

46. 神経回路形成因子 LOTUS による認知症治療法開発

竹居 光太郎

横浜市立大学 大学院生命医科学研究科 生体機能医科学研究室

Key words : LOTUS, 認知症, β アミロイド, 治療法開発, PirB

緒言

筆者らが発見した神経回路形成因子 LOTUS は、中枢神経系の再生を阻む主要因として知られる Nogo 受容体 (Nogo receptor-1 : NgR1) と結合し、その作用を完全に阻止する内在性の NgR1 拮抗物質である¹⁻³⁾。NgR1 は、脳内に存在する 5 種の再生阻害因子の共通の受容体で、神経細胞が NgR1 を介して再生阻害因子を受容すると神経突起伸長が著しく阻害される。LOTUS は強力な内在性 NgR1 拮抗物質として機能し、神経再生に対して促進的に作用する。近年、神経再生を阻むもう一つ別の受容体 Paired immunoglobulin-like receptor B (PirB) が発見された⁴⁾。最近になって、この PirB がアルツハイマー病の病因因子である β -amyloid ($A\beta$) と結合してアルツハイマー病様の神経変性・神経細胞死を惹起するという報告がなされた⁵⁾。つまり、PirB は再生阻害因子の受容体であるのみならず、 $A\beta$ の新たな受容体として同定された。他方、低親和性神経成長因子受容体である p75NTR (neurotrophin receptor) は神経細胞上に発現し、前出の NgR1 の共役受容体として神経再生を阻害したり、神経成長因子 nerve growth factor (NGF) の受容体として神経細胞の生存維持に関与したりして様々な作用を示すことが知られている。その一方で、p75NTR は $A\beta$ の受容体でもあり、 $A\beta$ と p75NTR の相互作用によって細胞死が誘導されることが報告されている⁶⁾。我々は、驚くべきことに、LOTUS は NgR1 のみならず PirB、および p75NTR と結合することを見いだした。

また、高齢化ラットにおいて、加齢に伴って海馬での LOTUS 発現量が減少し、それと関連して学習能力が減弱するという報告がなされた⁷⁾。認知能力の減衰と LOTUS 発現量の減少という相関関係から、LOTUS は認知機能と関連すると考えられる。

本研究では、LOTUS の $A\beta$ による神経変性や神経細胞死に対する拮抗作用を詳しく検討し、病態モデル動物を用いて LOTUS による認知低下に対する改善作用を検討することで、アルツハイマー病型神経変性の新たな治療基盤を創成することを目的とする。

方法および結果

1. LOTUS と PirB の相互作用による PirB に対する $A\beta$ 結合への影響の解析

pirB 遺伝子を導入して発現させた COS7 細胞株に、 $A\beta$ 42 リコンビナント蛋白質によって作製した $A\beta$ オリゴマーを添加し、 $A\beta$ オリゴマーの PirB に対する結合度を調べた。*lotus* 遺伝子と *pirB* 遺伝子の双方を同時に導入した COS7 細胞株において、LOTUS と PirB の同一細胞上でのシス結合は $A\beta$ オリゴマーと PirB の結合を約 30% 減弱させた (図 1)。Mock コントロールや LOTUS 単独発現細胞における $A\beta$ オリゴマーの結合をベースラインとし、PirB 単独発現細胞では約 2 倍の結合がみられたが、LOTUS と PirB の共発現細胞では PirB 単独発現細胞における結合度の約 70% 程度の結合度を示し、 $A\beta$ オリゴマーと PirB の結合を約 30% 減弱させた。PirB の細胞内シグナル伝達系の下流分子として cofilin のリン酸化減少が報告されていたので⁵⁾、我々も COS7 細胞や小脳顆粒細胞で cofilin のリン酸化減少を確認する実験を行ったが、 $A\beta$ オリゴマー結合によるリン酸化減少は確認できなかった。現在、3 ヶ月齢の *lotus* 遺伝子欠損マウスおよび *lotus* 遺伝子過剰発現マウスの双方において脳内 $A\beta$ 量を計測し、その異動について解析中である。

