

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21466

研究課題名（和文）神経回路形成因子LOTUSによる認知症の予防改善治療基盤の創成

研究課題名（英文）Development of therapy basis for dementia by using neural 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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：LOTUSはアミロイド（A β ）とその受容体であるPirBの結合を約30%減弱させ、培養海馬神経細胞におけるA β 濃度依存的なコフィリンの脱リン酸化（活性化）を抑制して、A β によるシナプス密度の減少を抑制した。他方、培養海馬神経細胞において、インターロイキン-1がLOTUS発現量を減少させ、逆にインターロイキン-6（IL-6）と脳由来神経栄養因子（BDNF）は発現増加をもたらした。IL-6とBDNFは培養海馬神経細胞のシナプス密度を増加させ、BDNFはNogo66による神経突起伸長阻害を完全にブロックした。アルツハイマー病モデル動物におけるLOTUSとA β の発現量を検討中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

A β の蓄積を防御する方策としてA β 産生の制御法がアルツハイマー型認知症の克服において重要視されているが、A β 受容体の機能制御を目指す研究は皆無に等しいため、本研究は極めて新規性に富んだ研究と言える。また、LOTUSの生理機能に着目した治療戦略は斬新性に富み、非常にチャレンジングな研究課題である。LOTUSの発生期の神経回路形成機構に寄与する生理機能を神経変性医療技術に利用する考えは比類なきものであるばかりか、内在性物質を利用することで副作用リスクの少ない創薬研究にも発展する。更には、本研究は従来のA β 産生の制御法と併用することで相乗的効果が期待できる画期的な創薬研究となる。

研究成果の概要（英文）：LOTUS, an endogenous neural circuit formation factor inhibited the binding of amyloid- β (A β) protein to its receptor PirB. This antagonistic action of LOTUS functioned in inhibition of A β -induced cofilin dephosphorylation and inhibition of decrease of synapse density in cultured hippocampal neurons. On the other hand, we found that interleukin-1 decreased LOTUS expression, whereas interleukin-6 (IL-6) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) increased LOTUS expression in cultured hippocampal neurons. Both of IL-6 and BDNF increased synapse density and BDNF also suppressed Nogo-induced inhibition of neurite outgrowth. We are now investigating the levels of LOTUS and A β expression in the hippocampus of the pathological animal model of Alzheimer disease.

研究分野：神経科学

キーワード：LOTUS アミロイド タンパク質 Nogo受容体 PirB シナプス形成 アルツハイマー病 認知症 治療法開発

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

脳や脊髄といった中枢神経系は、一度損傷を受けると再生が極めて困難である。その主要因は、神経細胞上に発現する2種の受容体が挙げられ、これらの受容体が脳内の再生阻害因子を受容すると軸索伸長が著しく阻害される。この2種の受容体とは、Nogo受容体 (Nogo receptor-1 : NgR1) と Paired immunoglobulin-like receptor B (PirB) で、我々が発見した神経回路形成因子 LOTUS はこれら双方と結合し、それらの受容体機能を完全に阻止する強力な内在性拮抗物質である (Sato et al., 2011; Kurihara et al., 2012, 2014, 2017, 2020)。驚いたことに、近年、アルツハイマー病型認知症の発症要因である β -amyloid (A β) タンパク質がこれらの受容体に結合して神経変性を惹起するという衝撃的な報告がなされた (Kim et al., 2013; Zhao et al., 2017)。つまり、LOTUS の相互作用分子である NgR1 と PirB は神経再生阻害因子の受容体のみならず A β 受容体としても同定され、これらの受容体は神経変性をもたらす原因分子であることが判明した。

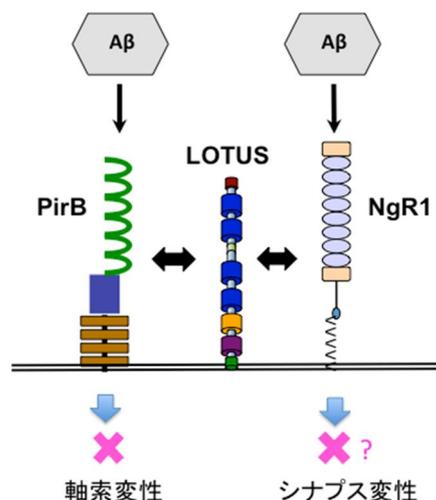


図1 LOTUSのNgR1と PirB に対する拮抗作用

そこで我々は、これら2種の受容体と LOTUS の相互作用が A β の受容機能に影響を与えるかどうかを検討したところ、LOTUS は A β と PirB の結合を抑制することが見いだされた (図 1, Kawaguchi et al., 未発表)。また、A β と NgR1 の結合については未検討であるが、PirB と同様に A β 作用を抑制する可能性がある。以上から、LOTUS とこれらの受容体との相互作用は、A β による神経変性を抑制する神経保護機能を示す可能性が示唆され、LOTUS による認知症改善効果が想起された。

