様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　６ 年　６ 月 ２０ 日現在

機関番号：２３７０１
研究種目：若手研究
研究期間：2021～2023
課題番号：２１Ｋ１４９９９

研究課題名（和文）黄斑変性網膜における細胞外小胞の非細胞自律的作用の解析とその分子基盤の解明

研究課題名（英文）Role of extracellular vesicles in the progression of macular degeneration

研究代表者
大津　航（Otsu, Wataru）

岐阜薬科大学・薬学部・特任講師

研究者番号：５０８４３０９１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,500,000円

研究成果の概要（和文）：視細胞特異的テトラスパニンであるペリフェリン-2は、光受容の場である外節の形成・維持に不可欠な膜タンパク質である。ペリフェリン-2の外節への輸送にエンドソーム経路が関わることが明らかになっている。プログラニュリンはリソソーム機能に関わる分泌タンパク質であり、プログラニュリン欠損マウスが網膜変性を引き起こすことが報告されている。本研究では、プログラニュリンの発現が視細胞においてペリフェリン-2などのテトラスパニンの局在に影響を与えることを明らかにした。プログラニュリンの発現低下や遺伝子欠損はペリフェリン-2の外節輸送を阻害することで外節の形態異常と視細胞変性を引き起こすと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義
ペリフェリン-2は視細胞外節の構造に必須の膜タンパク質であることは古くから知られているものの、その外節輸送の分子基盤については完全には明らかにされていない。ペリフェリン-2の遺伝子変異は網膜色素変性をはじめ、黄斑ディストロフィーなどの様々な遺伝性網膜疾患を引き起こすため、ペリフェリン-2の正常な代謝回転は、桿体、錐体両視細胞の維持に重要であると考えられる。今回、ペリフェリン-2の輸送を制御する因子としてプログラニュリンの存在が明らかとなった。プログラニュリンやプログラニュリンが関与する細胞内分解機構は網膜疾患の新たな治療標的になり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Peripherin-2(PRPH2, retinal degeneration slow, rds), a photoreceptor-specific tetraspanin, is essential for the maintenance of the outer segment in the photoreceptors. It has been shown that the endosomal pathway is involved in the transport of PRPH2 to the outer segment. However, its molecular mechanism has not been fully understood. Progranulin (PGRN) is a secreted protein involved in lysosomal function, and it has been reported that PGRN-deficient mice cause retinal degeneration. In this study, we show that PGRN expression affects the localization of tetraspanins such as PRPH2 in murine photoreceptors, and the deficiency of PGRN inhibits the transport of peripherin-2 to the outer segment, leading to abnormal outer segment morphology and photoreceptor cell degeneration.

研究分野：網膜

キーワード：エンドソーム　視細胞　プログラニュリン　テトラスパニン

※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、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

加齢黄斑変性は、加齢とともに黄斑の障害が不可逆的に進行し失明に至る網膜変性疾患である。世界的な高齢化傾向に伴い増加傾向にあるが、特に萎縮型とよばれるタイプでは有効な治療がないため、治療薬の開発が大きな課題となっている。光受容体とも呼ばれる視細胞では、ロドプシンをはじめとする外節のタンパク質が日々新生され、網膜色素上皮により分解されている。加齢黄斑変性の病態メカニズムは未だ完全には明らかにされていないが、加齢に伴う網膜色素上皮における視細胞外節の貪食や分解機能の衰えが病態に寄与していると考えられている。近年、視細胞の外節へのタンパク質輸送において後期エンドソームの新たな役割が明らかになった（Otsu *et al*., 2019, *J. Neurosci*, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2811-18.2019）。後期エンドソーム（Late endosome, LE）は多胞体（Multivesicular body, MVB）とも呼ばれ、他の細胞への情報伝達を担っている細胞外小胞形成の場である。網膜の視細胞の特に外節の基部では多数の細胞外小胞が観察されることが古くから知られている一方で、これらの細胞外小胞の役割については多くは明らかになっていない。プログラニュリン（PGRN）はリソソーム機能に関わる分泌タンパク質であり、そのホモ接合変異は神経セロイドリポフスチン症を引き起こし、PGRN 欠損マウスが網膜変性を引き起こすことが報告されている。本研究では、網膜、特に視細胞における細胞外小胞の役割とそれらの分子基盤の解明を目的として実験を実施した。

