンドロサイトの一部からも一種のプロテオグリカンが分泌されることも明らかとなっている。すなわち、ミエリンタンパク質の分解は軸索再生において非常に重要なステップである。オリゴデンドロサイトは中枢神経系でのミエリン形成細胞であるが、中枢神経損傷時のミエリン分解にオリゴデンドロサイトがどのように関わっているかはこれまで明らかでなかった。私たちは、これまでオリゴデンドロサイトが中枢神経障害時に２種のセリンプロテアーゼ、ニューロプシンとプロテアーゼMを新たに発現することを見いだした[2, 8]。さらに、これらのプロテアーゼ発現誘導が傷害後2 から8 日目にピークを迎える。これは、脱髄が開始される時期と一致する。この事実はこれらのプロテアーゼが脱髄に関連した機能を持つ可能性を示唆する。

そこで、今回の研究は脊髄損傷や多発性硬化症のモデルであるexperimental

allergic encephalitis (EAE)によりニューロプシンとプロテアーゼMがどの様に発現変化し、これらの基質と想定される細胞外基質の変化および神経軸索の再生との関連を検討した。

研究組織

研究代表者：吉　田　成　孝（旭川医科大学医学部教授）

研究分担者：塩　坂　貞　夫（奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科教授）

交付決定額（配分額）　（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成１３年度	1,500	0	1,500
平成１４年度	1,000	0	1,000
総計	2,500	0	2,500

研究発表

（1）学会誌等

1. Matsumoto-Miyai, K. et al., Decidualization induces the expression and activation of an extracellular protease neuropsin in mouse uterus. Biol. Reprod, 67, 1414-1418, 2002

2. Yoshida, S., Extracellular environment and extracellular serine proteases in the central nervous system Connective Tissue, 35, 37-43, 2003

3. Shimizu-Okabe, C., L-isoform but not S-isoform of myelin associated glycoprotein promotes neurite outgrowth of mouse cerebellar neurons. Neurosci. Lett. 311, 203-205, 2001

4. Kuwae, K., Epidermal expression of serine protease, neuropsin (KLK8) in normal and pathologic skin Molecular Pathology 55, 235-241, 2002

（2）口頭発表

1. Yoshida, S., Terayama, R., He, XP, Otsuji, M., Yoshida K, Tsuchiya Y, Shiosaka S, Oligodendrocytes express serine proteases after injury to the CNS. 32th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Orlando, 2002. 11.

2. 吉田成孝、寺山隆司、中枢神経損傷後のプロテアーゼと細胞接着因子の発現、第１０７回日本解剖学会全国学術集会、浜松、2002　3/29-31.

3. 寺山隆司、吉田成孝、マウス脊髄損傷後のニューロプシンおよびプロテアーゼ M の発現の変化、第２５回神経科学大会, 横浜, 2002 7/7-9.

研究の背景及び目的

外傷などによる脊髄損傷はその後の機能的回復が多く望めないため、医学的、社会的にも大きな問題となっている。これは、切断された軸索の再生は中枢神経においてはほとんど生じないという事実によるところが大きい。実際、教科書的にも中枢神経の軸索伸長はないとされてきた。このdogma は近年における様々な神経栄養因子の解析等により必ずしも事実でないことが明らかとなってきた。しかし、大きな障害の一つとなっているのがミエリンに含まれる軸索伸長阻害因子の存在である。これらとして、nogo やMAG などの蛋白性の因子が同定されてきている。ミエリン関連糖蛋白(MAG)はオリゴデンドロサイトが発現するミエリン蛋白質で最初に分子同定された軸索伸長阻害因子である。この蛋白質は軸索のミエリン化の際に互いを認識しあうのに重要な分子であるが、生後の神経細胞の軸索伸長阻害を行うことが明らかとなってきている。nogoは1999年に同定された因子で、オリゴデンドロサイトが発現する因子であるが、非障害時のはたらきなどまだ不明な点は多い。さらに、中枢神経傷害後に損傷部位に集まるアストロサイト等から分泌される様々なプロテオグリカンにも軸索伸長を高度に阻害することがわかった。オリゴデンドロサイトの一部からも一種のプロテオグリカンが分泌されることも明らかとなっている。すなわち、ミエリンタンパク質の分解は軸索再生において非常に重要なステップである。オリゴデンドロサイトは中枢神経系でのミエリン形成細胞であるが、中枢神経損傷時のミエリン分解にオリゴデンドロサイトがどのように関わっているかはこれまで明らかでなかった。私たちは、これまでオリゴデンドロサイトが中枢神経障害時に２種のセリンプロテアーゼ、ニューロプシンとプロテアーゼMを新たに発現することを見いだした[2, 8)]。さらに、これらのプロテアーゼ発現誘導が傷害後2 から8 日目にピークを迎える。これは、脱髄が開始される時期と一致する。この事実はこれらのプロテアーゼが脱髄に関連した機能を持つ可能性を示唆する。

ニューロプシンは海馬を始めとする大脳辺縁系に特異的に発現するプロテア

ーゼである。我々はニューロプシンの遺伝子クローニング、神経可塑性に関連する生理的作用、蛋白分解酵素としての生化学的性質に関して様々な知見を見いだしてきた[1,5,7]。ニューロプシンは生後の海馬の神経細胞に発現するカリクレイン型のセリンプロテアーゼで比較的限局した基質特異性を持つ。このプロテアーゼは神経可塑性に関するはたらきには海馬における長期増強への促進効果が電気生理学的に認められた[4]。また、ノックアウト動物の解析により海馬シナプス形成にも大きな役割を果たしていることが明らかとなった[3]。ところが神経損傷後においては通常発現が見られない神経線維束においてニューロプシンが発現していることが明らかとなった[8]。神経線維束のニューロプシンは損傷後１日から１４日にかけてオリゴデンドロサイトが発現していた。さらに、ニューロプシンと近縁の遺伝子産物であるプロテアーゼMがオリゴデンドロサイトに発現していることが明らかとなった[6,9]。オリゴデンドロサイトに関してはこれらのプロテアーゼを発現しているのはその一部のサブクラスに限られている。しかしそのサブクラスの特徴は全く明らかとなっていない。さらに、これらのプロテアーゼは細胞外に分泌され、細胞外の基質を分解することによりその機能を果たしていると考えられているが、現在のところその基質については不明な点が多い。

また、オリゴデンドロサイトが中枢神経障害時にどの様な機能を果たしているのかについての検討も十分になされていない。

そこで、今回の研究は脊髄損傷や多発性硬化症のモデルであるexperimental allergic encephalitis (EAE)によりニューロプシンとプロテアーゼMがどの様に発現変化し、これらの基質と想定される細胞外基質の変化および神経軸索の再生との関連を検討した。

