

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26290024

研究課題名(和文) 神経回路形成因子 LOTUS による神経再生促進法の開発

研究課題名(英文) Development of therapy methodology for neuronal regeneration 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) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、神経回路形成因子LOTUSの生理機能を利用した神経再生治療法の創成を目的とする。LOTUSの細胞機能としては、LOTUSはNogo受容体の5種のリガンド分子により惹起される神経突起伸長阻害に対して完全な拮抗作用を有することが判明した。また、脊髄損傷モデル動物におけるLOTUSの機能としては、げっ歯類が有する脊髄損傷後の自発的な神経再生能がLOTUS遺伝子欠損マウスでは殆ど見られず、逆にLOTUS過剰発現マウスは脊髄損傷後の運動機能回復が野生型マウスに比して有意に上昇していたことから、LOTUSは神経再生の内在性促進物質であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：After spinal cord injury (SCI), primates hardly recover the locomotor function, and the basic therapy has not been established. However, rodents, such as mice and rats, show a partial spontaneous recovery of the locomotor function. It has been considered that limitation of neuronal regeneration is mainly caused by axon growth inhibitors and a common receptor of these ligands, Nogo receptor-1 (NgR1). We found LOTUS suppressed axonal growth inhibition induced by interaction between these NgR1 ligands and NgR1. First, we found that lotus-deficient mice showed delayed locomotor functional recovery of behavioral outcome, whereas functional recovery was found in LOTUS-Tg mice overexpressing LOTUS in neurons. These findings suggest that LOTUS may contribute to promotion of functional recovery after SCI.

研究分野：神経科学

キーワード：神経再生 LOTUS Nogo受容体 再生医療技術 脊髄損傷 アンタゴニスト

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らが独自開発した機能的スクリーニング法によって発見した新規の神経回路形成因子 LOTUS は、神経突起伸長を阻む神経再生阻害因子の受容体である Nogo receptor-1 (NgR1) と相互作用し、その作用を抑制することで神経回路形成に使用することが示された (Sato et al., 2011)。

NgR1 は、中枢神経系のミエリン膜に存在する 3 種の再生阻害因子 (Nogo, Myelin-associated glycoprotein: MAG, Oligodendrocyte myelin glycoprotein: OMgp) および免疫グロブリン分泌に関与する Tumor Necrosis Factor (TNF) ファミリーの B リンパ球刺激因子 (B lymphocyte stimulator: BlyS) に共通する受容体で、神経細胞が NgR1 を介してこれらの因子を受容すると神経突起伸長が著しく阻害されることがよく知られている。このことから、NgR1 は、損傷を受けた中枢神経系の再生を困難にする主要因と考えられ、NgR1 の機能制御を目的とした創薬開発が世界中で進められている。しかし、NgR1 機能を特異的に且つ有効に負に制御する拮抗物質 (アンタゴニスト) や抗体の報告は未だに存在しない。その理由は、上述のように、複数種のリガンド分子と結合するため、有効な阻害作用が得られないと考えられている。以上のように、再生阻害因子群は神経細胞上の NgR1 を介し、神経再生を困難にしている。

2. 研究の目的

本研究は、神経回路形成因子 LOTUS とその結合分子 NgR1 の分子間相互作用が織りなす生理機能を利用した新しい再生医療技術の基盤構築を第一の目的とする。

LOTUS は成体の中枢神経系の再生を困難にする主要因として知られる NgR1 と相互作用し、この受容体の内在性拮抗物質として機能することが判明した。そこで、本研究では、内在性 NgR1 拮抗物質である LOTUS の機能を利用した新しい神経再生治療法の創成を目的とし、脊髄損傷モデル動物を用いて LOTUS による治療効果を検討する。また、LOTUS の 3 次元構造を構造生物学的に明らかにし、上記治療効果を飛躍的に促進する “スーパー LOTUS” を開発し、その治療効果をモデル実験系にフィードバックして検証する。

3. 研究の方法

LOTUS 遺伝子欠損 (LOTUS-KO) マウスと LOTUS 過剰発現トランスジェニック (LOTUS-TG) マウスを用いて脊髄損傷モデル動物を作製し、神経損傷に対する LOTUS による改善効果を検討する。これらを比較検討し、遺伝学的背景の違いで LOTUS による再生効果を検証する。次に、野生型マウスを用いた上記モデル動物にお

いて精製 LOTUS (全長または機能ドメインのみ) およびそれらの *lotus* 遺伝子を障害部に導入してこれらの処置効果を検討する。一方、LOTUS の構造生物学的解析を行って LOTUS の機能的構造を原子レベルで明らかにし、超高親和性の変異体 LOTUS を開発する。“スーパー LOTUS” を上記モデル動物実験系にフィードバックし、開発変異体タンパク質による治療効果を検証する。