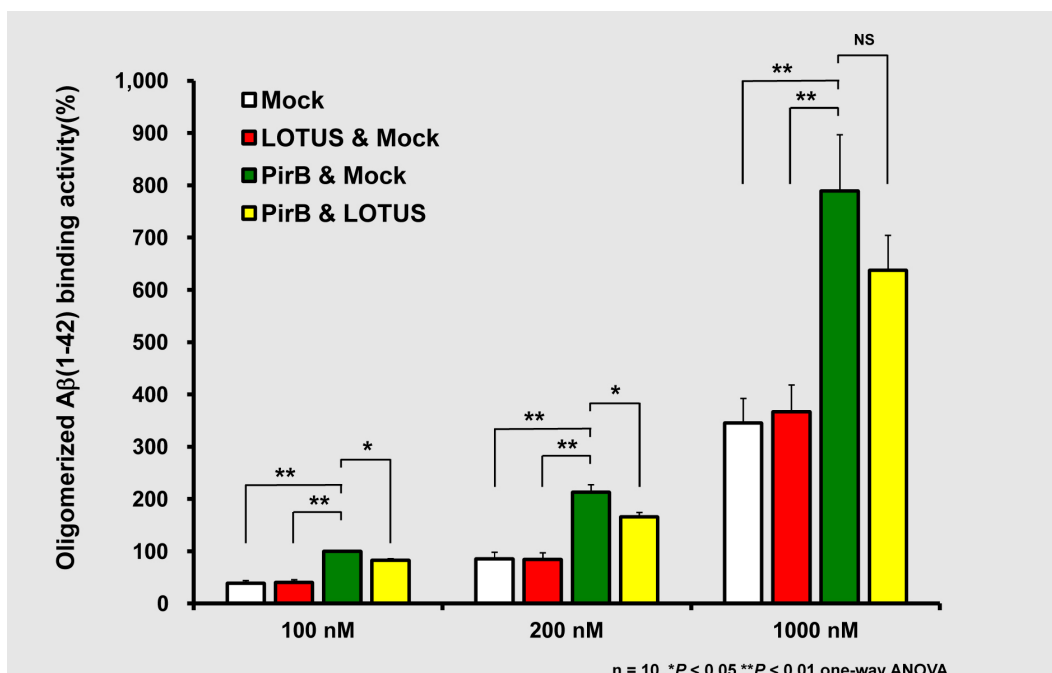


図1. LOTUS と PirB の共発現による A β の結合抑制

A β オリゴマー (β 1-42) の結合度。白色バー：Mock コントロール, 赤色バー：LOTUS 単独発現細胞, 緑色バー：PirB 単独発現細胞, 黄色バー：LOUTS と PirB の共発現細胞。A β オリゴマーを 100 nM, 200 nM, 1000 nM 添加した場合の結合度を示す。LOTUS と PirB の共発現において (黄色バー) において PirB への A β オリゴマーの結合が PirB 単独発現 (緑色バー) に比して減弱した。

2. LOTUS と p75NTR の相互作用による p75NTR における A β 作用への影響の解析

SBP-FLAG タグを N 末に融合させた SBP-FLAG-LOTU、GST タグを N 末に融合させた GST-p75NTR を作製して Pull-down アッセイを行ったところ、GST で pull-down したライセート中に抗 SBP 抗体によって SBP-FALG-LOTUS が検出されたことから、物理的に LOTUS と p75NTR が結合することが判明した (図2)。