材料と方法

動物と手術

本研究での動物実験は本学動物実験委員会により承認された。

脊髄損傷モデル作成

BALB/cマウス10週齢から12週齢にethylcarbonate（1.5g / kg b.w.）の腹腔内投与で麻酔後、脳定位固定装置で固定した。Bregmaから後方に2.5 mm、側方1.7 mm、背腹に2.5 mmの位置にハミルトンシリンジを用いて、5 nM kainic acid, その反対側に0.1 M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4), をそれぞれ0.3 lずつ30秒以上かけて注入した。脊髄損傷モデル作成のために、マウスを麻酔後に椎弓切除を行い脊髄のL4レベルをナイフにて半切した。手術後経時的に灌流固定し脳または脊髄を摘出した。

多発性硬化症モデルマウス作成

マウスの足底に100 l PBS に溶解した200 g の mouse oligodendrocyte glycoprotein (MOG) の部分シーケンス35-55（アミノ酸配列MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK)と100 l complete Freund adjuvant (CFA)と共に皮下注を行った。また、同日と２日後に200 ngの百日咳毒素を腹腔内投与を行った。マウスの臨床症状を３５日後まで観察を行い、６段階のスコアとして記録した。０は臨床症状なし；１は尾が垂れているか歩行異常がある；２は後肢の部分麻痺；３は後肢の部分麻痺か前肢の完全麻痺；４は後肢の完全麻痺と前肢の部分麻痺；５は四肢の完全麻痺もしくは死亡

灌流固定と切片作成

Ethyl carbonateの腹腔内投与（1.5g / kg b.w.）の麻酔下で心臓から0.85% NaCl、続いて４％ paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4)で潅流し、脳または脊髄を摘出した。脳及び脊髄は同じ固定液で一晩後固定し、さらに30% sucrose in 0.1 M PBに４℃で浸漬し、置換後ただちにドライアイスで凍結し、クリオスタットにて厚さ30 mの前額断切片を作成した。また電子顕微鏡観察用には、４％ paraformaldehyde, 0.05% glutaraldehyde in PBで灌流し、４％ paraformaldehyde / 0.1 M PBに４℃で一晩浸漬し、ビブラトームを用いて厚さ50 μmの前額断切片を作成した。

In situ hybridization

ニューロプ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、制限酵素処理によって開環ざせたDNA鎖を鋳型とし、DIG-RNA labelling mixを用いたin vitro transcriptionによって、DIG標識RNAのラベリングを行った。切片を室温で乾燥後、室温で20分間、4% formaldehyde / 0.1 M PB (pH 7.4)で後固定し、その後、protease K処理およびアセチル化処理した。続いて、切片を脱水および脱脂処理した。Hybridization bufferにて1時間prehybridizationさせた後、DIG標識プローブをhybridization bufferに混合し、切片にhybridizationを行った。Hybridization終了後、high stringency solution (50% formamide、2×SSC)に57℃で30分間洗浄後、RNase A酵素処理を行った。Blocking後、alkaline phosphatase (AP)-anti digoxigenin抗体にて抗体反応を行った。抗体反応後、AP発色基質 (NBT、BCIP)にて発色後反応を停止させた。50% glycerolで封入した後、光学顕微鏡下による検鏡及び写真撮影を行った。

免疫組織化学

一次抗体として抗ニューロプシン抗体(B5)、抗プロテアーゼM血清（北海道大学、高橋孝行教授より供与 (Matsui et al., 2000))、抗L1抗体を用いた。凍結切片を0.1 M PBで洗浄し、5% bovine serum albumin (BSA)/PBSで室温１時間ブロッキングを行い、一次抗体を5% BSA / PBSで1000倍希釈し、４℃で１６―２０時間反応させた。二次抗体として、biotynilated anti rabbit IgGを5% BSA / PBSで1000倍希釈し、４℃で１６－２０時間反応させた。ABC試薬 (Vectorstein ABC kit, Vector Labs) で室温２時間反応させた。PBSでの洗浄後、50 mM Tris Cl (pH 7.6)で浸漬し、可視化するために、0.05% diaminobenzidine (DAB), 0.03% H2O2, 0.4% ammonium nickel in 50 mM Tris-HCl (pH 7.6)で５分間反応ざせた。切片を乾燥させエタノール脱水しEntellanで封入し、鏡検した。

前包埋法

ビブラトーム切片を0.1 M PBで洗浄し、30% sucrose in 0.1 M PBに浸漬し、液体窒素で凍結、解凍後、0.1 M PBで洗浄した。上記のように免疫反応後エポン包埋した。また二次抗体として、1 nm colloidal gold conjugated を用い、5% BSA / PBSで400倍希釈し、室温で1-4時間反応ざせ、銀増感液（IntensEM, Amersham）を用いて22℃で6-8分間反応ざせ、超純水で洗浄後エポン包埋した。ウルトラミクロトームで1 mのsemi-thin切片と75 nmの超薄切片を作成した。semi-thin切片は、トルイジンブルーで染色し、水洗・乾燥して鏡検した。超薄切片は、formvarでコートした銅グリッド（日新ＥＭ）にのせ、2% uranyl acetateおよびlead citrateで染色し、透過型電子顕微鏡で観察した。

後包埋法

ビブラトーム切片を0.1 M PBで洗浄し、エタノール系列で脱水後、LR White に１時間浸漬し、平板包埋後で２日間重合した。ウルトラミクロトームで80 nmの超薄切片を作成しformvarでコートしたニッケルグリッド（日新ＥＭ）にのせた。PBSで洗浄後、5% BSA / PBSで室温１時間ブロッキングを行い、一次抗体を1000倍希釈し、４℃で１６－２０時間反応させた。続いてPBSで洗浄し、二次抗体として10 nm colloidal gold conjugated (Amersham) を用い、5% BSA / PBSで100倍希釈し、室温で１時間反応ざせた後、PBSで洗浄、1% glutaraldehyde / PBSで１０分後固定した。超純水で洗浄後、1% glutaraldehyde in PBSで固定、2% uranyl acetateおよびlead citrateで染色し、透過型電子顕微鏡で観察した。

ニューロプシンの酵素活性

マウス脳脊髄をホモジネートし、NortonとPoduslo の方法に従いショ糖濃度勾配法によりミエリン分画を粗精製した(Norton and Poduslo, 1973)。ミエリン分画を含むペレットに10 mM Tris HCl (pH 7.0)を加え超音波処理を行った。この溶液にリコンビナントニューロプシンを加え、2-8時間反応させた。これを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

１．脊髄損傷によるプロテアーゼmRNAの発現変化

無処置マウスではニューロプ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プシンmRNA発現細胞は認められなかった（図１Ａ）。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（図２Ａ）。これらの事実より、無処置のマウスではニューロプシンは神経細胞の一部に、プロテアーゼＭはオリゴデンドロサイトに発現していることが明らかとなった。

脊髄損傷後のマウスでニューロプシンmRNAの発現は白質に多く認められた（図１Ｂ－Ｃ）。ここは無処置マウスでは発現が全く認められなかった部位である。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（図２Ｂ－Ｃ）。両プロテアーゼmRNA発現細胞共に、損傷後１日から発現上昇が見られ、４日後をピークとして１４日後にはほとんど無処置の発現レベルにまで減少した（図３）。

