

様式第 1 号

論文内容要旨

LOTUS, an endogenous Nogo receptor antagonist,
is involved in synapse and memory formation

学位申請者氏名：西田 遼平
研究指導教員：竹居 光太郎

1. 序

高齢者の5人に1人は認知症と言われており高齢化に伴う記憶障害は今日大きな社会問題となっている。加齢による記憶障害を引き起こす因子として Nogo-NgR1 が知られている(1, 2)。Nogo-A は Nogo Receptor 1(NgR1)と結合し記憶形成能力を低下させる因子として知られている(3)。NgR1 は p75 neurotrophin receptor(p75NTR)や leucine-rich repeat and immunoglobulin-like domain-containing Nogo receptor-interacting protein 1(LINGO-1)、Tumor necrosis factor receptor superfamily(TROY)と共受容体構造を形成し、Ras homolog family member A (RhoA)の活性を介してアクチンの脱重合および成長円錐の崩壊を誘導する(4 - 7)。また、Nogo シグナルは、海馬初代培養細胞のシナプス密度を低下させることが報告された(8, 9)。同様に、生体マウスの脳において、NgR1 過剰発現マウスはスパイン密度の低下と記憶機能の障害を示すことが知られている(10)。一方、海馬初代培養細胞では、Nogo シグナルを抑制するとシナプス密度が増加することが報告されている(11)。さらに、Nogo A-KO マウスでは、シナプス密度の増加や記憶機能が亢進増加することが明らかとなっている(3)。また、ラットでは加齢に伴い MAI や NgR1 の発現量が増加し、それに伴い記憶機能が低下することが報告されている(1, 2)。近年、NgR1 のアンタゴニストとして leucine-rich glioma inactivated 1(LGI1)が同定されている(12)。LGI1 は Nogo シグナルを抑制することによりシナプス形成に寄与する中枢神経系に発現する分泌タンパク質であるが、LGI1-KO マウスはてんかん発作を引き起こし、最終的には生後 21 日目までに死亡することから、内因性アンタゴニストとしての記憶機能の解析は進んでいない(13 - 15)。一方、当研究室で発見された lateral olfactory tract (LOT) user substance(LOTUS)は LOT の形成に関与する神経回路形成因子であり、NgR1 の内因性アンタゴニストとして同定された(16)。LOTUS は生体脳に広く豊富に発現しているが、加齢と共に発現量が低下し、LOTUS 発現量の低下と相関して記憶機能が低下することが報告されている(17, 18)。しかし、シナプス形成や記憶機能における LOTUS の役割は明らかにされていない。そこで本研究では、LOTUS のシナプス形成に関する機能について検討し、海馬依存性記憶形成能力に与える影響について解析した。

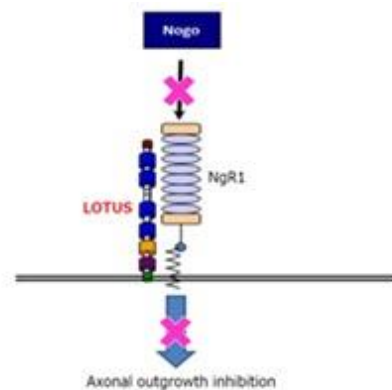


図1 神経回路形成因子 LOTUS は NgR1 に拮抗作用する

2. 実験方法

動物

C57/BL6J マウス(WT)は Charles River Co.から購入した。lotus/crtac1b 遺伝子欠損マウス(LOTUS-KO)は(16)で記述されている通りに作成された。Thy1-EGFP は各遺伝子型マウスと交配したものを使用した(19)。マウスの飼育は横浜市立大学福浦キャンパスの動物センターにて、明暗サイクル 5:00~19:00 で行い、オートクレーブ処理した飼料及び水を与えた。本研究における動物実験は横浜市立大学動物実験委員会の倫理規定に準拠して行った。

海馬初代培養法

海馬神経細胞の初代培養法は、既存の報告を参考に一部変更して行った(20)。WT、LOTUS-KO 各遺伝子型由来のマウスをイソフルラン(Pfizer)で深部麻酔し、胎児(E17.5)を摘出した。海馬を摘出し、0.25 %トリプシン、100 µg/ml DNase を用いて 37 °Cで 12 分間分散処理を行った。分散処理した細胞を 0.5×10^5 cells/well で 24 well dish に播種した。細胞培養導入培地には 10 % FBS(Biowest)を含む Neurobasal medium (Gibco)、維持培地には 1×B-27 (Gibco)、1×Glutamax (Gibco)、Neurobasal medium (Gibco)をそれぞれ使用した。

