



Title	Blockade of neuropsin, a serine protease, ameliorates kindling epilepsy
Author(s)	百田, 芳春
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41209
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	百 田 芳 春
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 1 0 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 10 年 7 月 7 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	Blockade of neuropsin, a serine protease, ameliorates kindling epilepsy (セリンプロテアーゼ, ニューロプシンの機能抑制によるキンドリング性てんかん発作に対する改善効果)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 遠 山 正 彌 (副査) 教 授 武 田 雅 俊 教 授 米 田 悦 啓

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

キンドリングはヒトのてんかんに類似した永続的な脳機能変化として、てんかん進行の分子メカニズムおよび治療方法を解明するための良いモデルを提供する。電気生理学および薬理的検討より、キンドリングにより生ずる異常な過興奮性にプロテアーゼとそのインヒビターが関連する可能性を示す報告が集積しつつある。最近、我々はマウス海馬 cDNA ライブラリーから活動依存的変動を示す遺伝子としてセリンプロテアーゼ、ニューロプシンを単離し、側頭葉てんかんの関連領域、すなわち海馬をはじめとする大脳辺縁系での特異的分布様式を明らかにした。本研究はキンドリングにおける海馬ニューロプシンの関与を明確にすると共に、その治療法の開発を目指し、ニューロプシンに対する中和抗体の作成とニューロプシンの活性阻害の影響を検討した。

[方法ならびに成績]

昆虫細胞から調整されたりコンビナント・ニューロプシン (rNP) を抗原とし、ラットモノクローナル抗体 mAbB5 及び mAbF12 が作製した。これらのモノクローナル抗体の性状を明らかにするため、ELISA 法を用い rNP と既存のセリンプロテアーゼに対する親和性を mAbB5 及び mAbF12 に関して比較した。その結果、mAbB5 及び mAbF12 ともにトロンビン、カリクレイン、組織型プラスミノゲンアクチベーター (tPA)、及びウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (uPA) に対して親和性を示さず、rNP に対してのみ親和性を示し、mAbB5 及び mAbF12 は rNP にのみ高い特異性があると考えられた。次に、rNP の合成ペプチドに対する分解活性に及ぼす mAbB5 及び mAbF12 の中和能を検討したところ、mAbF12 は rNP の分解活性に影響をあたえなかったが、mAbB5 は rNP の活性を約 50% 抑制した。キンドリングマウスを陳らの方法に従い作製した。すなわち、マウス扁桃体に埋め込み式電極を装着し 1 週間後に、電気刺激を毎日一度扁桃体にあたえ、痙攣の行動判定はラシーヌの基準を参考にした。キンドリングが完成したマウスを屠殺し脳を取り出し、海馬など 7 部位にわけた。これらの脳部位から内因性のニューロプシン蛋白のキンドリングによる影響を測定するため、中和能を持たない mAbF12 を用いて免疫沈降を行い、その免疫沈降物の酵素活性を種々の合成ペプチドを用いて比較検討した。その結果、キンドリング刺激群では側頭頭頂皮質において約 4

倍の、海馬において約2.6倍の、および前頭皮質においては約2倍の蛋白誘導が見られた。この結果を踏まえ、内因性ニューロプシン蛋白の活性を調整することにより、キンドリング発作の抑制が可能であると考えた。このため、キンドリング作成用の慢性電極に加え、側脳室への注入用カニューレを装着した動物を作成し、1週間の回復期の後、キンドリング刺激を開始した。キンドリング行動観察から、前肢の間代性痙攣を伴う中程度（スコア2）のてんかん状態に到達したマウス（キンドリング進行期マウス）に、無麻酔無拘束下で注入用カニューレを介して mAbB5 及び mAbF12、あるいは対照用精製ラット IgG を注入した。抗体注入後のマウス行動指標の観察から中和抗体である mAbB5 において顕著な発作抑制が観察され、また同時に記録した脳波においててんかんの典型的棘波が消失した。一方、中和能をもたない特異抗体 mAbF12 では、注入されたマウスで行動と脳波の発作抑制は有意ではあったが、mAbB5 ほど顕著ではなく、この抑制効果は主としてニューロプシン蛋白のプロテアーゼ活性を中和することにより起こるものと断定した。また、抗体の単回注入ではこの抑制効果は徐々に減弱した。

[総括]

ニューロプシンはキンドリング誘発刺激により海馬で強く誘導された。一方、キンドリング形成中にそのニューロプシン特異的抗体によって、プロテアーゼ活性を抑制されると、キンドリングにともなう痙攣発作の顕著な抑制が観察された。したがって、てんかんが形成される過程でニューロプシンはてんかん形成に関連する可塑性を誘導する重要な因子であることが考えられる。また、中和抗体による顕著な抑制効果はニューロプシンの活性制御がてんかんのあらたな治療法を提供する可能性を示した。

論文審査の結果の要旨

脳内セリンプロテアーゼ、ニューロプシンは海馬など大脳辺縁脳に局在し、またキンドリングモデルにおいてその遺伝子発現が増強すること、ニューロプシン蛋白質が増加することなどからキンドリング形成に関連していることが考えられた。そこで、本研究ではキンドリング誘発脳においてニューロプシンの機能を抑制することによって、キンドリング発作が抑制されるのではないかと考え、ニューロプシンの特異抗体を作成し、これを *in vivo* において無麻酔・無拘束下で脳室内注入することを試みた。その結果、ニューロプシン特異抗体はキンドリング発作を有意に抑制し、ニューロプシンがてんかん発作の誘発に何らかの作用をしているものと推察され、これらの知見は、てんかん形成の病理メカニズムの解明及び治療法の開発にとって有用であることを示した。従って、本研究は学位の授与に値するものと認められる。