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

抗プロテアーゼＭ抗体を用いて免疫組織化学法による染色を行い、光学顕微鏡および電子顕微鏡での観察を行った。

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。下位脳とは異なり突起には強い免疫陽性構造は観察されなかった。またこれらのプロテアーゼＭタンパク質発現パターンは、プロテアーゼＭ mRNAの発現パターンと一致していた。

この発現細胞を同定するために様々な細胞マーカーとの２重染色を行った。

この結果、神経細胞のマーカーであるMAP2との共存は観察されなかった（data not shown）。アストロサイトのマーカーであるGFAPとの共存も観察されなかった（図４Ａ－Ｃ）。成熟したオリゴデンドロサイトのマーカーであるCNPaseとはほとんどのプロテアーゼＭ陽性細胞で共存が観察された（図４Ｄ－Ｆ）。この結果からプロテアーゼＭは成熟オリゴデンドロサイトに発現することが明らかとなった。

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（図７）。オリゴデンドロサイトは、低電子密度型（LO）、中電子密度型（MO）および高電子密度型（DO）に分類される。LO型オリゴデンドロサイトは大きな細胞で核は大きく、核染色質塊は少なく、胞体には遊離リボソームが散在し、粗面小胞体やGolgi装置の発達が悪い。MO型オリゴデンドロサイトは低電子密度オリゴデンドロサイトより小ざく、染色質塊は核の周辺部によくみられる。DO型オリゴデンドロサイトは細胞体も核も小ざく、また粗面小胞体やゴルジ装置はよく発達している。この中で、プロテアーゼＭ陽性のオリゴデンドロサイトはLO型（図６Ａ）およびMO型（図６Ｂ）であり、DO型で免疫陽性であるものはほとんど認めなかった（図６Ｃ）。金コロイド標識した二次抗体を用いた検討により、ミエリンに高い陽性反応が観察された。その反応は、ミエリンの圧密部位、弛緩部位を問わずミエリン鞘全体に広範にみとめられた。また弛緩部位により高い反応性がみられた。

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

上位脳と下位脳でもプロテアーゼＭ発現様式の違いがオリゴデンドロサイトの微細構造の差異によるものであるかを検討した。

トルイジンブルー染色方法でオリゴデンドロサイトは３種類の染色パターンを示し、それぞれの電子密度の違いから上記のLO、MO、DOに分類した。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

上位脳および下位脳でプロテアーゼＭタンパク質のミエリンでの染色性が異

なっていた。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、これは光学顕微鏡による観察で下位脳では突起により高いプロテアーゼM陽性反応がみられた結果と関連があると考えられる。

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

中枢神経系障害時におけるプロテアーゼMの機能を検討するために、海馬内カイニン酸投与4日後のマウス脳を用いてプロテアーゼMタンパク質の免疫組織化学を行い、光学顕微鏡および電子顕微鏡による観察を行った。
チオニン染色によって、カイニン酸注入側では海馬ＣＡ１領域の錐体細胞が細胞死を起こしているのを確認した。脳梁と海馬白板においてコントロール側（PBS注入）より陽性細胞数が増えていた。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陽性反応が認められた。これは、カイニン酸投与後、海馬白板においてプロテアーゼM mRNAの発現誘導がみられることに一致する。また1 μmのsemi-thin切片を作成しトルイジンブルー染色したところ、滝馬白板に明調の核をもった細胞が集合しているのがみられ，これは無処置マウス脳およびコントロール側ではみられないものであった。さらに、脊髄損傷によってもプロテアーゼM発現が増強した。陽性細胞はCNPase陰性のものも観察され、損傷時には成熟オリゴデンドロサイト以外の細胞も発現していることが明らかとなった（図９）。

前包埋法による免疫電子顕微鏡観察において、光学顕微鏡観察でみられた海馬白阪における細胞集合はLOのオリゴデンドロサイトであり、プロテアーゼM陽性であることが認められた。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（図８）。また軸索が変性しミエリン鞘との接触がなくなったものもあり、それを取り巻いていたミエリン鞘にも陽性反応が認められた。後包埋法による免疫標識を行った結果、

プロテアーゼM陽性反応はミエリン鞘およびオリゴデンドロサイトの細胞質にみられた。

5．ニューロプシンの基質

ミエリン分画の蛋白質をリコンビナントニューロプ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、ニューロプシンによりMBP蛋白質の減少が認められた（図１０）。これにより、ニューロプシンはMBPを切断することができることが明らかとなった。

6．Ｌ１発現の変化

脊髄損傷により脊髄白質の前索と側索においてＬ１免疫陽性構造の増加が観察された。また、Ｌ１mRNA発現細胞の増加も観察された。

7．EAEの進行とプロテアーゼ発現

EAEはMOGの皮下注後３週から４週間後にスコアがピークに達した（図１１）。この時期の脊髄におけるプロテアーゼmRNAの発現を炎症部位と比較検討を行った。EAE発症マウスでは軟膜からの炎症性細胞が浸潤しているのが観察された（図１２）。ニューロプシンmRNA発現細胞はこの炎症部位の周辺に多く存在していた。プロテアーゼM mRNA発現細胞も炎症細胞浸潤部位の周辺に多く存在しており、ニューロプシンmRNA発現細胞よりも数が多かった（図１３、１４）。また、ニューロプシンノックアウトマウスでEAEの進行を観察したところ、重症化が遅延する傾向にあった。

考察と今後の展望

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。これらの結果より、ニューロプシンやプロテアーゼMなどのプロテアーゼが中枢神経損傷時に発現してミエリン蛋白質等を分解することにより損傷後の修復、再生の一連の過程に関連していることを示している。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る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。

参考文献

1) Chen ZL, Yoshida S, Kato K, Momota Y, Suzuki J, Tanaka T, Ito J, Nishino H, Aimoto S, Kiyama H, Shiosaka S (1995) Expression and activity-dependent changes of a novel limbic-serine protease gene in the hippocampus. J Neurosci 15: 5088-5097.

2) He XP, Shiosaka S, Yoshida S (2001) Expression of neuropsin in oligodendrocytes after injury to the CNS. Neurosci Res 39: 455-462.

