

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460103

研究課題名(和文) GPNMBの受容体同定および高次脳機能に及ぼす影響に関する研究

研究課題名(英文) Identification of glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B (GPNMB) receptor and effect of GPNMB in higher brain function

研究代表者

原 英彰 (Hara, Hideaki)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20381717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、GPNMBの記憶に対する作用、およびGPNMB細胞外断片の受容体同定に関する検討を行うことで、GPNMB関連疾患の新規治療法の開発へと繋げることを目的としている。

GPNMBは総GluA1およびリン酸化GluA1を増加させることで海馬依存的な記憶の増強作用を示した。また、GPNMB細胞外断片はNa<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATPase (NKA) 1およびNKA 3に結合し、PI3K/Akt経路およびMEK/ERK経路を活性化させたため、NKA 1および3サブユニットがGPNMB細胞外断片の受容体のような働きをすることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to lead to development of effective novel treatment for GPNMB related diseases by investigating whether GPNMB affects to memory and by identifying of novel GPNMB extracellular fragment receptors.

We found that GPNMB promoted hippocampus-dependent memory by increasing expression levels of total GluA1 proteins and phosphorylated GluA1 proteins. Moreover, we also found that GPNMB extracellular fragment bound to Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase (NKA) 1 and NKA 3 and activated PI3K/Akt pathway and MEK/ERK pathway via NKA 1 and 3. Therefore, it was suggested that NKA 1 and 3 work as a novel GPNMB extracellular fragment receptor.

研究分野：神経化学、眼科学、薬理学

キーワード：GPNMB 記憶 GluA1 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase PI3K/Akt経路 MEK/ERK経路

## 1. 研究開始当初の背景

Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B (GPNMB)は560または572アミノ酸からなる一回膜貫通型の糖タンパク質である。GPNMBは癌細胞の増殖性および転移性に関係があり、乳がんやグリオーマ、肝細胞がんなど様々ながん疾患で認められている(参考文献1-4)。更に、我々は筋萎縮性側索硬化症(Amyotrophic Lateral Sclerosis; ALS)モデル動物脊髄を用いたDNAマイクロアレイ法による新規病態関連因子の網羅的な解析を行い、ALS発症により発現変動する因子としてGPNMBを同定し、その神経保護因子としての可能性を世界に先駆けて提唱した(参考文献5;特願2010-252476)。しかしながら、GPNMBがどのような分子機構でALS病態を改善したかは未だ不明のままである。過去の報告より、GPNMBは $\alpha$ -セクレターゼ切断を受けることで、細胞外および血中へ放出されること、更に、GPNMB細胞外断片はMAPKのリン酸化を更新することが明らかにされている。実際に、我々はGPNMB細胞外断片を細胞に添加することにより、AktおよびERK1/2のリン酸化レベルの上昇を確認している。

更に、GPNMBが記憶や感情を司る脳部位である海馬や大脳皮質に神経に発現していることが報告されている(参考文献6)。このことから、脳に内在的に存在しているGPNMBが脳の高次機能に何らかの影響を与えている可能性が示唆されている。我々は、GPNMB細胞外断片のマウス脳室内投与により、マウスの記憶能力が増強されたことや、海馬におけるGluR1のタンパク質レベルでの発現上昇を確認している。これらの知見より、GPNMBの中樞に対する影響は大きく、GPNMB細胞外断片が神経細胞に発現する受容体を介して、細胞内シグナルを調節している可能性が推測される。

## 〔参考文献〕

1. Weterman M.A., et al. *Int J Cancer*, 1995, 60, 73-81.
2. Rose A.A., et al. *Mol Cancer Res*, 2007, 5, 1001-1014.
3. Kuan C.T., et al. *Clin Cancer Res*, 2006, 12, 1970-1982.
4. Rich J.N., et al., *J Biol Chem*, 2003, 278, 15951-15957.
5. Tanaka H., et al. *Sci Rep*, 2012, 2, 573.
6. Huang J.J., et al. *Brain Behav*, 2012, 2(2), 85-96.