4. 研究成果

(1) LOTUS の細胞機能

NgR1 は、5 種の再生阻害因子 (Nogo, MAG, OMgp, BlyS, CSPG) に共通する受容体で、LOTUS は、上述の 5 種の阻害因子の内 Nogo と NgR1 の結合を完全にブロックすることは既に判明していた (Sato et al., 2011)。そこで、Nogo 以外の再生阻害因子 MAG, OMgp, BlyS, CSPG による NgR1 機能について詳しく解析したところ、MAG, OMgp, BlyS の 3 種においてはそれらのリガンド分子と NgR1 の結合を LOTUS は完全に阻害した。CSPG においては実験上の困難さから未検討である。更に、これら 4 種のリガンド分子と NgR1 の結合がもたらす神経突起伸長阻害作用について LOTUS が成長円錐崩壊と突起伸長作用において抑制するかどうかを検討したところ、Nogo を含めた 5 種全ての作用を強く抑制することが判明した (Kurihara et al., 2014; Kurihara et al., 2017)。これらより、LOTUS は内在性の強力な NgR1 アンタゴニストであると結論された。

一方、これらの拮抗作用とは全く異なる別の生理作用として、LOTUS は網膜神経節細胞や後根神経節細胞の神経突起伸長を著しく促進することも判明した (Kurihara et al., 投稿準備中)。従って、NgR1 に対する強力な拮抗作用と神経突起伸長作用のこれら双方の LOTUS の機能は、どちらも神経損傷の症状改善・機能回復に奏功すると考えられた。

(2) 脊髄損傷モデル動物における LOTUS の機能

マウスやラットなどの齧歯類では霊長類とは異なって脊髄損傷後に部分的機能回復が見られ、内在的な神経再生能を有することが知られている。そこで、我々は LOTUS-KO マウスを用いて脊髄損傷モデルを作製したところ、齧歯類が本来有する神経再生能が著しく損なわれることが判明した。興味深いことに、損傷後 5 日までは回復能に優れているが、その後は回復能が減衰し回復能を失うことが知られているが、損傷前後において脊髄患部における LOTUS の発現量を経時的に解析すると、損傷後 5 日目までは本来の発現量を維持するが、その後に急激に発現量が減少することが判明し、LOTUS の発現量と神経再生能に相関性が認められた。これらのことが

ら、LOTUS は神経再生能に寄与する内在性物質であることが示された。

以上より LOTUS は神経再生促進物質として機能することが予想されたため、次に神経細胞に LOTUS が過剰発現する LOTUS-TG マウスを作製し、同様の脊髄損傷モデル動物を作製して機能回復について解析したところ、LOTUS-TG マウスは脊髄損傷後の運動機能回復が野生型マウスに比して有意に上昇していることが明らかになった。この結果は、LOTUS は神経再生の内在性促進物質であることを明確に示す (Hirokawa et al., 論文投稿中)。

上述のように、脊髄損傷患部では損傷後に LOTUS の発現が半減することから、LOTUS の人為的補填が神経再生を助長すると考えられる。そこで、LOTUS リコンビナントタンパク質を大量に精製し、損傷患部に徐放剤 Medgel を用いて外来性に投与する処理を行った。精製 LOTUS タンパク質の投与によって LOTUS-TG マウスで見られた機能回復とほぼ同等の有意な運動機能回復が認められた。この機能回復について組織学的、生化学的に解析した。無処理または溶解液投与のコントロール群に比して、LOTUS 投与群では、5-HT (セロトニン) 陽性の Rhapsespinal tact 神経線維の増加や、神経再生線維のマーカー分子である GAP43 が増加していることが判明し、機能回復が裏付けられた。

以上の結果から、LOTUS は NgR1 に対する強力な拮抗作用と神経突起伸長作用という LOTUS の細胞機能を利用した新しい神経再生治療戦略を提言するに至った。しかも、LOTUS は神経回路形成に寄与する内在性物質であることから、外来性に投与する場合を含め、生体に対する毒性や副作用の危惧は極めて少ないと予想されることから、非常に有用な再生医療技術に発展すると期待される。

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 7 件)

- 1) Kurihara, Y., Saito, Y., and Takei, K. Blockade of chondroitin sulfate proteoglycans-induced axonal growth inhibition by LOTUS. *Neuroscience*, (DOI:10.1016/j.neuroscience.2017.05.034) (2017), 査読有.
- 2) Iketani, M., Yokoyama, T., Kurihara, Y., Strittmatter, S.M., Goshima, Y., Kawahara, N., and Takei, K. Axonal branching in lateral olfactory tract is promoted by Nogo signaling. *Scientific Reports*, 6, 39586 (DOI:10.1038/srep39586) (2016), 査読有.

