

様式第 1 号

論文内容要旨

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) induces antagonistic action to Nogo signaling by the upregulation of lateral olfactory tract usher substance (LOTUS) expression

学位申請者氏名：松林潤平
研究指導教員：竹居光太郎

1. 序

脊椎動物の中樞神経系は脳と脊髄からなり、神経細胞とグリア細胞（アストロサイト、マイクログリア、オリゴデンドロサイト）の2種の主要な細胞種により構成される。これら細胞の協調的な働きにより神経回路は形成され、感覚、行動、思考、記憶といった高次脳機能を可能にする。一方で、成体哺乳類における中樞神経系は、末梢神経系と比べ、障害により一度神経回路が破壊されるとその再生能は著しく低い。複雑かつ精緻な神経機能を取り戻すには、障害後に生き残った神経回路が失われた機能を代償的に担うほか、新たな神経回路が形成される必要がある。しかしながら、障害後の中樞神経内では神経再生阻害因子*が高発現するため、脳内環境は抑制性に変化し元来備わっていた神経回路の機能を修復することはきわめて困難を要する[1, 2]。これらのことから、中樞神経回路を再生するためには、障害と修復の両方の機構を理解する必要がある。

当研究室で発見された Lateral olfactory tract usher substance (LOTUS)* は嗅覚情報の二次投射路である嗅索の神経回路形成を担う分子として同定された[3]。LOTUS は神経再生阻害に機能する Nogo receptor-1 (NgR1) や Paired immunoglobulin-like receptor (PirB) に対して強力な拮抗作用を有する[4, 5, 6]。これまでに、LOTUS は内在性の NgR1 アンタゴニストとして機能し、脊髄損傷や脳虚血といった神経障害において機能回復を促進することが報告されている[7, 8]。さらに、LOTUS はシナプス形成や記憶形成を亢進し、脳高次機能に寄与することも分かっている[9]。これらのことから、LOTUS は中樞神経系の発生・発達・再生といった現象に関わり、脳内環境を内在的に制御する重要な分子で、神経回路形成に基づく新しい再生医療技術に利用することが可能だと考えられる。

しかしながら、LOTUS の発現量は脊髄損傷や脳虚血、多発性硬化症などの神経疾患の発症により患部や病巣内で減少することが観察された[7, 8, 10]。また、前述の神経障害に加え、加齢に伴い海馬での LOTUS 発現量が減少することも報告されている[11]。これらのことから、LOTUS の発現減少は中樞神経系の再生や可塑性が滞る一因だと考えることができる。そのため、LOTUS の発現量を維持もしくは増加することができれば、神経障害後の機能改善や神経可塑性の亢進もたらされることが期待される。しかし、LOTUS の発現制御機構については未だ明らかになっていない。そこで本研究では、LOTUS の発現増加を誘起する分子として同定した Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)* に着目し、BDNF による LOTUS の発現制御機構の解明と LOTUS の発現上昇による NgR1 の機能抑制の亢進の検証を目的とする。

[生命科学における本研究の位置付け]

LOTUS は中樞神経系の発生・発達・再生といった現象に関わり、脳内環境を制御する重要な

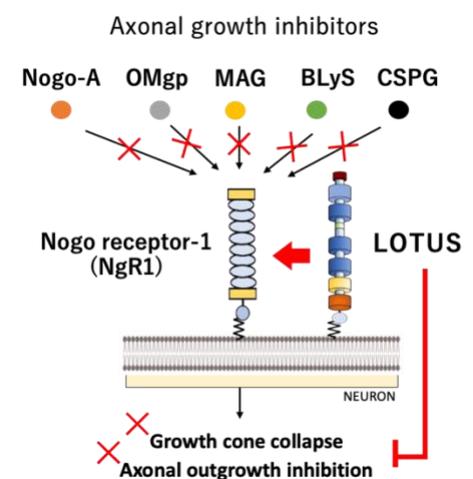


図1 神経回路形成因子 LOTUS は NgR1 の内在性アンタゴニストとして強力な拮抗作用を示す

分子である。このことから、LOTUS の発現制御機構における分子基盤の解明は脳内環境制御機構を理解する上で重要な課題である。また、内在性 LOTUS の発現制御機構に基づき、神経障害時における LOTUS 発現量の減少阻止や維持・亢進ができれば、LOTUS タンパク質製剤の投与や LOTUS 発現 iPS 細胞の移植、アデノ随伴ウイルスを用いた LOTUS 過剰発現による遺伝子治療といった外来的に LOTUS を補填する治療戦略とは異なる新たな治療法の開発が期待できる。

2. 実験方法

動物

C57BL/6J 野生型マウスは日本 SLC 社より購入した。lotus 遺伝子欠損マウスは理研 CDB において作製され、lotus 遺伝子の Exon 1 部位が neomycin 遺伝子に置き換えられた。いずれも明暗サイクル 12 時間、specific-pathogen-free の動物飼育施設内でプラスチックケージ内 1-5 匹ずつ飼育され、オートクレーブ処理した飼料および水が与えられた。本研究における動物実験は横浜市立大学実験動物委員会から承認を得て行った (承認番号: T-A-21-002)。

ウエスタンブロッティング用タンパク質サンプルの調製

培養 3 日目または培養 7 日目の海馬初代培養神経細胞を用意し、氷上で 10 分間静置した。4°C PBS で well を 2 回洗浄し、Lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 mM NaF, 1 mM EDTA-Na pH 8.0, 1% Nonidet P-40, 1 mM Na₃VO₄ pH 10.0, 0.05 mM (*p*-Amidinophenyl) methanesulfonyl fluoride, and 0.1 U/mL aprotinin) を 100 μ L 添加して氷上で 10 分間静置した。細胞破砕液を 20,400 g, 4°C で 10 分間遠心分離し、上清に 10% β -mercaptoethanol を含む 4 \times Laemmli buffer (40% glycerol, 8% SDS, 250 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.03% bromophenol blue) を加えて 95°C で 7 分間還元処理した。各サンプルは使用まで -80°C で保存した。