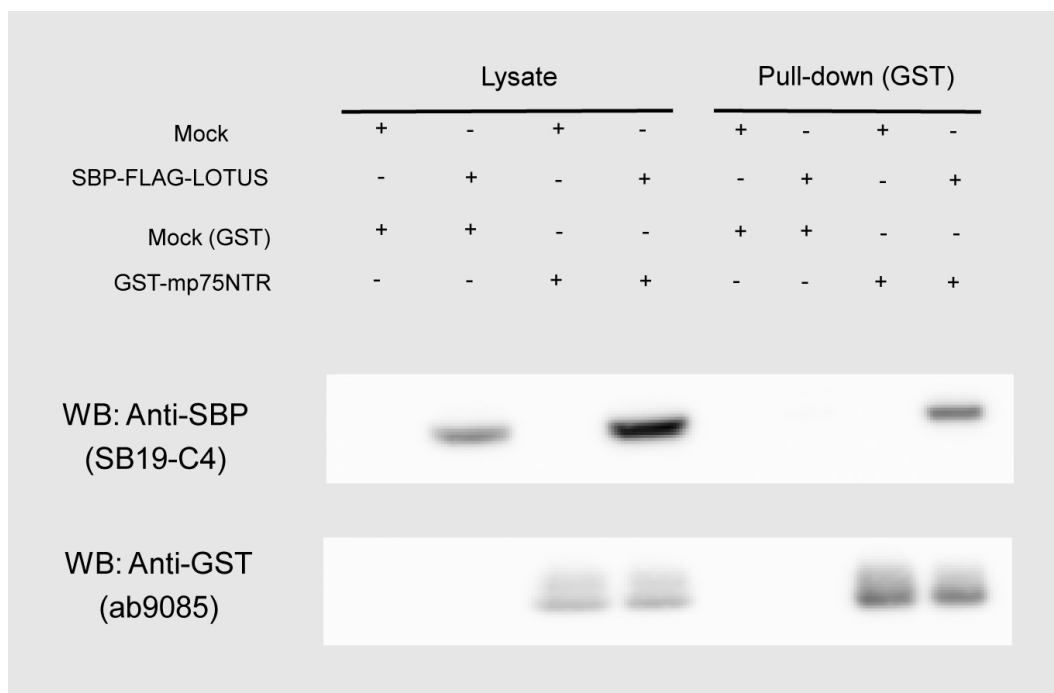


図2. SBP-FAG-LOTUS と GST-p75NTR を用いた pull-down アッセイ
抗 SBP 抗体および抗 GST 抗体によるプルダウンライゼート中の LOTUS と p75NTR の検出。LOTUS と p75NTR は相互作用することが示された。

そこで、この分子間相互作用がもたらす生理作用を検討する目的で、ラット副腎褐色細胞腫由来の細胞株である PC12 細胞に p75NTR を強制発現させ、NGF 添加で分化させる条件下で培養上清に A β (1-42) オリゴマーを添加して 48 時間培養した後、培養 PC12 細胞の生存率を WST1 アッセイによって評価した。A β (1-42) オリゴマー濃度を各々、0, 5, 10, 15 μ M で添加すると、濃度依存的に PC12 細胞の生存率が 100% から 60% 程度まで減少し、A β (1-42) オリゴマーによる細胞死が誘発された。それに反して、p75NTR に加えて LOTUS を共発現させた場合には、若干の生存率の低下があったものの、A β (1-42) オリゴマー濃度 15 μ M であっても約 85% の生存率に留まり、A β (1-42) オリゴマーによる細胞死が有意に抑制された。次に PC12 細胞に p75NTR を単独発現させて培養した後、p75NTR との結合が確認されている N 末に FC タグを融合させた可溶性 LOTUS タンパク質 (Fc-LOTUS) を 1 μ M 添加し、48 時間培養後に同様に細胞生存率を評価したところ、共発現の場合と同様に A β (1-42) オリゴマーによる細胞死を有意に抑制した (図 3)。これらのことから、p75NTR を介した A β (1-42) オリゴマー結合による PC12 細胞の細胞死が LOTUS の共発現やリコンビナント LOTUS タンパク質投与によって抑制されることが判明した。