## 2. 研究の目的

本研究の目的はGPNMBの記憶保持に対する分子機構を解明すること、およびGPNMB細胞外に親和性を示す受容体を同定することで、神経難病である筋萎縮性側索硬化症(Amyotrophic lateral sclerosis; ALS)や認知症、さらに癌に代表されるGPNMB関連疾患の有効な新規治療法の開発に貢献することである。

## 3. 研究の方法

### (1) モリス水迷路試験

遺伝子操作により脳内のGPNMBを高発現させたマウスを用いて、試験は前訓練試行、訓練試行およびプローブ試行の3部に分けて行った。前訓練試行ではマウスを試験装置の中央部の水面に放ち、60秒間泳がせた。マウスに対し訓練試行を1日4回連続5日間(計20試行)行った。6日目にプラットホームを取り除き、プローブ試行を行った。

### (2) 新規物体認識試験

試験は前訓練試行、訓練試行および保持試行の3部に分けて行った。前訓練試行では測定用ケージにマウスを15分間入れ、ケージに慣れさせた。その後、マウスを一度ケージから出し、2つのブロックを左右対称の位置に置き、訓練試行を10分間行った。24時間後に、一方のブロックを新規ブロックに変え保持試行を10分間行った。

### (3) 受動回避試験

試験は前訓練試行、獲得試行および保持試行

の3部に分けて行った。前訓練試行では、実験装置の2室間にあるドアを閉じた状態でマウスを明室に入れた。その後ドアを開け、マウスが後肢まで完全に暗室に入ったらドアを閉めた。翌日の獲得試行では、ドアを閉じた状態でマウスを明室に入れた。30秒後ドアを開け、マウスが後肢まで完全に暗室に入ったらドアを閉めた。その3秒後にマウスに電気刺激(0.25mA, 2秒間)を負荷した。電気刺激の30秒後にマウスを暗室から取り出し、飼育ケージに戻した。獲得試行の24時間後に保持試行を行った。ドアを閉じた状態でマウスを明室に入れた。30秒間明室に順化させた後、ドアを開けマウスが後肢まで完全に暗室に入るまでの時間を測定した。

#### (4) 電気生理学的検討

マウスの海馬スライスを作成し、記録チャンバーに入れ34の人工脳脊髄液(ACSF)を2ml/minの流速で浸した。双極刺激電極をSchaffer側枝に置き、記録電極をCA1野の放射状層において、ガラス電極により0.05Hzのテスト刺激を負荷した。反応は増幅器を使用して記録し、興奮性シナプス後場電位の立ち上がり相の傾きの最大値は1分毎に3回の平均値を記録した。安定な規定値が得られたら100Hzで1秒間の高周波刺激を10秒間隔で負荷した。

#### (5) 受容体同定試験

受容体高発現臓器(全脳)より膜タンパク質ライブラリを調製し、BLOTCHIPディファレンシャル解析により標的受容体を探索し、LC-ESI-MS/MS解析により受容体を同定する。その後、リガンドとの結合・親和性試験および下流シグナルの探索を行った。

## 4. 研究成果

(1) GPNMBの記憶保持に対する分子機構の解明に関する検討において、遺伝子操作によ

り脳内のGPNMBを高発現させたマウス(Tgマウス)を用いて記憶に関する行動薬理的試験、モリス水迷路試験、新規物体認識試験、受動回避試験を行った(図1)。モリス水迷路試験ではTgマウスは野性型(WT)マウスと比較し、プラットホームエリアでの滞在時間が増加した。新規物体認識試験ではTgマウスはWTマウスと比較し、保持試行での新規物体への接触時間が増加した。受動回避試験ではTgマウスはWTマウスと比較し、暗室への侵入頻度が減少した。以上の行動薬理学試験から、Tgマウスは記憶保持が促進されていることが示され、GPNMBが記憶保持促進作用を示すことが示唆された。

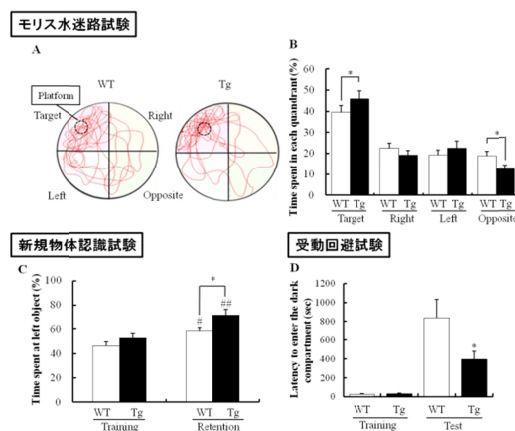


図1 記憶に関する行動薬理的試験

更に、電気生理学的検討により海馬におけるGPNMBの長期シナプス可塑性に対する影響を調べた。TgマウスはWTマウスと比較し、長期増強(LTP)が増加していたことより、GPNMBの記憶保持作用は海馬依存的事であることが示唆された(図2)。

