

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21268

研究課題名(和文) 神経変性疾患の病因受容体PirBの機能制御

研究課題名(英文) Regulation of PirB, a receptor causing neurodegenerative diseases

研究代表者

栗原 裕司 (KURIHARA, Yuji)

横浜市立大学・生命医科学研究科・特任助教

研究者番号：00634552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病の認知・記憶機能障害の原因分子と考えられているamyloid (A) 重合体の新規受容体として同定されたpaired immunoglobulin-like receptor B (PirB) の分子機能に対する制御法について検討した。LOTUSがPirBに結合することを発見し、LOTUS-PirB結合がA 重合体のPirBへの結合を阻害することを明らかにした。また一方で、抗PirB抗体もA 重合体のPirBへの結合を阻害することが判明した。以上の研究成果により、LOTUSあるいは抗PirB抗体がA 重合体結合により誘起されるPirBの生理機能を阻害する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Paired immunoglobulin-like receptor B (PirB) is a novel functional receptor for oligomerized beta-amyloid impairing cognitive and memory function in Alzheimer's disease. I examined the regulation of the molecular function of PirB bound by oligomerized beta-amyloid. I found that LOTUS interacts with PirB. Furthermore, overexpression of LOTUS with PirB in COS7 cells blocked the binding of oligomerized beta-amyloid to PirB. Moreover, an antibody against PirB also interfered with the binding of oligomerized beta-amyloid to PirB overexpressed in COS7 cells. These data suggest that LOTUS or the antibody might inhibit the physiological function of PirB induced by oligomerized beta-amyloid.

研究分野：神経薬理学

キーワード：神経科学 薬理学 神経疾患 受容体制御

1. 研究開始当初の背景

認知機能や記憶機能の障害を主症状とする進行性の神経変性疾患であるアルツハイマー病に対する有効な予防法・治療法の開発が強く望まれている。アルツハイマー病の予防・治療を目指した医学研究が世界中で行われ、現在最も注目されている研究の一つとして、amyloid precursor protein の部分配列である amyloid (A) の機能抑制を目指した研究が挙げられる。A は脳内において凝集・蓄積して重合する。重合した A (A 重合体) が、神経細胞を傷害・死滅させることによって、認知・記憶機能障害を惹起すると考えられている。近年、A 重合体は、paired immunoglobulin-like receptor B (PirB) に結合することにより、アルツハイマー病の認知・記憶機能を障害することが報告された (Kim *et al.*, Science, 2013) ことから、この A 重合体-PirB 結合がアルツハイマー病発症の原因であることが示された。アルツハイマー病の認知・記憶機能障害の原因分子として知られている A 重合体が結合する新規受容体として PirB が同定されているものの、PirB を制御できる手法の報告は全くの未知である。

申請者らは新規の神経回路形成因子 lateral olfactory tract usher substance (LOTUS) を発見し、LOTUS は Nogo 等の神経再生阻害因子の受容体である Nogo receptor-1 (NgR1) に結合し、Nogo によって誘起される神経細胞の軸索伸長阻害を抑制することを明らかにした (Sato *et al.*, Science, 2011)。さらに、申請者は、LOTUS の NgR1 への結合が、Nogo の他に 4 種存在する神経再生阻害因子の作用も抑制し、NgR1 のリガンド 5 種全てに対する抑制効果を有することを明らかにした (Kurihara *et al.*, Mol Cell Neurosci, 2014; Kurihara *et al.*, Neuroscience, 2017)。しかしながら、NgR1 機能抑制以外の LOTUS の機能は未知である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、アルツハイマー病の病因受容体である PirB の機能に対する制御法を開発することである。本研究課題開始に先立って、申請者は、LOTUS と PirB との相互作用を検討した。LOTUS と PirB におけるリガンド-受容体結合実験および共沈降実験において、LOTUS が PirB に結合することを見出した。しかしながら、LOTUS 結合が PirB の機能に及ぼす影響は不明である。そこで、PirB への A 重合体結合に対する LOTUS の機能を解析する研究計画を立案した。

