

氏名 谷江 良崇
たにえ よしたか

学位の種類 博士 (薬科学)

学位記番号 富医薬博甲第 367 号

学位授与年月日 令和 3 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士後期課程
薬科学専攻

学位論文題目 Neuroleukin による脊髄損傷改善作用の研究
(Study of Neuroleukin for improving spinal cord injury)

論文審査委員

(主査) 教授 中川 嘉
(副査) 准教授 田渕 明子
(副査) 教授 東田 千尋 (指導教員)

論文要旨

論文題目：Neuroleukin による脊髄損傷改善作用の研究

課程・専攻：博士後期課程 薬科学専攻

所属：和漢医薬学総合研究所 病態制御分野 神経機能領域

氏名：谷江良崇

【背景】

脊髄損傷 (Spinal Cord Injury: SCI) では、脊髄組織に対する外傷とそれに引き続いて生じる炎症反応により、神経伝導路の断裂や、細胞の脱落が起きる。それにより損傷部より下位の神経支配領域では、運動・感覚機能障害等が生じる。損傷後、活性化アストロサイトが損傷部に集積するとグリア瘢痕を形成し、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (Chondroitin Sulfate Proteoglycan: CSPG) を含む軸索伸展阻害因子が損傷部に増加する。これにより神経伝導路の再生は阻害され、多くの場合、機能障害は永続する。

近年まで SCI の治療薬には、抗炎症薬のメチルプレドニゾロンのみが承認されていたが、有効性を疑問視する報告や副作用のリスクから、現在の治療ガイドラインでは使用が推奨されていない。薬物療法以外には、損傷椎骨による圧迫除去のための外科的手術、リハビリテーションがあるが、これらの対症療法には、損傷後の運動機能や感覚機能を改善する積極的な役割は期待されていないため、より本質的な観点から損傷した軸索の回復を促す治療法が求められている。現在新たな治療開発を目指して growth factor 投与や細胞移植による臨床試験が行われている。また実施可能な医療機関は非常に限定されるが、自家骨髄間葉系幹細胞の移植療法が条件及び期限付で承認され、昨年臨床で実施されている。この様に新たな治療法の開発が進んでいるが、十分な機能回復を見込める治療法が確立されたとはまだ言えない現状である。

当研究室では、SCI 治療には損傷部での軸索伸展が重要であり、断裂した神経伝導路の再建が運動機能障害からの回復には必要であると考えている。そこで、より効果的な治療戦略を見出すため、損傷部に集積するアストロサイトに着目した。アストロサイトによる軸索伸展促進作用を誘導できれば、損傷後の運動機能の回復に、より効果的に寄与できるかもしれない。本研究では、アストロサイトを軸索伸展に寄与するよう機能誘導し、かつ神経細胞にも直接関与して軸索伸展をもたらす共通因子の発見を目指した。

【第1章 細胞外 NLK のアストロサイトへの作用、及び急性期 SCI 改善作用の検討】¹⁾

SCI におけるアストロサイトは、神経機能に対して有益にも有害にも作用することが知られている。通常の SCI では、アストロサイトの有害な作用が有益な作用よりも優位であるために、運動機能の回復が妨げられると考えられる。そこで私は、アストロサイトの有益な作用、特に軸索伸展を促進する機能を高めることが出来れば、SCI 後の運動機能の回復により効果的に寄与できると考えた。本研究では、アストロサイトから分泌されるタンパク質であり、機能的な意義が未検討であった NLK に着目した。本章では、細胞外 NLK のアストロサイトへの作用と急性期 SCI マウスへの有効性の検討に取り組んだ。

アストロサイトからの NLK 分泌に対する細胞外 NLK の作用

培養アストロサイト (ddY マウス、胎生 14 日齢) に recombinant NLK (500 ng/ml) を処置したところ、細胞内における NLK の発現量及び、培養上清 (conditioned medium: CM) 中の NLK 量が増加した。この細胞外 NLK による NLK の発現量の増加は、培養神経細胞 (ddY マウス、胎生 14 日齢) 及びマイクログリア (ddY マウス、生後 2-4 日齢) では認められなかった。