蛍光免疫細胞化学法

培養 14 日目の海馬初代培養細胞をメタノールを用いて-20 °Cで 8 分間固定し、1 % BSA/PBS で 20 分間ブロッキングを行った。その後、1 % Bovine Serum Albumin (BSA : nacalai tesque)/PBS で希釈した Mouse 抗 PSD-95 抗体(1/1000)、Rabbit 抗 Bassoon 抗体(1/1000)、Chicken 抗 MAP2 抗体(1/1000)を一次抗体として使用した。一次抗体を 1 時間室温で反応させた後に、PBS で洗浄し、1 % BSA/PBS で希釈した Alexa Fluor488 Goat 抗 Mouse IgG(1/2000)、Alexa Fluor 594 Goat 抗 Rabbit IgG(1/2000)、および Alexa Fluor 647Goat 抗 Chicken IgY(1/2000)を二次抗体として使用し、室温で 1 時間二次抗体反応を行った。その後、細胞を PBS で洗浄し、Fluoromount (コスモバイオ)を使用して封入した。

海馬初代培養細胞のシナプス密度の解析

全ての蛍光免疫染色画像は、共焦点顕微鏡(TCS SP8 : Leica)および Las X ソフトウェア(Leica)を用いて取得した。MAP2 陽性樹状突起の細胞体に最も近い分岐点から 40 µm 以内の PSD-95 および Bassoon の共局在を有する粒を数え、各細胞における樹状突起の 10 µm あたりのシナプス密度を測定した。

マウス脳切片を用いた樹状突起スパイン密度の解析

マウス(雄、2 ヶ月齢)を、イソフルランで深く麻酔し、4 % PFA/PBS を用いて灌流固

定した。その後、脳を取り出し、4 % PFA/PBS に一晚浸漬した。その後、脳を 30 % スクロースに浸漬した。その後、クライオスタットを用いて 30 μm 厚の冠状断切片を作製した。蛍光画像は、LAS X ソフトウェアを用いて共焦点顕微鏡(TCS SP8)を使用して取得した。スパイン密度は Neuron Studio software を用いて半自動で計測した(21)。スパイン密度は、頭部と首の直径比が 1.1 以上、最大頭部の直径が 0.35 μm 以下のものを thin type、頭頸部直径比が 1.1 以上、最大頭径が 0.35 μm 以上のものを mushroom type、頭頸部直径比が 1.1 以下のものを stubby type として計測した。海馬 CA1 錐体ニューロンからの apical dendrite または basal dendrite の最初の分岐部位のスパイン密度を定量した

行動解析

・社会的認知記憶課題

社会的認知記憶課題は海馬依存性記憶である社会認知記憶を評価する行動解析である(22, 23)。まず、トレーニングとして、記憶能力を評価する成熟マウス(雄、2 ヶ月齢)のケージに今まで出会ったことのない新規個体として幼若マウス(雄、2 - 3 週齢)を 3 分間面会させ、成熟マウスが幼若マウスに対して鼻先を接触させて臭いをかいでいる時間(I.T. : Investigation time)を個体認知に必要な時間として測定した。24 時間後に、テストとして同じ組み合わせの成熟マウスと幼若マウスとを用いて再度 I.T. を測定した。トレーニング時に比べテスト時の I.T. が有意に減少した場合に成熟マウスが幼若マウスを記憶していたと判断される。

・モリス水迷路課題

モリス水迷路課題は、海馬依存性記憶である空間依存性記憶を評価するために行った(24)。マウス(雄、2 ヶ月齢)を 1 日 2 回、1 分間、計 6 日間トレーニングを行い空間記憶学習させた。3 日目と 6 日目のトレーニングの 24 時間後にテストを行った。テスト時はプラットフォームを取り外し、マウスを 1 分間自由に泳がせた。テスト中の各区画の滞在時間を測定し記憶形成能力を評価した

統計解析

統計的有意差の検証は J-STAT software を用いて行った。モリス水迷路課題の escape latency は two-way repeated ANOVA を使用した。また、モリス水迷路課題の TQ 区画滞在時間は χ^2 検定および one-way ANOVA with post-hoc Steel-Dwass を用いて行った