3. 研究の方法

(1) A 重合体-PirB 結合に対する LOTUS の分子機能の検討;

COS7 細胞株に PirB および LOTUS の両者を強制発現させ、ビオチン化された A 重

合体を添加して、アビジン-ビオチン複合体システムを用いてビオチン化 A 重合体の PirB への結合を解析した。

(2) A 重合体-PirB 結合に対する抗 PirB 抗体の作用の検討;

COS7 細胞株に PirB を強制発現させ、A 重合体と同時に当研究室が所有する抗 PirB 抗体を添加して、アビジン-ビオチン複合体システムを用いてビオチン化 A 重合体の PirB への結合を解析した。

4. 研究成果

PirB および LOTUS の両者を強制発現させた COS7 細胞株に A 重合体を添加し、その結合を検討した。その結果、PirB 単独を強制発現させた COS7 細胞株に A 重合体は結合するが、LOTUS および PirB の両者を強制発現させた COS7 細胞には A 重合体の結合が抑制されることを発見した (図 1A、B)。

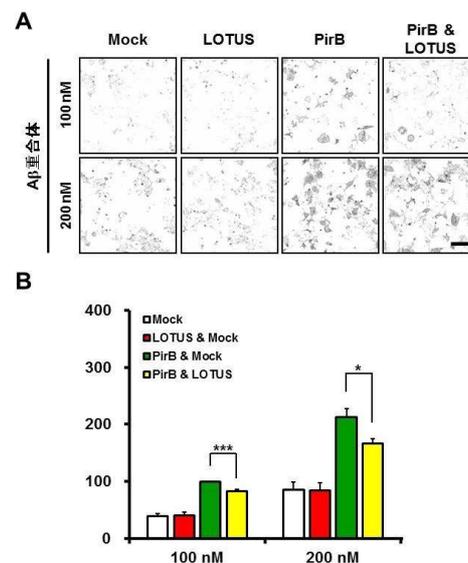


図1 LOTUSはAβ重合体-PirB結合を抑制する
A COS7細胞にLOTUSと共に強制発現させたPirBに対するAβ重合体の結合実験。Scale bar, 200 μm。
B COS7細胞にLOTUSと共に強制発現させたPirBに対するAβ重合体結合の定量化グラフ。
n = 10 (*P < 0.05, ***P < 0.001; Kruskal-Wallis test)

また、PirB を強制発現させた COS7 細胞株に A 重合体と抗 PirB 抗体を添加し、その結合を検討した。その結果、PirB を強制発現させた COS7 細胞株に対する A 重合体の結合が、当研究室所有の抗 PirB 抗体の添加により抑制されることも見出した (図 2)。

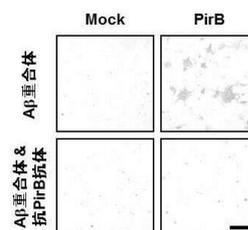


図2 抗PirB抗体はAβ重合体-PirB結合を抑制する
COS7細胞に強制発現させたPirBへのAβ重合体結合に対する抗PirB抗体の阻害効果。
Scale bar, 200 μm。

以上の研究成果により、LOTUS あるいは当研究室所有の抗 PirB 抗体は A 重合体-PirB の結合を阻害することが明らかとなった。このことは、A 結合により誘起される PirB の機能を LOTUS あるいは当該抗 PirB 抗体が抑制する可能性を示唆する。

A 重合体は、PirB 結合を介して神経細胞内におけるリン酸化 Cofilin および post synaptic density-95 (PSD-95) を減少させることによって、アルツハイマー病の認知・記憶機能を障害することが示されている (Kim *et al.*, Science, 2013)。現在、PirB を発現し、A 重合体-PirB 相互作用によりリン酸化 Cofilin および PSD-95 が減少することが知られているマウス大脳皮質神経細胞および海馬神経細胞 (Kim *et al.*, Science, 2013) を用いて、LOTUS あるいは抗 PirB 抗体によるリン酸化 Cofilin 減少および PSD-95 減少に対する抑制効果を検証する実験を遂行中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