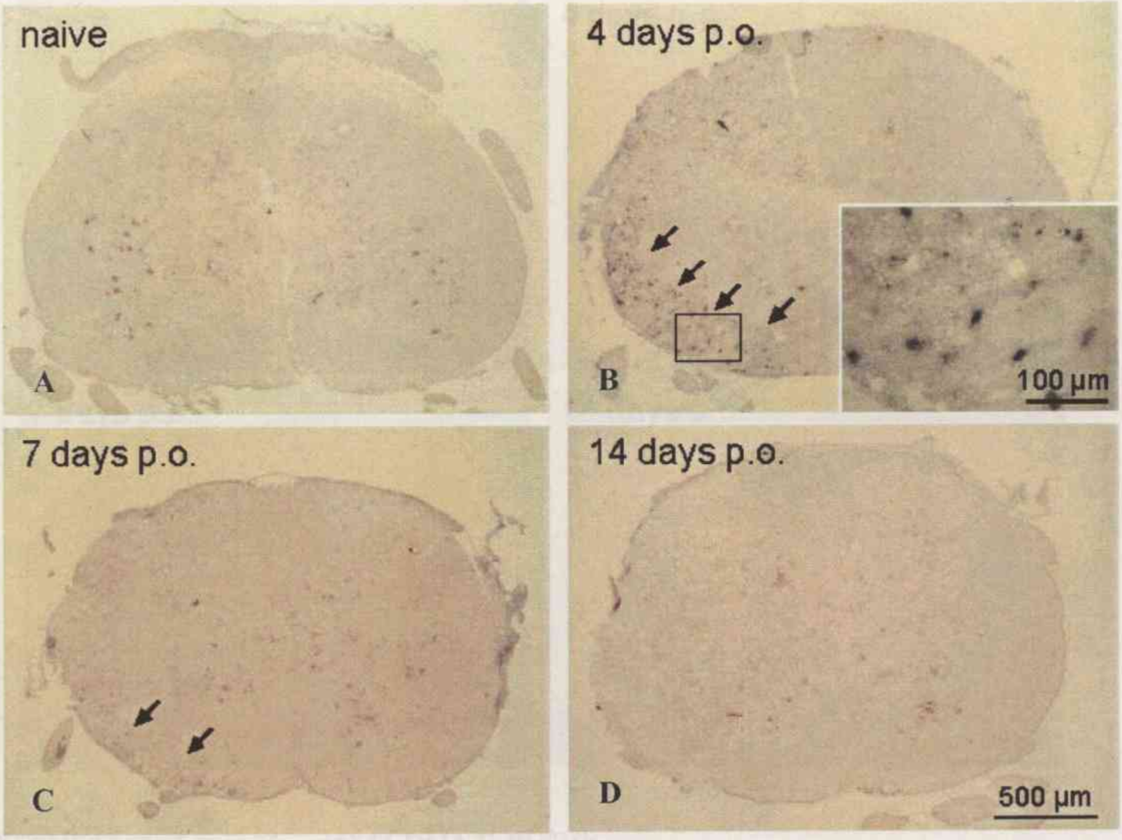
3) Hirata A, Yoshida S, Inoue N, Matsumoto-Miyai K, Ninomiya A, Taniguchi M, Matsuyama T, Kato K, Iizasa H, Kataoka Y, Yoshida N, Shiosaka S (2001) Abnormalities of synapses and neurons in the hippocampus of neuropsin-deficient mice. Mol Cell Neurosci 17: 600-610.

4) Komai S, Matsuyama T, Matsumoto K, Kato K, Kobayashi M, Imamura K, Yoshida S, Ugawa S, Shiosaka S (2000) Neuropsin regulates an early phase of schaffer-collateral long-term potentiation in the murine hippocampus. Eur J Neurosci 12: 1479-1486.

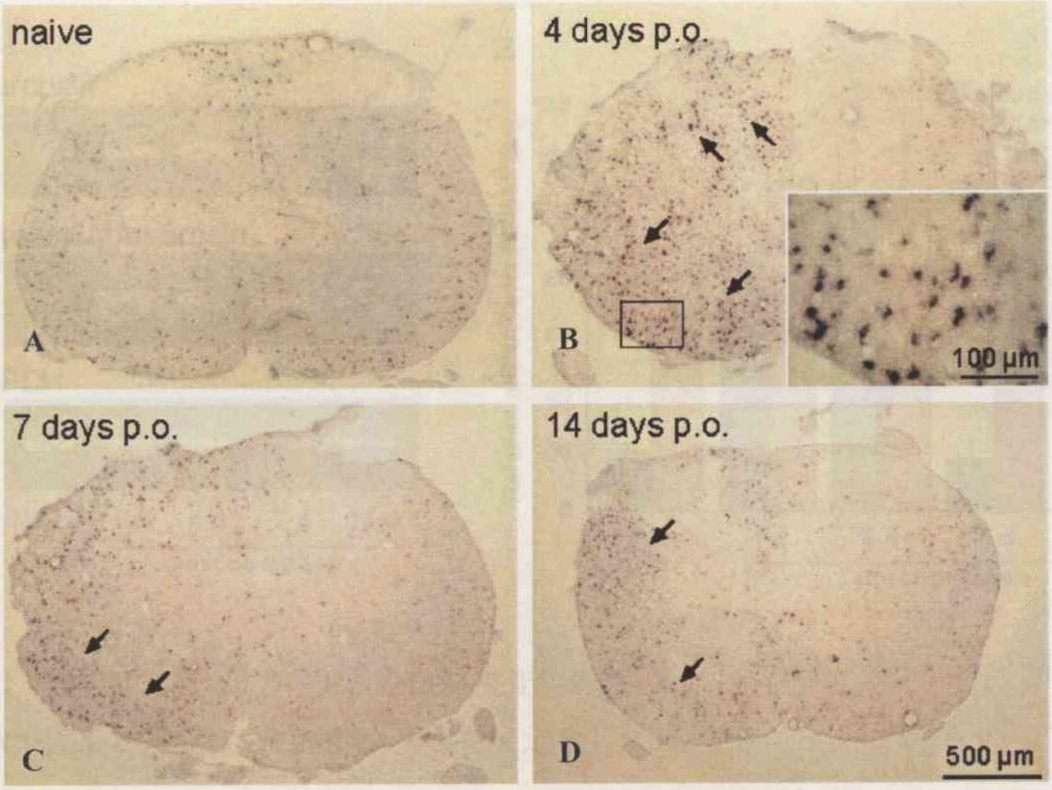
5) Momota Y, Yoshida S, Ito J, Shibata M, Kato K, Sakurai K, Matsumoto K, Shiosaka S (1998) Blockade of neuropsin, a serine protease, ameliorates kindling epilepsy. Eur J Neurosci 10: 760-764.

6) Scarisbrick IA, Towner MD, Isackson PJ (1997) Nervous system-specific expression of a novel serine protease: regulation in the adult rat spinal cord by excitotoxic injury. J Neurosci 17: 8156-8168.

