

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08289

研究課題名(和文)脳梗塞における神経細胞のLRP1機能変化と治療戦略

研究課題名(英文)Functional changes in LRP1 in neurons after cerebral infarction and therapeutic strategies

研究代表者

高木 教夫(Takagi, Norio)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50318193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は神経細胞でのLRP1が脳梗塞病態で切断され機能不全を引き起こす可能性を提示した。また、このLRP1切断によって細胞内ドメインの著しい増加および細胞外ドメインの減少が引き起こされ、さらに細胞内ドメインが核周辺に局在することを明らかにした。この切断に関わる furin の役割を明らかにするとともに、その阻害薬は濃度依存的にNMDA誘発神経細胞障害を抑制した。これらの結果は furin 阻害薬の神経保護機構の一端を解明し、脳梗塞治療薬開発につながる有益な知見を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳神経では、NMDA受容体を介する神経障害に対して LRP1 は保護効果を発揮せず、その原因として虚血性障害で誘導される LRP1 の切断による機能不全が考えられた。この切断に関わる furin の役割を示すとともに、furin 阻害薬の脳神経保護効果を明らかにした。NMDA 受容体を介する神経障害は様々な中枢神経疾患の病態形成に寄与していることから、LRP1 の機能不全の機序解明は治療困難な中枢神経系疾患に対する治療法開発に有益な波及効果をもたらすものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The present study suggested that LRP1 in neurons was cleaved after cerebral infarction and might lead to brain dysfunction. In addition, it was revealed that this LRP1 cleavage caused a marked increase in the intracellular domain and a decrease in the extracellular domain, and the intracellular domain of LRP1 was localized in the perinuclear region after NMDA treatment. In addition to clarifying the role of furin involved in this cleavage, we also elucidated that furin inhibitor dose-dependently prevented neuronal injury induced by NMDA treatment. These useful findings would contribute to the development of therapeutic agents for cerebral infarction.

研究分野：神経生化学・薬理学

キーワード：脳虚血

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞は、我が国の主たる死因であり、たとえ死に至らぬ場合でも重篤な後遺症(寝たきり原因の第1位)を残してしまい、その克服は医療的、社会的な急務と言える。現在、組織型プラスミノーゲン活性化因子(t-PA)による急性期治療が存在するものの、投与開始時間の制限により、その恩恵を受けられる脳梗塞患者は3%以下と極めて少ない。すなわち、脳梗塞発症後の病態を改善する優れた治療薬・治療法は未だ創出されていないのが現状である。

LDL 受容体ファミリーの1つである LDL receptor-related protein 1 (LRP1)は t-PA と結合するクリアランス受容体としても良く知られる。一方、中枢神経細胞にも豊富に存在する LRP1 は、種々のリガンドと結合し、細胞内情報伝達系を駆動しながら、軸索伸張、海馬長期増強、あるいは興奮性神経毒にも寄与すると報告されている。興味深いことに、LRP1 はグルタミン酸受容体の1つ NMDA 受容体とも機能的に会合しており、中枢高次機能を発揮する上で重要な役割を果たしている。一方で、LRP1 が NMDA 受容体サブユニットの細胞内移行に重要な役割を有していることが近年報告された。虚血性神経細胞障害を誘発する NMDA 受容体の病態生理学的役割を考え合わせると、脳梗塞病態の新たな側面が明らかになる可能性がある。しかし、脳梗塞病態に対する LRP1 の病態生理学的寄与は明らかでなく、その詳細な把握は新規治療標的の創出につながる重要事項であると考えられる。