更に、神経細胞の初代培養系において上記の抑制作用を検証するため、p75NTR を内在的に発現する海馬神経細胞を培養して同様の実験を行った。A β (1-42) オリゴマーを 15 μ M 添加すると細胞生存率が約 58% 程度まで減少し、A β (1-42) オリゴマーによる細胞死が誘発された。しかし、PC12 細胞と同様に、可溶性 LOTUS タンパク質 Fc-LOTUS (1 μ M) を添加したところ、A β (1-42) オリゴマー濃度 15 μ M で約 75% の生存率で、タグタンパク (Fc) を添加した場合 (生存率: 約 58%) に比して有意に高く、A β (1-42) オリゴマーによる細胞死の抑制が認められた。(図 3)。因に、ネガティブコントロールとして用いた逆配列型の A β (42-1) オリゴマーの添加では生存率はほぼ 100% のままで変化が認められなかった。従って、培養海馬神経細胞においても A β (1-42) オリゴマーによる細胞死の抑制が認められた (図 3)。

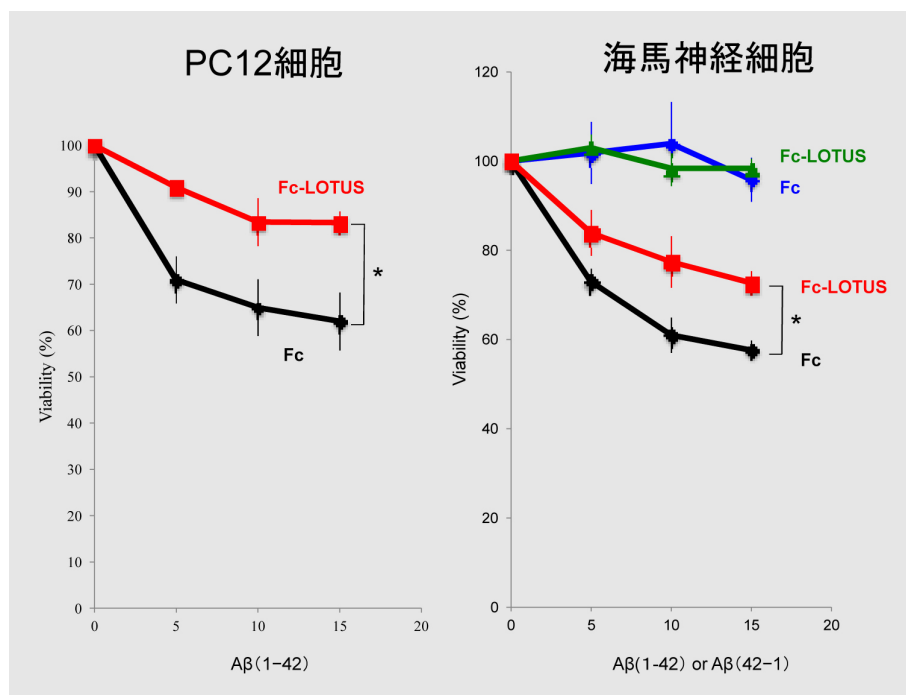


図3. Fc-LOTUS 添加による PC12 細胞および培養海馬神経細胞における Aβ による細胞死の抑制

Fc-LOTUS 添加による PC12 細胞 (左パネル) および培養海馬神経細胞 (右パネル) における Aβ オリゴマー添加による細胞生存率を WST-1 アッセイによって計測した。Fc タグ (黒線) 存在下での活性型 Aβ (1-42) 添加によって誘起される細胞生存率の低下は、Fc-LOTUS (赤線) の添加によって上昇した。不活性型 Aβ (42-1) による生存率の低下は見られなかった。*: p < 0.05, one-way ANOVA.