ウエスタンブロッティング

8%のアクリルアミドゲル内で SDS-PAGE を行った。泳動後のタンパク質をセミドライ式ブロッティングにより PVDF 膜上に転写し、5% skim milk/TBS-T 内で 1 時間ブロッッキングした。一次抗体として Mouse 抗 Rat LOTUS 抗体 (0.425 μ g/ μ L), Rabbit 抗 Tropomyosin-related kinase B (TrkB) 抗体 (0.167 μ g/ μ L), Mouse 抗 β -actin (1/10000) を 5% Bovine serum albumin (BSA)/TBS-T または 1% skim milk/TBS-T で希釈し、PVDF 膜と 4°C で一晩反応させた。翌日、二次抗体として Horse radish peroxidase (HRP) 標識 Goat 抗 Mouse IgG 抗体 (β -actin: 0.08 μ g/ μ L, LOTUS: 0.16 μ g/ μ L) または HRP 標識 Goat 抗 Rabbit IgG 抗体 (0.16 μ g/ μ L) を 5% skim milk/TBS-T で希釈し、室温で 1 時間反応させた。各種発光基質 (ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Life Sciences), Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck Millipore) または Western blot Ultra Sensitive HRP Substrate (Takara)) と PVDF 膜を室温でインキュベートし、ImageQuant LAS4000 mini (GE Healthcare Life Sciences) を用いて目的タンパク質を検出した。シグナルの定量解析は ImageJ

(National Institutes of Health) を用いて行った。

RNA 抽出とリアルタイム PCR

培養 7 日目の海馬初代培養神経細胞を用意し、NucleoSpin RNA Plus (MACHEY-NAGAL) を用いて total RNA を抽出した。PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time) (Takara Bio) と抽出した total RNA 100 ng から逆転写反応液を調製し、T100 Thermal cycler (Bio-Rad) 上で鋳型 cDNA を合成した。リアルタイム用 PCR 反応液は鋳型 cDNA, TB Green Premix Ex TaqII (Tli RNaseH Plus) (Takara), 各種プライマー (*Lotus* および β -actin) から調製した。PCR 反応は Thermal Cycler Dice Real Time System (Takara Bio) 上で行い、mRNA の定量は $\Delta \Delta$ Ct 法に基づき解析した。各サンプルの LOTUS mRNA 発現量は β -actin mRNA 発現量で補正した。

海馬神経細胞初代培養

胎生 17.5 日目の野生型マウスまたは LOTUS 遺伝子欠損マウスより海馬組織を摘出し、37 °C 浴槽内で 0.25% トリプシンを用いて 12 分間酵素処理を行った。非働化処理済の Fetal bovine serum を加えて反応停止させ、さらに DNaseI (100 μ g/mL) で DNA を分解処理した。細胞分散後に Neurobasal medium, 10% FBS, 10 mM HEPES-NaOH で調製したプレATING培地で細胞懸濁液を調製し、Poly-L-lysine (100 μ g/mL) でコーティング処理したガラスカバースリップ (ϕ 12 mm) 上へ 2.5×10^4 cells/well または Polyethyleneimine でコーティング処理した 6 well plate 上に 5×10^5 cells/well になるように細胞を播種した。37 °C 5% CO₂ インキュベーター内で 3 時間静置し、Neurobasal medium, 2% B27, 2 mM Glutamax, 10 mM HEPES-NaOH で調製した維持培地と交換したのち、インキュベーター内で各種操作まで培養した。

Recombinant BDNF は終濃度 0.1-100 ng/mL で培養 1 日目 (48 時間処理) または培養 6 日目 (24 時間処理) に添加した。K252a (200 nM), PD98059 (100 μ M), LY-294002 (50 μ M), U-73122 (10 μ M) または CREB inhibitor 666-15 (500 nM) は BDNF 処理の 30 分前に予め添加した。

siRNA トランスフェクション

TrkB および Non-targeting negative control を標的とする 27mer 2 本鎖 RNA は Integrated DNA Technologies 社より入手した。各種 2 本鎖 RNA は海馬初代培養神経細胞の培養 4 日目に RNAiMAX を用いて終濃度 40 nM でトランスフェクションした。培養 6 日目に BDNF (100 ng/mL) を添加し、さらに 24 時間培養した。

Neurite outgrowth assay

培養 1 日目の海馬神経初代培養細胞を用意し、BDNF (100 ng/mL) と Recombinant Rat Nogo66-Fc (400 nM) を処理した。K252a (200 nM) は BDNF または Nogo66-Fc 処理の 30 分前に予め添加した。培養 3 日目に 4% paraformaldehyde で 37°C 10 分間と室温 10 分間の固定処理を行い、1% BSA

/TBS-T を用いて 10 分間室温でブロッキングした。一次抗体として、Rabbit 抗 human Microtubule-associated protein 2 (MAP2) 抗体 (1/2000) を 1% BSA/TBS-T で希釈し、4°C で一晩反応させた。翌日、二次抗体として、Alexa Fluor 488 標識 Goat 抗 Rabbit IgG 抗体 (0.75 $\mu\text{g/mL}$) を 1% BSA/TBS-T で希釈し、室温暗所内で 1 時間反応させた。染色サンプルは Prolong Diamond Antifade Mountant (Life technologies) を用いて封入した。全ての蛍光免疫染色図は BZ-8100 蛍光顕微鏡で取得した。ImageJ を用いて各神経細胞における最も伸長した突起の初めから先端部までを測定し、全ての突起長から算出した平均値を最大突起長とした。