申請者らは、これまで *in vivo* 病態の把握に基づいた脳梗塞治療薬の探索研究を続けてきている【*Stroke* 26 : 1101 (1995); *Br. J. Pharmacol.*, 118 : 33 (1996); *Exp. Brain Res.*, 114 : 279 (1997); *J. Neurosci. Res.* 68 : 363 (2002); *Br. J. Pharmacol.* 138 : 642 (2003)】。近年では、脳梗塞後のグルタミン酸受容体、とりわけ NMDA 受容体のサブユニットチロシンリン酸化に基づく細胞内情報伝達系の病態生理学的変化を明らかにしてきた【*J. Neurochem.* 69 : 1060 (1997); *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19 : 880 (1999); *J. Neurochem.* 74 : 169 (2000); *J. Neurochem.* 84 : 67 (2003); *J. Neurochem.* 105 : 1625 (2008); *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 29 : 1099 (2009); *J. Neurochem.* 114 : 1711 (2010)】。

一方、網膜神経節細胞の栄養因子除去、過酸化水素添加による酸化ストレスおよび興奮性アミノ酸神経毒に対する LRP1 を介したアポ E 含有リポプロテインの保護効果が明らかとなり、神経細胞における LRP1 の重要性が示唆されている。

以上の背景を踏まえ、脳梗塞後に惹起される LRP1 の病態生理学的変化の把握は現存する脳梗塞治療の課題を克服する有力な基盤研究であると期待した。

2. 研究の目的

LDL 受容体ファミリーに属する LRP1 が神経細胞において種々の生理学的機能を有することが近年明らかになってきたが、脳梗塞後の神経細胞における病態生理学的意義は明らかになっていない。申請者はこれまで、脳梗塞後のグルタミン酸受容体のひとつ NMDA 受容体および脳血管の病態生理学的機能変化を明らかにしてきた。本研究は、LRP1 が NMDA 受容体と会合する点および細胞外ドメインと膜貫通ドメインに分かれる点にも着目し、LRP1 を介した脳梗塞後の神経細胞障害改善効果とその機序を明らかにする。ここで得られる成果は、血栓溶解療法の外に優れた治療薬が極めて少ない脳梗塞、さらには、LRP1 の発現部位や機能等を加味すると、アルツハイマー病、不安・恐怖反応、脊髄における疼痛等の病態把握や治療戦略への応用が期待できる。

3. 研究の方法

(1) 中大脳動脈閉塞モデルの作製と脳梗塞病態の評価

臨床上多く観察される脳血管障害および脳卒中病態を鑑み、本研究ではラット中大脳動脈閉塞・再灌流モデルを用いる。具体的には、5% イソフルラン吸入麻酔薬で麻酔導入し、その後 2.5% イソフルランで術中の麻酔を維持した。頸部正中線を切開し、右総頸動脈、右外頸動脈および右翼突口蓋動脈を周囲結合組織から剥離した。続いて外頸動脈を切開し栓子(先端部約 200 μm)を内頸動脈に向けて約 20 mm 挿入し、中大脳動脈起始部を閉塞した。絹糸で外頸動脈を固定し、麻酔を解除し覚醒させた。閉塞 1 時間後のラットの症状を観察し、歩行時に左側方への力に対する抵抗力が欠如しているラット、あるいは左旋回するラットのみを選出し、中大脳動脈閉塞 90 分後に再度麻酔し、栓子を除去し血液を再灌流させた。再灌流 24 時間後にサンプルとして回収した。

(2) 脳梗塞後の LRP1 の病態生理学的変化の検討

ホモジネートおよび細胞膜画分の LRP1 量の変化を細胞外ドメインおよび膜貫通ドメインについて梗塞領域、梗塞巣周辺領域および非梗塞巣において Western blotting 法および免疫組織学的手法により検証後、*furin* 阻害薬の効果を検討する。

(3) ラット大脳皮質神経細胞の初代培養と神経細胞障害の誘導

胎生 16 日目のラット胎児から大脳皮質を摘出し、常法に従ってラット大脳皮質神経細胞の初代培養を行なった。初代培養後 10 日目に NMDA あるいはグルタミン酸処置を行った。また、培養処置による細胞への障害を考慮するため 10 日目まで同様に培養し NMDA あるいはグルタ

