

令和元年6月24日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11325

研究課題名(和文) プログラニュリンの網膜再生とその役割に関する研究

研究課題名(英文) The role of progranulin in retinal regeneration

研究代表者

原 英彰 (Hara, Hideaki)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20381717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：プログラニュリンは神経新生などへの関与が報告されている成長因子である。我々はこれまでにプログラニュリンがマウス網膜において再生を促進する作用を有していることを報告しており、本研究ではプログラニュリン欠損マウスを用いて網膜発生期からのプログラニュリンの影響を検討した。プログラニュリン欠損マウスにおいては網膜神経節細胞の変性が起こっていることが認められ、生後9日目においてプログラニュリン欠損マウスでは網膜前駆細胞とミクログリアの減少が見られた。これらのことから、我々は網膜発生においては再生に寄与するプログラニュリンの働きを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においては、網膜再生を誘導する成長因子であるプログラニュリンの作用について詳細な検討を行った。その作用機序の一端を明らかにしただけでなく、ミクログリアによる網膜前駆細胞増殖の制御などの新たな機構についても明らかとした。これらのことは学術的な新規性を有しているのみならず、未だ達成されていない哺乳類における網膜の再生制御を行うための重要な知見であり、本研究の実施は網膜再生医療の新たな発展に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：Progranulin is a growth factor which leads to neurogenesis. Previously, we found that progranulin induces retinal regeneration in mice. However, little is known that the mechanism of progranulin to leads retinal regeneration. In this study, we investigated that the influence of progranulin deficiency during retinal development using progranulin knockout mice. In progranuline knockout mice, we found that retinal ganglion cells are degenerated. In progranulin knock out mice, retinal precursor cells and microglia were also decreased on postnatal day 9. Collectively, we found that the novel mechanisms of progranulin which contribute to retinal development and retinal regeneration.

研究分野：網膜再生

キーワード：Progranulin microglia retinal regeneration retinal development

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々にとって、視覚は重要な感覚の一つであり、その感覚に大きく依存している。目の中でも、特に網膜は光や色を感受するのに重要な器官である。加齢黄斑変性症や網膜色素変性症などの網膜変性疾患における視細胞（光や色を感受する細胞）の損失は、患者の生活の質を大きく低下させるが、現在、視細胞が変性する疾患である萎縮型加齢黄斑変性症に対する治療薬は存在しない。そのため、視細胞の保護や再生を促すような薬の探索が切望されている。網膜障害モデルに対して保護的に働く薬物は基礎検討によりいくつか候補が見つかったものの、臨床で使用されている薬はない。また、哺乳類において、網膜細胞は障害を受けると増殖・再生は起きないことが知られているが、近年、哺乳類においても障害後に網膜細胞の再生が起きる可能性が報告されてきた。

当研究室において、最近、ヒトおよびマウス由来の脂肪幹細胞 (Adipose-derived Stem Cell; ASC) の培養上清 (Adipose-derived Stem Cell Conditioned Medium; ASC-CM) が光誘発網膜障害、脳虚血・再灌流障害に対して保護的に働くことを報告した。さらに、その脂肪幹細胞培養上清中に豊富に含まれているプログランニリンの保護作用も見出した。プログランニリンは成長因子として知られており、組織の発達や修復に関わるとされている。特にその発現は、脳の神経細胞やミクログリアにおいて見られる。しかし、網膜におけるプログランニリンの作用は未だ明らかになっていない部分が多いため、申請者らは、プログランニリンの網膜における更なる作用を探ることを考えた。

2. 研究の目的

近年、老齢のプログランニリン欠損マウス網膜において、網膜神経節細胞 (retinal ganglion cell: RGC) 数の減少が起きることが報告された。一方、プログランニリン欠損下で若齢の成体マウス網膜や、発達期マウス網膜がどのように変化しているのかについては明らかになっていない。また、プログランニリンは発生期において中枢神経系に豊富に存在すると報告されているが、その作用についてほとんど明らかにされていない。In vitro 培養細胞系においてプログランニリンによる神経細胞分化促進作用が示されているものの、in vivo においてそれを示した報告や網膜における分化への関与の報告は全くない。そこで本研究では、網膜発達期におけるプログランニリンの網膜視細胞への分化に対する作用並びに網膜神経節細胞及びその近傍に位置するミクログリアに対する作用を検討した。