- (1) Takahashi K, Takeuchi H, Kurihara Y, Doi H, Kunii M, Tanaka K, Nakamura H, Fukai R, Tomita-Katsumoto A, Tada M, Higashiyama Y, Joki H, Koyano S, Takei K, Tanaka F. Cerebrospinal fluid level of Nogo receptor 1 antagonist lateral olfactory tract usher substance (LOTUS) correlates inversely with the extent of neuroinflammation. *J Neuroinflammation*, 査読有, 15, 46, 2018.
DOI: 10.1186/s12974-018-1084-x.
- (2) Kawakami Y, Kurihara Y, Saito Y, Fujita Y, Yamashita T, Takei K. The soluble form of LOTUS inhibits Nogo receptor-mediated signaling by interfering with the interaction between Nogo receptor type 1 and p75 neurotrophin receptor. *J Neurosci.*, 査読有, 38, 2589-2604, 2018.
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0953-17.2018.
- (3) Kurihara Y, Takei K. Regulation of lateral olfactory tract development by Nogo-A, Nogo receptor-1 and LOTUS proteins. *Trends Dev Biol.*, 査読有, 10, 41-47, 2017.
- (4) Hirokawa T, Zou Y, Kurihara Y, Jiang Z, Sakakibara Y, Ito H, Funakoshi K, Kawahara N, Goshima Y, Strittmatter SM, Takei K. Regulation of axonal regeneration by the level of function of the endogenous Nogo receptor

antagonist LOTUS. *Sci Rep.*, 査読有, 7, 12119, 2017.

DOI: 10.1038/s41598-017-12449-6.

- (5) Takase H, Kurihara Y, Yokoyama TA, Kawahara N, Takei K. LOTUS overexpression accelerates neuronal plasticity after focal brain ischemia in mice. *PLoS One*, 査読有, 12, e0184258, 2017.
DOI: 10.1371/journal.pone.0184258.
 - (6) Kurihara Y, Saito Y, Takei K. Blockade of chondroitin sulfate proteoglycans-induced axonal growth inhibition by LOTUS. *Neuroscience*, 査読有, 356, 265-274, 2017.
DOI: 10.1016/j.neuroscience.2017.05.034.
 - (7) Iketani M, Yokoyama T, Kurihara Y, Strittmatter SM, Goshima Y, Kawahara N, Takei K. Axonal branching in lateral olfactory tract is promoted by Nogo signaling. *Sci Rep.*, 査読有, 6, 39586, 2016.
DOI: 10.1038/srep39586.
 - (8) Matsumoto K, Kurihara Y, Kuroda Y, Hori S, Kizu J. Pharmacokinetics and brain penetration of carbapenems in mice. *J Infect Chemother.*, 査読有, 22, 346-349, 2016.
DOI: 10.1016/j.jiac.2015.11.010.
- [学会発表](計 5 件)
- (1) 栗原 裕司, 川上 裕, 竹居 光太郎. 神経回路形成因子 LOTUS は神経突起伸長を促進する. 第 60 回日本神経化学学会大会 仙台, 2017.9.7.
 - (2) Kurihara Y, Takei K. LOTUS, a neural circuit formation factor, blocks PirB-mediated axon growth inhibition. The 26th Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry and the European Society for Neurochemistry Paris, 2017.8.23-24.
 - (3) 栗原 裕司, 竹居 光太郎. 神経回路形成因子 LOTUS の軸索再生阻害因子 PirB に対する拮抗作用. 第 90 回日本薬理学会年会 長崎, 2017.3.17.
 - (4) 栗原 裕司, 竹居 光太郎. LOTUS は Nogo により誘起される PirB の軸索伸長阻害を抑制する. 第 59 回日本神経化学学会大会 福岡, 2016.9.8.
 - (5) 栗原 裕司, 竹居 光太郎. LOTUS は PirB のアンタゴニストとして機能する. 第 39 回日本神経科学大会 横浜, 2016.7.20.

6. 研究組織

(1)研究代表者

栗原 裕司 (KURIHARA Yuji)

横浜市立大学・
生命医科学研究科・特任助教
研究者番号：00634552