統計処理

データは平均値 \pm 平均値の誤差 (standard error of the mean: SEM) として示す。統計学的解析は Student's t-test, one-way ANOVA による分散分析に続いて Tukey-Kramer 法または Holm multiple comparison test 法, two-way ANOVA による分散分析に続いて Tukey-Kramer multiple comparison test を用いて検定を行った。

3. 結果

1) BDNF は海馬神経初代培養細胞における LOTUS 発現増加を誘起する

まず初めに、BDNF の LOTUS 発現量に与える影響を解析した。内在的に LOTUS を発現するマウス海馬初代培養神経細胞を用いて培養 6 日目に BDNF を各種濃度で添加し、24 時間後の LOTUS 発現量をウエスタンブロッティング法およびリアルタイム PCR 法により調べた。その結果、BDNF を終濃度 10 ng/mL または 100 ng/mL で添加した場合、24 時間後の LOTUS 発現量は有意に増加することが明らかとなった (図 2a-2c)。

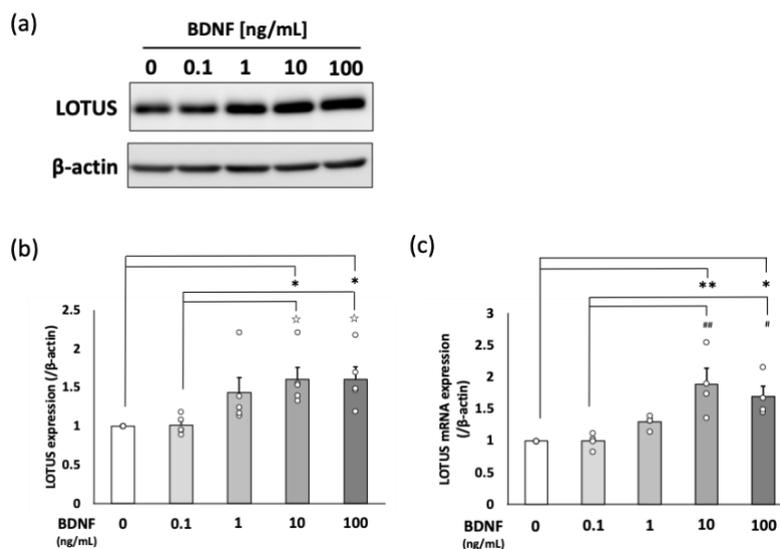


図 2 BDNF により海馬初代培養神経細胞における LOTUS 発現量は増加する (Matsubayashi et al, *J Neurochemistry*, in press. (2022).)

- (a) BDNF 処理した培養 7 日目の海馬初代培養神経細胞における LOTUS のウエスタンブロッティング
培養 6 日目に BDNF を各種濃度 (0-100 ng/mL) で添加し、24 時間後の LOTUS 発現量を解析した。
- (b) (a)における LOTUS 発現量の定量結果
各群の LOTUS 発現量は β -actin で補正し、コントロール (BDNF 0 ng/mL) の定量値で標準化した。(Data are means \pm SEM from the five independent cell culture preparations, $*P < 0.05$ versus BDNF 0 ng/mL, $^{**}P < 0.05$ versus BDNF 0.1 ng/mL, one-way ANOVA post hoc Tukey-kramer)
- (c) BDNF 処理した培養 7 日目の海馬初代培養神経細胞における LOTUS mRNA 発現のリアルタイム PCR 解析
 $\Delta \Delta Ct$ 法による相対定量を行い、各群の LOTUS mRNA 発現量は β -actin で補正し、コントロール (BDNF 0 ng/mL) の定量値で標準化した。(Data are means \pm SEM from the four independent cell culture preparations, $*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ versus BDNF 0 ng/mL, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ versus BDNF 0.1 ng/mL, one-way ANOVA post hoc Tukey-kramer)

2) BDNF は TrkB を介して LOTUS の発現増加を誘起する

次に、BDNF による LOTUS 発現増加の詳細な分子機構について検討した。TrkB は BDNF と高親和性に結合することで活性化し、細胞内ドメインのチロシン残基がリン酸化することで下流の細胞内情報伝達を行う[12]。そこで、BDNF による LOTUS の発現増加は TrkB を介するかを検討するため、TrkB 阻害剤である K252a を用いて薬理的な阻害実験を行った。培養 6 日目の海馬初代培養神経細胞に k252a を終濃度 200 nM で予め添加し、30 分後に BDNF を終濃度 100 ng/mL で添加した。処理後 24 時間培養し、ウエスタンブロッティング法により LOTUS 発現量を解析した。その結果、BDNF 添加でみられた LOTUS の発現上昇は k252a によりコントロールレベルまで抑制された (図 3a, b)。さらに TrkB の関与を検証するため、small interference RNA (siRNA) による TrkB ノックダウンを行った。TrkB siRNA の結果、培養 7 日目の海馬初代培養神経細胞における TrkB 発現量は約 50%減少し (図 3c, d)、BDNF による LOTUS 発現増加は有意に抑制された。また、TrkB siRNA による内在性 LOTUS の発現減少はみられなかった (図 3e, f)。

