

カリクレインのラット神経幹細胞増殖促進作用

木付和幸,* 大久保隆一, 岩館寛大, 貞 啓介

Growth-stimulating Effect of Kallikrein on Rat Neural Stem Cells

Kazuyuki KIZUKI,* Ryuichi OKUBO, Hiromoto IWADATE, and Keisuke SADA

Department of Materials Science and Environmental Engineering, Faculty of Science and Engineering,
Tokyo University of Science, Yamaguchi, 1-1-1 Daigaku-dori,
Sanyou-onoda City, Yamaguchi 756-0884, Japan

(Received April 21, 2006; Accepted July 6, 2006; Published online August 3, 2006)

Tissue kallikrein is expressed in many species and is widely distributed throughout the body, including the brain. In general, this protease is well known to release the vasoactive peptide, kinin, from kininogen. We report here that kallikrein has a prominent growth-stimulating effect on neural stem cells prepared from the brains of prenatal rats. This growth-stimulating effect was suppressed by antiserum against rat tissue kallikrein. Since bradykinin B₂-receptor antagonist, Hoe140, did not suppress the growth-stimulating effect, kallikrein-mediated kinin release does not appear to be involved in this effect. Thus, our data suggest a new physiological function of kallikrein, the growth of neural stem cells. Such involvement would suggest that kallikrein is not only potentially involved in an important function of brain development, but also available for studies on regenerative medicine for neurons.

Key words—kallikrein; brain; neural stem cell; neuron; proliferation; cerebrum

緒 言

組織性カリクレイン (EC.3.4.21.35) は、キニノーゲンに対する基質特異性が極めて高いキニンを遊離するセリンプロテアーゼであり、これまでに基礎、臨床両分野からカリクレイン—キニン系に関する多くの研究があるが、組織性カリクレインの機能に関しては、確証のあるものは少なく、なお不明な部分が多い。^{1,2)} カリクレインは、従来知られていた膵臓、腎臓、顎下腺などの組織以外に、種々動物の脳、³⁾ 脳下垂体、⁴⁾ 松果体⁵⁾ など、脳内に発現している。ラット脳に関しては、抗ラットカリクレイン抗体を用いた免疫組織化学的解析で、成熟ラット脳ではカリクレインの発現はグリア細胞には全く認められず、神経細胞にだけ発現していることが分かっている。⁶⁾ 筆者らは、この神経細胞でのカリクレインの機能追究の過程で、カリクレインに強い神経幹細胞増殖促進作用があることを見出したので報告する。

実 験 の 部

1. 実験動物 九動株式会社 (熊本) より購入した Wistar 系妊娠ラットを用いた。
2. カリクレイン 前に筆者らが報告した方法⁴⁾ でラット尿から精製した純品カリクレイン (rat urinary kallikrein, 以下 RUK) を用いた。酵素活性は prolyl-phenylalanyl-arginine-4-methylcoumaryl-7-amide (Pro-Phe-Arg-MCA) (Peptide Institute, Inc., Japan) を用いてカリクレインの作用によって遊離する 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) の蛍光強度を測定し、純品 RUK の比活性 22.1 AU/mg⁴⁾ から RUK 量を算出した (1 AU は、30°C, pH 8.0 で 1 分間に 1 μmol の Pro-Phe-Arg-MCA を水解する酵素量)。
3. 抗 RUK ウサギ血清 筆者らが作製したものの⁴⁾ を用いた。
4. 神経幹細胞の調製 神経幹細胞の調製は Tang らの方法⁷⁾ を一部改変して行った。すなわち、エーテル麻酔した妊娠 17 日目のラットより胎仔を取り出し脳より実体顕微鏡下で線条体を取り出し、Dulbecco's modified Eagle's medium: Nutrient

