

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03342

研究課題名（和文）神経回路形成因子LOTUSの遺伝子導入による神経再生医療技術の開発

研究課題名（英文）Development of neural regeneration therapy by gene transfection of neuronal circuit formation factor LOTUS

研究代表者

竹居 光太郎（TAKEI, Kohtaro）

横浜市立大学・生命医科学研究科・教授

研究者番号：40202163

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：神経回路形成因子LOTUSの生理機能を利用した新たな再生医療技術の構築を目的とし、中枢神経系の再生を阻む主要因を抑制する内在性物質LOTUSの生理機能を利用した再生医療技術の開発を行った。LOTUSは中枢神経系が損傷を受けると著しく発現が減少することから、本研究では、脊髄損傷モデル動物において精製LOTUSタンパク質、およびアデノ随伴ウイルスによるLOTUS遺伝子の導入によってLOTUSの発現減少を補填したところ、行動学的解析と組織学的解析の双方において、両者ともに有意に機能改善が認められ、LOTUSの補充療法は脊髄損傷の機能改善に有効であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によってマウス脊髄損傷に対する精製LOTUSタンパク質投与及びAAV-LOTUS投与の有効性が確認された。これは、機能再建が極めて困難である脊髄損傷に対する新たな有望治療法の提案に該当する。中枢神経系は損傷後の機能再建は非常に困難であるが、多種の再生阻害因子を標的とした治療法で奏功したものは未だ存在しない。LOTUSは脊髄損傷などの損傷によって発現が激減するため、減少したLOTUSを補充するタンパク質製剤投与や遺伝子導入が有効となる。更にLOTUSの安全性も確認された。これらより、LOTUSの補充療法のヒトでの治療効果や安全性が十分に想定され、本治療法の社会実装が期待される。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to develop a new regenerative medicine technology utilizing the physiological function of LOTUS, an endogenous substance that suppresses the main factors that prevent the regeneration of the central nervous system (CNS). However, LOTUS is significantly downregulated when the CNS is damaged, resulting in the loss of its antagonistic effects on the factors preventing regeneration. In this study, we attempted to construct a regenerative medicine technique to compensate for the decreased expression of LOTUS by introducing purified LOTUS protein and the LOTUS gene by adeno-associated virus in an animal model of spinal cord injury. When recombinant purified LOTUS protein or the LOTUS gene was administered to the affected area, behavioral and histological analyses revealed significant functional improvement. The data indicate that LOTUS replacement therapy is effective in improving function in spinal cord injury.

研究分野：神経系の発生と再生

キーワード：LOTUS 脊髄損傷 遺伝子導入 アデノ随伴ウイルス タンパク質製剤 神経再生

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系の再生を阻む主要因として5種の再生阻害因子が知られており、Nogo 受容体-1(NgR1) はそれら全てと、Paired immunoglobulin-like receptor B (PirB) はミエリン膜の阻害因子3種と結合する。我々は、LOTUS が NgR1 による軸索伸長阻害作用を完全に抑制し (Sato et al., 2011; Kurihara et al., 2012, 2014, 2017; Kawakami et al., 2018a, 2018b) 更に PirB と Nogo の結合を完全に阻害すること (Kurihara et al., 2020) を見出した。このように、LOTUS は NgR1 と PirB の双方と結合し、複数種の再生阻害因子を一挙に抑制できる現時点で唯一の内在性物質であるが、神経損傷によって LOTUS の発現が減少する。LOTUS の過剰発現マウスは脊髄損傷モデル (Hirokawa et al., 2017) 視神経障害モデル (Hirokawa et al., 2017, Kawakami et al., 2018) 脳虚血 (脳梗塞) モデル (Takase et al., 2017) 脳梁切断モデル (Ueno et al., 2020) において顕著に損傷後の機能改善を誘起した。この LOTUS 過剰発現動物は異常な表現型を示さず、遺伝的な過剰発現は動物個体にとって有害とはならないことから、LOTUS の精製タンパク質、および LOTUS 遺伝子導入による補充療法を考案するに至った。

2. 研究の目的

本研究は、我々が発見した神経回路形成因子 LOTUS の中枢神経系の再生阻害因子に対する抑制機能を利用した再生医療技術の構築を目的とする。LOTUS は内在性物質であるが、中枢神経系が損傷を受けると発現が減少するため、精製 LOTUS タンパク質の投与、およびアデノ随伴ウイルス (AAV) を用いた遺伝子導入による補充療法で神経再生の誘起を試みる。

3. 研究の方法

・脊髄損傷モデルの作製と機能回復評価

C57BL/6 マウスを背景にもつ野生型マウスを用いて脊髄損傷モデル動物を作製し、神経再生状態を行動学的および組織学的に解析する。麻酔下の 7 週齢成体雌マウスの椎弓を胸椎レベル (Th7-8) で切除し、コンピューター制御されたインパクト (IH-044MK) を用いて脊髄硬膜上に 60kdyn の圧挫傷を形成する。損傷直後に LOTUS の外来導入処置後、損傷直後より経時的に歩行運動評価 (BMS スコアリング, Basso et al., 2006) によって行動学的評価を行い、損傷 4 週間後に grid waking test, beam walking test, footprint test も行う。行動解析後、脊髄標本 (薄切片) において 5-HT 免疫組織化学によって可視化された縫線核脊髄路 (錐体外路系) の神経走行を組織学的に解析する。