以上の結果から、外来性の BDNF 添加により誘導される LOTUS の発現増加は TrkB の活性化を介することが示唆された。

3) MAPK シグナルおよび PI3K シグナルは BDNF による LOTUS の発現増加の制御機構に関与する

BDNF による LOTUS 発現増加のより詳細な分子機構を調べるため、TrkB の下流シグナルとして知られる mitogen-activated protein kinase (MAPK), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), phospholipase C- γ (PLC γ) [13]に着目し、薬理的な阻害実験を行った。MEK 特異的阻害剤の PD98059, PI3K 特異的阻害剤の LY-294002, PLC の特異的阻害剤である U-73122 をそれぞれ培養 6 日目の海馬初代培養神経細胞に予め処理し、BDNF 添加後の LOTUS 発現量についてウエスタンブロッティングにより解析した。その結果、BDNF による LOTUS 発現増加は PD98059 または LY-

294002 の添加により有意に抑制された (図 4a, b)。一方で、U-73122 の添加により BDNF による LOTUS 発現増加は抑制されなかった (図 4c)。

c-AMP response element binding protein (CREB) は TrkB の下流シグナル経路において、MAPK シグナルまたは PI3K シグナルにより活性化され、種々の遺伝子の転写を促進することが知られている[14, 15]。そこで、CREB 阻害剤である 666-15 を用いて同様に阻害実験を行った。その結果、666-15 の添加により完全な阻害効果は示されなかったものの、BDNF による LOTUS 発現増加は抑制されることが分かった (図 4d)。

これらの結果から、BDNF による LOTUS 発現増加において、MAPK-CREB 経路または PI3K-CREB 経路が関与することが示唆された。

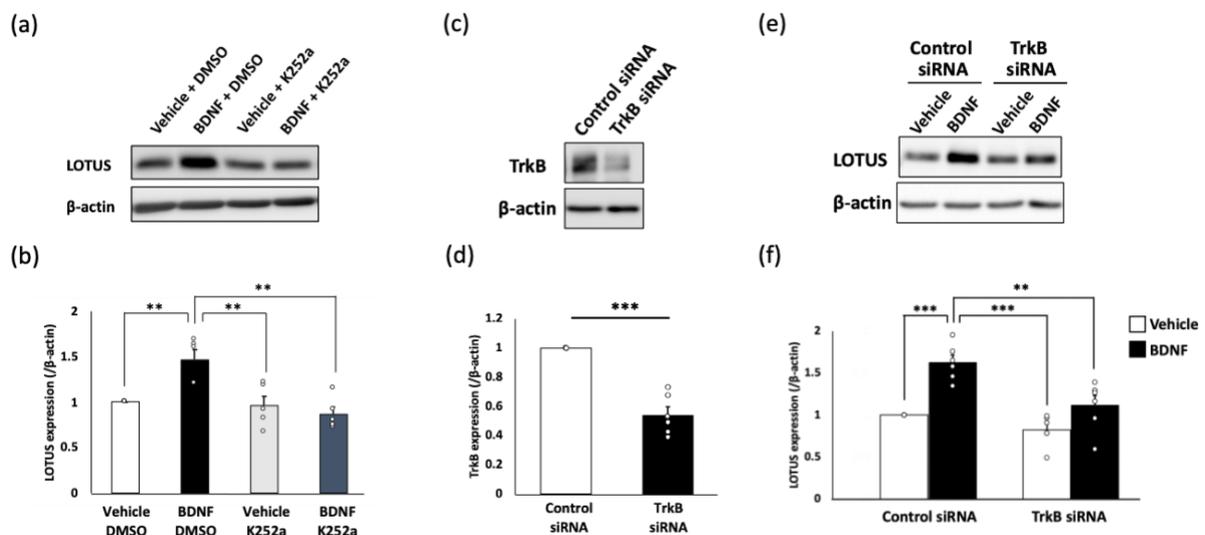


図 3 TrkB の阻害は BDNF による LOTUS 発現増加を抑制する
(Matsubayashi et al, *J Neurochemistry*, in press. (2022).)

(a) K252a および BDNF で処理した培養 7 日目の海馬初代培養神経細胞における LOTUS のウエスタンブロッティング

培養 6 日目に K252a (200 nM) または BDNF (100 ng/mL) を添加し 24 時間後の LOTUS 発現量を解析した。

(b) (a)における LOTUS 発現量の定量結果

各群の LOTUS 発現量は β -actin で補正し、コントロール (Vehicle + DMSO) の定量値で標準化した。(Data are means \pm SEM from the five independent cell culture preparations, $**P < 0.01$ versus BDNF treatment alone, one-way ANOVA post hoc Tukey-kramer)

(c) TrkB siRNA トランスフェクションによる TrkB ノックダウンの確認 (ウエスタンブロッティング)

培養 4 日目の海馬初代培養神経細胞に TrkB siRNA を終濃度 40 nM でトランスフェクションし、さらに 72 時間培養した。

(d) (c)における TrkB 発現量の定量結果

TrkB 発現量は β -actin で補正した。(Data are means \pm SEM from the six independent cell culture preparations, $***P$

< 0.001 versus control siRNA, Student's *t*-test)

(e) TrkB siRNA 処理した培養 7 日目の海馬初代培養神経細胞における LOTUS のウエスタンブロッティング
TrkB siRNA 処理 48 時間後に BDNF を終濃度 100 ng/mL で添加し 24 時間後の LOTUS 発現量を解析した。

(f) (e)における LOTUS 発現量の定量結果

各群の LOTUS 発現量は β -actin で補正し、コントロール (control siRNA + vehicle) の定量値で標準化した。
(Data are means \pm SEM from the six independent cell culture preparations, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus BDNF treatment alone, one-way ANOVA post hoc Tukey-kramer)