山口東京理科大学基礎工学部, 物質・環境工学科

*e-mail: kizuki@ed.yama.tus.ac.jp

mixture F-12 Ham 培養液 (DMEM/F12) (Sigma-Aldrich Co., USA) 中でパスツールピペットで 10 回ピペッティングすることにより細胞を分散させた。この細胞懸濁液をセルストレイナー (70 μm) (BD Biosciences Discovery Labowares, USA) でろ過したのち、ろ液を 500 $\times\text{g}$ で 5 分間遠心分離することにより細胞を回収した。脳の 1 個当たりから得た細胞を 5 ml の 20 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF) (PeproTech EC, Ltd., UK), 20 ng/ml epidermal growth factor (EGF) (Sigma-Aldrich Co., USA), N-2 supplement (Invitrogen Co., USA) を含む DMEM/F12 培養液に懸濁させ、浮遊培養で neurosphere を形成させることにより神経幹細胞を得た。

5. カリクレインによる神経幹細胞増殖促進作用
Neurosphere を 500 $\times\text{g}$ で 1 分間遠心分離し、上清を除去したのち、100 U/ml papain, 0.8 mM EDTA を含むハンクス平衡塩類溶液を加え 30°C で 20 分間インキュベートした。500 $\times\text{g}$ で 1 分間遠心分離することにより上清を除去したのち、200 U/ml DNaseI (Worthington Biochemical Co., USA) を含む DMEM/F12 培養液 1 ml を加え、パスツールピペットで 10 回ピペッティングすることにより細胞を分散させた。500 $\times\text{g}$, 1 分間の遠心分離で細胞を集めたのち、20 ng/ml bFGF, 20 ng/ml EGF, N-2 supplement を含む DMEM/F12 培養液に再懸濁し、 8×10^3 cells/well になるようにポリリジン—ラミニンコートした⁸⁾ 96 穴プレートに播いた。24 時間後、培養液に RUK を最終濃度 10, 50, 100 ng/ml になるように添加して培養を続けた。培養液の交換は 3 日毎に RUK の最終濃度が 10, 50, 100 ng/ml になるように RUK を添加した培養液を用いて行った。生細胞数の測定は Cell Counting Kit-8 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan) を用いて行った。また、あらかじめ、RUK 溶液 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を等容量の抗 RUK ウサギ血清と 30°C でインキュベートしたものを RUK の最終濃度が 100 ng/ml になるように添加して同様に培養した。また、対照として同倍率に希釈した抗血清を添加して同様に培養した。抗血清により RUK のキニン遊離活性が阻害されていることは、基質としてラットキニノーゲンを用いて、遊離されるキニンをラット子宮筋収縮により測定する方法⁹⁾により確認した。

6. 蛍光免疫組織染色 ガラスシャーレーにカバーガラスを敷き、ポリリジン—ラミニンコート処理を行った。Neurosphere から DMEM/F12 培養液に再懸濁までは 4 の項記載の方法で行ったのち、 2.2×10^4 cells/ cm^2 になるように細胞を播き、培養した。7 日後、カバーガラスを取り出し、常法により細胞の染色を行った。すなわち、ブアン固定化後、一次抗体として 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈した anti- β III tubulin mouse IgG (Promega Co., USA), anti-nestin mouse IgG (Chemicon International Inc., USA) 各抗体、市販組織染色用希釈 anti-gial fibrillary acidic protein (GFAP) rabbit IgG (Dako, Denmark), 二次抗体として 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen Co., USA), Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG (Invitrogen Co., USA) を用いて細胞の染色を行った。核染色には 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を用いた。

結 果

1. 神経幹細胞標品の蛍光免疫組織染色 本研究で調製したラット神経幹細胞標品は抗 nestin 抗体陽性であり (Fig. 1 (A)), 抗 GFAP, 抗 β III tubulin 抗体では陰性であった (Fig. 1 (B)) ことからグリア細胞、神経細胞の混在は極めて少ないものと考えられる。