3. 研究結果

LOTUS は欠損するとシナプス密度が低下する

初めに、海馬初代培養神経細胞を用いてシナプス密度の定量を行った。海馬初代培養神経細胞において Nogo シグナルを抑制するとシナプス密度が増加するという報告がある(10)。このことから、LOTUS はシナプス数を増加させるかについて検討した。WT、LOTUS-KO マウスの各遺伝子型由来の海馬神経初代培養細胞をポストシナプ

スマーカーである PSD-95、プレシナプスマーカーである Bassoon、樹状突起マーカーである MAP2 で三重染色しシナプス密度を定量した結果、PSD-95 と Bassoon が共発現するシナプスは WT と比較して LOTUS-KO では減少することが確認された (図 2e)。このことから LOTUS は欠損するとシナプス密度を低下させることが示唆された

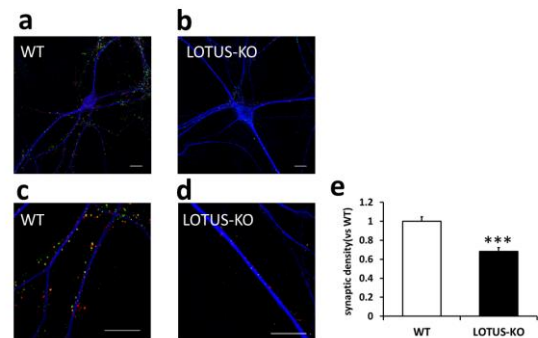


図2 LOTUS は欠損するとシナプス密度が低下する

Nishida R. et al. Scientific Reports (2021)

LOTUS が欠損するとマウス海馬の樹状突起スパイン密度を低下する

LOTUS-KO マウスの海馬初代培養細胞のシナプス密度が低下していることから(図3)、生体海馬の樹状突起におけるスパインに対する LOTUS の役割を検討するために Thy1-EGFP マウスと各遺伝子型のマウスを交配することにより樹状突起を可視化したマウスを作製し検討した。海馬 CA1 錐体ニューロンの apical dendrite における樹状突起スパイン密度は、LOTUS-KO マウスでは WT マウスと比較して有意に減少した。特に、mushroom type および thin type のスパイン密度は WT と比較して LOTUS-KO マウスでは有意に減少した。しかし、stubby type のスパイン密度に差は見られなかった(図 3a, b)。同様に、basal dendrite についても測定した結果、apical dendrite と同様の結果が得られた(図 3c, d)。これらの結果は、LOTUS が欠損すると海馬 CA1 錐体ニューロンの thin type、mushroom type のスパイン密度を減少させ、総スパイン密度を減少させることを示唆した。この

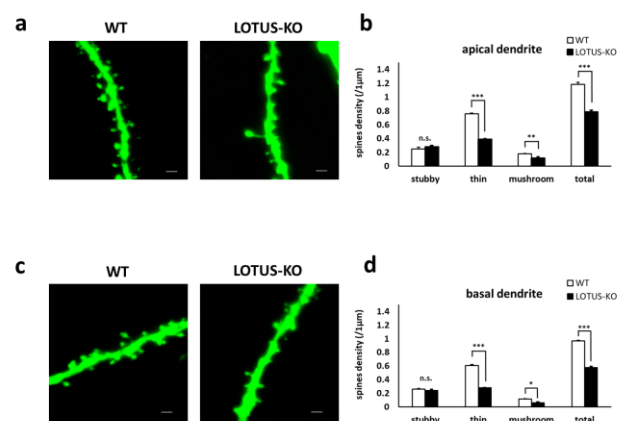


図3 LOTUS は欠損するとマウス海馬の樹状突起スパイン密度が低下する

Nishida R. et al. Scientific Reports (2021)

ことから LOTUS は海馬におけるシナプス形成に寄与する可能性が考えられた。

LOTUS は海馬依存性記憶形成に寄与する

LOTUS の記憶との関わりを検討するために WT、LOTUS-KO、LOTUS-Tg マウスを用いて、社会性認知記憶形成能力について評価した。その結果、3 分間のトレーニング条件では WT ではテストにおいて I.T.の有意な低下が観察された。一方、LOTUS-KO マウスでは有意な低下が観察されなかった(図 4a, b)。以上の結果から、LOTUS は欠損すると社会的認知記憶形成能力が低下