- 3) Ge, X., Ritter, S.Y. Tsang, K., Shi, R., Takei, K., and Aliprantis, A.O. Sex-specific protection of osteoarthritis by deleting cartilage acid protein 1. *PLoS One*, DOI:10.1371/journal.pone.0159157 (2016), 査読有.
- 4) Nagai, J., Kitamura, Y., Owada, K., Yamashita, N., Takei, K., Goshima, Y., Ohshima, T. Crmp4 deletion promotes recovery from spinal cord injury by neuroprotection and limited scar formation. *Scientific Reports*, 5: 8269 (DOI: 10.1038/srep08269) (2015), 査読有.
- 5) Kurihara, Y. and Takei, K. LOTUS, a potent blocker of Nogo receptor causing inhibition of axonal growth. *Neural Regeneration Research*, 10(1): 46-48 (2015), 査読有.
- 6) 竹居光太郎 (2015) 神経回路形成因子 LOTUS の機能に基づく神経系の再生医学的研究. 横浜医学 66: 547-552, 査読無.
- 7) 竹居光太郎 (2015) 軸索再生阻害因子の制御による神経回路形成と神経再生. 脳神経系の再生医学. p85-90, 診断と治療社, 査読無.

〔学会発表〕(計 12 件)

- 1) 竹居光太郎 (2015) 神経回路形成因子 LOTUS の発見と神経再生研究への展開. 第 37 回神経組織培養研究会, 企画シンポジウム「神経科学における新知見発見への道のり」, 招待講演, 霧島グランドホテル (鹿児島県霧島市).
- 2) 川上裕, 栗原裕司, 齋藤優, 竹居光太郎 (2016) 神経回路形成因子 LOTUS の可溶性タンパク質は Nogo 受容体機能を抑制する, 第 38 回神経組織培養研究会, 横浜ランドマークタワー (神奈川県横浜市).
- 3) 栗原裕司, 竹居光太郎, (2016) LOTUS は Nogo により誘起される PirB の軸索伸長阻害を抑制する, 第 59 回日本神経化学会, 福岡国際会議場 (福岡県福岡市).
- 4) 廣川智子, 栗原裕司, 五嶋良郎, 竹居光太郎 (2016) 内在性 Nogo 受容体アンタゴニスト LOTUS による脊髄損傷後の神経再生と機能回復, 第 59 回日本神経化学会, 福岡国際会議場 (福岡県福岡市).
- 5) 栗原裕司, 竹居光太郎 (2016) LOTUS は PirB のアンタゴニストとして機能する, 第 39 回日本神経科学会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
- 6) 川上裕, 栗原裕司, 齋藤優, 中川良太, 竹居光太郎 (2016) 可溶性 LOTUS は Nogo 受容体機能を抑制する, 第 39 回日本神経科学会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).

- 7) 廣川智子, 栗原裕司, 五嶋良郎, 竹居光太郎 (2016) 内在性 Nogo 受容体アンタゴニスト LOTUS は脊髄損傷後の機能回復能に寄与する, 第39回日本神経科学会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
- 8) 高瀬創, 横山高玲, 栗原裕司, 竹居光太郎, 川原信隆 (2015) 内在性 Nogo 受容体阻害因子 LOTUS の脳虚血後機能再建における役割. 第27回日本脳循環代謝学会, 富山国際会議場 (富山県富山市).
- 9) Takase, H., Yokoyama, T., Kurihara, Y., Takei, K., Kawahara, N. (2015) Overexpressed LOTUS improves functional recovery after brain focal ischemia in mice. 27th International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function and 12th International Conference on Quantification of Brain Function with PET. Vancouver, Canada.
- 10) Takase, H., Murata, H., Yokoyama, T., Kurihara, Y., Takei, K., Kawahara, N. (2015) NgR1 antagonist promotes delayed reconstruction of motor pathways in brain stem, and cervical spinal cord after central nervous system injury. ASIA SPINE(アジア脊髄外科学会), Taipei, Taiwan.
- 11) 廣川智子, 榊原裕介, 栗原裕司, 五嶋良郎, 竹居光太郎 (2015) 内在性 Nogo 受容体アンタゴニスト LOTUS による脊髄損傷後の神経再生. 第14回日本再生医療学会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
- 12) 栗原裕司, 齋藤優, 竹居光太郎 (2014) LOTUS はコンドロイチン硫酸プロテオグリカンにより誘起される軸索伸長阻害を抑制する. 第37回日本神経科学会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：

番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ：
<http://yokohama-cu-mbs-lotus.jp/>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者
 なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者
 禾 晃和 (NOGI, Terukazu)
 横浜市立大学・生命医科学研究科・准教授
 研究者番号：40379102

(4) 研究協力者
 栗原 裕司 (KURIHARA, Yuji)