7) Shimizu C, Yoshida S, Shibata M, Kato K, Momota Y, Matsumoto K, Shiosaka T, Midorikawa R, Kamachi T, Kawabe A, Shiosaka S (1998)



1　脊髄損傷後のニューロプシンmRNA発現変化
傷後４日と７日の前索と側索にmRNA発現細胞がみられる。



2　脊髄損傷後のプロテアーゼMmRNA発現変化

傷後４日から１４日にかけてmRNA発現細胞がみられる。

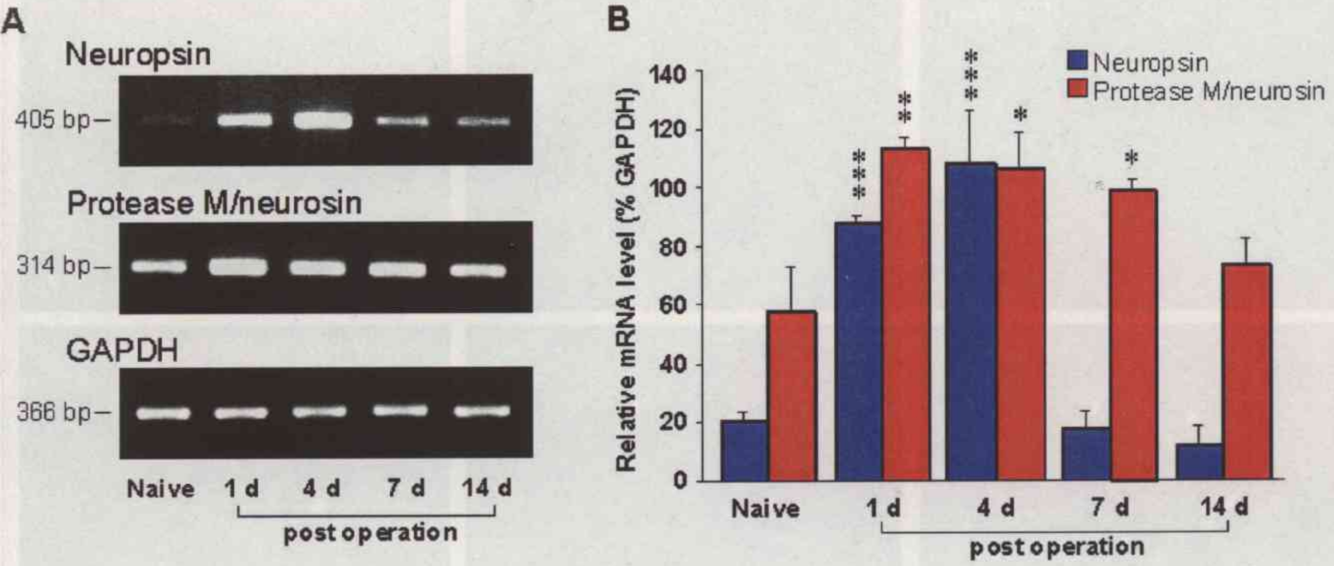


図３　脊髄でのプロテアーゼmRNA発現変化

RT-PCRにより、脊髄でのmRNA発現を反定量した。

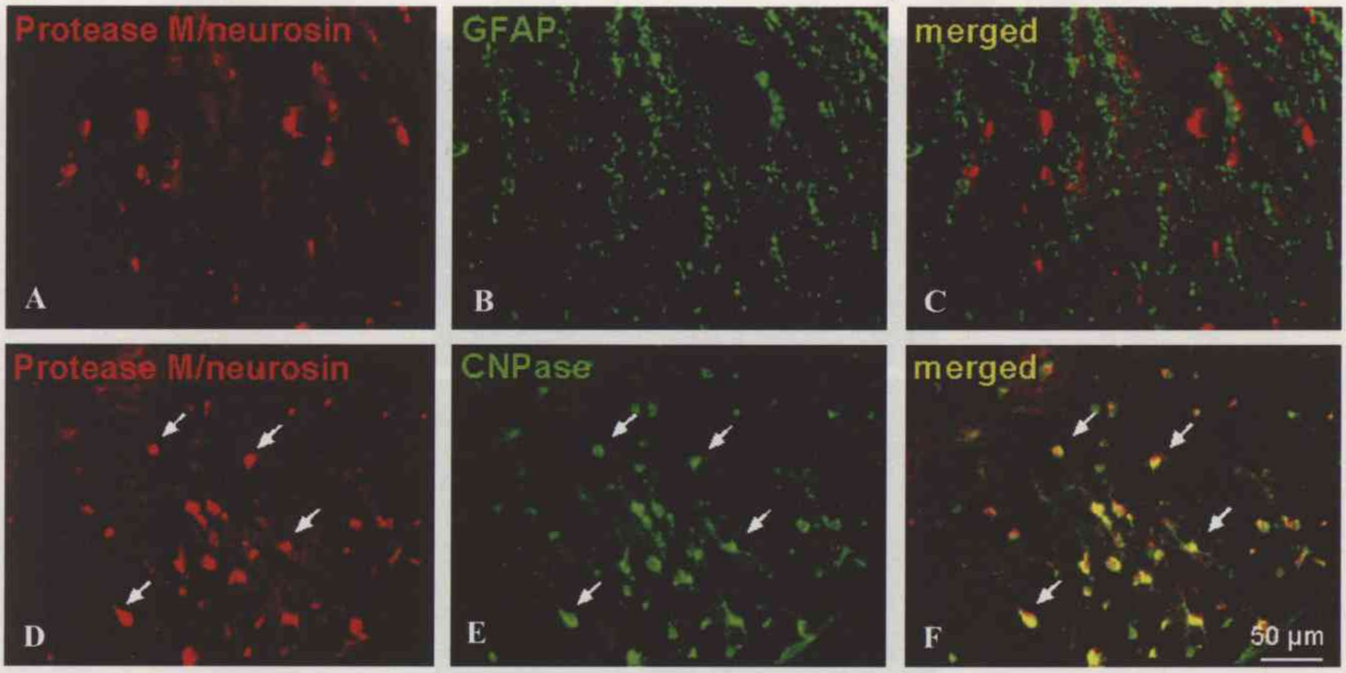


図4　非損傷時の脊髄でのプロテアーゼM発現細胞

オリゴデンドロサイトマーカーのCNPaseと共存する。