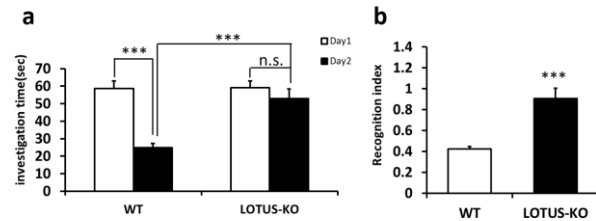


図 4 LOTUS は欠損すると社会性認知記憶形成能力が低下する

Nishida R. et al. Scientific Reports (2021)

することが示唆された。次に、空間記憶形成能力を評価するためにモリス水迷路課題を行った(図 5a)。6 日間のトレーニングの結果、LOTUS-KO マウスは WT マウスと比較して escape latency が有意に長くなった。また、LOTUS-KO マウスは、2 日目と 4 日目の escape latency が WT マウスに比べて有意に長かった(図 5b)。1 日 2 回 3 日間のトレーニングを行った後の Test1 では、プラットフォーム設置していた TQ 区の滞在時間に WT と LOTUS-KO マウスの間で差は認められなかった(図 5c)。

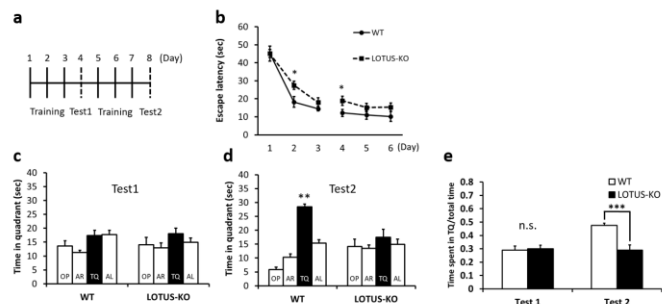


図 5 LOTUS は欠損すると空間記憶形成能力が低下する

Nishida R. et al. Scientific Reports (2021)

しかし、6 日間のトレーニング後に行った Test2 では、WT マウスでは TQ 区滞在時間が有意に増加したのに対し、LOTUS-KO マウスでは差が認められなかった(図 5d)。さらに、Test1 における TQ 区滞在時間の割合は WT マウスと LOTUS-KO マウス間に差は認められなかったが、Test2 では LOTUS-KO マウスに有意な減少が認められた(図 5e)。これらの結果から、LOTUS-KO マウスは空間記憶形成能力に障害があることが示唆された。以上のことから、LOTUS は欠損すると社会性認知記憶や空間記憶などの海馬依存性記憶の形成能力を低下させることが示唆された。

4. 討論

Nogo シグナルは、神経突起伸長を阻害し、それにより NgR1 を介して中枢神経系の損傷後の軸索再生を阻害する(4, 7)。NgR1 は、p75NTR や LINGO-1 または TROY と

の共受容体構造を取り、RhoA の活性化を介して細胞骨格の構造変化を引き起こすことが知られている(5, 6)。また、Nogo シグナルは海馬のシナプス密度を低下させることが報告されている(3, 11)。さらに、アルツハイマー病の原因タンパク質と考えられている β アミロイドタンパク質(A β)も NgR1 と結合してシナプス密度を低下させ、記憶機能障害を誘発することも報告された(25)。いずれの場合も、NgR1 は RhoA-ROCK シグナルを介してシナプス形成の阻害につながる。当研究室で発見された LOTUS は、NgR1 の内因性アンタゴニストとして機能することから、LOTUS は NgR1 の抑制を介してシナプス形成や記憶形成に関与するという仮説を立てた。このことを検証するために、まず、海馬初代培養細胞における LOTUS の発現部位を蛍光免疫細胞化学を用いて調べた。その結果、LOTUS は海馬初代培養細胞の樹状突起やシナプス部位に局在していることが明らかになった。さらに、LOTUS は PSD-95 陽性のシナプス部位に発現し、NgR1 と共局在していることから、LOTUS は海馬ニューロンのシナプス部位で NgR1 を抑制し、シナプス形成に影響を与える可能性が考えられる。さらに、LOTUS-KO マウス由来の海馬初代培養細胞におけるシナプス密度が低下や、生体脳における LOTUS-KO マウスの海馬樹状突起スパイン密度の低下が観察された。これには、シナプス部位における Nogo シグナルの増加が関与すると考えられた。