2. RUK の神経幹細胞増殖促進作用 RUK 最終濃度 10 ng/ml 以上で RUK 濃度依存的に神経幹細胞の顕著な増殖促進が認められ、100 ng/ml では 11 日目まで対照の 2.6 倍の増殖が認められた (Fig. 2)。このカリクレインの神経幹細胞増殖促進作用の再現性を確認するために、別の 3 匹の妊娠ラットから同様に調製した神経幹細胞を用いて最終濃度 100 ng/ml の RUK で培養 7 日目の細胞数を比較した。その結果、いずれの神経幹細胞を用いても RUK による 3.1—5.5 倍の顕著な増殖促進が認められた (Table 1)。このカリクレインの増殖促進作用は、抗 RUK ウサギ血清により抑制された (Fig. 3)。また、この RUK による神経幹細胞増殖促進作用は、RUK と同時にキニン B₂ 受容体アンタゴニストである D-arginyl-[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸-bradykinin (Hoe140, Peptide Institute, Inc., Japan) を最終濃度 1 μM になるよう培養液に添加して培養した場合、抑制されなかった (data not shown)。

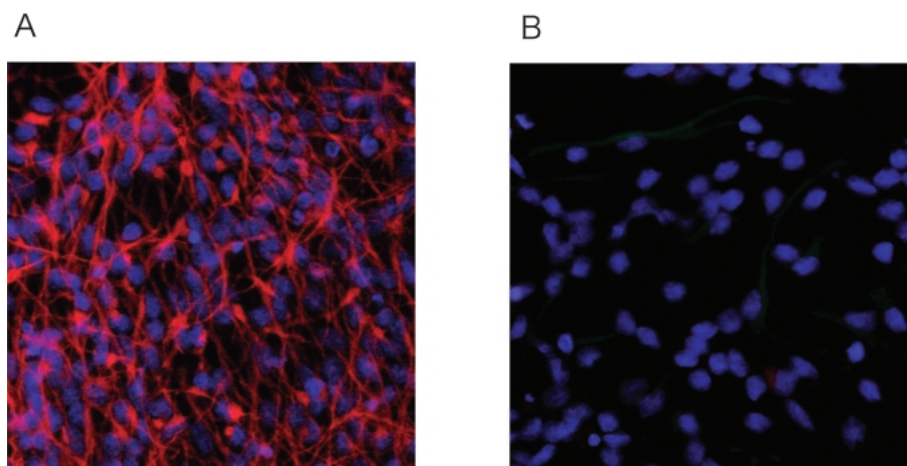


Fig. 1. Immunocytochemical Analysis of Rat Neural Stem Cell Preparations

A: Immunocytochemistry for nestin (red), B: Immunocytochemistry for GFAP (green) and β III tubulin (red). Nuclei were stained with DAPI (blue).