細胞外 NLK による軸索伸展作用

NLK 処置されたアストロサイトから得た CM を培養神経細胞に処置したところ、軸索長が増加した。また recombinant NLK (10 - 100 ng/ml) を神経細胞に処置すると、軸索長が増加した。この NLK の軸索伸展活性は、CSPG coating 上に播種された神経細胞においても確認された。

アストロサイトにおける NLK の直接結合タンパク質の探索

アストロサイトからの NLK 分泌のメカニズムの全容を明らかにするには、まずは NLK が直接結合するタンパク質を同定することが重要と考えた。直接結合タンパク質の同定には、Drug affinity responsive target stability (DARTS) 法、銀染色、nano-LC MS/MS 解析、及び Western blot を用いた。培養アストロサイトの whole cell lysate から NLK の直接結合タンパク質を探索した結果、78 kDa glucose regulated protein (GRP78) が同定された。GRP78 は小胞体に発現し、タンパク質のフォールディングやストレス応答シグナル等に関わるシャペロン分子として一般的に認識されているものの、小胞体以外にも多様な局在を示し、細胞膜に発現し受容体様の機能を示す GRP78 の研究が、近年多く報告されている。そこで培養アストロサイトから細胞膜画分 lysate を調製し DARTS 法を行ったところ、細胞膜の GRP78 と NLK の結合が確認された。

アストロサイトからの NLK 分泌における GRP78 の関与

NLK タンパク質は、その分子量の大きさから、細胞膜を通過して細胞内の GRP78 に結合する可能性は低いと想定された。そこで、細胞膜上に局在する GRP78 がアストロサイトからの NLK 分泌を制御する NLK の受容体であると予想した。培養アストロサイトに GRP78 中和抗体 (2 µg/ml) または normal IgG (2 µg/ml) を前処置した後、NLK (500 ng/ml) を処置した。その結果、NLK 刺激によるアストロサイトからの NLK 分泌亢進作用は、中和抗体処置により完全に阻害された。

急性期 SCI マウスに対する NLK の作用

損傷 15 分以内の SCI マウスの損傷部に NLK (2 µg/mouse) を単回注入したところ、運動機能の回復が認められた。損傷 20 日目の脊髓矢状断切片を作製し、蛍光免疫染色法による組織学的解析を行ったところ、NLK 投与により損傷領域内の NF-H 陽性軸索密度、及び NLK 発現量が増加した。

以上本章では、NLK 刺激によりアストロサイトからの NLK が分泌されること、NLK は軸索伸展を促進することを見出した。また、アストロサイトからの NLK 分泌を制御する受容体として、細胞膜に局在する GRP78 が同定された。

【第 2 章 NLK の軸索伸展メカニズムの解明】²⁾

第 1 章では *in vitro*, *in vivo* の軸索伸展に阻害的な環境下において、NLK は軸索伸展作用を示した。さらに急性期 SCI マウスの損傷部への NLK 単回投与は、運動機能を改善させた。これらの結果から、NLK の軸索伸展活性は SCI からの回復に有用と考えられるが、その軸索伸展シグナルは不明である。前章では、アストロサイトにおける NLK の受容体として細胞膜に局在する GRP78 が同定されたが、神経細胞においても NLK の軸索伸展作用を制御する最上流タンパク質が GRP78 である可能性を予想した。そこで本章では、神経細胞における NLK と GRP78 の結合性、受容体型 GRP78 の軸索伸展への関与、さらに NLK による SCI 改善作用に対する GRP78 の寄与を明らかにすることを目的とした。

神経細胞における NLK と GRP78 の結合

神経細胞の細胞膜画分 lysate と NLK (10 µg/ml) を用いて DARTS 法、western blot を行ったところ、GRP78 と NLK の結合が確認された。さらに recombinant GRP78 (10 pmol) 及び NLK (20 pmol) を反応させ、抗 His-tag 抗体を用いた免疫沈降法を実施したところ、GRP78 と NLK の結合が示された。