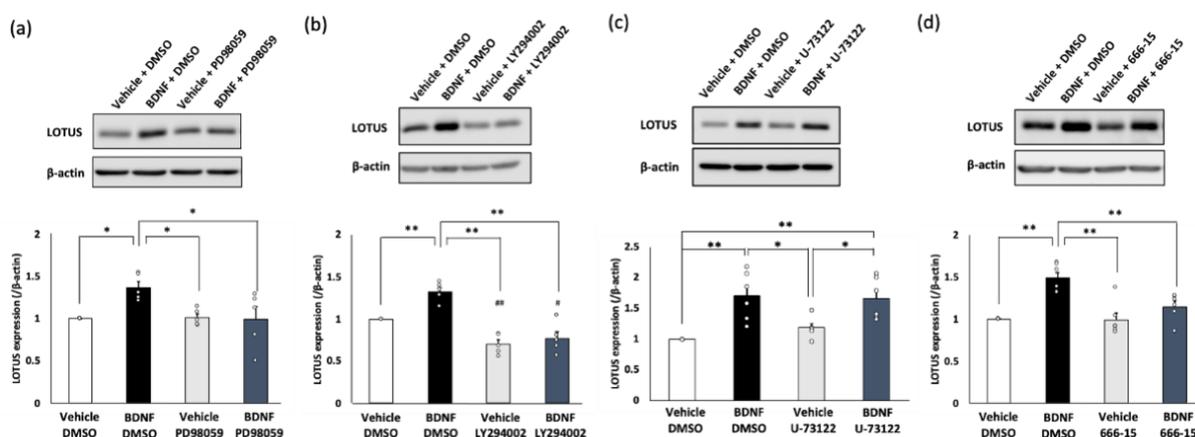


図 4 MAPK または PI3K シグナル経路の障害は BDNF による LOTUS 発現の増加を抑制する
(Matsubayashi et al, *J Neurochemistry*, in press. (2022).)

(a-d) 各種 TrkB シグナル阻害剤および BDNF で処理した培養 7 日目の海馬初代培養神経細胞の LOTUS 発現量
培養 6 日目に (a) PD98059 (100 μ M), (b) LY294002 (50 μ M), (c) U-73122 (10 μ M) または (d) 666-15 (500 nM) を
それぞれ添加し、30 分後に BDNF (100 ng/mL)を添加した。24 時間後の LOTUS 発現量についてウエスタンブ
ロッキングにより解析した。各群の LOTUS 発現量は β -actin で補正し、コントロール (vehicle + DMSO) の
定量値で標準化した。(Data are means \pm SEM from the five (a and b) or the six (c and d) independent cell culture
preparations. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ versus control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, one-way ANOVA post-hoc Tukey-kramer)

4) BDNF は LOTUS の発現上昇を介して Nogo66 により引き起こされる突起伸長阻害を抑制する

これまでに、LOTUS は NgR1 の強力なアンタゴニストとして NgR1 とそのリガンドの一種で
ある Nogo66 の結合により引き起こされる神経突起伸長阻害を抑制することが分かっている [3, 4,
5, 16]。そこで、BDNF により発現増加した LOTUS が NgR1 の機能抑制を亢進するか検討するた
め、野生型マウスと *lotus* 遺伝子欠損マウスの海馬初代培養神経細胞を用いて神経突起伸長アッセ
イを行った。はじめに、培養 3 日目の海馬初代培養神経細胞においても LOTUS は BDNF により
発現増加が誘起されることを確認した (図 5a)。次に、野生型マウスおよび *lotus* 遺伝子欠損マウ
スの培養 1 日目の海馬初代培養神経細胞に BDNF (100 ng/mL) および Nogo66 ペプチド (400 nM)

を添加し、培養 3 日目の最大神経突起長を測定した。その結果、野生型および *lotus* 遺伝子欠損マウスにおける神経突起伸長は Nogo66 ペプチドの添加で阻害された。ここで、BDNF を同時に添加すると野生型マウスにおいては、Nogo66 ペプチドの添加でみられた突起伸長阻害の抑制が観察された。一方で、*lotus* 遺伝子欠損マウスにおいては、BDNF を添加しても Nogo66 ペプチドによる突起伸長阻害は抑制されなかった (図 5b, c)。これらの結果から、BDNF 添加による Nogo66 の突起伸長阻害に対する抑制効果は、LOTUS の発現増加により誘起されることが示唆された。

BDNF による LOTUS の発現上昇が Nogo66 による突起伸長阻害に対して抑制効果を示すか検討するため、続いて K252a を用いて突起伸長アッセイを行った。はじめに K252a は培養 7 日目と同様、BDNF による LOTUS 発現増加を抑制することを確認した (図 5d)。K252a により内在性 LOTUS 発現量の減少はみられなかった。神経突起長を測定したところ、BDNF を処理することで Nogo66 による突起伸長阻害は観察されなかった。ここで K252a を予め添加すると、K252a による突起伸長の抑制がみられたものの、BDNF 添加による Nogo66 の突起伸長阻害作用に対する抑制効果は観察されなかった (図 5e, f)。以上の結果から、海馬神経細胞初代培養細胞において Nogo66 により誘起される神経突起伸長阻害は、BDNF-TrkB シグナルを介した LOTUS の発現増加により抑制されることが示唆された。