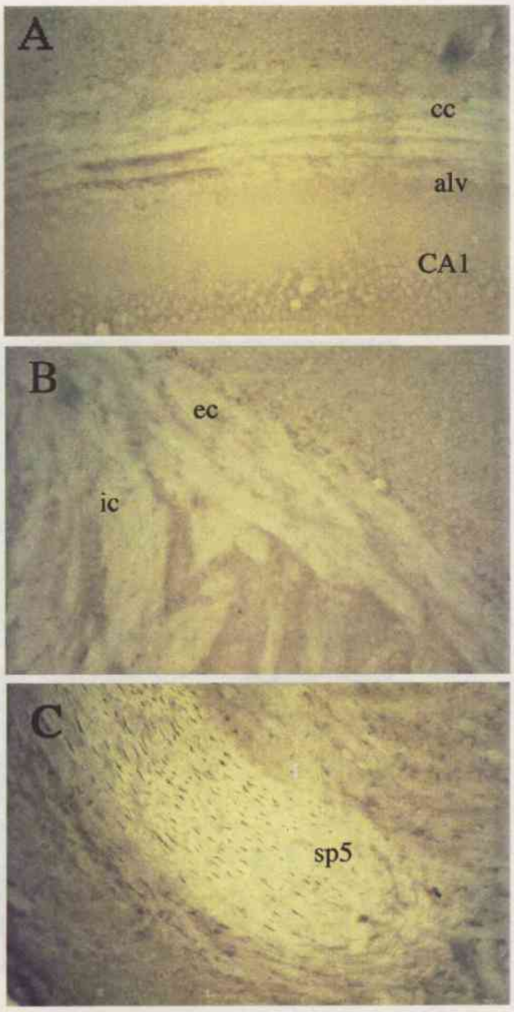


図5　プロテアーゼMタンパク質の発現

、脳梁；B、外包と内包；C、三叉神経脊髄路。

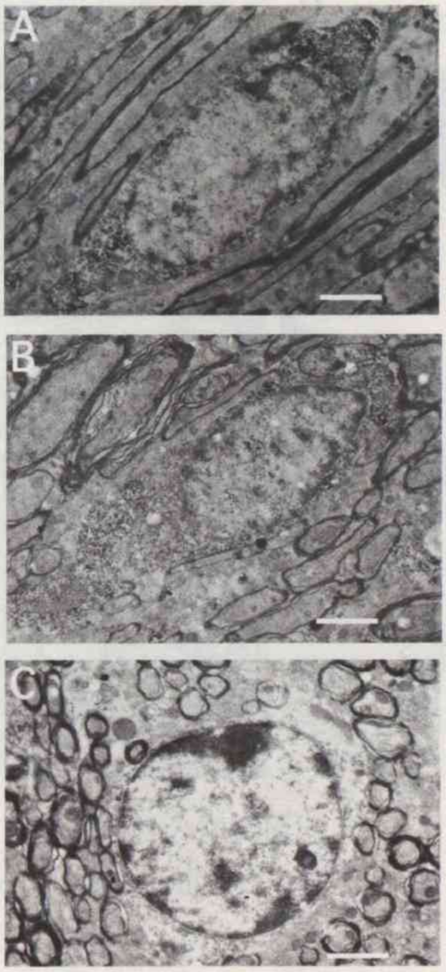


図6　オリゴデンドロサイト形態の相違とプロテアーゼM発現

A、プロテアーゼM陽性のLO。B、プロテアーゼM陽性のMO。C、プロテアーゼM陰性のDO

scale bar, 2 μm。

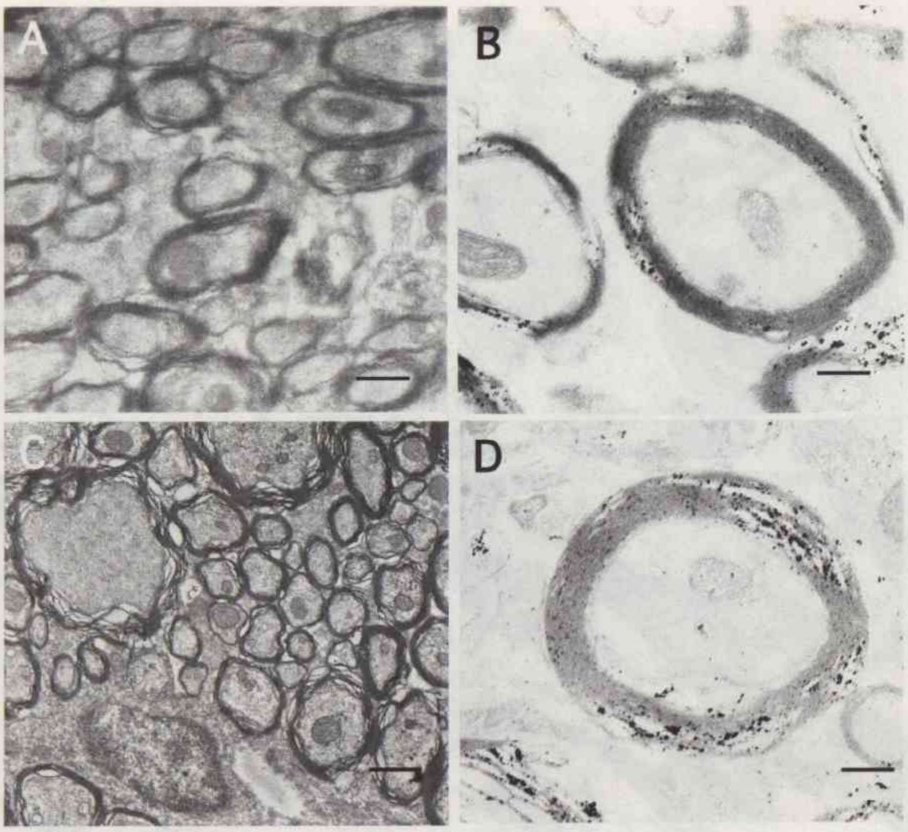


図7　プロテアーゼM陽性の微細構造

scale bars, 1.5 μm (A, C); 300 nm (B, D).

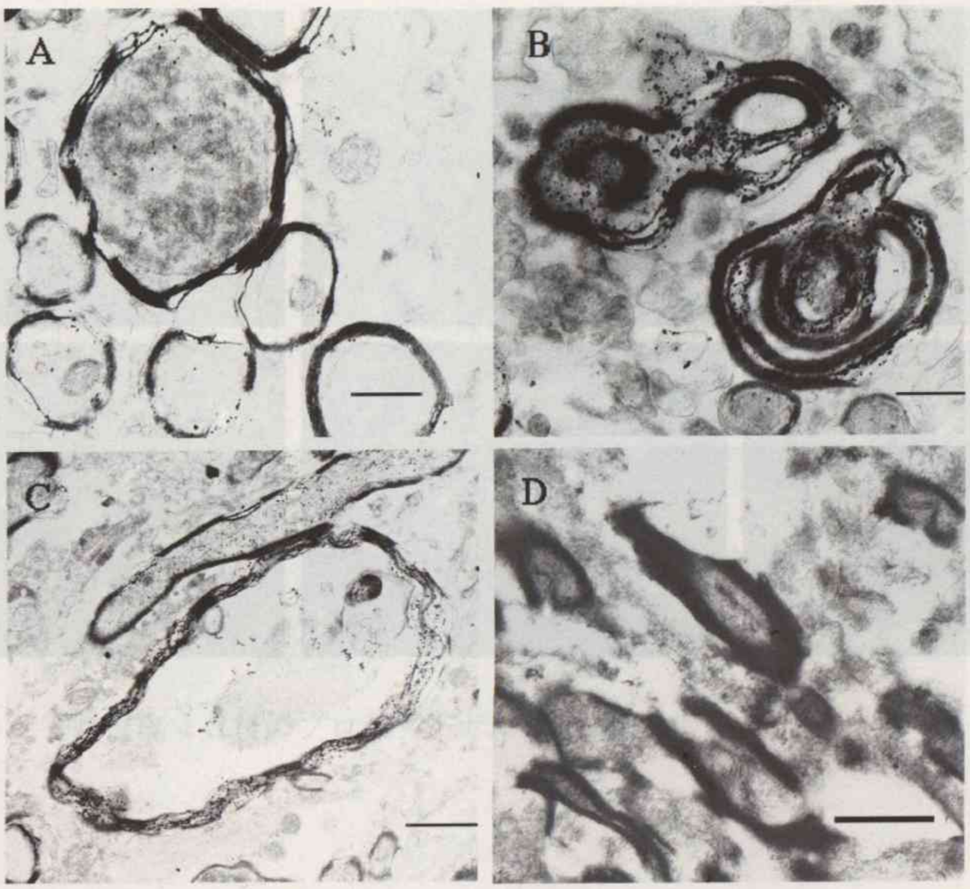


図８　脳損傷後のプロテアーゼM陽性の微細構造

scale bars, 500 nm (A, B, D); 1 μm (C).