NLKの軸索伸展作用における細胞膜のGRP78の関与

培養神経細胞に対し、GRP78 中和抗体 (10, 100 ng/ml) または normal IgG (10, 100 ng/ml) を前処置した後、NLK (100 ng/ml) を処置したところ、NLK の軸索伸長作用が中和抗体前処置により阻害された。

NLKの軸索伸展メカニズムへのAkt活性化の関与

がん細胞や血管内皮細胞を用いた検討では、受容体型 GRP78 へのリガンド刺激による Akt の活性化が示されており、その活性化は細胞生存、増殖、運動能等の制御に必須であることが報告されている。また Akt は軸索伸展シグナルにも重要な役割を担う分子として広く知られている。そこで NLK 刺激により GRP78 の下流で Akt の活性化が制御される可能性を検討した。培養神経細胞に対し、GRP78 中和抗体 (10, 100 ng/ml) または normal IgG (10, 100 ng/ml) を前処置後、NLK (100 ng/ml) を処置して 30 分経過後に cell lysate を調製した。抗セリンリン酸化抗体を用いた免疫沈降法及び western blot により Akt のリン酸化を評価したところ、NLK により Akt のリン酸化は亢進し、中和抗体処置によりその活性化は抑制された。さらに培養神経細胞に対して Akt 阻害剤 (0.1 μ M) と NLK (100 ng/ml) を同時処置すると、NLK の軸索伸展作用は阻害された。

急性期 SCI に対する NLK - GRP78 シグナリングの作用

SCI マウスに損傷当日から 21 日間、GRP78 中和抗体及び NLK を同時に側脳室内持続投与したところ、NLK の後肢運動機能改善作用は阻害された。さらに損傷 21 日目の脊髓矢状断切片を作製し蛍光免疫染色により NF-H 陽性軸索密度を評価した。その結果、損傷部における NLK の軸索伸展作用は中和抗体同時投与により抑制された。

以上本章では、NLK が神経細胞の受容体型 GRP78 を介して軸索伸展作用を発揮すること、その下流では Akt が関与することを明らかにした。この軸索伸展をもたらす NLK-GRP78 シグナリングは、急性期 SCI 治療における治療ターゲットになり得ることを示した。