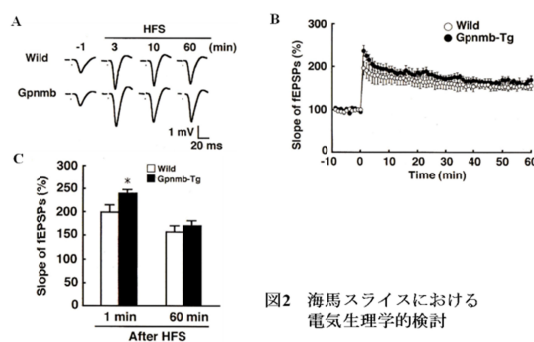


図2 海馬スライスにおける電気生理学的検討

続いて、GPNMB の記憶保持促進作用の分子機構解明の検討を行った。記憶機能に關与するグルタミン酸受容体に着目したところ、Tg マウスは WT マウスと比較し、海馬領域の神経細胞に発現する AMPA 受容体サブユニットである総 GluA1 およびリン酸化 GluA1 のタンパク質発現量が増加していた。更に、リン酸化 CaMK2 およびリン酸化 GSK3 $\beta$  のタンパク質発現量も増加していた (図 3)。

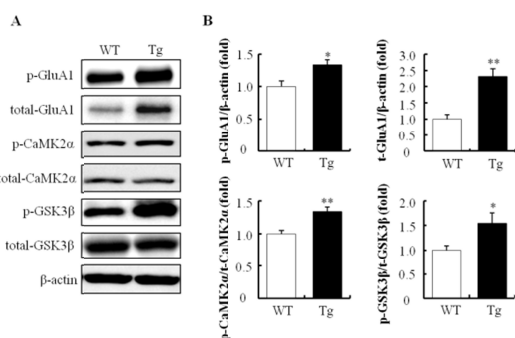


図3 GPNMBの記憶保持促進作用の分子機構解明の検討

以上のことより、GPNMB は AMPA 受容体の機能や発現を選別的に促進することにより記憶保持促進作用を示すことが示唆された。

(2) GPNMB 細胞外断片の受容体同定に関する検討において、受容体高発現臓器 (全脳) より膜タンパク質ライブラリを調製し、BLOTCHIP ディファレンシャル解析により標的受容体の網羅的な探索を行い、LC-ESI-MS/MS 解析により受容体候補となるタンパク質を同定した。この網羅的な受容体解析の結果、Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase (NKA)  $\alpha$ 1 および NKA  $\alpha$ 3 が GPNMB 細胞外断片の受容体候補タンパク質として同定された (表 1)。

| MALDI-TOF-MS Assay |               |              |   |
|--------------------|---------------|--------------|---|
| Gel No.            | Accession No. | MASDOT SCORE | Protein Name  |
| No. ①              | gill12363107  | 58.9         | neurofilament medium polypeptide                                      |
| No. ②              | DASA_MOUSE    | 229          | succinate dehydrogenase flavoprotein subunit, mitochondrial precursor |
| No. ③              | VDAC_MOUSE    | 36           | Voltage-dependent anion-selective channel protein 1                   |
| LC-FT-MS Assay     |               |              |   |
| Gel No.            | Accession No. | MASDOT SCORE | Protein Name  |
| No. ①              | AT1A3_MOUSE   | 4196         | Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase subunit alpha-3              |
| No. ②              | AT2A1_MOUSE   | 2855         | Sarcolemmal endoplasmic reticulum calcium ATPase1                     |
| No. ③              | AT1A1_MOUSE   | 2478         | Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase subunit alpha-1              |
| No. ④              | DASA_MOUSE    | 5933         | succinate dehydrogenase flavoprotein subunit, mitochondrial precursor |
| No. ⑤              | CMC1_MOUSE    | 2458         | Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1                 |
| No. ⑥              | VATA_MOUSE    | 638          | V-type proton ATPase catalytic subunit A                              |
| No. ⑦              | VDAC1_MOUSE   | 2069         | Voltage-dependent anion-selective channel protein 1                   |
| No. ⑧              | VDAC2_MOUSE   | 922          | Voltage-dependent anion-selective channel protein 2                   |
| No. ⑨              | VDAC_MOUSE    | 799          | Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1              |