3. 研究の方法

(1) 免疫染色用組織切片作製

妊娠 ddY マウスは日本エスエルシー株式会社より、プログランニリン遺伝子を欠損したマウスは理研バイオリソースセンターより購入した。

(2) プログランニリン欠損マウスの組織学的評価

未処置のマウス眼球を摘出し、4%パラホルムアルデヒド含有 0.1 M phosphate buffer (PB) (pH 7.4) を 2 μ L 硝子体内投与し、同液にて 24 時間固定した。つぎに 70%エタノール 2 時間、90%エタノール 2 時間、95%エタノール 2 時間、99%エタノール 12 時間、無水エタノール 2 時間 \times 2 回、キシレン 2 時間 \times 2 回、キシレン 12 時間、融解パラフィン 2 時間 \times 2 回、融解パラフィン 12 時間の順に浸透させた。その後、パラフィンにて眼球を包埋し、ミクロトーム (Leica, Tokyo, Japan) を用いて、5 μ m の切片を作製し、カバーガラス (Matsunami, Osaka, Japan) に載せ 37°C にて一日乾燥し、室温にて保存した。

(3) ヘマトキシリン・エオジン染色

パラフィン切片は、キシレンに浸してパラフィンを洗浄した。つづいて段階的にアルコール濃度を下げた溶液に浸し、蒸留水に浸透した後、ヘマトキシリン液に 2 分間、エオジン液に 8 分間浸して、段階的にアルコールで脱水し、キシレンで透徹しオイキット (AS ONE, Osaka, Japan) を用いて封入した。封入後、キーエンス顕微鏡 (BZ-9000) を用いて撮影した。

(4) 組織評価

網膜組織の評価はヘマトキシリン・エオジン染色した標本を用いた。各サンプルにつき 3 切片を任意に抽出し、視神経乳頭中心から 240 μ m 間隔で網膜外顆粒層 (outer nuclear layer: ONL) の厚みを Image J (NIH, Bethesda, MD, USA, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) を使用して測定した。

(5) ウェスタンブロットによる評価

マウス網膜を摘出し、マイクロチューブの中に入れ急速凍結した。サンプルはタンパク質抽出まで -80 °C に保存した。タンパク質抽出には細胞溶解液として、protease inhibitor cocktail、phosphatase inhibitor cocktail 2 及び 3 を含む RIPA buffer [50 mM Tris HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、1% Igepal CA-630] を 100 μ L 用い、ホモジナイザー (Physcotron, Microtec Co., Chiba, Japan) により 30 秒間破碎、均質化した。その後、20 分間水中に静置させ、12,000 \times g、4 °C、20 分間遠心分離した。遠心分離した上清を回収し、タンパク質抽出液とした。SDS ポリアクリルアミドゲルを泳動装置にセットし、容器に泳動用緩衝液