【結論】

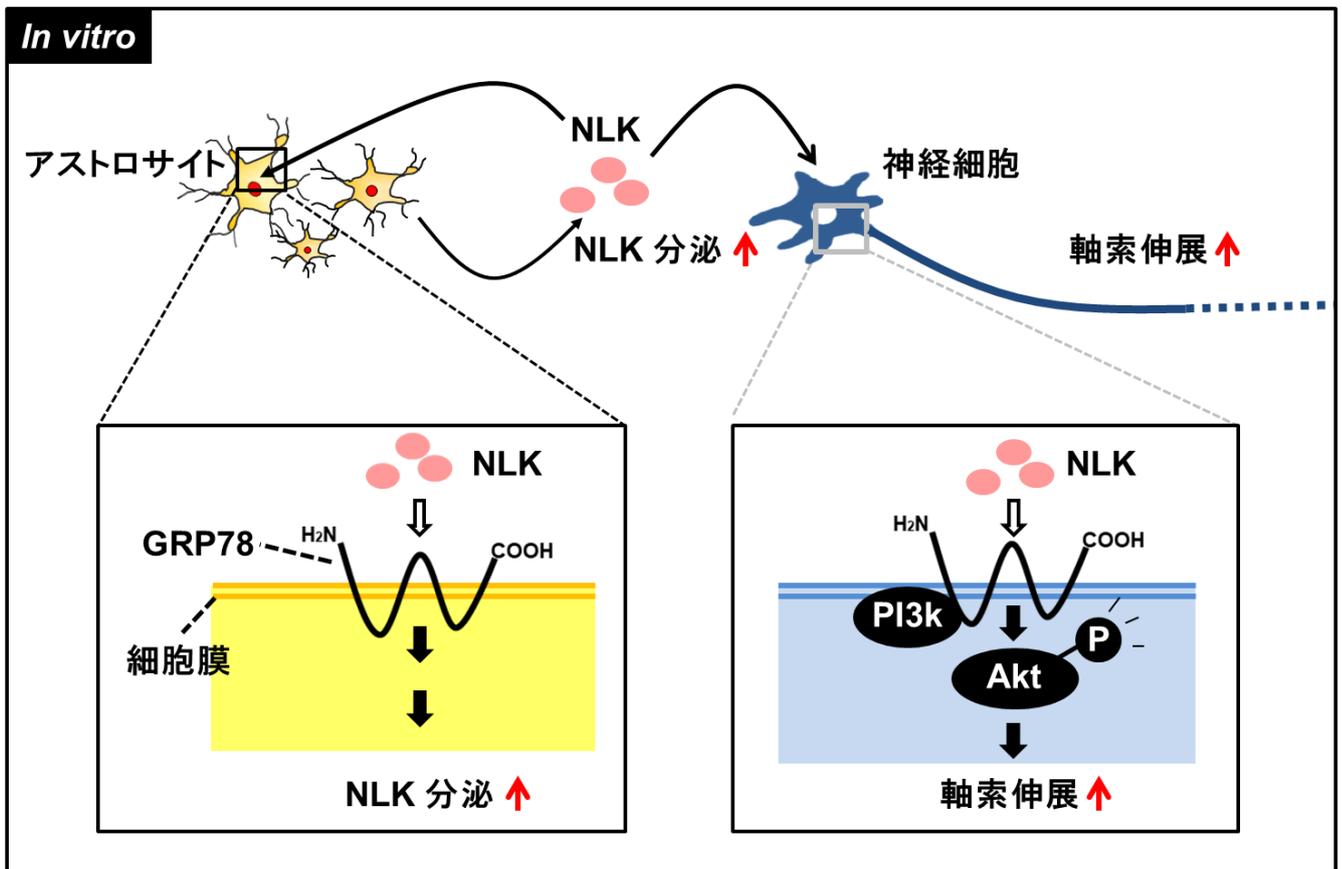
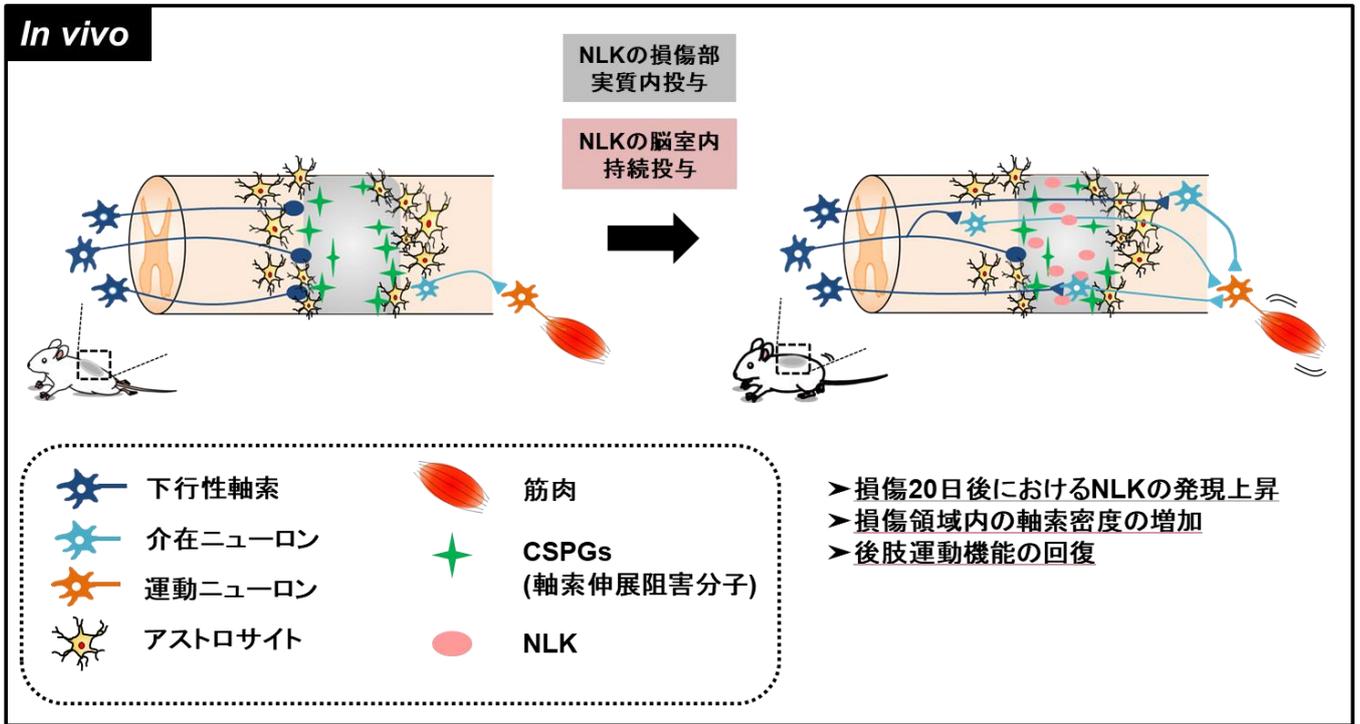
本研究では、NLK-GRP78 シグナリングがアストロサイトの有益な機能としての NLK 分泌能を高め、かつ神経細胞に対して軸索伸展を促す経路であることを見出した。さらにこのシグナリングは、損傷部での軸索伸展を介した SCI 改善作用を示した。近年、受容体型 GRP78 を標的とする低分子化合物の開発がいくつか報告されているが、それら薬物の中枢移行性が良好であるならば、経口投与での治療も可能となり、低侵襲性の効果的な治療法の確立につながり得る。