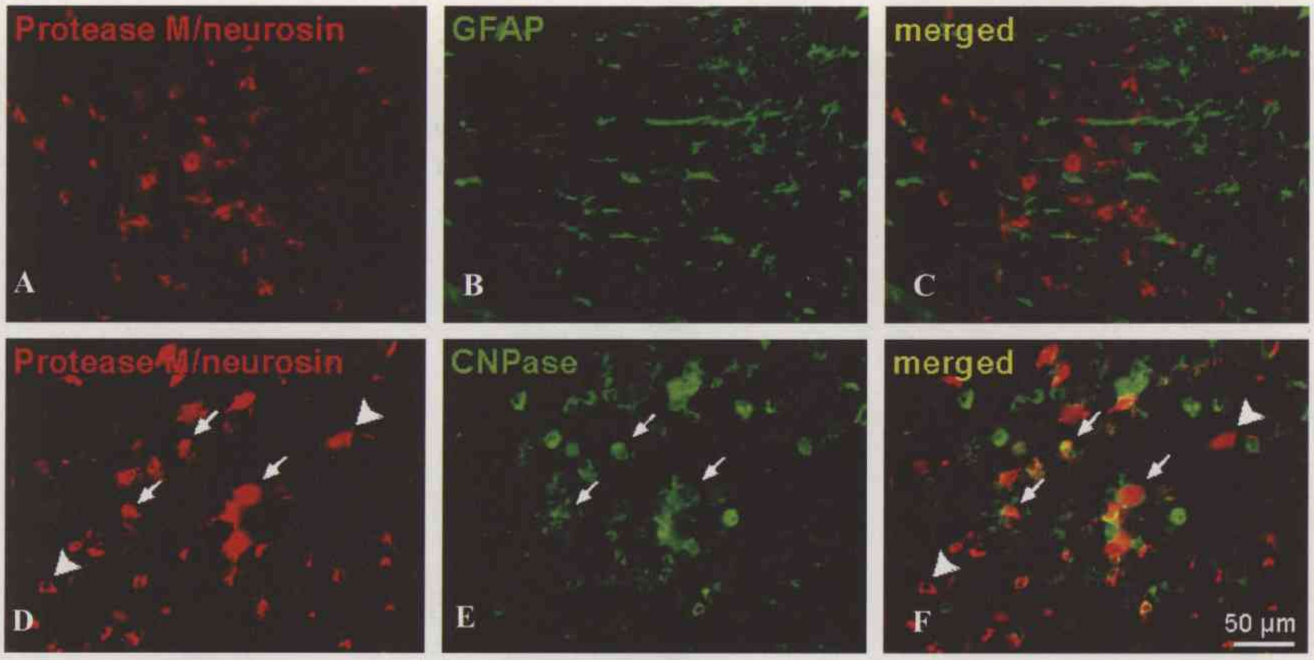


図９　脊髄損傷４日後のプロテアーゼM陽性細胞

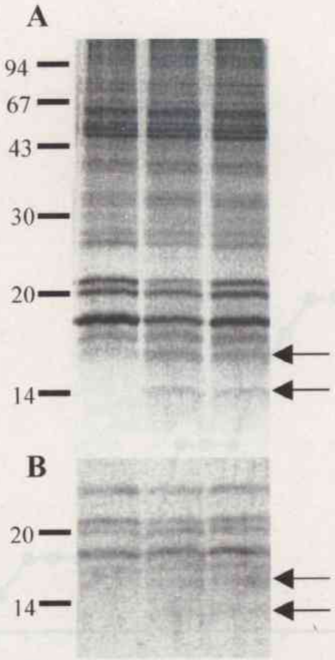


図１０　ニューロプシンによるMBPの切断

A、クマシーブルー染色；B、抗MBP抗体を用いたウエスタンブロット.