(25 mM Tris、190 mM Glycine、3.5 mM SDS) を入れ、ゲルを取り付けた泳動装置に浸した。泳動装置の中にも泳動用緩衝液を入れた。1 ウェル当りの添加量は分子量マーカーを 5 μ L、各サンプルを 10 μ L とした。サンプルを添加後、ゲル 1 枚当たり 20 mA で泳動した。泳動後、ゲルを cathode buffer (25 mM Tris、40 mM 6-aminohexanoic acid、20% methanol) に 15 分間浸した。転写膜は、メタノールに 15 秒間浸し、超純水に 15 分間浸した。その後、anode buffer 2 (25 mM tris、20%メタノール) に 20 分間浸した。陽極側から、anode buffer 1 (0.3 M tris、20%メタノール) に浸したろ紙、anode buffer 2 に浸したろ紙、転写膜、ゲル、cathode buffer に浸したろ紙の順に組み、0.8 mA/cm² の条件で転写した。転写後、0.05% Tween 含有 0.01 M TBS でメンブランを洗浄し、Blocking One-P に浸し、30 分間ブロッキングした。0.05% Tween TBS で洗浄後、Can Get Signal Solution 1 で一次抗体を希釈し、4°C で一晩反応させた。0.05% Tween TBS で洗浄後、Can Get Signal Solution 2 で二次抗体を希釈して室温で 1 時間反応させた。0.05% Tween TBS で洗浄した後、イムノスター-LD に 5 分間浸した。その後、LAS-4000UVmini (Fujifilm, Tokyo, Japan) を用いて検出した。

一次抗体には、rabbit anti-CRX antibody (1:200 dilution; SantaCruz)、mouse anti-rhodopsin antibody (1:1000 dilution; Millipore)、mouse anti- β -actin (1:2000 dilution; Sigma-Aldrich) を用いた。二次抗体には、Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:2000 dilution; Thermo Scientific)、HRP-conjugated goat anti mouse antibody (1:2000 dilution; Thermo Scientific) を用いた。タンパク質の発現強度は、Multi Gauge Ver3.0 (Fujifilm, Tokyo, Japan) を用いて解析した。バンドの強度を数値化し、個々の値を算出した。

(6) 免疫染色用組織切片作製

マウス眼球を摘出し、4%パラホルムアルデヒド含有 0.1 M PB (pH 7.4) にて一晩放置した。その後、25%スクロース含有 0.1 M PB (pH 7.4) 液に移し 24 時間放置した。液体窒素を用いて O.C.T. compound により凍結し、薄切するまで -80°C にて保存した。凍結した眼球を O.C.T. compound を用いて -20°C 下で固定し、クリオスタット (Leica, Wetzlar, Hesse, Germany) を用いて厚さ 10 μ m の切片を作製し、MAS コーティングされたカバーガラス (Matsunami, Osaka, Japan) に載せ、-80°C で保存した。

(7) 免疫染色による評価

染色時、-80°C より凍結切片を取り出し、-20°C で 1 時間放置した後、4°C で 1 時間放置し、さらに室温で 2 時間乾燥させた。その後、Super PAP pen (Daido sangyo, Osaka, Japan) にて反応液の流出を防ぐために切片の周囲を囲んだ。その後、マウス由来の抗体を用いる際には、M.O.M Blocking Reagent により 1 時間ブロッキングした。それ以外の場合は、10% goat serum または horse serum により 1 時間ブロッキングを行った。ブロッキング後、一次抗体 (溶媒: M.O.M protein concentrate を PBS で希釈またはブロッキング剤) を用いて 4°C で一晩反応させた。その後、二次抗体 (溶媒: M.O.M protein concentrate を PBS で希釈またはブロッキング剤) を 1 時間反応させた。つづいて、Hoechst 33342 により核染色を行った。染色後、Fluoromount (水溶性封入基材) で封入した。

一次抗体には、rabbit anti-Iba-1 antibody (1:200 dilution; Wako)、sheep anti-progranulin antibody (1:20 dilution; R&D) を用いた。二次抗体にはそれぞれ Alexa Fluor®546 donkey anti-rabbit IgG、Alexa Fluor®647 donkey anti-sheep IgG (Thermo Scientific) を用いた。また、一次抗体を除いたネガティブコントロールを用意した。

染色した切片は共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FLUOVIEW FV10i; Olympus, Tokyo, Japan) を用いて撮影した。