これまでに、神経栄養因子や growth factor 投与により SCI 改善作用を示す報告はいくつもあるが、損傷部のアストロサイトからの NLK 分泌を介した軸索伸展増強作用を示す例はなく、その点が本研究の新規性であると私は考えている。現在、実施されている臨床試験において、アストロサイトを標的とした治療法はなく、損傷部に集積する活性化アストロサイトを利用し、軸索伸展を促進する NLK-GRP78 シグナリングは、今後の SCI における、より効果的な新規治療ターゲットとして期待される。

【参考文献】

1. **Tanie Y**, Tanabe N, Kuboyama T, Tohda C. Extracellular Neuroleukin Enhances Neuroleukin Secretion From Astrocytes and Promotes Axonal Growth in vitro and in vivo. *Front Pharmacol.* 2018. 9:1228.
2. **Tanie Y**, Kuboyama T, Tohda C. GRP78-Mediated Signaling Contributes to Axonal Growth Resulting in Motor Function Recovery in Spinal Cord-Injured Mice. *Front Pharmacol.* 2020. 11:789.

図 本論文の概要



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

<p>報 告 番 号</p>	<p>富医薬博甲第 号 富医薬博乙第 号</p>	<p>氏 名</p>	<p>谷江 良崇</p>
<p>審査委員</p>	<p>職 名</p> <p>(主査) 教授</p> <p>(副査) 准教授</p> <p>(副査) 教授</p> <p>(副査)</p> <p>(副査)</p>	<p>氏 名</p> <p>中川 嘉</p> <p>田淵 明子</p> <p>東田 千尋</p>	 <p>印</p>
<p>(論文題目 英語の場合は和訳, 日本語の場合は英訳を付記すること。)</p> <p>Neuroleukinによる脊髄損傷改善作用の研究 (Study of Neuroleukin for improving spinal cord injury)</p>		<p>(判定)</p> <p>合格</p>	
<p>(論文審査の要旨) (2頁以内)</p> <p>【背景】 脊髄損傷 (Spinal Cord Injury: SCI) では、脊髄組織に対する外傷とそれに引き続いて生じる炎症反応により、神経伝導路の断裂や、細胞の脱落が起き、運動・感覚機能障害等が生じる。損傷後、活性化アストロサイトが損傷部に集積するとグリア瘢痕を形成し、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (Chondroitin Sulfate Proteoglycan: CSPG) を含む軸索伸展阻害因子が損傷部に増加する。これにより神経伝導路の再生は阻害され、多くの場合、機能障害は永続する。 当研究室では、SCI 治療には損傷部での軸索伸展が重要であり、断裂した神経伝導路の再建が運動機能障害からの回復には必要であると考えている。そこで、より効果的な治療戦略を見出すため、損傷部に集積するアストロサイトに着目した。アストロサイトによる軸索伸展促進作用を誘導できれば、損傷後の運動機能の回復に、より効果的に寄与できるかもしれない。本研究では、アストロサイトを軸索伸展に寄与するよう機能誘導し、かつ神経細胞にも直接関与して軸索伸展をもたらす共通因子の発見を目指した。</p> <p>【第 1 章 細胞外 NLK のアストロサイトへの作用、及び急性期 SCI 改善作用の検討】¹⁾ SCI におけるアストロサイトは、神経機能に対して有益にも有害にも作用することが知られているが、本研究では、アストロサイトの有益な作用、特に軸索伸展を促進する機能を高めることが出来れば、SCI 後の運動機能の回復により効果的に寄与できると考えた。本研究では、アストロサイトから分泌されるタンパク質であり、機能的な意義が未検討であった NLK に着目した。第 1 章では、細胞外 NLK のアストロサイトへの作用と急性期 SCI マウスへの有効性を検討した。</p> <p>アストロサイトからの NLK 分泌に対する細胞外 NLK の作用 培養アストロサイト (ddY マウス、胎生 14 日齢) に recombinant NLK (500 ng/ml) を処置したところ、細胞内における NLK の発現量及び、培養上清 (conditioned medium: CM) 中の NLK 量が増加した。この細胞外 NLK による NLK の発現量の増加は、培養神経細胞 (ddY マウス、胎生 14 日齢) 及びマイクログリア (ddY マウス、生後 2-4 日齢) では認められなかった。</p> <p>細胞外 NLK による軸索伸展作用 NLK 処置されたアストロサイトから得た CM を培養神経細胞に処置したところ、軸索長が増加した。また recombinant NLK (10 - 100 ng/ml) を神経細胞に処置すると、軸索長が増加した。この NLK の軸索伸展活性は、CSPG coating 上に播種された神経細胞においても確認された。</p> <p>アストロサイトにおける NLK の直接結合タンパク質の探索 アストロサイトからの NLK 分泌のメカニズムを明らかにするために、NLK が直接結合するタンパク質を、Drug affinity responsive target stability (DARTS) 法、銀染色、nano-LC MS/MS 解析、及び Western blot により同定した。培養アストロサイトの whole cell lysate から NLK の直接結合タンパク質を探索した結果、78 kDa glucose regulated protein (GRP78) が同定された。GRP78 は小胞体のシャペロン分子として一般的に認識されているものの、小胞体以外にも多様な局在を示</p>			

し、細胞膜に発現し受容体様の機能を示す GRP78 の研究が、近年多く報告されている。そこで培養アストロサイトから細胞膜画分 lysate を調製し DARTS 法を行ったところ、細胞膜の GRP78 と NLK の結合が確認された。

アストロサイトからの NLK 分泌における GRP78 の関与

培養アストロサイトに GRP78 中和抗体 (2 µg/ml) または normal IgG (2 µg/ml) を前処置した後、NLK 刺激(500 ng/ml)すると、アストロサイトからの NLK 分泌亢進作用は、中和抗体処置により完全に阻害された。この結果は、細胞膜上に局在する GRP78 がアストロサイトからの NLK 分泌を制御する NLK の受容体であることを示唆する。

急性期 SCI マウスに対する NLK の作用

損傷 15 分以内の SCI マウスの損傷部に NLK (2 µg/mouse) を単回注入すると、運動機能の回復が認められた。損傷 20 日目の脊髄矢状断切片を、蛍光免疫染色法により組織学的解析したところ、NLK 投与により損傷領域内の NF-H 陽性軸索密度、及び NLK 発現量が増加した。

【第 2 章 NLK の軸索伸展メカニズムの解明】²⁾

NLK の軸索伸展シグナルは不明である。そこで、アストロサイトだけでなく、神経細胞においても NLK の軸索伸展作用を制御する最上流タンパク質が GRP78 である可能性を予想し、神経細胞における NLK と GRP78 の結合性、受容体型 GRP78 の軸索伸展への関与、さらに NLK による SCI 改善作用に対する GRP78 の寄与を明らかにすることを目的とした。

