

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390346

研究課題名(和文)新規内因性軸索伸張促進因子 Lotus の脳虚血後神経再生に及ぼす効果

研究課題名(英文) A role of Lotus, a novel axon growth promoting factor, in post-ischemic neuronal regeneration

研究代表者

川原 信隆 (Kawahara, Nobutaka)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60214673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：新規発見された軸索伸展促進因子 Lotus が、神経発生および脳梗塞後の機能回復にどの程度関与するかを検証した。胎生期神経発生過程では、Lotus 欠損マウス生後7日目の海馬にて、神経前駆細胞の遊走が阻害されることが示され、Lotus が神経発生期の遊走を促進していることが分かった。また、過剰発現マウスにて脳梗塞を作成し、神経機能の回復を Bederson's score を用いて長期追跡したところ、12週以降で有意に過剰発現マウスの機能回復が優れていた。これは、Lotus が軸索再生などを通じて脳の機能再建に重要な役割を果たすことを示しており、今後の脳梗塞治療の新たな戦略になると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated a role of a novel axon growth promoting factor Louts in neurogenesis and functional recovery after Stroke. Lotus knockout mouse exhibited inhibition of neural progenitor migration in the hippocampus, suggesting a role in neurogenesis. In the stoke model, Lotus transgenic mouse exhibited better recover of motor function compared with wild type, suggesting a new therapeutic regenerative strategy for ischemic stroke.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：脳虚血 神経再生 軸索 脳梗塞 機能回復

1. 研究開始当初の背景

哺乳類成体脳は神経再生能力が極めて乏しく、脳卒中などの損傷を受けた後の機能回復の大きな障壁となっている。臨床的にも、要介護者の多くが脳血管障害後遺症であることを考慮すると、その原因解明と治療法開発は社会的にも大きな課題となっている。最近の研究の発展で、神経細胞自体の再生能力が失われていないことが報告され、神経再生療法へのいくつかの方向性が示されている。内因性機構を利用した方法には大きく二つの流れがある。

(1) 内在性神経幹細胞からの神経細胞再生：その一つは内在性神経幹細胞の発見であり、成体脳であっても一定レベルの神経再生が生じることが示されたが、その再生能力は極めて乏しい(Arvidson, Nat Med 8:963, 2002)。我々は、脳虚血後に成長因子を脳室内投与し神経幹・前駆細胞の増殖を刺激することで、海馬 CA1 領域において 40% の神経再生を得ることに成功した(Nakatomi, Cell 110:429, 2002)。これらの神経細胞は、形態学的に成熟し、神経回路網内に再度組み込まれ、機能も再建された。同様の手法にて、線条体においても 20% 近い再生と機能再建が得られることも示した(Yoshikawa, J Neurosurg 113:835, 2010)。これらは、成体脳での内因性再生機構が広い範囲で残っていることを示している。しかし、神経細胞への分化決定、遊走、樹状突起や軸索進展、新たなシナプス形成など、成体脳内での再生機構は未だに不明である。特に、次項の軸索伸展阻害因子が発現している環境下での成熟過程については、その解明が重要な課題となってきたといえる。

(2) 軸索再生：一方、機能再生には、神経細胞の再生を伴わない神経回路網再構築も重要な役割を担っているとされ、霊長類でも損傷後に周辺領域に機能移転が生じていることも分かっている(Nudo, Science 272:1791, 1996)。しかし、中枢性ミエリンには、Nogo、Mag(myelin-associated glycoprotein)、OMgp (oligodendrocyte myelin glycoprotein) 等の因子が発現しており、成体脳での軸索進展を阻害し、髄鞘化後の軸索成長を阻害し回路網を安定化している(Cao, Mol Cell Neurosci 43:1, 2010)。この中で最も研究が進んでいるのが Nogo であり、ミエリン髄鞘の最内側に発現し、軸索の collateral sprouting を抑制すると同時に、成長円錐の虚脱(軸索伸張停止)を来す(Schwab, Nat Rev Neurosci 11:799, 2010)。過去の研究では、脳虚血後に Nogo 中和抗体を投与することで、対側皮質から赤核への新たな軸索伸張と行動学的改善が得られることが示され(Tsai, Stroke 42:186, 2010)、脳虚血後の機能再建療法へ向けた臨床応用研究が既に始まっている。これらの作用に加え、Nogo は神経細胞にも発現している。胎生期では神経前駆細胞の遊走阻害、神経分化の抑制等

(Mathis, Cereb Cortex 20:2380, 2010)、神経細胞の発生にも何らかの役割を持つことが示唆されている。また、成体脳でも Nogo は成熟神経細胞に発現し、虚血後にその発現が亢進することは示されているが(Cheatwood, Stroke 39:2091, 2008)、その役割は全く解明されていないといっても過言ではない。