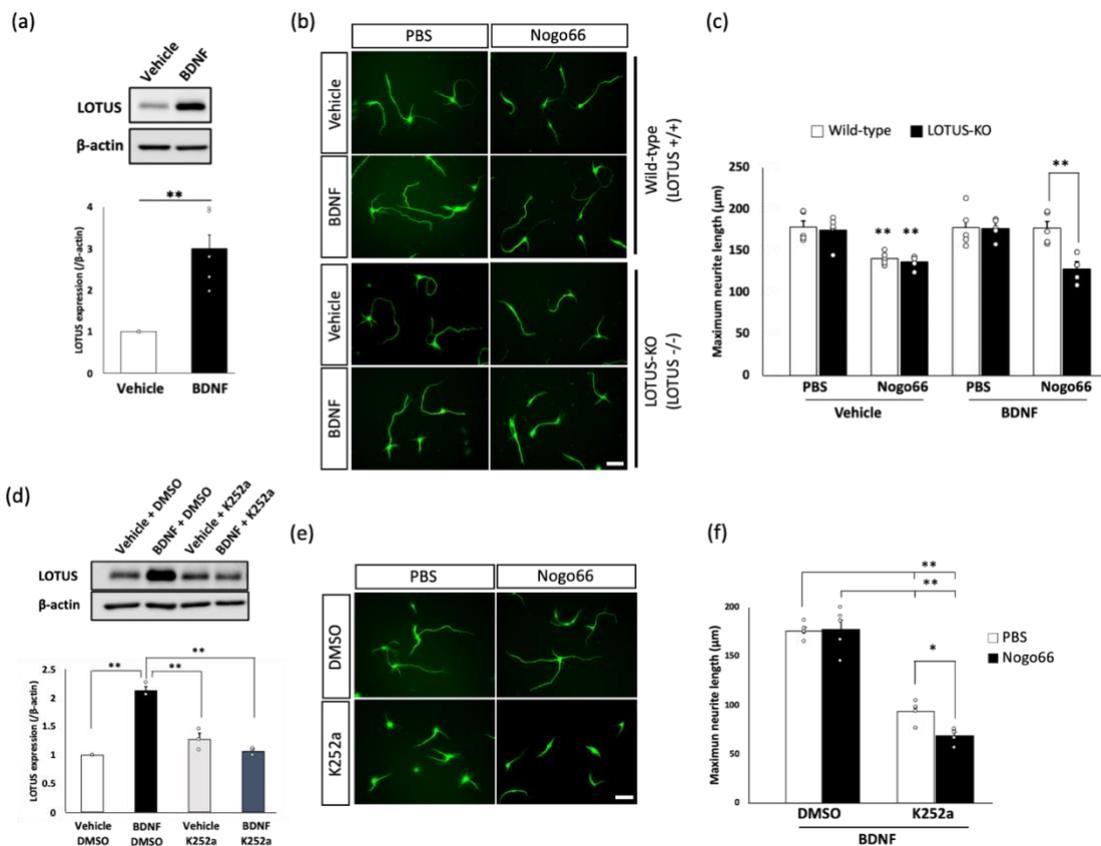


図 5 BDNF により発現増加した LOTUS は Nogo66 による神経突起伸長阻害を抑制する (Matsubayashi et al, *J Neurochemistry*, in press. (2022).)

- (a) BDNF 処理した培養 3 日目の海馬初代培養神経細胞における LOTUS 発現量
培養 1 日目に BDNF (100 ng/mL) を添加し 48 時間後の LOTUS 発現量をウェスタンブロッティングにより解析した。(Data are means \pm SEM from the five independent cell culture preparations. $**P < 0.01$ versus vehicle control, Student's *t*-test)
- (b) 野生型マウスおよび *lotus* 遺伝子欠損マウスにおける培養 3 日目の海馬初代培養神経細胞の代表的な MAP-2 免疫染色図
培養 1 日目に BDNF (100 ng/mL) と Nogo66 (400 nM) を添加し、48 時間後に MAP-2 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。撮像図は蛍光顕微鏡で取得した。Scale bar は 50 μ m を示す。
- (c) (b)における神経突起長の定量結果
White bar は野生型マウスの最大神経突起長を示し、black bar は *lotus* 遺伝子欠損マウスを示す。最大神経突起長は各細胞における最も伸長した突起の根本から先端までを測定し、平均値を算出した。(Data are means \pm SEM (total neurite analyzed = 616–719 per each group) from the five independent cell culture preparations. $**P < 0.01$, two-way ANOVA post-hoc Tukey–kramer)
- (d) K252a および BDNF で処理した培養 3 日目の海馬初代培養神経細胞における LOTUS のウェスタンブロッティング
培養 1 日目に K252a (200 nM) または BDNF (100 ng/mL) を添加し 48 時間後の LOTUS 発現量を解析した。
- (e) 培養 3 日目の海馬初代培養神経細胞の代表的な MAP-2 免疫染色図
培養 1 日目に K252a を予め添加し、30 分後に BDNF (100 ng/mL) と Nogo66 (400 nM) を添加した。48 時間後に MAP-2 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。Scale bar は 50 μ m を示す。
- (f) (e)における神経突起長の定量結果
White bar は control PBS 処理群の最大神経突起長を示し、black bar は Nogo66 処理群を示す。(Data are means \pm SEM (total neurite analyzed = 657–692 per each group) from the five independent cell culture preparations. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, one-way ANOVA post-hoc Holm)

4. 討論

本研究より、海馬初代培養神経細胞における LOTUS 発現量は BDNF の添加により増加することが明らかとなった (図 2a-c)。また、K252a や siRNA を用いた TrkB の阻害実験から、BDNF は TrkB を介して LOTUS の発現増加を誘起することが示された (図 3a, b, e, f)。一方で、K252a および TrkB siRNA による LOTUS 発現量への影響は観察されなかった (図 3a, b, e, f, 図 5d)。このことから、外来的な BDNF の添加による一過的な TrkB の活性化は内在性の LOTUS 発現を誘導することが考えられる。

TrkB の下流シグナルに対する各種阻害剤 (PD98059, LY294002, U-73122, 666-15) を用いて BDNF による LOTUS 発現増加の詳細な制御機構を調べた結果、MAPK-CREB 経路または PI3K-CREB 経路の関与が示唆された (図 4a, b, d)。PLC γ 阻害剤の U-73122 は BDNF による LOTUS 発現増加は抑制効果を示さなかった (図 4c)。TrkB は BDNF と結合すると、細胞内ドメインのチロ