表1 受容体同定試験

続いて、運動神経様細胞 NSC-34 細胞において、実際に GPNMB 細胞外断片が NKA  $\alpha$ 1 および NKA  $\alpha$ 3 と結合するか否かの検討を行ったところ、内因性 GPNMB の細胞外断片および外因性 GPNMB の細胞外断片がともに NKA  $\alpha$ 1 および NKA  $\alpha$ 3 と結合する結果が得られた (図 4)。

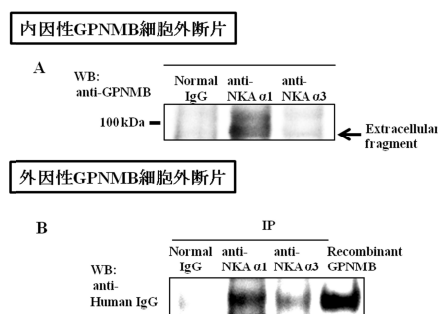


図4 運動神経様細胞NSC-34細胞におけるGPNMB細胞外断片とNKA $\alpha$ サブユニットの結合試験

そこで、GPNMB 細胞外断片が NKA  $\alpha$  サブユニットを介して、神経保護作用を示すか否かの検討を行ったところ、NKA 阻害剤および siRNA による NKA  $\alpha$ 1 の発現抑制により GPNMB 細胞外断片の神経保護作用が抑制された (図 5)。

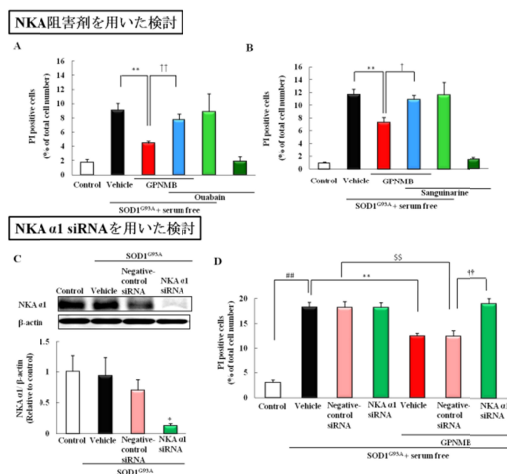
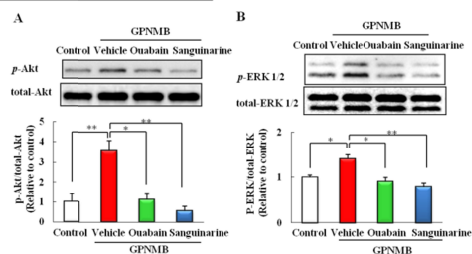


図5 NKA  $\alpha$ サブユニットを介したGPNMB細胞外断片の保護作用の検討

更に、GPNMB 細胞外断片が NKA  $\alpha$  サブユニットを介して PI3K/Akt 経路および MEK/ERK 経路を活性化するか否かの検討を行ったところ、GPNMB 細胞外断片による Akt および ERK1/2 のリン酸化レベルの上昇が

NKA 阻害剤および siRNA による NKA  $\alpha 1$  の発現抑制により抑制された (図 6)。

**NKA阻害剤を用いた検討**



**NKA  $\alpha 1$  siRNAを用いた検討**

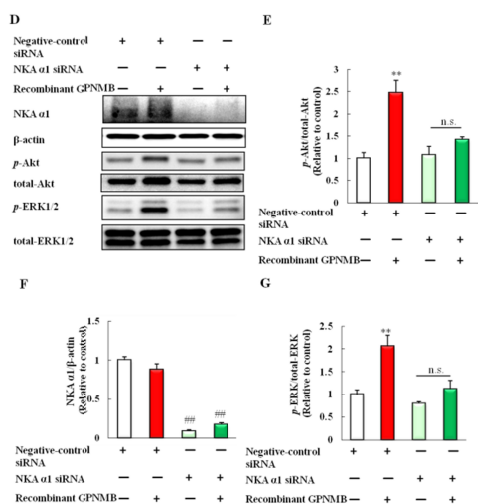


図6 NKA  $\alpha$ サブユニットを介したGPNMB細胞外断片のPI3K/Akt経路およびMEK/ERK経路の活性化に関する検討

以上の結果より、GPNMB細胞外断片はNKA  $\alpha$ サブユニットを介してPI3K/Akt経路およびMEK/ERK経路を活性化することにより神経保護作用を示すことが示唆され、NKA  $\alpha$ サブユニットがGPNMB細胞外断片の受容体のような働きを示すことが示唆された。