ミン酸処置を行わなかったものを untreated control とした。

(4) Western immunoblotting

既存の方法で目的タンパク質を Western immunoblotting 法で解析した。

(5) 免疫組織・細胞染色

既存の方法で、免疫組織・細胞染色を行い、組織学的検討を行った。

4. 研究成果

神経細胞の脂質の供給はグリア細胞からの輸送に頼っており、中枢神経系ではアポリポタンパク質 E を含むリポタンパク質 (LP) がその中心的役割を担っている。その LP 受容体のひとつである LDL receptor-related protein 1 (LRP1) を介する情報伝達は初代培養網膜神経節細胞における酸化ストレス障害、栄養因子欠乏およびグルタミン酸誘導性神経細胞死に対して保護効果発揮する。しかしながら、脳神経細胞における LRP1 の病態生理学的役割は明らかになっていない。

プロタンパク質転換酵素 (proprotein convertase : PC) は Ca^{2+} 依存性のセリンプロテアーゼであり、不活性なタンパク質前駆体を活性体へと変化させる。Furin は主にトランスゴルジネットワーク (trans Golgi network : TGN) に存在し、特定のアミノ酸配列を標的として切断する。特に、中枢神経系では脳由来神経栄養因子 (brain derived neurotrophic factor : BDNF) や LRP1 の成熟化に関与すると報告されている。しかし、furin の脳血管疾患での役割は明らかになっていない。

そこで LRP1 および furin に着目し、それらの病態生理学的意義を検討することとした。まずはじめに、初代培養大脳皮質神経細胞およびラット脳梗塞モデルでの LRP1 を介した神経保護効果および虚血性神経障害時の LRP1 の変化について検討した。次に、虚血性神経障害時の LRP1 の変化に対する furin の役割を検討し、最後に furin 阻害薬の虚血性神経障害に対する効果を検討した。

(1) 中枢神経系神経伝達物質のグルタミン酸は、虚血などにより細胞間隙に大量放出されると興奮性の神経障害を誘導する。イオンチャネル共役型グルタミン酸受容体の中でも N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体は脳虚血などの急性神経疾患の細胞死にも寄与している。LP の結合による LRP1 の活性化が、網膜神経節細胞の細胞死に対し保護効果を発揮することを報告されている。そこで脳梗塞病態時の神経障害に対する LRP1 を介する神経保護効果を、初代培養大脳皮質神経細胞およびラット脳梗塞モデルを用いて検討した。その結果、初代培養大脳皮質神経細胞の NMDA 誘発神経細胞障害に対して、LP は保護効果を示さなかった。そこで LRP1 の変化を検討した結果、細胞外ドメインである α -chain が減少し、細胞内ドメイン (intracellular domain : ICD) が著しく増加していた。また、蛍光免疫染色法で局在を検討した結果、NMDA 障害によって α -chain は神経突起上で観察されなくなり、ICD は核の周辺に集積する傾向が観察された。

(2) 次に、ラット脳梗塞モデルを用いて in vivo での LRP1 の変化を検討した結果、脳梗塞領域の LRP1 α -chain は非梗塞領域と比較して減少し、その一方で ICD は著しく増加していた。本研究の in vitro および in vivo の結果より、脳神経では、視神経で観察されたような LRP1 による保護効果は観察されず、その原因として虚血性障害で誘導される LRP1 の切断による機能不全が考えられた。NMDA 受容体を介する神経障害は様々な中枢神経疾患の病態形成に寄与していることから、LRP1 の機能不全の機序解明は治療困難な中枢神経系疾患に対する治療法開発に有益な波及効果をもたらすものと考えられる。

(3) LRP1 は前駆体タンパク質として合成され、TGN で furin によって、リガンド結合ドメインを持つ α -chain と、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン (ICD) を含む β -chain に切断され、これらは共有結合し膜 1 回貫通型受容体として膜上で機能する。成熟した LRP1 は matrix metalloproteinase (MMP) や γ -secretase および furin などの酵素によってさらに切断され α -chain の遊離および ICD の産生が誘導される。次に、LRP1 の切断に関わる因子および切断後の LRP1 の局在変化を明らかにすることを目的とした。