神経細胞における NLK と GRP78 の結合

神経細胞の細胞膜画分 lysate と NLK (10 µg/ml)を用いて DARTS 法、western blot を行ったところ、GRP78 と NLK の結合が確認された。さらに recombinant GRP78 (10 pmol) 及び NLK (20 pmol) を反応させ、抗 His-tag 抗体を用いた免疫沈降法を実施したところ、GRP78 と NLK の沈降、すなわち結合性が示された。

NLK の軸索伸展作用における細胞膜の GRP78 の関与

培養神経細胞における、NLK (100 ng/ml) による軸索伸長作用は、GRP78 中和抗体 (10, 100 ng/ml)前処置により阻害された。

NLK の軸索伸展メカニズムへの Akt 活性化の関与

がん細胞や血管内皮細胞での、受容体型 GRP78 の下流シグナルとして Akt リン酸化が示されていることから、神経細胞においても NLK 刺激により GRP78 の下流で Akt の活性化が制御される可能性を検討した。培養神経細胞に対し、GRP78 中和抗体 (10, 100 ng/ml) または normal IgG (10, 100 ng/ml) を前処置後、NLK (100 ng/ml) を処置して 30 分経過後に cell lysate を調製した。抗セリンリン酸化抗体を用いた免疫沈降法及び western blot により Akt のリン酸化を評価した、NLK により Akt のリン酸化は亢進し、中和抗体処置によりその活性化は抑制された。さらに培養神経細胞における NLK の軸索伸展作用は、Akt 阻害剤 (0.1 µM)の同時処置により阻害された。

急性期 SCI に対する NLK - GRP78 シグナリングの作用

SCI マウスに損傷当日から 21 日間、GRP78 中和抗体及び NLK を同時に側脳室内持続投与したところ、NLK の後肢運動機能改善作用は阻害された。さらに損傷 21 日目の脊髄矢状断切片における NF-H 陽性軸索密度は NLK 処置により増加し、中和抗体同時投与により抑制された。

以上本章では、NLK が神経細胞の受容体型 GRP78 を介して軸索伸展作用を発揮すること、その下流では Akt が関与することを明らかにした。この軸索伸展をもたらす NLK-GRP78 シグナリングは、急性期 SCI 治療における治療ターゲットになり得ることを示した。

【結論】

本研究では、NLK-GRP78 シグナリングがアストロサイトの有益な機能としての NLK 分泌能を高め、かつ神経細胞に対して軸索伸展を促す経路であることを見出した。さらにこのシグナリングは、損傷部での軸索伸展を介した SCI 改善作用を示した。

これまでに、神経栄養因子や growth factor 投与により SCI 改善作用を示す報告はいくつがあるが、損傷部のアストロサイトからの NLK 分泌を介した軸索伸展増強作用を示す例はなく、その点が本研究の新規性である。損傷部に集積する活性化アストロサイトを利用し、軸索伸展を促進する NLK-GRP78 シグナリングは、今後の SCI における、より効果的な新規治療ターゲットとして期待される。

主査及び副査は、申請者 谷江良崇氏に面接試験を行うとともに論文内容を綿密に審査し、本論文が博士学位(薬科学)を受けるに十分に値すると判断した。

(学位論文のもとになる論文 著者名, 論文題目, 掲載誌名, 巻, 最初の頁と最後の頁, 年を記載)

1. **Tanie Y**, Tanabe N, Kuboyama T, Tohda C. Extracellular Neuroleukin Enhances Neuroleukin Secretion From Astrocytes and Promotes Axonal Growth in vitro and in vivo. *Front Pharmacol.* 2018. 9:1228.
2. **Tanie Y**, Kuboyama T, Tohda C. GRP78-Mediated Signaling Contributes to Axonal Growth Resulting in Motor Function Recovery in Spinal Cord-Injured Mice. *Front Pharmacol.* 2020. 11:789.