神経再生の観点から、上記の 2 つの流れは独立したものではなく、互いに密接な関連をもつ。特に、Nogo を中心とした阻害因子が発現している成体脳内で、如何に再生神経細胞が既存の神経回路網に組み込まれるかについては不明であり、Nogo の作用を阻害する何らかの因子の必要性も想定される。逆に、Nogo の活性を阻害すれば、損傷後の残存神経細胞からの軸索進展のみでなく、再生神経細胞の遊走、分化、樹状突起進展、軸索伸張など、失われた神経機能の直接的再生効果も期待される。

新規 Nogo 受容体阻害因子 Lotus (本学薬理学教室にて、Nogo 受容体に対する新規内因性阻害因子 Lotus) が最近同定された(Sato, Science 333:769, 2011)。Lotus は、嗅索の進展に重要な役割を担う物質として同定され、その後の機能解析にて、Nogo の受容体への結合を阻害する作用が確認され、内因性の阻害因子であることが分かった。その発現に関してはいまだ十分な解析がなされていないが、Allen Institute for Brain Science における遺伝子の発現アトラス(<http://www.brain-map.org/>)からは、成体脳においても比較的広範に発現しているようである。特に海馬における強い発現からは、Nogo 阻害因子として成体脳における可塑性に關与する生理的役割も示唆される。従来は、Nogo の発現の多寡が軸索再生阻害の一つの目安となっていたが、今後は Lotus 発現との関連が重要な課題となり、神経再生研究への新たな展開が始まると思われる。

2. 研究の目的

本研究では、2 つの点から研究を進めた。

(1) 海馬神経新生に及ぼす影響

LOTUS による Nogo-A-NgR1 シグナルに対する拮抗作用が、神経前駆細胞の遊走能に影響を与えるかを明らかにすべく、WT と LOTUS KO マウス新生仔における歯状回門(hilus)の組織学的差異を検討した。

(2) 脳梗塞に対して及ぼす影響

LOTUS が脳梗塞後の機能再建にどのような役割を果たすかを検討するため、過剰発現マウス(Lotus-Tg)と野生型(WT)(C57BL6J/Jcl)に対して intraluminal suture method による中大脳動脈閉塞を行って脳梗塞モデルを作製し、in vivo における内因性 LOTUS の効果について検討を行った。

3. 研究の方法

(1)海馬神経新生に及ぼす影響

Animals: LOTUS heterozygous mice を交配し、その littermates を作成し、PCR で genotyping を行った。

Slice Preparation: littermates を P7、P28 で灌流固定し、20um 厚の脳冠状断連続切片を作成した。歯状回門細胞数計測に Nissl 染色、歯状回門細胞 characterization に SOX2、NeuroD、Prox1 による蛍光免疫染色を行った。

Western Blotting: WT マウスの海馬を P0、P7、P14 で採取し、蛋白を抽出後 Nogo-A、NgR1、LOTUS の経時的な発現量を定量分析した。

(2)脳梗塞に対して及ぼす影響

Tg と WT の両群において、脳梗塞後に長期生存が得られる一方で、神経学的脱落症状が比較的大きく、症状が長期間持続するモデルを作製した(9-11 週齢, 28-34g, 45 分虚血後再灌流, N=9)。虚血負荷後の、脳幹から上位頸髄に至る組織内の LOTUS の発現変動を Western Blot 法で解析した。また、神経症状を Bederson's neurological score を用いて虚血負荷後 16W まで追跡し、最終的に、Biotinylated dextran amine (BDA)を用いて健常側運動線維回路の順行標識を行い、患側への線維投射について評価を行った。また同時に、Nissl 染色で、虚血負荷後の脳萎縮の体積評価を行った。

4. 研究成果

(1)海馬神経新生に及ぼす影響

WT、KO ともに、P28 の歯状回門の顆粒細胞層が明瞭に形成され、その平均厚は suprablade、infrablade 共に、両群で有意差が認められなかった。

一方、P7 では、両群ともに顆粒細胞層の形成が不明瞭だが、KO で歯状回門に細胞がより散逸していた。P7 の歯状回門における細胞の散らばりを定量化するため、顆粒細胞層の外縁から「P28 顆粒細胞層平均厚 + 1SD」の距離を結んだ線と、海馬 CA3 層の外側縁で囲まれた領域を、P7 における歯状回門細胞数計測範囲に設定し、その細胞密度を比較したところ、KO で有意に高かった。即ち、KO では歯状回門の細胞が生後早期においてより散逸していたが、成長と共に WT と KO の差が消失しており、このことから、LOTUS が欠損すると発達早期における歯状回門から顆粒細胞層への遊走が遅延すると考えられた。次に、歯状回門に散逸する細胞を同定し、全細胞数に対する比率を計測するため、3 つの神経分化マーカー、即ち神経幹細胞の SOX2、神経前駆細胞の NeuroD、成熟顆粒細胞の Prox1、によって染色される細胞数と、総細胞数(核染)から陽性細胞率を同様に計測した。結果は、両群においていずれのマーカーの陽性細胞率にも有意差は認められなかった。即ち、LOTUS は神経の分化には影響せず、遊走能のみ関与していることが示唆された。