考 察

本研究によって、LOTUS は Aβ による PirB および p75NTR を介した神経細胞死に対する抑制作用を有することが判明した。Aβ を介する神経細胞死は古くから知られているものの、どのような受容体を介してどのような細胞内シグナル伝達系を経て細胞死に至るかは不明な点が多い。現在のところ、本研究で検討した PirB と p75NTR を介した Aβ 作用が重要視されているが、その制御法については未知の段階にある。本研究により、神経回路形成因子 LOTUS は、Nogo 受容体に対する拮抗作用のみならず、PirB と p75NTR との分子間相互作用によって Aβ 作用を抑制することが判明し、Aβ 拮抗物質としての今後の展開が期待される。

前述したように、高齢化ラットにおける加齢に伴った海馬での LOTUS 発現量減少と学習能力減弱の相関関係から [7\)](#)、LOTUS は認知機能の維持に関連すると考えられ、その分子機序として Aβ 抑制作用が関連すると推察できる。この作業仮説を今後検証することが重要で、LOTUS の発現低下によって脳内 Aβ 量が増加したり、LOTUS 発現量の維持・または増加によって脳内 Aβ 量の増加の抑制や減少が見られるかどうかを検討する必要がある。現在、LOTUS を過剰発現するトランスジェニックマウス (*lotus*-Tg マウス) と *lotus* 遺伝子欠損マウス (*lotus*-KO マウス) の脳内における Aβ 蓄積量の違いを検討している。一方で、*lotus*-Tg マウスとアルツハイマー病のモデルマウス (PS/APP 過剰発現マウス) との交配実験を行ってモデルマウスにおける学習能力の低下が軽減されるかについても検討を行っている。これらの実験によって生体における LOTUS の認知症改善作用を確認し、Aβ 抑制作用との関連を追究する予定である。

共同研究者

本研究の共同研究者は、横浜市立大学大学院生命医科学研究科生体機能医科学研究室の栗原裕司博士および川上裕氏である。最後に本研究に御支援を賜りました上原記念生命科学財団に深謝申し上げます。

文 献

- 1) Sato Y, Iketani M, Kurihara Y, Yamaguchi M, Yamashita N, Nakamura F, Arie Y, Kawasaki T, Hirata T, Abe T, Kiyonari H, Strittmatter SM, Goshima Y, Takei K, Cartilage acidic protein-1B (LOTUS), an endogenous Nogo receptor antagonist for axon tract formation. *Science* 2011;333:769-773. doi: 10.1126/science.1204144.
- 2) Kurihara Y, Arie Y, Iketani M, Ito H, Nishiyama K, Sato Y, Nakamura F, Mizuki N, Goshima Y, Takei K, The carboxyl-terminal region of Crtac1b/LOTUS acts as a functional domain in endogenous antagonism to Nogo receptor-1. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2012;418:390-395. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.01.033.
- 3) Kurihara Y, Iketani M, Ito H, Nishiyama K, Sakakibara Y, Goshima Y, Takei K, LOTUS suppresses axon growth inhibition by blocking interaction between Nogo receptor-1 and all four types of its ligand. *Mol. Cell. Neurosci.* 2014; 61:211 – 218. PMID: 25034269.
- 4) Atwal JK, Pinkston-Gosse J, Syken J, Stawicki S, Wu, Y, Shatz, CJ, Tessier-Lavigne M, PirB is a functional receptor for myelin inhibitors of axonal regeneration. *Science* 2008; 332:967-970. doi: 10.1126/science.1161151.
- 5) Kim, T., Vidal, G.S., Djuristic, M., William, C.M., Birnbaum, M.E., Garcia, K.C., Hyman, B.T., 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: 1399-1404, (2013). doi: 10.1126/science.1242077.
- 6) Yaar M, Zhai S, Pilch PF, Doyle SM, Eisenhauer PB, Fine RE, Gilchrest BA, Binding of β -amyloid to the p75 neurotrophin receptor induces apoptosis. *J. Clin. Invest.* 1997; 100(9): 2333-2340. PMID: 9410912.
- 7) Heather D, Sterkey V, Bixler GV, Sonntag WE, Freeman WM, Expression of NgR1-antagonizing proteins decreases with aging and cognitive decline in rat hippocampus. *Mol. Cell. Neurobiol.*2013; 33:483-488. doi: 10.1007/s10571-013-9929-4.