シン残基 Y532 または Y833 がリン酸化され、Y532 のリン酸化により SHC-transforming protein (SHC) や fibroblast growth factor receptor substrate 2 (FRS2) といったアダプター分子が結合することで MAPK または PI3K は活性化される。一方で、Y833 はリン酸化により PLC γ が結合し、下流のシグナル伝達を活性化することが知られている[19]。これらのことから、BDNF による LOTUS の発現増加は Y532 といった特異的な TrkB のチロシン部位に依存することが示唆された。

興味深いことに、LOTUS を過剰発現したヒト iPS 細胞由来の神経細胞/神経前駆細胞において、BDNF や neurotrophin-3, nerve growth factor といった神経栄養因子の発現が増加することが最近報告された[20]。また、BDNF の制御機構にポジティブフィードバックループが存在することも報告されている [21, 22]。当研究室の先行研究において、LOTUS は TrkB と結合することが示されている (未発表データ)。LOTUS と TrkB の結合によるシグナル伝達の変化や細胞機能との関連は明らかになっていないが、LOTUS が TrkB の活性化を介して BDNF の発現誘導に寄与する場合、LOTUS と BDNF の相互制御によるポジティブフィードバック機構が存在する可能性がある。

海馬初代培養神経細胞は約 1 週間の間に軸索または樹状突起を形成し、シナプス形成においても培養 7 日目で確認されている[17, 18]。これまでに LOTUS は、初代培養神経細胞におけるシナプス部での発現が認められ、シナプス形成を亢進することが分かっている[9]。これらのことから、BDNF による LOTUS の発現増加は発達中の海馬神経細胞において、シナプス形成といった神経細胞の極性変化に寄与する可能性がある。

これまでに、視神経障害モデルや脊髄損傷モデルにおいて、可溶性 LOTUS の投与や LOTUS 遺伝子を搭載したアデノ随伴ウイルスによる遺伝子治療、LOTUS 発現 iPS 細胞由来神経細胞を用いた細胞移植は障害後の神経再生を促進することが明らかとなっている[7, 16, 20]。また、BDNF は神経細胞の成長や突起伸長の促進、シナプス可塑性の亢進など多様な作用を示すことから、種々の神経疾患に対して有効であり、現在では BDNF の生理機能を利用した新規治療薬の開発が行われている [23]。本研究において、BDNF による LOTUS の発現増加が NgR1 の機能抑制を示すことが明らかとなった。BDNF は半減期が短いため直接的な投与法は難しいとされるが、生体内でも BDNF による LOTUS の発現上昇を示すことができれば、神経障害に対して LOTUS と BDNF の相加的な生理機能を利用する方策が期待できる。このことから、生体内でも BDNF による LOTUS の発現増加がみられるかは今後の興味深い検討課題である。また、BDNF による内在性 LOTUS の発現制御に基づき、神経障害時における LOTUS の減少阻止や維持・亢進ができれば、内在性機序による新たな治療法の開発が期待できる。

5. まとめ

- ① BDNF は海馬初代培養神経細胞における LOTUS 発現増加を誘起する
- ② BDNF による LOTUS 発現増加は TrkB を介する
- ③ BDNF による LOTUS 発現増加は MAPK-CREB または PI3K-CREB 経路が関与する
- ④ BDNF による LOTUS の発現上昇は Nogo66 ペプチドによる神経突起伸長障害を抑制する

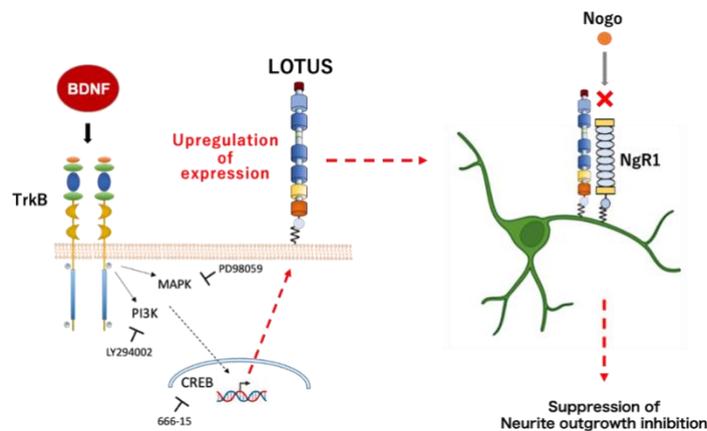


図 6 本研究結果の概略図

(Matsubayashi et al, *J Neurochemistry*, in press. (2022).)

6. 論文リスト

主論文

- 1) Junpei Matsubayashi, Yuki Kawaguchi, Yutaka Kawakami, and Kohtaro Takei; Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) induces antagonistic action to Nogo signaling by the upregulation of lateral olfactory tract usher substance (LOTUS) expression. *Journal of Neurochemistry*, in press. (2022).

参考論文

- 1) Yuki Kawaguchi, Junpei Matsubayashi, Yutaka Kawakami, Ryohei Nishida, Yuji Kurihara, and Kohtaro Takei; LOTUS suppresses amyloid β -induced dendritic spine elimination through the blockade of amyloid β binding to PirB. *Molecular Medicine*, in press. (2022).