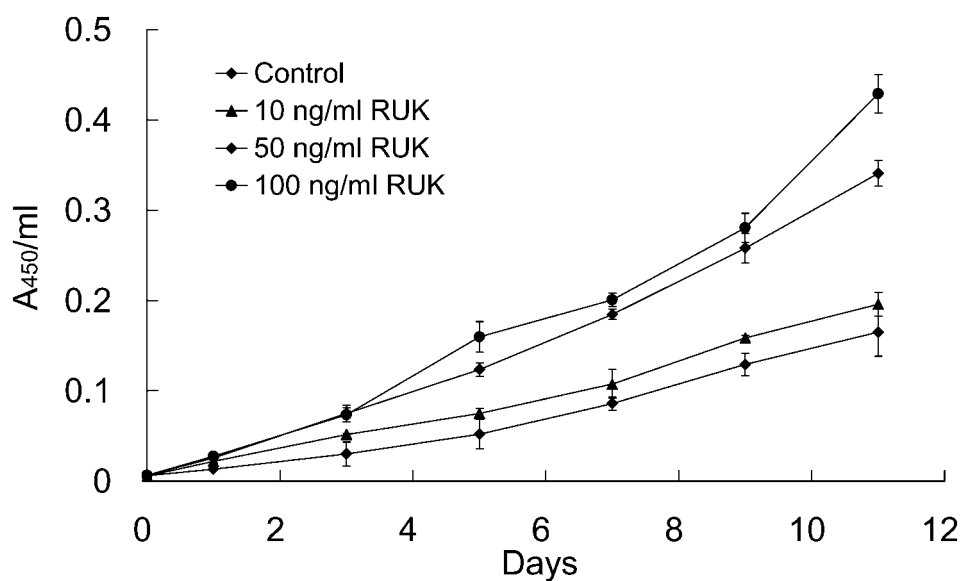


Fig. 2. Growth-stimulating Effect of Kallikrein on the Rat Neural Stem Cells

Each point and the vertical bars are the mean and S. E., respectively ($n=3$).

Table 1. The Reproducibility of the Growth-stimulating Effect of Kallikrein on Rat Neural Stem Cells

Pregnant rat no.	Amounts of cells (A ₄₅₀ /ml)		Ratio +RUK/-RUK
	-RUK	+RUK	
1	0.068 ± 0.012	0.298 ± 0.052	4.4
2	0.129 ± 0.043	0.405 ± 0.038	3.1
3	0.048 ± 0.010	0.262 ± 0.056	5.5

Neural stem cells obtained from three different pregnant rats were cultured in the presence or absence of RUK. Seven days after the first addition of RUK (100 ng/ml at the final concentration) to the cell culture medium, the number of cells were counted using Cell Counting Kit-8. Values are the mean ± S.E. ($n=3$).

考 察

異なる4つの神経幹細胞標品 (Fig. 2, Table 1) を用いて、いずれも顕著な RUK の増殖促進作用が認められたことから、カリクレインが神経幹細胞増殖促進作用を有することが明らかになった。この増殖促進作用メカニズムの詳細は不明であるが、Hoe140によりこの効果が抑制されなかったことから、カリクレインの増殖促進作用には、キニン遊離は関与していないものと思われる。また、抗 RUK ウサギ血清で、この神経幹細胞増殖促進作用が消失

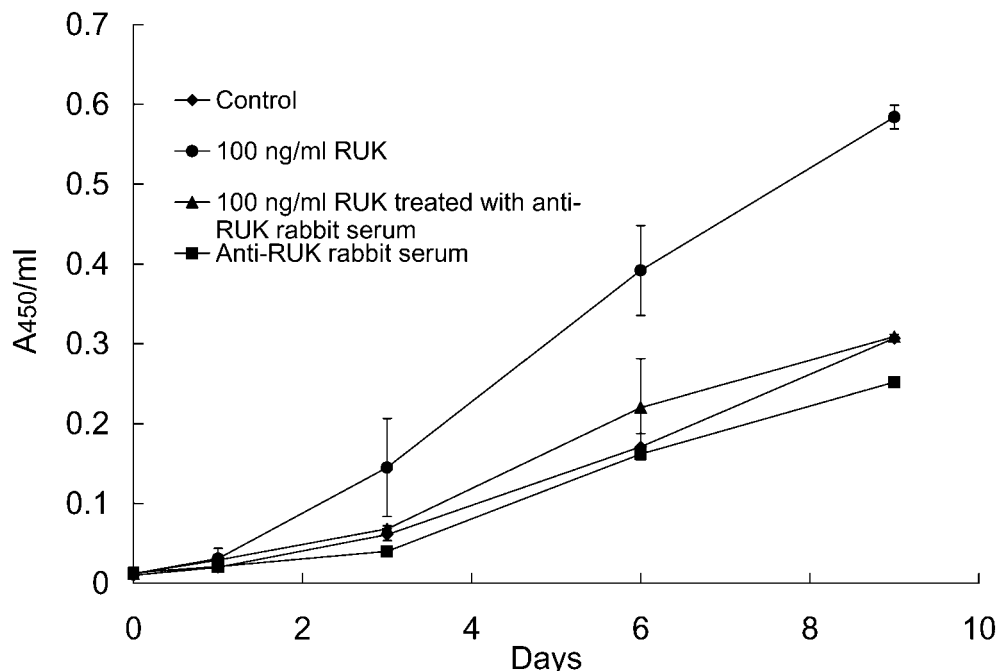


Fig. 3 Suppression of the Growth-stimulating Effect of Kallikrein by Antiserum against Rat Kallikrein
Each point and the vertical bars are the mean and S.E., respectively ($n=3$).