以上、(1)および(2)の検討結果より、ALSや認知症、さらに癌に代表されるGPNMB関連疾患の有効な新規治療法の開発に貢献する結果が得られた。

**5. 主な発表論文等**

〔雑誌論文〕(計3件)

Ono Y., Turuma K., Takata M., Shimazawa M. and Hara H. Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B extracellular fragment shows

neuroprotective effects and activates the PI3K/Akt and MEK/ERK pathways via the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Scientific Reports*, 2016, 6, 23241. 査読有り。

Nakano Y., Suzuki Y., Takagi T., Kitashoji A., Ono Y., Tsuruma K., Yoshimura S., Shimazawa M., Iwama T. and Hara H. Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B (GPNMB) as novel neuroprotective factor in cerebral ischemia reperfusion injury. *Neuroscience*, 2014, 277, 123-131. 査読有り。

Murata K., Yoshino Y., Tsuruma K., Moriguchi S., Oyagi A., Tanaka H., Ishisaka M., Shimazawa M., Fukunaga K. and Hara H. The extracellular fragment of GPNMB improves memory and increases hippocampal GluA1 levels in mice. *Journal of Neurochemistry*, 2014, 132, 583-594. 査読有り。

〔学会発表〕(計7件)

小野陽子、高田真史、鶴間一寛、嶋澤雅光、原英彰

GPNMB 細胞外フラグメントの新規受容体探索に関する研究

第127回日本薬理学会近畿部会

2015年6月26日

岐阜

長原悠樹、大内一輝、小野陽子、鶴間一寛、嶋澤雅光、原英彰

膜貫通糖タンパク質GPNMBは変異TDP-43誘発運動神経細胞死を抑制する

第88回日本薬理学会年会

2015年3月18日-20日

愛知・名古屋

中野雄介、鈴木悠起也、高木俊範、北庄司輝、小野陽子、鶴間一寛、嶋澤雅光、原英彰  
脳虚血における膜貫通糖タンパク質GPNMBの役割

第126回日本薬理学会近畿部会

2014年10月24日

和歌山

小野陽子、鶴間一寛、嶋澤雅光、原英彰

GPNMB 細胞外フラグメントの新規受容体としての Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase の同定

心血管膜輸送研究会 2014

2014年9月04日-05日

愛知・岡崎

Hara H., Yoshino Y., Murata K., Tsuruma K., Oyagi A., Moriguchi S., Tanaka H., Shimazawa M. and Fukunaga K. Extracellular fragment of GPNMB enhances memory and learning ability by increasing AMPA receptor subunit GluA1 protein level in mouse hippocampus.

17<sup>th</sup> World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2014).

2014年7月13日-18日.

Cape Town, South Africa.

Ono Y., Tanaka H., Takata M., Tsuruma K., Shimazawa M. and Hara H. Extracellular fragment of GPNMB has protective effects via Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase against SOD1(G93A) and serum free stress-induced cell death.

17th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2014).

2014年7月13日-18日.

Cape Town, South Africa.

Nagahara Y., Tanaka H., Tsuruma K., Ono Y., Noda Y., Nikawa T., Shimazawa M. and Hara H. GPNMB resists skeletal muscle lesion in the SOD1(G93A) Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. 17th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2014).

2014年7月13日-18日.

Cape Town, South Africa.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

## 6.研究組織

### (1)研究代表者

原 英彰 (HARA Hideaki)

岐阜薬科大学 薬学部 教授

研究者番号：20381717

### (2)研究分担者

鶴間 一寛 (TSURUMA Kazuhiro)

岐阜薬科大学 薬学部 講師

研究者番号：50524980

### (3)連携研究者

青木 正志

東北大学 医学系研究科 教授

研究者番号：70302148