

脳梗塞慢性期における LGR シグナルの機能解明と治療応用の検討

島村宗尚

大阪大学医学系研究科 健康発達医学講座

【研究の背景】

我々は脳梗塞後の活性化マクロファージ、ミクログリアにおける RANKL(リガンド)が RANK(受容体)を介して TLR 関連炎症を抑制する新規シグナルであることを報告した¹⁾が、近年、RANKL の受容体として新たに LGR4 が同定された²⁾。LGR4 下流のシグナルは多様であり、TLR2, TLR4 を介した炎症を抑制することや LGR4 のリガンドの一つである R-Spondin1 が、Wnt/ β -カテニンシグナルを活性化することが報告されているが、脳梗塞における発現と機能は明らかでは無かった。研究開始時点では、正常および脳梗塞周囲では神経細胞に、脳梗塞部位では、CD11b 陽性細胞、CD4 陽性細胞に LGR4 が発現していることが脳梗塞 2 日目の組織で明らかとなっていた。一方で、LGR ファミリーである LGR5、6³⁾もマクロファージにおける immunorelevant に関連していることが研究開始後に報告された。これらのことから、LGR ファミリーが脳梗塞後の新規の炎症シグナルに関連していることを想定し、研究を行った。

【目 的】

脳梗塞における LGR4, 5, 6 の発現細胞と機能を明らかにする。

【方 法】

マウス塩化鉄誘発中大脳動脈血栓閉塞モデルを用いて、LGR4-6 の realtime RT-PCR および免疫染色にて、脳梗塞 1, 3, 7 日目の LGR4-6 mRNA の発現と発現細胞を解析した。また、siRNA を用いて RAW264.7 細胞における LGR4 をノックダウンし、LPS による TNF- α の発現を解析し、脳梗塞後炎症における DAMPs-TLRシグナルに LGR4 が関連するか解析した。

【結 果】

正常マウスにおいては、LGR4, 5, 6 はいずれも神経細胞に強く発現していた。正常部位に比較し、脳梗塞後 1 日目では LGR4, 5 mRNA の発現は低下し、LGR6 mRNA の発現には変化がなかった。しかし、3 日目、7 日目では LGR4, 5, 6 いずれも mRNA の発現が低下した。LGR4, 5, 6 のリガンドの一つである R-spondin1 は、1 日目には発現が上昇するものの、3 日目、7 日目には発現が低下した。免疫染色では、LGR4, 5, 6 のいずれも障害神経細胞での発現は低下していたが、1 日目では LGR4, LGR5 は CD31 陽性細胞(血管内皮細胞)周囲に、3 日目には LGR4, 5, 6 が CD11b 陽性細胞に弱く発現が認められた。7 日目には、LGR4, 5, 6 のいずれも CD11b 陽性細胞に発現していたが、特に LGR6 が強く発現していた。一方で、LGR4 は、7 日目において、脳梗塞周囲の GFAP 陽性アストロサイトにも強く発現していた。

CD11b 陽性細胞であるマクロファージに LGR4 が発現することから、RAW264.7 細胞の LGR4 を siRNA でノックダウンし、TLR4 リガンドである LPS を細胞に添加し、培養液中の TNF α の発現を確認した。陽性対照として我々が開発した MHP1 では TNF α の発現が抑制されたが、LGR4 をノックダウンした細胞では TNF α の発現が抑制されることはなく、LGR4 と TLR4 シグナルの直接の関連については、本検討では明らかではなかった。

【考 察】

最近、心筋梗塞後修復急性期におけるマクロファージとの関連性が LGR4 で報告された⁴⁾。この報告では、心筋梗塞後の急性期に LGR4 mRNA が梗塞部位でマクロファージに強く発現し、LGR4 をマクロファージ特異的にノックアウトしたマウスでは心筋の線維化が抑制され、予後が良いことが報告されている。我々の検討では、mRNA レベルの検討では梗塞部位において、むしろ LGR4-6 の発現は低下しているが、これは神経細胞にもともと強く発現していた LGR が、免疫染色で示されるように神経細胞の障害のために発現が低下していることを反映していると考えられる。しかし、同じく免疫染色では LGR が 7 日目にかけて発現が増強してくること、RAW264.7 細胞にも LGR4 は発現していることから、心筋梗塞とは異なり、亜急性期から慢性期において LGR が脳梗塞後の炎症過程に関与していると考えられる。細胞での実験結果より、LGR4 は TLR4 シグナルの制御には直接関与しておらず、また、前述のごとく、LGR6 については、Maresin 1 による immunorelevant に関連していることが報告されていることから、LGR は脳梗塞の炎症の寛解に関与している可能性があると考えられる。また、LGR4 については、脳梗塞 7 日目から脳梗塞周囲のアストロサイトに強く発現してくることから、脳梗塞周囲のシナプス可塑性の促進や微小循環の調節に関連していることも示唆された。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究により、LGR4-6 が脳梗塞後亜急性期から慢性期におけるマクロファージに発現していること、また、LGR4 はアストロサイトにも強く発現していることから、LGR を介したシグナルが脳梗塞の免疫寛解、修復過程に必要である可能性が考えられた。今後のさらなる解析で機能が明らかになれば、LGR シグナルを標的にした治療法の開発につながると考えられる。

【参考・引用文献】

1. Shimamura M, Nakagami H, Osako MK, Kurinami H, Koriyama H, Zhengda P, et al. OPG/RANKL/RANK axis is a critical inflammatory signaling system in ischemic brain in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014;111:8191-8196.
2. Luo J, Yang Z, Ma Y, Yue Z, Lin H, Qu G, et al. LGR4 is a receptor for RANKL and negatively regulates osteoclast differentiation and bone resorption. *Nat. Med.* 2016;22:539-546.
3. Chiang N, Libreros S, Norris PC, De La Rosa X, Serhan CN. Maresin 1 activates LGR6 receptor promoting phagocyte immunoresolvent functions. *J. Clin. Invest.* 2019;129:5294-5311.
4. Huang CK, Dai D, Xie H, Zhu Z, Hu J, Su M, et al. Lgr4 governs a pro-inflammatory program in macrophages to antagonize post-infarction cardiac repair. *Circ. Res.* 2020;953-973.