・精製タンパク質及び遺伝子の導入

損傷処置の 3 日後 (急性期) に再び脊髄を露出させて Med-gel (徐放剤) に包埋した精製 LOTUS タンパク質 (3.83mg/mL) を圧挫滅部位直上に静置して皮膚を縫合する。徐放剤より精製タンパク質が約 7 日間徐々に放出されることを *in vitro* で確認してある。

一方、圧挫滅処置直後 (急性期) にマウス LOTUS 発現用アデノ随伴ウイルス (AAV.GTX-GFP-LOTUS) を注入して皮膚を縫合する。AAV.GTX-GFP-LOTUS による遺伝子導入は、AAV.GTX-GFP-LOTUS を 2×10^{12} vector genome/mL 濃度のウイルス溶液を髄腔内に 0-3 μ L 注入する。AAV.GTX-GFP-LOTUS はマウスの神経細胞に特異的に発現させるために、神経特異的な synapsin-1 をプロモータ遺伝子として導入する。このプロモータによって神経細胞特異的な発現は確認済みである。遺伝子導入効率は、*lotus* 遺伝子に融合させた GFP タグの免疫組織化学的解析によって確認する。対照実験として、AAV.GTX-GFP または AAV.GTX (空ベクター) を同様に遺伝子導入して解析する。

・LOTUS 遺伝子導入の安全性評価: 野生型成体マウスに擬手術を施して髄腔内に実験と同量の AAV.GTX-LOTUS を導入し、一般行動、HE 染色による組織構築、および 5-HT 免疫組織化学的染色による縫線核脊髄路の神経線維走行について異常の有無を解析する (各個体を 3 ヶ月間) また、非臨床安全性予備試験 (信頼性基準) として、ラットで臨床投与経路と同一の髄腔内投与を行い、GLP 非臨床安全性試験のプロトコルの策定を試みる。

4. 研究成果

(1) 精製タンパク質の投与

損傷処置の 3 日後 (急性期) に Med-gel (徐放剤) に包埋した精製 LOTUS タンパク質を圧挫滅部位直上に静置して投与したところ、コントロールに比して顕著な運動機能改善が認められた (図 1)。損傷後 5 日目における単回投与であるが、損傷後 21 日目まで機能回復が亢進し、21 日以降の機能改善は認められなかった。徐放剤から約 7 日間精製 LOTUS タンパク質が患部周辺に放出されたと推察されるため、損傷後 12-14 日目までは LOTUS の補填があったと考えられ、補填されなくなった後の過程では機能回復が停滞したものと推察された。より高濃度の精製タンパク質を投与することや、徐放されなくなった時期に再度投与することを検討することで、機能改善

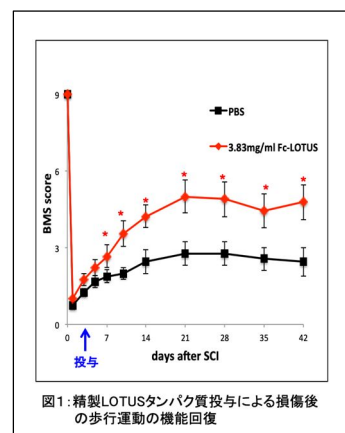


図1: 精製LOTUSタンパク質投与による損傷後の歩行運動の機能回復

効果の更なる効能亢進が期待される。

(2) LOTUS 遺伝子導入

野生型マウスを用いて脊髄損傷モデル動物を作製して神経再生状態を行動学および組織学的に解析した。圧挫滅処置後、損傷直後（急性期-1）、5日後（急性期-2）、14日後（亜急性期-1）に再び脊髄を露出させて LOTUS 発現用アデノ随伴ウイルス (AAV-LOTUS) を髄腔内に最大容量で注入した。遺伝子導入効率は、lotus 遺伝子に P2A を介して融合させた GFP の免疫組織化学的解析によって解析し、最長 2 カ月間の行動学的解析を行なって遺伝子治療における効能を検討したところ、損傷直後投与の場合、著効ではなかったが、有意な運動歩行の改善効果が認められた（図 2）。しかし、損傷後 5 日目投与では歩行運動の改善効果は認められず、対照実験群（GFP 発現用アデノ随伴ウイルス：AAV-GFP）および AAV-LOTUS 投与群の双方で約 30% の割合で後肢の固縮が見られ、ベクター投与による副反応が生じたと考えられた。また、損傷後 14 日目投与では損傷直後投与とほぼ同様な歩行運動の改善が認められた。次に、AAV-LOTUS 投与による脊髄における LOTUS の過剰発現状態を解析したところ、内在性 LOTUS の発現量の約 25 倍の過剰発現が脊髄の広範囲において認められた。先行研究で顕著な機能改善を示した LOTUS 過剰発現トランスジェニックマウスにおける LOTUS 発現量が約 1.5 倍であったことから、過剰発現の度合いが大きすぎた可能性があり、今後は投与量を減量させて最適化を図る予定である。一方、GLP 安全性試験の予備段階として遺伝子導入後最長 3 カ月間の行動学的・組織学的・病理学的解析を行ったところ、有害事象は一切認められず、AAV-LOTUS 投与の安全性が確認された。