一方、発達に伴う ligand、receptor、antagonist の発現変動を WT マウスで検討したところ、Nogo-A も LOTUS も出生後は微量ながら P7 で急激に増加、一方 NgR1 は出生直後より発現が高く P14 で低下していた。

これらより、出生後 LOTUS は Nogo-A と同期して発現が増加し、Nogo-A-NgR1 シグナルによる神経前駆細胞遊走阻害効果を減弱させ、分化した前駆細胞による顆粒細胞層形成を適切なタイミングで導くことが示唆された。今後、歯状回神経前駆細胞の遊走遅延が、Nogo-A-NgR1 シグナルによるものかを実証するために、NgR1 KO、LOTUS/NgR1 double KO マウスにおいても歯状回門の形態学的検討を行い、同部位に散逸する細胞上に、どのような分布で上記 3 つのタンパクが発現しているかを、in-situ hybridization にて明らかにする予定である。現在投稿準備中である。

(2)脳梗塞に対して及ぼす影響

両群で、脳萎縮の程度に差は認めなかった。脳組織内の LOTUS は、経過を通じて Tg 群で発現量が多かった。また、何れにおいても虚血後慢性期で LOTUS の発現は増加し、中でも患側の 6W 後が顕著であった。神経症状については、虚血負荷後より両群で同等の回復傾向を示したが、WT 群では 4W 後より回復傾向が緩徐となる一方で、Tg 群では回復傾向を維持した。16W 後までの追跡を解析すると、Tg 群で有意に回復が得られる結果であった。BDA による運動線維の順行性回路標識では、下部延髄における健側皮質脊髓路から対側(患側)外側網様体核への投射と、脊髄 C4 レベルにおける健側の背側皮質脊髓路から対側(患側)灰白質への線維について評価を行った。Preliminary data (N=3)ではあるが、両回路の評価で Tg 群の神経線維数が多い傾向を認めている。その傾向は、特に前者において顕著であった。

脳虚血後の慢性期において、組織内の LOTUS の発現が、特に健側において増加していることが示された。また、神経症状の比較において、Tg 群で、梗塞後の回復傾向が慢性期においても良好に維持された。以上より、NgR1 シグナルカスケードの阻害が、脳虚血慢性期においても機能回復に有効であることが確認され、その点において内因性の LOTUS が機能することが示された。その機序として、健側錐体外路系の代償機構発達による機能回復促進が示唆された。

脳虚血後急性期は、脳内の分子動態が非常に複雑で、かつ、個々においてその程度バランスが異なるため、実際的な保護療法の開発が困難を極めている。一方で、慢性期には脳は定常状態にあるが、中枢神経系の可塑性が乏しいが故に治療期間としては不適切と考えられてきた。しかしながら、本研究では、近年の研究結果同様、脳損傷後も神経細胞は可塑性を有しており、機能回復の余地が存在することが示された。今後、NgR1 シグナルを

ターゲットとした治療法開発を検討する場合、外来投与の選択肢としては、LOTUS は内因性因子であるため機能阻害抗体より現実的と考えられる。しかしながら、本研究では、行動解析の正確性の点で劣る mouse を対象としているため、まずは rat における精査が必要と思われる。更に、ヒトへの転用を考慮した場合、元々外路系の発達が良好な齧歯類よりむしろ、将来的には non human primate を用いた精査が適当と考えられる。現在投稿準備中である

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 17 件)

川原信隆: 脳虚血後の神経再生—前脳虚血モデルでの検討—。脳卒中 36:216-219, 2014, 査読無

川原信隆: 脳梗塞の治療—急性期治療—外科治療。最新診療脳卒中学—下—最新の診断と治療、日本臨床 72(増刊号 7):69-73, 2014, 査読無

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, 2014, 査読有,

DOI: 10.1001/jamaneurol.2014.3613

Kurihara, Y., Iketani, M., Ito, H., Nishiyama, K., Sakakibara, Y., Goshima, and Y. 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, 査読有,

DOI: 10.1016/j.mcn.2014.07.001

Yamashita, N., Usui, H., Nakamura, F., Chen, S., Sasaki, Y., Hida, T., Suto, F., Taniguchi, M., Takei, K., and Goshima, Y. PlexinA4-dependent retrograde Semaphorin3A signaling regulates the dendritic localization of GluA2-containing AMPA receptors. Nature Communications, 5: 3424, 2014, 査読有,

DOI: 10.1038/ncomms4424.