また、LOTUS-KO マウスでは WT と比較して、thin type や mushroom type のスパイン密度が減少していた。この結果からは、LOTUS がシナプスの形態変化に影響を与えていると考えられた。また、Nogo シグナルはアクチンダイナミクスを制御することが報告されている(5)。そのため、LOTUS はアクチンダイナミクスの制御を通してシナプスの成熟と形成に関与すると考えられる。

Nogo シグナルの抑制は記憶形成能力の亢進、増強は記憶形成能力の減少にそれぞれ作用することが報告されている(3, 10)。これらの知見をもとに、LOTUS-KO マウスの海馬依存性記憶形成能力を評価した結果、社会認知記憶や空間記憶形成能力に障害があることが確認された。以上の結果から、LOTUS は海馬依存性記憶形成に寄与している可能性が示唆された。

加齢に伴う Nogo シグナルの増加や LOTUS 発現量の減少が記憶障害を引き起こすことが報告されている(1, 2, 17, 18)。LOTUS 発現量の減少を抑制することにより、加齢に伴う記憶障害が抑制されるかどうかを検討することは興味深い。また、アルツハイマー病の原因タンパク質である A β は NgR1 と結合し、シナプス形成の阻害を介して、記憶障害を引き起こすことが報告されている(25, 26)。さらに、paired immunoglobulin-like receptor B (PirB)は A β の受容体としても機能し、PirB が結合することにより記憶障害を引き起こすことが知られている(27)。また当研究室において、LOTUS は PirB のアンタゴニストとしても機能することが確認された(28)。LOTUS が A β と NgR1 及び PirB との結合を抑制するかについては、今後検討の余地がある。高齢性認知症やアルツハイマー病の予防・治療法の開発に有効な LOTUS の機能を明らかにするためにはさらなる研究が求められる。

5. まとめ

- (1) LOTUS は海馬初代培養細胞においてシナプス密度を制御し、生体海馬 CA1 領域のスパイン密度や形態変化に寄与する。
- (2) LOTUS は海馬依存性記憶形成に関与し、欠損すると記憶形成能力を損なう。

6. 論文リスト

主論文

Ryohei Nishida, Yuki Kawaguchi, Junpei Matsubayashi, Rie Ishikawa, Satoshi Kida, and Kohtaro Takei, LOTUS, an endogenous Nogo receptor antagonist, is involved in synapse and memory formation. *Scientific Reports* 11, 5085 (2021).

7. その他(参考文献等)

1. VanGuilder, H. D. et al. Hippocampal dysregulation of synaptic plasticity-associated proteins with age-related cognitive decline. *Neurobiol. Dis.* 43, 201-212, (2011).
2. VanGuilder, H. D., Bixler, G. V., Sonntag, W. E. & Freeman, W. M. Hippocampal expression of myelin-associated inhibitors is induced with age-related cognitive decline and correlates with deficits of spatial learning and memory. *J. Neurochem.* 121, 77-98, (2012).
3. Zagrebelsky, M. et al. Nogo-a regulates spatial learning as well as memory formation and modulates structural plasticity in the adult mouse hippocampus. *Neurobiol. Learn. Mem.* 138, 154-163, (2017).
4. Fournier, A. E., GrandPre, T. & Strittmatter, S. M. Identification of a receptor mediating nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* 409, 341-346, (2001).
5. Yiu, G. & He, Z. Glial inhibition of cns axon regeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 617-627, (2006).
6. Yamashita, T. & Tohyama, M. The p75 receptor acts as a displacement factor that releases rho from rho-gdi. *Nat. neuroscience* 6, 461-467, (2003).
7. Akbik, F. V., Bhagat, S. M., Patel, P. R., Cafferty, W. B. & Strittmatter, S. M. Anatomical plasticity of adult brain is titrated by nogo receptor 1. *Neuron* 77, 859-866, (2013).
8. An, H. et al. Soluble lilra3 promotes neurite outgrowth and synapses formation through a high-affinity interaction with nogo 66. *J. Cell Sci.* 129, 1198-1209, (2016).
9. Raiker, S. J. et al. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein and nogo negatively regulate activity-dependent synaptic plasticity. *J. Neurosci.* 30, 12432-12445, (2010).
10. Karlsson, T. E. et al. Ngr1: a tunable sensor regulating memory formation, synaptic, and dendritic plasticity. *Cereb. Cortex* 26, 1804-1817, (2016).
11. Wills, Z. P. et al. The nogo receptor family restricts synapse number