4. 研究成果

(1) プログラニュリン欠損マウス網膜外顆粒層の変化

全身的にプログラニュリンを欠損したマウスを用いて、網膜層の変化について検討を行った。ウェスタンブロット及び免疫染色により、プログラニュリン欠損マウスの網膜において、プログラニュリンが欠損していることを確認した。野生型マウスとプログラニュリン欠損マウスの網膜層を測定した結果、欠損マウス網膜において視細胞の存在している網膜外顆粒層 (ONL) の厚さが低下していた (図 1)。また、rhodopsin の発現量がプログラニュリン欠損マウスにおいて低下していた。ヘテロ欠損マウスにおいては、いずれも明らかな変化は認められなかった (図 1)。以上のことから、プログラニュリン欠損

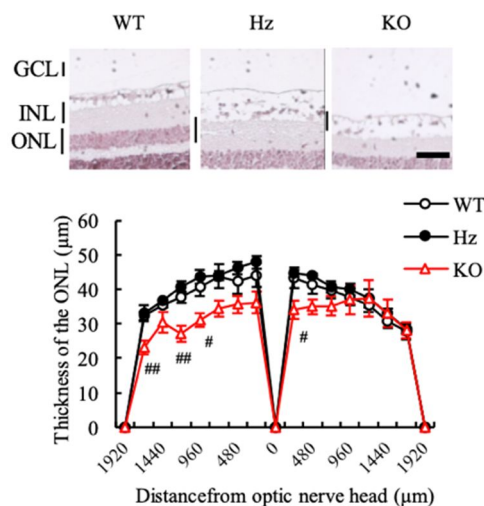


図 1. プログラニュリン欠損マウス網膜外顆粒層の組織学的評価

Data are shown as means \pm S.E.M. (n = 6). #; p < 0.05 and ##; p < 0.01 vs. WT (Student's t-test). WT: Wild-type; Hz: Heterozygous; KO: Knockout. GCL: ganglion cell layer, IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, ONL: outer nuclear layer. Scale bar = 50 μ m.

マウスの視細胞の発達異常または神経変性により、視細胞数の減少が認められた。

(2) プログラニュリン欠損による網膜発達に及ぼす影響

発生段階におけるプログラニュリン欠損の影響を検討するため、生後 9 日目において評価を行った。ウェスタンブロットによる結果から、プログラニュリン欠損マウスにおいて視細胞の前駆細胞のマーカである CRX の発現増加、視細胞のマーカである rhodopsin の発現が低下した (図 2)。また、免疫染色による結果から、視細胞外節の rhodopsin の発現量が減少し、ONL の rhodopsin の発現量が増加した。以上の結果から、プログラニュリン欠損により、視細胞の発達障害 (分化障害) が起き、それが成体における外顆粒層の菲薄化につながっていることが示唆された

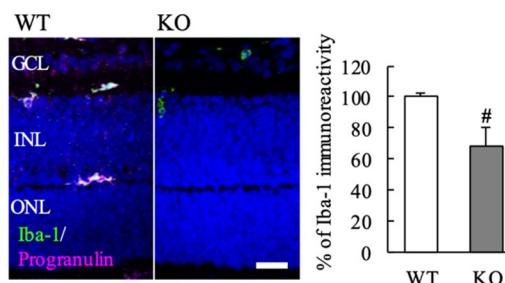


図 2. 生後 9 日目のプログラニュリン欠損マウスにおける視細胞の変化

Data are the means ± S.E.M. (n = 3 or 4). #; p < 0.05 vs. WT (Student's t-test). WT: Wild-type; KO: Knock-out.