竹居光太郎, 神経再生促進物質 LOTUS の生理機能解析。ブレインサイエンスレビュー—2014, クバプロ, p149-164.2014, 査読無

竹居光太郎, 脳内環境制御による軸索再生: LOTUS による軸索再生。Bio Clinica 28 (13): 43-48, 北隆館, 2013, 査読無

竹居光太郎, 哺乳類中枢神経系の新しい神経回路形成機構: 神経束形成因子 LOTUS の発見。生化学 85: 328-335.2013, 査読無

栗原裕司, 竹居光太郎, LOTUS による神

経回路形成機構。Annual Review 2013 神経 p.63-67, 中外医学社.2103, 査読無

竹居光太郎, 神経回路形成因子 LOTUS の機能。横浜医学 63(4): 635-640.2013, 査読無

Higurashi M, Iketani M, Takei K, Yamashita N, Aoki R, Kawahara N, Goshima Y: Localized role of CRMP1 and CRMP2 in neurite outgrowth and growth cone steering. Dev Neurobiol 72(12):1528-1540, 2012, 査読有

DOI: 10.1002/dneu.22017

Abe K, Yamashita T, Takizawa S, Kuroda S, Kinouchi H, Kawahara N: Stem cell therapy for cerebral ischemia: from basic science to clinical applications. J Cerebral Blood Flow Metab 32:1317-1331, 2012, 査読有, DOI: 10.1038/jcbfm.2011.187

Miyatake S, Miyake N, Touho H, Nishimura-Tadaki A, Kondo Y, Okada I, Tsurusaki Y, Sakai H, Saito H, Shimojima K, Yamamoto T, Higurashi M, Kawahara N, Nagasaka K, Okamoto N, Mori T, Koyano S, Kuroiwa Y, Taguri M, Morita S, Matsubara Y, Kure S, Matsumoto N: Homozygous c.1457G>A variant of RNF213 predicts early-onset and severe form of moyamoya disease. Neurology 78: 803-810, 2012, 査読有,

DOI: 10.1212/WNL.0b013e318249f71f

Iketani, M., Iizuka, A., Sengoku, K., Kurihara, Y., Nakamura, F., Sasaki, Y., Sato, Y., Yamane, M., Matsuhita, M., Nairn, A.C., Takamatsu, K., Goshima, Y., and Takei, K. Regulation of neurite outgrowth mediated by localized phosphorylation of protein translational factor eEF2 in growth cones. Developmental Neurobiology, 73(3): 230-246, 2012, 査読有,

DOI 10.1002/dneu.22058)

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, 査読有

竹居光太郎, 光照射分子不活性化法 (CALI 法)。日本薬理学会雑誌 (Folia Pharmacology Japan) 140: 226-230.2012, 査読無

池谷真澄, 栗原裕司, 佐藤泰史, 五嶋良郎, 竹居光太郎, 内在性 Nogo 受容体アンタゴニスト LOTUS の嗅索形成における生理的役割。実験医学 30(3): 479-482. 2012, 査読無

〔学会発表〕(計5件)

Takase H, Yokoyama T, Takei K, Kawahara N: Overexpressed LOTUS improves functional recovery after brain focal ischemia in mice. 27th International Symposium on Cerebral Blood Flow and Metabolism & 10th International Conference on Quantification of Brain Function with PET, Vancouver(Canada), 2015.6.30

川原信隆: 脳虚血後の神経再生と機能再建. 第10回九州・山口脳循環代謝フォーラム. ホテル日航福岡(福岡), 2013年11月29日, 特別講演

川原信隆: 脳虚血後の神経再生-前脳虚血モデルでの検討. 第38回日本脳卒中学会, グランドプリンスホテル新高輪(東京), 2013年3月23日

川原信隆: 脳虚血と再生に関する研究. Expert Meeting in Kanagawa. ホテルプラム(神奈川), 2011年7月6日, 特別講演

Kawahara N: Intrinsic neurogenesis in cerebral ischemia. 25th International Symposium on Cerebral Blood Flow and Metabolism & 10th International Conference on Quantification of Brain Function with PET, Barcelona(Spain), 2011.5.25, 国際学会教育講演

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川原 信隆(KAWAHARA NOBUTAKA)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号: 60214673

(2) 研究分担者: なし

(3) 連携研究者

竹居 光太郎(TAKEI KOUTAROU)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号: 40202163