- in the developing hippocampus. *Neuron* 73, 466-481, (2012).
12. Senechal, K. R., Thaller, C. & Noebels, J. L. Adpeaf mutations reduce levels of secreted lgi1, a putative tumor suppressor protein linked to epilepsy. *Hum. Mol. Genet.* 14, 1613-1620, (2005).
 13. Thomas, R. A. et al. The nogo receptor ligand lgi1 regulates synapse number and synaptic activity in hippocampal and cortical neurons. *eNeuro* 5, (2018).
 14. Thomas, R. et al. Lgi1 is a nogo receptor 1 ligand that antagonizes myelin-based growth inhibition. *J. Neurosci.* 30, 6607-6612, (2010).
 15. Fukata, Y. et al. Disruption of lgi1-linked synaptic complex causes abnormal synaptic transmission and epilepsy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 3799-3804, (2010).
 16. Sato, Y. et al. Cartilage acidic protein-1b (lotus), an endogenous nogo receptor antagonist for axon tract formation. *Science* 333, 769-773, (2011).
 17. Starkey, H. D. V., Bixler, G. V., Sonntag, W. E. & Freeman, W. M. Expression of ngr1-antagonizing proteins decreases with aging and cognitive decline in rat hippocampus. *Cell. Mol. Neurobiol.* 33, 483-488, (2013).
 18. VanGuilder Starkey, H. D., Sonntag, W. E. & Freeman, W. M. Increased hippocampal ngr1 signaling machinery in aged rats with deficits of spatial cognition. *Eur. J. Neurosci.* 37, 1643-1658, (2013).
 19. Feng, G. et al. Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of gfp. *Neuron* 28, 41-51, (2000).
 20. Banker, G. A. & Cowan, W. M. Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res.* 126, 397-425, (1977).
 21. Rodriguez, A., Ehlenberger, D. B., Dickstein, D. L., Hof, P. R. & Wearne, S. L. Automated three-dimensional detection and shape classification of dendritic spines from fluorescence microscopy images. *PLOS ONE* 3 e1997, (2008).
 22. Kogan, J. H., Frankland, P. W. & Silva, A. J. Long-term memory underlying hippocampus-dependent social recognition in mice. *Hippocampus* 10, 47-56, (2000).
 23. Ishikawa, R., Kim, R., Namba, S., Uchino, S. & Kida, S. Time-dependent enhancement of hippocampus-dependent memory after treatment with memantine: Implications for enhanced hippocampal adult neurogenesis. *Hippocampus* 24, 784-793, (2014).
 24. Morris, R. G. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn. Motiv.* 12, 239-260, (1981).
 25. Zhao, Y. et al. Amyloid beta peptides block new synapse assembly by nogo receptor-mediated inhibition of t-type calcium channels. *Neuron* 96, 355-372, (2017).
 26. Smith, L. M., Kostylev, M. A., Lee, S. & Strittmatter, S. M. Systematic and standardized comparison of reported amyloid- β receptors for sufficiency, affinity, and alzheimer's disease relevance. *J. Biol. Chem.* 294, 6042-6053, (2019).

27. Kim, T. et al. Human lilrb2 is a β -amyloid receptor and its murine homolog pirb regulates synaptic plasticity in an alzheimer's model. *Science* 341, 1399-1404, (2013).
28. Kurihara, Y., Takai, T. & Takei, K. Nogo receptor antagonist lotus exerts suppression on axonal growth-inhibiting receptor pir-b. *J. Neurochem.* (2020).

8. 用語集

- ・シナプス: 神経細胞同士で情報のやり取りを行う接触構造。シナプスの伝達効率は必ずしも一定ではなく、シナプスの数やシナプスにおける受容体の数などによる入力の強度により変化する。このことはシナプス可塑性と呼ばれ、学習・記憶機序の根幹にある現象と考えられている。
- ・樹状突起スパイン: 神経細胞の樹状突起上に形成される構造でありプレシナプスから放出された神経伝達物質により神経細胞の活動電位の発生に寄与し記憶形成や情動行動に関与する。