(3) ミクログリア及び網膜前駆細胞に及ぼすプログラニュリン欠損の影響

プログラニュリンはミクログリアの遊走に關与する (72)。そこで、プログラニュリン欠損下では網膜内のミクログリアの減少が起きていることが考えられる。生後 7 日目のマウスを用いて検討を行ったところ、野生型ではプログラニュリンの発現が、網膜において認められ、特にミクログリアでの高発現が認められた (図 3)。プログラニュリン欠損マウスでは、網膜内でプログラニュリンの発現がないことを確認し (図 3)、さらに、網膜ミクログリアの減少が認められた (図 3)。このほかに生後 7 日目のマウスにおいてミクログリアを除去することにより、前駆細胞の減少がみられていた。そこで、プログラニュリン欠損マウスにおいても同様に前駆細胞が減少するかについて検討した。プログラニュリン欠損マウスは、網膜前駆細胞のマーカである Pax6 陽性細胞数が減少した。以上の結果から、プログラニュリンはミクログリアの網膜への遊走を介して、前駆細胞の数を調節していることが示唆された。

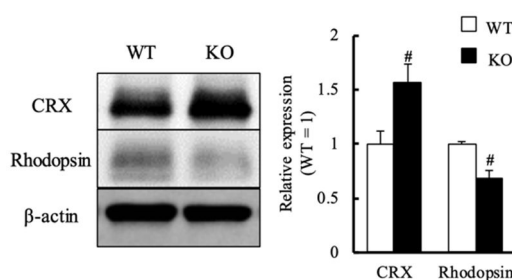


図 3. 生後 7 日目のプログラニュリン欠損マウスにおける網膜ミクログリアの減少

Data are the means ± S.E.M. (n = 5 or 6). #; p < 0.05 vs. WT (Student's t-test). GCL: ganglion cell layer, INL: inner nuclear layer, ONL: outer nuclear layer. WT: Wild-type; KO: Knock-out. Scale bar = 20 μm.

これらの検討により、プログラニュリンは網膜発生期に網膜細胞分化や生存を促進することを明らかにした。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤によるプログラニュリンの網膜神経細胞での誘導や、後眼部送達を目的としたリポソーム点眼剤を用いることで、眼内へとプログラニュリンを送達することができる。プログラニュリンは加齢黄斑変性症などの網膜変性疾患における治療標的の候補となることが期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Kuse Y., Ohuchi K., Nakamura S., Hara H. and Shimazawa M., Microglia increases the proliferation of retinal precursor cells during postnatal development., *Molecular Vision*, 24, 536-545, 2018.

Murase H., Tsuruma K., Kuse Y., Shimazawa M. and Hara H., Progranulin Increases Phagocytosis by Retinal Pigment Epithelial Cells in Culture., *Journal of Neuroscience Research*, 95(12), 2500-2510, 2017.

Kuse Y., Tsuruma K., Mizoguchi T., Shimazawa M. and Hara H., Progranulin deficiency causes the retinal ganglion cell loss during development., *Scientific Reports*, 7, 1679, 2017.

〔学会発表〕(計 4 件)

久世祥己、大内一輝、中村信介、嶋澤雅光、原英彰
マウス網膜発生期におけるミクログリアの関与
第 132 回日本薬理学会近畿部会 (大阪、2017、11、24)

久世祥己、鶴間一寛、嶋澤雅光、原英彰
マウス網膜発生期におけるプログラニュリンの役割
第 2 回プログラニュリン研究会 (東京、2017、5、27)

久世祥己、鶴間一寛、溝口貴洋、嶋澤雅光、原英彰
プログラニュリンの欠損は網膜発達期におけるアストロサイトの活性化と網膜神経節細胞の減

少をもたらす

第 90 回日本薬理学会年会（長崎、2017、3、15-17）

久世祥己、鶴間一寛、嶋澤雅光、原英彰

マウス網膜再生におけるプログランユリンの機能解析

第 1 回プログランユリン研究会（岐阜、2016、5、28）

〔図書〕(計 1 件)

Hara H., Hosokawa M., Nakamura S., Shimohata T., Nishihara M.

Progranulin and Central Nervous System Disorders

Springer, 193, 2019.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://sv1.gifu-pu.ac.jp/lab/seitaikinou/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：鶴間 一寛

ローマ字氏名：TSURUMA Kazuhiro

所属研究機関名：岐阜薬科大学

部局名：薬学部

職名：講師

研究者番号（8 桁）：50524980

（2017 年 3 月 7 日辞退）

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。