一方、高齢化ラットでは、記憶に関する海馬領域での LOTUS 発現量が加齢に伴って減少し、それに相関して記憶障害が増大するという報告が米国の研究グループからなされ、LOTUS は認知機能と深く関連することが示唆された (Starkey et al., 2013)。我々も高齢化マウスでの発現量解析と行動実験において同様の結果を追試検証した。この研究結果を A β との関連で考えてみると、健常脳にも少量の A β が存在することから、加齢によって生じる自然な健忘症状は LOTUS の発現減少によって A β 作用が徐々に増加したことに起因すると考えることができる。つまり、LOTUS の発現減少を阻止することが認知症予防策となる可能性が想起される。それを裏付けるように、LOTUS 遺伝子欠損マウスは記憶障害を呈した (Nishida et al., 2021)。

2. 研究の目的

少子高齢化を迎える日本をはじめ多くの先進国で社会問題となっている認知症患者の増加に対して、それを克服するような予防法や治療法は現在のところ確立されていない。A β はアルツハイマー病型認知症の発症や進行に関わることは広く知られているが、その制御法については未解決のままである。本研究では、今まで検討されたことのない革新的なアプローチによって、認知症の予防戦略、およびアルツハイマー病型認知症の治療戦略を創成することに挑戦する。LOTUS の NgR1 と PirB に対する A β 抑制作用について培養海馬神経細胞の *in vitro* 実験系とアルツハイマー病の病態モデル動物における *in vivo* 実験系の双方で詳細に解析し、LOTUS による記憶障害に対する改善作用を検討する。更に、LOTUS の過剰発現が記憶・学習能力におよぼす影響を解析する。また、LOTUS の発現減少の分子機構を解明し、LOTUS の発現低下を阻止する方法論を提唱する。これらによって、LOTUS の発現低下阻止や LOTUS の補填が認知症の予防・治療に寄与するという独創的な考えに立脚した今まで検討されたことのない革新的なアプローチを考案し、アルツハイマー病型認知症治療基盤の創成に挑戦する。

3. 研究の方法

- (1) 株細胞におけるA β 結合に対するLOTUSの拮抗作用の検討 : NgR1およびPirBのA β に対するLOTUSの拮抗作用について検討する。市販のA β 42リコンビナント蛋白質によってA β オリゴマーを得て、COS7細胞株において発現させたLOTUSとNgR1の結合、またはLOTUSとPirBの結合がA β オリゴマーとこれらの受容体との結合を阻害するかについて詳細に解析する。
- (2) 培養海馬神経細胞におけるLOTUSの拮抗作用の検討 : NgR1とPirBが高発現する海馬神経細胞において、A β により誘起される神経変性 (シナプス密度の減少) に対するLOTUS

の拮抗作用を検討する。Banker法によって単離した培養海馬神経細胞に*lotus*遺伝子を導入してLOTUSを強制発現させる。別途の方法として、培養2時間後に精製LOTUSタンパク質を添加する。また、LOTUS過剰発現マウス由来の培養海馬神経細胞を用いて検討する。Aβオリゴマーを培養後3時間目の時点で培養液に添加し、その後さらに約19-20時間培養し、培養下でシナプス形成を観察する実験系を準備する。Aβオリゴマーの添加によるシナプス密度の減少を確認した上で、精製LOTUSタンパク質の添加やLOTUSの過剰発現によるシナプス密度の減少に対する作用を解析する。