NMDA による神経障害はカルシウム依存性であるため、NMDA 処置による培養神経細胞の LRP1 の変化と、それに対するカルシウム依存性タンパク質分解酵素である calpain の阻害薬の効果を検討した。その結果、NMDA 処置後の LRP1 の変化は calpain 阻害薬の影響を受けなかった。次に、NMDA 処置による LRP1 の切断機序を明らかにするために、furin、MMP および γ -secretase 阻害薬の影響を解析した結果、furin 阻害薬が NMDA 処置後の α -chain の減少と ICD の産生を抑制した。蛍光免疫染色の結果も同様に、NMDA 処置による LRP1 の局在変化が furin 阻害薬によって抑制されることを示した。また、脳梗塞モデルの免疫組織染色の結果から、初代培養細胞と同様に LRP1 ICD が TGN に局在することが示された。

本研究は脳梗塞後のリポタンパク質受容体の病態学的変化を明らかにし、特に NMDA 障害後の神経細胞の LRP1 および furin の神経生存に関わる役割を示した。今後、LRP1 ICD の病態生

理的役割や furin の in vivo での機能を解明することで、新たな脳梗塞治療薬の開発に貢献できると考えられた。

(4)Ca²⁺ 依存性システインプロテアーゼである calpain は、通常時は基質の限定分解により細胞機能や細胞骨格形態を調節するが、虚血性神経障害時の Ca²⁺ 過剰流入によって活性化されると下流の細胞障害経路が誘発され細胞死を誘導する。

本研究ではこれまでに LRP1 が神経細胞の生存維持に重要な因子であり、その機能不全が NMDA 誘発神経細胞障害につながる可能性を示唆してきた。そこで、LRP1 の切断を抑制することで神経細胞死を抑制できる可能性が考えられるため、虚血性脳血管障害に対する furin 阻害薬の効果を検討した。その結果、furin 阻害薬は NMDA 誘発神経細胞生存率の低下を濃度依存的に抑制した。一方、 α -secretase 阻害薬および MMP 阻害薬は NMDA 誘発細胞障害に対し、なんら抑制効果を示さなかった。さらに NMDA 障害による calpain 活性化に対する furin 阻害薬の影響を検討した結果、furin 阻害薬は calpain 活性を抑制した。これらのことから、furin 阻害薬が calpain 活性を抑制することにより NMDA 障害に対し、保護効果を発揮する可能性が明らかとなった。