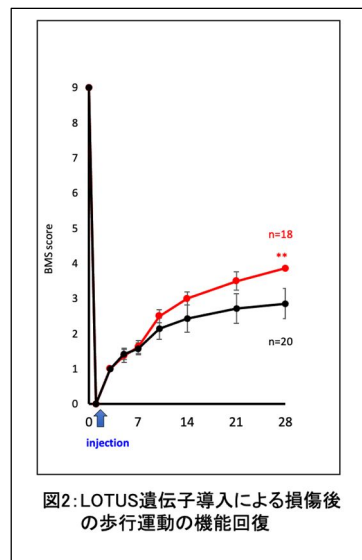


図2: LOTUS 遺伝子導入による損傷後の歩行運動の機能回復

< 引用文献 >

- 1) Sato, Y., Iketani, M., Kurihara, Y., Yamaguchi, M., Yamashita, N., Nakamura, F., Arie, Y., Kawasaki, T., Hirata, T., Abe, T., Kiyonari, H., Strittmatter, S.M., Goshima, Y., and Takei, K. Cartilage acidic protein-1B (LOTUS), an endogenous Nogo receptor antagonist for axon tract formation. *Science*, 333 : 769-773 (2011).
- 2) Kurihara, Y., Arie, Y., Iketani, M., Ito, H., Nishiyama, K., Sato, Y., Nakamura, F., Mizuki, N., Goshima, Y., and Takei, K. The carboxyl-terminal region of Crtac1b/LOTUS acts as a functional domain in endogenous antagonism to Nogo receptor-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 418 : 390-395 (2012).
- 3) Kurihara, Y., Iketani, M., Ito, H., Nishiyama, K., Sakakibara, Y., Goshima, Y. and Takei, K. LOTUS suppresses axon growth inhibition by blocking interaction between Nogo receptor-1 and all four types of its ligand. *Molecular Cellular Neuroscience*, 61 : 211 - 218 (2014).
- 4) Kurihara, Y., Saito, Y., and Takei, K. Blockade of chondroitin sulfate proteoglycans-induced axonal growth inhibition by LOTUS. *Neuroscience*, 356 : 265 - 274 (DOI: 10.1016/j.neuroscience.2017.05.034) (2017).
- 5) Kawakami, Y., Saito, Y., Nakagawa, R., Kurihara, Y., and Takei, K. The soluble form of LOTUS inhibits Nogo receptor type 1-mediated signaling induced by B lymphocyte stimulator and chondroitin sulfate proteoglycans. *Neuroscience Letters*, 683 : 61 - 68 (2018).
- 6) Kawakami, Y., Kurihara, Y., Saito, Y., Fujita, Y., Yamashita, T., and 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. *Journal of Neuroscience*, 38(10): 2589-2604 (2018).
- 7) Kurihara, Y., Takai, T., and Takei, K. Nogo receptor antagonist LOTUS exerts suppression on axonal growth-inhibiting receptor PIR-B. *Journal of Neurochemistry*, 155: 285-299, DOI:10.1111/jnc.15013 (2020).
- 8) Hirokawa, T., Zou, Y., Kurihara, Y., Jiang, Z., Sakakibara, Y., Ito, H., Funakoshi, K., Kawahara, N., Goshima, Y., Strittmatter, S.M., and Takei, K. Regulation of axonal regeneration by the level of function of endogenous Nogo receptor antagonist LOTUS. *Scientific Reports*, 7 : 12119/ DOI:10.1038/s41598-017-12449-6 (2017).
- 9) Takase, H., Kurihara, Y., Yokoyama, T., Kawahara, N. and Takei, K. LOTUS overexpression accelerates neuronal plasticity after focal brain ischemia in mice. *PLOS ONE*, 12(9) e0184258, doi.10.1371/journal.pone.0184258 (2017).
- 10) Ueno, R., Takase, H., Suenaga, J., Kishimoto, M., Kurihara, Y., Takei, K., Kawahara, N., and Yamamoto, T. Axonal regeneration and functional recovery driven by endogeneous Nogo receptor antagonist LOTUS in a rat model of unilateral pyramidotomy. *Experimental Neurology*, 323 : 113068(doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.113068) (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹居光太郎
2. 発表標題 神経再生促進物質LOTUSを用いた神経再生治療法の開発
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------