

学位論文審査の結果の要旨

氏名	松林 潤平	
学位の種類	博士(理学)	
学位記番号	甲 第1865号	
学位授与の日付	令和5年3月24日	
学位授与の要件	文部科学省令学位規則 第4条第1項 該当	
学位論文題目	Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) induces antagonistic action to Nogo signaling by the upregulation of lateral olfactory tract usher substance (LOTUS) expression	
主研究指導教員	竹居光太郎	
論文審査委員	(主査) 古久保 哲朗	教授
	(副査) 片岡 浩介	准教授
	(副査) 佐々木 幸生	准教授
	(副査) 有田 誠	大学院客員教授

論文内容の要旨

哺乳類における成体の中枢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、障害後の中枢神経系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。Lateral olfactory tract usher substance (LOTUS) は神経再生阻害因子を受容する Nogo receptor-1 (NgR1) や Paired immunoglobulin-like receptor B (PirB) に対して強力な拮抗作用を有するため、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。しかし、LOTUS の発現量は脊髄損傷や脳虚血により患部領域で大幅に減少することが観察された。本論文では、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 の発現制御機構や NgR1 の機能制御との関連性を明らかに

するための一連の実験研究がなされた。

最初に、BDNF の LOTUS 発現量に与える影響について、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 BDNF を添加して 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を明らかにした。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ことが知られているため、BDNF による LOTUS の発現増加は TrkB を介するかについて検討された。TrkB 阻害剤である K252a を用いた薬理的な阻害実験では 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、small interference RNA (siRNA) による TrkB ノックダウンにおいても BDNF による LOTUS 発現増加は有意に抑制されたことから、外来性の BDNF 添加によって誘導される LOTUS の発現増加は TrkB の活性化を介することが示唆された。次に、TrkB の下流シグナルとして知られる MAPK, PI3K, PLC γ の薬理的な阻害実験が行われ、BDNF による LOTUS 発現増加は MAPK, PI3K を各々阻害することで有意に抑制されたが、PLC γ の阻害では LOTUS 発現増加は抑制されなかった。これらの下流シグナル経路の転写因子として c-AMP response element binding protein (CREB) が知られているので、CREB 阻害剤による検討を行ったところ、BDNF による LOTUS 発現増加が抑制され、BDNF による LOTUS 発現増加は MAPK-CREB 経路または PI3K-CREB 経路が関与することが示唆される結果が示された。

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が行われ、Nogo66 ペプチドを添加して見られる神経突起伸長の阻害は、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のに対し、*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。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を示唆した。最後に、TrkB を介した BDNF による LOTUS の発現上昇の関与を検討するため、K252a を用いて突起伸長アッセイが行われ、K252a の添加によって BDNF の Nogo66 の突起伸長阻害作用に対する抑制効果が観察されず、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 の発現増加によって抑制されることを示唆する実験結果を得た。以上より、本論文において、BDNF による LOTUS の発現増加が NgR1 の機能抑制を示すことを明らかにした。本論文の内容は、Journal of Neurochemistry に掲載された (Matsubayasi et al., J. Neurochem. 164, 29-43 DOI:10.1111/jns.15732 (2023))。

論文審査結果の要旨

本論文の審査は、4名の審査員（主査：古久保 哲朗 副査：片岡 浩介、佐々木 幸生、有田 誠）により、提出された学位論文の内容、専門的知識や関連分野に関する知識、外国語能力に関して行われた。

令和4年12月20日に行われた公聴会では、指定された時間内に非常に分かりやすい表現での確な発表が行われた。続いて質疑応答においては、ほぼ全ての質問に対して概ね良好な回答を行い、その代表的な質疑応答は以下の通りである。