した事、ホモロジー検索でカリクレインと有意な相同性が認められる既知の増殖因子は 31% 相同性のある hepatocyte growth factor activator だけであったことから、この神経幹細胞増殖促進作用は、用いたカリクレイン標品に混在するかもしれない未知の因子の作用ではなく、カリクレイン自身による直接作用、又は、カリクレインが培養液中、また、神経幹細胞膜上のキニノーゲン以外の基質に作用した結果と考えられる。動物血中には種々組織から分泌されたと考えられる微量の組織性カリクレインが循環していることが分かっており、¹⁾ ラジオイムノアッセイで測定した正常ラット血中組織性カリクレイン濃度は 47.1 ± 1.7 ng/ml,¹⁰⁾ 6.1 ± 2.1 ng/ml¹¹⁾ であるとの報告がある。また、酵素免疫測定法で測定した成熟ラット大脳のカリクレイン含有量は、 0.3 — 1.0 ng/g 組織重量³⁾ という極微量である。しかし、これは大脳をすり潰して抽出したときの組織の平均の測定値であり、カリクレイン遺伝子はシグナルペプチド配列を有し、¹²⁾ 基本的にはカリクレインは分泌性タンパク質であることから、生体内では autocrine 的に局所でこの濃度よりはるかに高い濃度で作用し得るものと考えられる。したがって、本研究で神経幹細胞増殖促進が認められたカリクレイン濃度は生理的条件下で十分に作用し得る濃度であり、カ

リクレインが未知の重要な脳神経機能に係わっていることが示唆される。一方、神経幹細胞は、神経分化機構追究、再生医療研究等に重要な細胞であるが、本研究で見出されたカリクレインの作用は生理機能追究とは別の観点から、神経幹細胞を効率よく確保するための試薬としての可能性が期待できる。本研究は、東京理科大学の動物実験指針に準じて行われた。

REFERENCES

- 1) Bhoola K. D., Figueroa C. D., Worthy K., *Pharmacol. Rev.*, **44**, 1–80 (1992).
- 2) Mareau M. E., Garbacki N., Molinaro G., Brown N. J., Marceau F., Adam A., *J. Pharmacol.*, **99**, 6–38 (2005).
- 3) Kizuki K., Suzuki T., Kudo M., Noguchi T., *Brain Res.*, **634**, 305–309 (1994).
- 4) Kizuki K., Kitagawa A., Takahashi M., Moriya H., Kudo M., Noguchi T., *J. Endocrinol.*, **127**, 317–323 (1990).
- 5) Kudo M., Yamazaki I., Suzuki T., Ebihara Y., Iwadate H., Kizuki K., *Brain Res.*, **797**, 287–294 (1998).
- 6) Iwadate H., Kawamata K., Kudo M., Kizuki K., *Brain Res.*, **863**, 87–93 (2000).
- 7) Tang Z., Yu Y., Guo H., Zhou J., *Neurosci.*

- Lett.*, **324**, 13–16 (2002).
- 8) Williams E. J., Furness J., Walsh F. S., Doherty P., *Development*, **120**, 1685–1693 (1994).
 - 9) Kizuki K., Moriwaki C., Moriya H., *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 42–48 (1980).
 - 10) Rabito S. F., Scicli A. G., Kher V., Carretero O. A., *Am. J. Physiol.*, **242**, 602–610 (1982).
 - 11) Masferrer J., Albertini R., Croxatto H. R., Garcia P., Pinto I., *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 51–56 (1985).
 - 12) MacDonald R. J., Margolius H. S., Erdos E. G., *Biochem. J.*, **253**, 313–321 (1988).