- (3) LOTUS発現減少の分子機序の検討：LOTUSは脊髄損傷、脳梗塞、多発性硬化症、髄膜炎などの炎症や脱髄を伴う病態（Takahashi et al., 2015, 2018； Hirokawa et al., 2017）や加齢（Starkey et al., 2013, Nishida et al., 未発表）によって発現が減少することから、LOTUS発現減少と炎症性物質の関連性が想起されるため、培養海馬神経細胞を用いて多種多様の炎症性サイトカインを網羅的に添加してLOTUS発現変動を解析する。また、実験的自己免疫性脳炎由来のリンパ球の培養上清添加によってLOTUSの発現減少が見られることから、この減少を阻害する各種薬剤のスクリーニングを行う。これらによって、LOTUS発現減少を惹起するサイトカインの同定と、それによる発現減少を阻止する薬剤を探索する。
- (4) アルツハイマー病の病態モデル動物におけるLOTUS機能の検討：アルツハイマー病の病態モデル動物である変異型APPノックインマウス（理研より供与）におけるLOTUSのAβ拮抗作用の機能を解析する。最初に、同モデル動物におけるLOTUSとAβの発現量について免疫組織化学法とウエスタンブロッティング法で調査する。上述のように、高齢化ラットの海馬でのLOTUSの発現量が減少に伴って記憶障害が起こるという報告から（Starkey et al., 2013）申請者は病態モデル動物の海馬においてLOTUSの発現が野生型に比して減少していると予想している。

4. 研究成果

(1) 株細胞における Aβ 結合に対する LOTUS の拮抗作用の検討

COS7 細胞に NgR1 または PirB を発現させ、Aβ オリゴマーを添加して結合を検討したところ、PirB には Aβ オリゴマーは既報通りに結合が確認できたが、NgR1 との結合は非常に弱く、既報のような明確な結合を確認することができなかった。そのため、本研究では PirB と Aβ オリゴマーとの結合について LOTUS の関与を検討した。PirB と LOTUS を強制発現させた COS7 細胞では、PirB 単独発現で見られた Aβ オリゴマーの結合が約 30% 減弱した。これは 100nM, 200nM, 500nM の各濃度における Aβ オリゴマーの結合を有意差をもって抑制しており、LOTUS は PirB との結合を介して Aβ オリゴマーと PirB の結合を抑制したことを示す。

(2) 培養海馬神経細胞における LOTUS の拮抗作用の検討

培養海馬神経細胞に LOTUS を過剰発現させた時の Aβ オリゴマーの培養細胞に対する結合を検討した。LOTUS 過剰発現によって Aβ オリゴマー（200nM, または 500nM）は、COS7 細胞での再構成系と同様に約 30% 減少した。次に、Aβ オリゴマーと PirB の結合によって生じる細胞内シグナルカスケードの中のリン酸化コフィリンの脱リン酸化（コフィリンの活性化）に着目し、Aβ オリゴマーによる脱リン酸化を生化学的に解析したところ、野生型マウス由来の培養海馬神経細胞では Aβ オリゴマー濃度依存的にリン酸化コフィリンが減少した（コフィリンが活性化した）のに対し、LOTUS 過剰発現マウス由来の培養海馬神経細胞ではリン酸化コフィリンの減少が見られなかった。これは LOTUS の過剰発現はコフィリンの脱リン酸化を抑制したことを示す。そこで、Aβ オリゴマーによるシナプス密度減少作用に対する LOTUS の拮抗作用について検討した。Aβ オリゴマーの添加により培養海馬神経細胞におけるシナプス密度は濃度依存的に減少したが、LOTUS 過剰発現マウス由来の海馬神経細胞や LOTUS の遺伝子導入による過剰発現では Aβ オリゴマーによるシナプス密度の減少が抑制され、コントロールレベルまで抑制することが分かった。これらの実験結果から、LOTUS は Aβ オリゴマーと PirB (and/or NgR1) の結合を抑制し、その結果 Aβ オリゴマーの細胞内シグナルのコフィリンの脱リン酸化（活性化）が抑制されてシナプス密度の低下を抑制したものと考えられた。

(3) LOTUS 発現減少の分子機序の検討

培養海馬神経細胞において、種々のサイトカインや神経栄養因子を添加して LOTUS 発現量の変化を調査した。13 種の物質を添加したところ、インターロイキン-1 が LOTUS 発現量を減少させ、逆にインターロイキン-6（IL-6）と脳由来神経栄養因子 (brain derived neurotrophic factor: BDNF) は LOTUS 発現量を増加させた。インターロイキン-1 の受容体阻害薬はインターロイキン-1 による LOTUS 発現低下を抑制したため、インターロイキン-1 受容体を介して LOTUS の発現低下が引き起こされると考えられた。