7. その他 (参考論文等)

- [1] Fujita Y, et al. Axon growth inhibition by RhoA/ROCK in the central nervous system. *Front. Neurosci.*, 8, 338 (2014).
- [2] He Z, et al. Intrinsic Control of Axon Regeneration. *Neuron.*, 90, 437-451 (2016).
- [3] Sato Y, et al. Cartilage acidic protein-1B (LOTUS), an endogenous Nogo receptor antagonist for axon tract formation. *Science*, 333, 769-773 (2011).
- [4] Kurihara Y, et al. LOTUS suppresses axon growth inhibition by blocking interaction between Nogo receptor-1 and all four types of its ligand. *Molecular Cellular Neuroscience*, 61, 211-218 (2014).
- [5] Kurihara Y, et al. Blockade of chondroitin sulfate proteoglycans-induced axonal growth inhibition by LOTUS. *Neuroscience*, 356, 265-274 (2017).
- [6] Kurihara Y, et al. Nogo receptor antagonist LOTUS exerts suppression on axonal growth-inhibiting

- receptor PIR-B. *J Neurochem*, 155, 258-299 (2020).
- [7] Hirokawa T, et al. Regulation of axonal regeneration by the level of function of endogenous Nogo receptor antagonist LOTUS. *Scientific Reports*, 7, 12119 (2017).
- [8] Takase H, et al. LOTUS overexpression accelerates neuronal plasticity after focal brain ischemia in mice. *PLoS One*, 12, e0184258 (2017).
- [9] Nishida R, et al. LOTUS, an endogeneous Nogo receptor antagonist, is involved in synapse and memory function. *Scientific Reports*, 11, 5085 (2021).
- [10] Takahashi K, et al. Association of cerebrospinal fluid levels of lateral olfactory usher substance protein with disease activity in multiple sclerosis. *JAMA Neurology*, 72, 176-179 (2015).
- [11] Heather D, et al. Expression of NgR1-Antagonizing Proteins Decreases with Aging and Cognitive Decline in Rat Hippocampus. *Cell Mol Neurobiol*, 33, 483–488 (2013).
- [12] Kowiański P, et al. BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cell Mol Neurobiol*, 38, 579–593 (2018).
- [13] Chao, M. V. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signaling pathways. *Nat Rev Neurosci*, 4, 299-309 (2003).
- [14] Du, k., & Montminy, M. CREB is a regulatory target for the protein kinase AKT/PKB. *J Biol Chem*, 273, 32377-32379 (1998).
- [15] Gokce O, et al. Short-Term Striatal Gene Expression Responses to Brain-Derived Neurotrophic Factor Are Dependent on MEK and ERK Activation. *PLoS One*, 4, e5292 (2009).
- [16] Kawakami Y, et al. The Soluble Form of LOTUS inhibits Nogo Receptor-Mediated Signaling by Interfering with the Interaction Between Nogo Receptor Type 1 and p75 Neurotrophin Receptor. *J Neurosci*, 38, 2589-2604 (2018).
- [17] Dotti, C. G, et al. Establishment of Polarity by Hippocampal Neurons in Culture. *J Neurosci*, 8, 1454-1468 (1988).
- [18] Grabrucker A, et al. Synaptogenesis of hippocampal neurons in primary cell culture. *Cell Tissue Res*, 338, 333-341 (2009).
- [19] Cocco E, et al. NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. *Nat Rev Clin Oncol*, 15, 731-747 (2018).
- [20] Ito S, et al. LOTUS overexpression via ex vivo gene transduction further promotes recovery of motor function following human iPSC-NS/PC transplantation for contusive spinal cord injury. *Stem Cell Reports*, 16, 1-15 (2021).
- [21] Cheng P, et al. Self- amplifying autocrine actions of BDNF in axon development. *PNAS*, 108, 18430-18435 (2011).
- [22] Tuvikene J, et al. AP-1 transcription factors mediate BDNF-positive feedback loop in cortical neurons.

J Neurosci, **36**, 1290-1305 (2016).

[23] Nagahara AH, et al. Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. *Nat Rev Drug Discov*, **10**, 209-219 (2011).

8. 用語集

神経再生阻害因子

中枢神経の再生を阻む主要因として、病巣内に集積したアストロサイトによるグリア瘢痕、ミクログリアや浸潤した免疫細胞の炎症反応による二次障害、さらに髄鞘やアストロサイトに存在する神経再生阻害因子の存在が考えられている。代表的な神経再生阻害因子として、Nogo, Myelin-associated glycoprotein (MAG), Oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp), B lymphocyte stimulator (BlyS)および Chondroitin sulfate proteoglycan が報告されている。これら5種の神経再生阻害因子は、共通の受容体である Nogo receptor-1(NgR1)に結合し、軸索伸長阻害や成長円錐の崩壊を引き起こす。

Lateral Olfactory Tract Usher Substance (LOTUS)

マウス嗅索の神経束形成に必須の分子として発見された。LOTUS は N 末端側から、シグナルドメイン, FG-GAP ドメイン, LOTUS 特異的な UnvB/ASPIC (UA)ドメイン, C 末端側の EGF-calcium binding ドメインにより構成される GPI アンカー型の膜タンパク質である。また、LOTUS は膜結合型と C 末端側が切断されて分泌される可溶型の双方が存在する。

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

1982年にブタ脳から精製され発見された神経栄養因子の一つである。アミノ酸 119 個, 13.5 kDa のタンパク質で、シグナル配列を含む Prepro-neurotrophin, 前駆型の pro-neurotrophin の変換過程を経て成熟型に合成される。細胞外に放出された BDNF は低親和性受容体の p75 および高親和性受容体の Tropomyosin-related kinase B (TrkB)と特異的に結合し、シグナルを細胞内に伝達する。中枢神経においては、BDNF は TrkB とともに海馬、大脳皮質、小脳など幅広い脳領域での発現が認められる。また、神経細胞の生存維持や成長、シナプスの機能亢進による神経可塑性の制御といった多彩な生理作用が知られており、高次脳機能の発現において主要かつ根幹的な役割を果たす。