佐々木副査より、LOTUS の発現を抑制するものがあるかとの質問に対し、IL-1 β が LOTUS の発現を減少させること、また PTEN^{-/-} などでは LOTUS の発現が増加するためにこのような因子が抑制系に働いている可能性があるかと回答した。また、突起伸長の実験結果から、BDNF と Nogo を添加した群では、BDNF と LOTUS が Nogo 受容体が作用する p75 と協調的に作用していることは考えられるのかとの質問に対し、BDNF-LOTUS が p75 にどう関与しているのかは現在知見がなく知られていないため、今後の課題であると回答した。片岡副査より、損傷で CREB が減少する理由は何か、また減少した環境下で BDNF による CREB 活性化はどれほどのものかという質問に対し、BDNF も LOTUS と同時に神経疾患で減少することが報告されているので、減少理由は不明だが CBP などのコアアクチベーターとの相互作用の変化なども解析対象として重要と考えられると回答した。その他、CREB 活性を下げる因子と BDNF を下げる因子との関連性についても質問があったが、そのような関連性は知られていないとの回答がなされた。有田副査より、LOTUS や NgR1 が GPI アンカー型膜蛋白質である意義は何かとの質問があり、脂質ラフトにおける分子の相互作用やプロセッシングによる分泌が挙げられるとの回答がなされた。また、BDNF によって NgR1 の発現に変化があるかとの質問には、BDNF によって NgR1 の発現が減少するという自身の実験結果を示して回答した。更に、cAMP の変動ではどうかとの質問においては、発達期の神経細胞では cAMP の発現変動が知られているので、LOTUS の発現が cAMP に関係する可能性はあるかもしれないが、未検討なので今後の課題であると回答があった。古久保主査からは多くの質問があったが、例えば、BDNF と LOTUS の作用は似ていると思われるが、BDNF の作用の内、LOTUS が関与して起こる作用はどのくらいあるのかという質問に対し、NgR1 を介した作用ではメジャーであると思われると回答があった。また突起伸長アッセイでは野生型と LOTUS 遺伝子欠損マウスとの違いが見られない理由についての質問では、今回の実験条件では培養液中に成長因子などが含まれているために LOTUS の有無に影響しない要素で突起伸長が起こったためではないかと推察されると回答があった。K252a 自体で神経突起伸長が低下するが、BDNF 添加がない時に K252a を処理すると突起伸長はどうなるのかとの質問もあり、BDNF 非存在下でも突起伸長が阻害され、TrkB 以外の K252a の阻害標的が突起伸長活性に関与すると考えられるとの回答があった。

続いて12月27日には審査会が開かれ、再度簡単に研究内容の説明がなされた後、まず最初に専門分野に関する質疑応答が行われた。佐々木副査より、K252aによる突起伸長について培養1日目ではどうか、この薬剤による細胞死は見られるかとの質問があり、培養1日目では短いものや長いものなどのヘテロな状態にあるが、少なくとも20-30 μm の突起伸長があること、薬剤による細胞死は認められないことの的確な回答があった。有田副査より、NgR1には5種のリガンド分子があるが、各々の結合様式などはどの程度分かっているのかとの質問に対し、NogoとNgR1の結合として知られている知見などを説明して回答した。また、これら5種の再生阻害因子はどのような違いがあるのかという質問では、Nogo、MAG、OMgpはミエリンに、BLYSはアストロサイトに、CSPGはグリア瘢痕に発現しているように発現の細胞種や場所が異なるとの説明があった。更に、5種のリガンドの中でNogoとNgR1の関係を検討した理由と海馬神経細胞で検討した理由を問われ、Nogoの作用は最もよく知られていることから多くの先行研究で吟味されているため、そして記憶や学習といった重要な機能が知られている海馬の神経細胞はLOTUSが内在的に発現しているためと回答があり、全部の質問に対し、概して的確な回答がなされた。片岡副査より、ウエスタンブロットにおけるLOTUS発現量はK252a単独では影響がないように見えるが矛盾していないかとの質問に対し、示された実験結果は播種した細胞密度が異なるなどの実験条件が異なるために生じた違いであると回答があった。また、K252a自体によるLOTUSの発現量の変化はあるかとの質問では、実験として結果を見ていないので分からないが、チロシンキナーゼ型受容体に関連したFGF2によってもLOTUS発現上昇が当研究室で見出されているためにそのような可能性は考えられると回答した。最後に古久保主査より、K252aの影響を切り分けるためにはどういった実験を行うと良いかという質問においてはBDNF下のTrkBのRNAiによるノックダウン実験などがあると思うと回答があったが、最も的確な回答は確認できなかった。培養後48時間の解析ではなく、もっと短時間や長時間での変化を検討することはできないのかという質問に対しては、様々な時間経過での観察は行っていないが、培養後6-7時間ではLOTUSの発現上昇が開始していることは確認したので、そのような時間的変化を検討することは重要だと思われると回答があった。転写でない可能性としてはどうか、mRNAの安定性はどうかなどの質問もなされたが、的確な回答は得られなかった。次に関連項目に関する質疑応答が成された。佐々木副査よりsiRNAによるノックダウンメカニズムについて、有田副査よりGPIアンカーの生合成系と生理的意義について、片岡副査より再生の実験系について、そして古久保主査よりCREBによる転写制御のメカニズムについて各々質問があり、概ね的確に回答したが、回答に困難が生じた場合も幾つか見受けられた。最後に、英語によるプレゼンテーションがあり、概要は何とか理解できるといったレベルではあったが、英語による説明は可能であると思われた。

以上の質疑応答の直後に審査委員全員で討議を行なった。研究内容や質疑は十分学位に値するレベルであり、関連科目や英語の能力なども総合的に判断して、申請者は博士の学位を得るにふさわしい資格を有すると判定された。