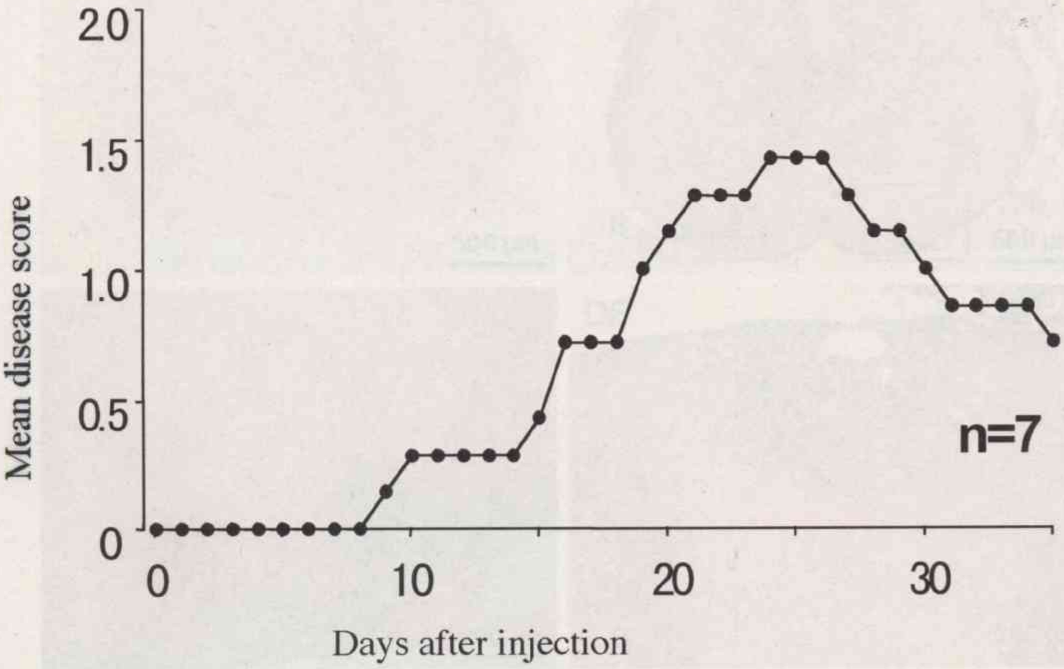

2.0
1.5
1.0
0.5
0
Mean disease score
0
10
20
30
Days after injection
n=7

図１１　EAEの進行

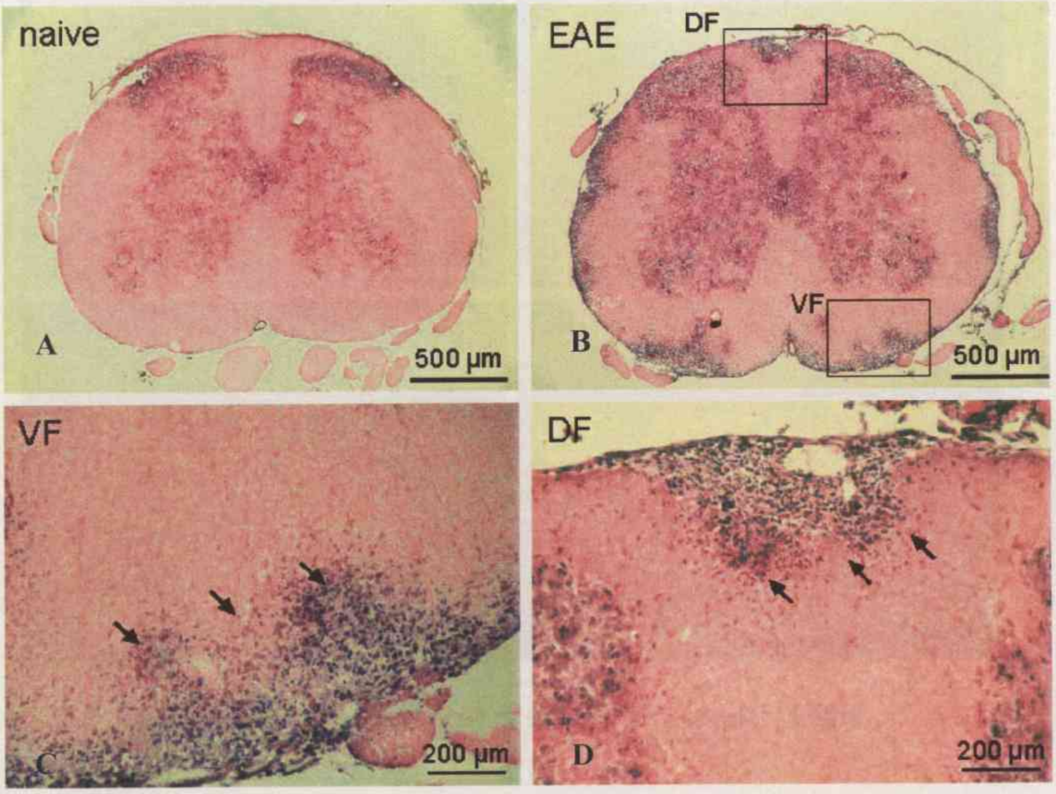


図１２　EAEでの細胞浸潤

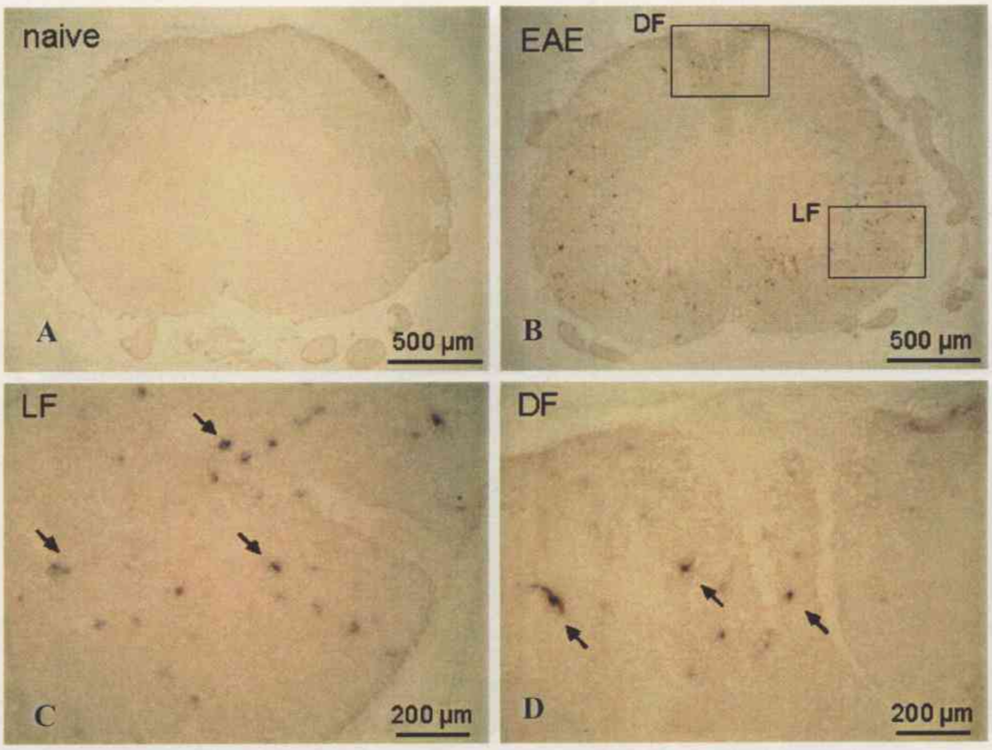


図１３　EAEによる脱髄領域でのニューロプシンmRNA発現

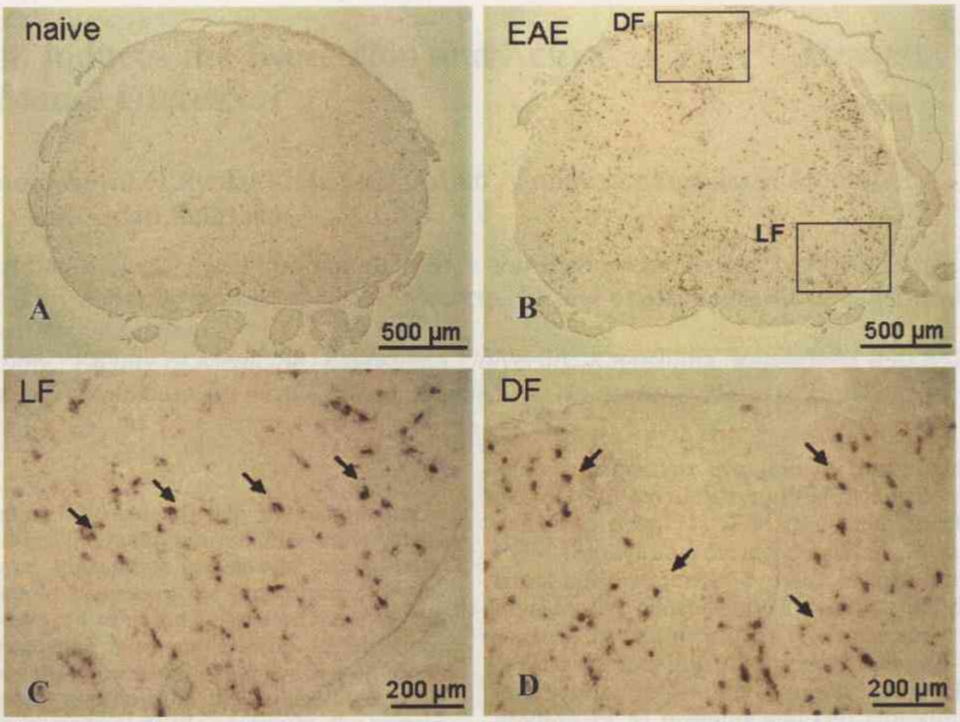


図１４　EAEによる脱髄領域でのプロテアーゼMmRNA発現