本研究は神経細胞での LRP1 が脳梗塞病態で切断され機能不全を引き起こす可能性を提示した。また、この LRP1 切断によって細胞内ドメインの著しい増加および細胞外ドメインの減少が引き起こされ、さらに細胞内ドメインが核周辺に局在することを明らかにした。この切断に関わる furin の役割を明らかにするとともに、furin 阻害薬の神経保護機構の一端を解明し、脳梗塞治療薬開発につながる有益な知見を見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamada Mariko, Hayashi Hideki, Suzuki Kaori, Sato Shoko, Inoue Daisuke, Iwatani Yui, Ohata Meiko, Yuan Bo, Takagi Norio	4. 巻 9
2. 論文標題 Furin-mediated cleavage of LRP1 and increase in ICD of LRP1 after cerebral ischemia and after exposure of cultured neurons to NMDA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-48279-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Mariko, Hayashi Hideki, Yuuki Moe, Matsushima Nahoko, Yuan Bo, Takagi Norio	4. 巻 8
2. 論文標題 Furin inhibitor protects against neuronal cell death induced by activated NMDA receptors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5212-5220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-23567-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 岩谷結衣、山田まりこ、鈴木かおり、林秀樹、高木教夫
2. 発表標題 虚血性脳神経障害によるLRP1切断と細胞内ドメインの産生
3. 学会等名 第93回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mariko Yamada, Hideki Hayashi, Yui Iwatani, Kaori Suzuki, Bo Yuan, Norio Takagi
2. 発表標題 A possible neuroprotective mechanism of preventing LRP1 cleavage after ischemic brain damage
3. 学会等名 59th International Conference on the Bioscience of Lipids (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mariko Yamada, Hideki Hayashi, Yui Iwatani, Kaori Suzuki, Bo Yuan, Norio Takagi
2. 発表標題 Furin inhibitors protect central nervous system neurons from ischemic damage
3. 学会等名 WCP 2018, 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今村唯、堀之北一朗、林 秀樹、高木 教夫
2. 発表標題 虚血性脳神経障害時のLRP1プロセッシングと神経細胞死の関連
3. 学会等名 第140回 日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩谷結衣, 山田まりこ, 鈴木かおり, 林秀樹, 高木教夫
2. 発表標題 虚血性脳神経障害によるLRP1切断と細胞内ドメインの産生
3. 学会等名 第93回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田 まりこ、林 秀樹、井上 大輔、大畑 芽衣子、松嶋 菜穂子、袁 博、高木 教夫
2. 発表標題 虚血性神経障害時の LRP1 プロセッシングと神経生存
3. 学会等名 第60回日本脂質生化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. Yamada, H. Hayashi, M. Ichianagi, Y. Imamura, B. Yuan, N. Takagi
2. 発表標題 Effects of furin inhibitors on excitotoxic neuronal damage
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田まりこ, 林秀樹, 岩谷結衣, 鈴木かおり, 袁博, 高木教夫
2. 発表標題 虚血性神経障害時の LRP1 の変化と神経保護の可能性
3. 学会等名 日本薬学会 第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mariko Yamada, Hideki Hayashi, Nahoko Matsushima, Meiko Ohata, Bo Yuan, Norio Takagi
2. 発表標題 Pathologic roles of proteolytic enzymes associated with receptor processing
3. 学会等名 Neuroscience 2017, Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山田 まりこ、佐藤 祥子、結城 もえ、袁 博、林 秀樹、高木 教夫
2. 発表標題 初代培養大脳皮質神経細胞障害時の LRP1 の変化とリポプロテイン による神経保護への可能性
3. 学会等名 第59回 日本脂質生化学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山田 まりこ、林 秀樹、井上大輔、岩谷結衣、鈴木かおり、袁 博、高木 教夫
2. 発表標題 中枢神経細胞障害時の LRP1 プロセッシングに関わるタンパク質分解酵素と神経生存
3. 学会等名 第90回 日本生化学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岩谷結衣、鈴木かおり、山田まりこ、林 秀樹、袁 博、高木教夫
2. 発表標題 初代培養大脳皮質神経細胞障害時のproprotein convertasesの役割に関する研究
3. 学会等名 第138回 日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山田まりこ、林 秀樹、岩谷結衣、鈴木かおり、袁 博、高木 教夫
2. 発表標題 虚血性神経障害時のLRP1の変化と神経保護の可能性
3. 学会等名 日本薬学会 第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩谷結衣、山田まりこ、鈴木かおり、林秀樹、高木教夫
2. 発表標題 虚血性脳神経障害によるLRP1切断と細胞内ドメインの産生
3. 学会等名 第93回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mariko Yamada, Hideki Hayashi, Yui Iwatani, Kaori Suzuki, Bo Yuan, Norio Takagi
2. 発表標題 Furin inhibitors protect central nervous system neurons from ischemic damage
3. 学会等名 WCP 2018, 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mariko Yamada, Hideki Hayashi, Yui Iwatani, Kaori Suzuki, Bo Yuan, Norio Takagi
2. 発表標題 A possible neuroprotective mechanism of preventing LRP1 cleavage after ischemic brain damage
3. 学会等名 59th International Conference on the Bioscience of Lipids (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>応用生化学教室 研究室の業績 https://www.ps.toyaku.ac.jp/ouyoseika/publications</p>
--

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
連携研究者	林 秀樹 (Hayashi Hideki) (90508657)	東京薬科大学・薬学部・講師 (32659)	