他方、IL-6 は約 1.4 倍、BDNF は約 2 倍の LOTUS 発現の増加をもたらした。そこで、LOTUS 発現量を増加させるこれら 2 種の物質について更に検討を加えた。IL-6 は腹腔投与が可能のため、生体においても発現増加を来すかを検討したところ、海馬で顕著な発現増

加が認められた。次に培養海馬神経細胞において IL-6 を添加したところ、シナプス密度が顕著に増加した。但し、LOTUS 遺伝子欠損マウス由来の培養海馬神経細胞においてもシナプス密度の増加が認められたため、IL-6 によるシナプス密度の増加は LOTUS 発現上昇によるものだけではないと考えられた。BDNF についても更なる検討を加えた。BDNF は濃度依存的に培養海馬神経細胞の LOTUS 発現量を増加させた。BDNF の受容体である TrkB の阻害剤 k252a を添加すると、BDNF による発現増加が抑制された。次に、BDNF による LOTUS 発現増加は Nogo 受容体-1(NgR1)に対する拮抗作用を示すかを検討したところ、Nogo66 による神経突起伸長阻害を BDNF は完全にブロックした。以上より、BDNF は LOTUS 発現増加を介して Nogo の NgR1 を介した作用に拮抗することが判明した。

(4) アルツハイマー病の病態モデル動物における LOTUS 機能の検討

アルツハイマー病の病態モデル動物における LOTUS の A β 拮抗作用の効能を解析するため、理研の西道博士より変異型 APP ノックインマウスの供与を受けた。このマウスは 6-8 ヶ月齢よりアルツハイマー病様の症状を呈することが知られている。現時点において、その月齢になったコロニーを得ることができたので、社会的認知記憶テストを行なって記憶障害を呈するかどうかを検討している。今後、記憶障害が確認されたマウスにおける LOTUS と A β の発現量について免疫組織化学法とウエスタンブロッティング法で調査する予定である。

<引用文献> (アルファベット順)

- 1) 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).
- 2) Kim, T., Vidal, G.S., Djuricic, M., William, C.M., Birnbaum, M.E., Garcia, K.C., Hyman, B.T., and Shatz, C.J. Human LirB2 is a β -amyloid receptor and its murine homolog PirB regulates synaptic plasticity in an Alzheimer's model. *Science* 341(6152): 1399-404 (2013).
- 3) 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).
- 4) 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).
- 5) 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).
- 6) 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) .
- 7) Nishida, R., Kawaguchi, Y., Matsubayashi, J., Ishikawa, R., Kida, S., and Takei, K. LOTUS, an endogenous Nogo receptor antagonist, is involved in synapse and memory formation. *Scientific Reports*, 11 : 5085 (<https://doi.org/10.1038/s41598-021-84106-y>) (2021).
- 8) Starkey, H.D.V., Bixler, G.V., Sonntag, W.E., and Freeman, W.M. Expression of NgR1-antagonizing proteins decreases with aging and cognitive decline in rat hippocampus. *Cellular and Molecular Neurobiology* 33: 483-488 (2013).
- 9) 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).

- 10) Takahashi, K., Kurihara, Y., Suzuki, Y., Goshima, Y., Tanaka, F., and Takei, K. Association of cerebrospinal fluid levels of lateral olfactory usher substance protein with disease activity in multiple sclerosis. *JAMA Neurology*, 72(2): 176-179 (DOI: 10.1001/jamaneurol.) (2015).
- 11) Zhao, Y., Sivaji, S., Chiang, M.C., Ali, H., Zukowski, M., Ali, S., Kennedy, B., Sklyar, A., Cheng, A., Guo, Z., Reed, A.K., Kodali, R., Borowski, J., Frost, G., Beukema, P., and Wills, Z.P. Amyloid beta peptides block new synapse assembly by Nogo receptor mediated inhibition of T-type calcium channels. *Neuron* 96(2): 355-372 (2017).

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 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川口祐生, 松林潤平, 竹居光太郎
2. 発表標題 神経回路形成因子LOTUSによるアミロイド タンパク質受容体PirBの制御
3. 学会等名 第64回日本神経化学会
4. 発表年 2021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
研究協力者	川口 祐生 (Kawaguchi Yuki)		
研究協力者	松林 潤平 (Matsubayashi Junpei)		

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
---------	---------