２．研究の目的

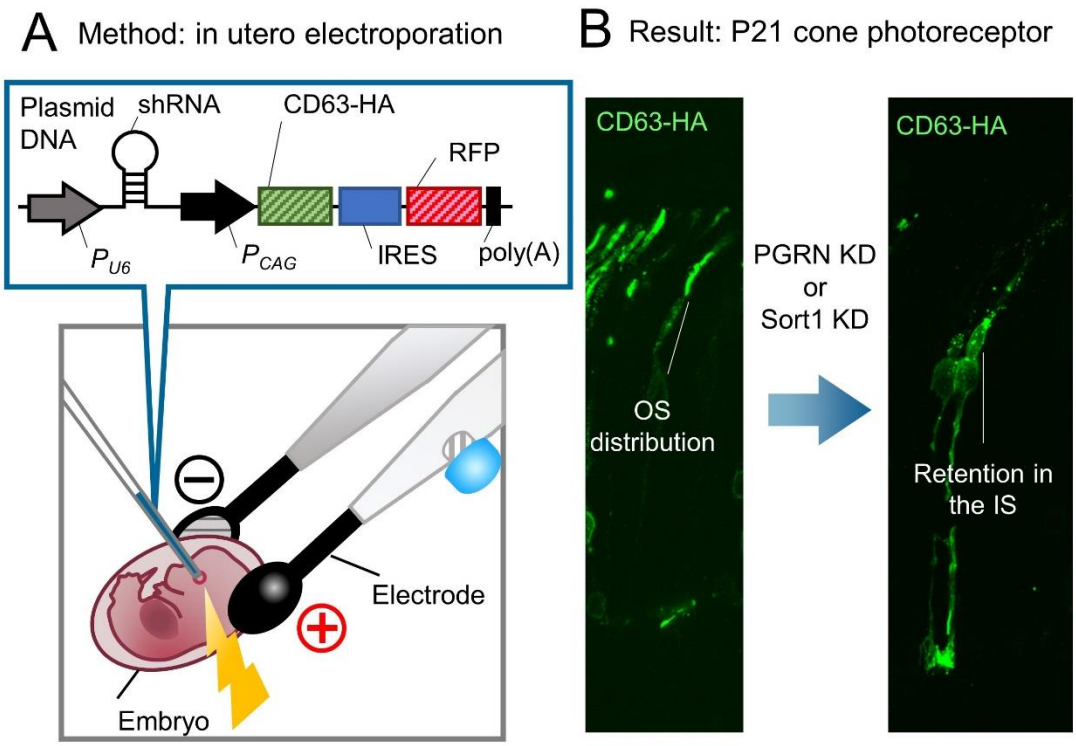
視細胞特異的テトラスパニンであるペリフェリン-2/rds（PRPH2）はその外節への局在が視細胞の生存と網膜構造の維持に不可欠である。PRPH2 は視細胞の内節や細胞体の後期エンドソームや多胞体に局在し、PRPH2 の C 末端領域にはこれらの細胞内分布を規定するモチーフが存在している。テトラスパニンは細胞膜を 4 回貫通する構造を持つ膜タンパクファミリーであり、CD63 や CD81 などのテトラスパニンは細胞外小胞に分布し、エクソソームマーカーとしても知られている。視細胞は暗所で働く杆体細胞と色覚に重要な錐体細胞に大別されるが、特に錐体細胞周囲には細胞外小胞が豊富に存在するものの、これらの細胞外小胞の機能や役割についてはほとんど明らかにされていない。本研究では、視細胞層の後期エンドソームや、細胞周囲に存在する膜小胞の役割について明らかにすることを最終的な目標とし、膜小胞の局在を規定する因子としてプログラニュリンに着目して、実験を実施した。

３．研究の方法

1. プラスミド DNA の作製 : mCherry を付加したヒト *GRN*、c-Myc タグを付加したヒト *PRPH2*、または 3xHA タグを付加したヒト *CD63* を含む cDNA を pCAG-IRES-GFP を背景に持つベクターに挿入した。マウス *Grn* 遺伝子または *Sort1* 遺伝子を標的とする shRNA の配列を pCAG-IRES-tdTomato および pCAG-CD63-HA-IRES-tdTomato に挿入した(図 1)。遺伝子の発現については、共発現した tdTomato の蛍光で確認した。
2. 細胞培養： 不死化マウス網膜細胞株 661W を既報（Otsu *et al.*, 2020, *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.03.118）の通りに培養・継代し、Neon NxT システムを用いた電気穿孔法を用いて遺伝子導入を実施した。
3. 子宮内電気穿孔法： 胎生期網膜遺伝子導入は、Slc:ICR マウス（日本 SLC、浜松）を用いて、妊娠 14.5 日目に行った（図 A, Otsu *et al.*, 2019, *J. Neurosci*. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2811-18.2019）。遺伝子導入した動物は 12 時間明暗期サイクルで飼育し、生後 21 日目に採取した網膜を免疫蛍光染色に供し、オリンパス社の共焦点顕微鏡 FV3000 で撮影し画像を得た。

４．研究成果

mCherry タグ付加 PGRN はマウス網膜由来細胞株 661W において LysoTracker で染色されるリソソームに局在した。同様のプラスミド電気穿孔法にてマウス網膜に遺伝子導入したところ、発現させた PGRN は錐体および桿体細胞においてリソソームマーカーである Lamp1 と局在を共にした。次に PGRN に対する shRNA 発現プラスミドを用い 661W 細胞において PGRN の発現を抑制したところ、同時に発現させた PRPH2 や CD63 の酸性オルガネラへの局在が低下した。マウス網膜に遺伝子導入し PGRN の発現抑制したところ、錐体細胞において外節が菲薄化し、内節が膨化する像が観察された。また、対照群では錐体細胞の外節に局在していた CD63 は、PGRN 発現抑制により内節で小胞様の分布を示し、PRPH2 においても同様の局在異常を示した（図Ｂ）。以上の結果から、視細胞において PGRN はテトラスパニンの局在に重要であり、その発現低下や遺伝子欠損は PRPH2 の外節輸送を阻害することで外節の形態異常と視細胞変性を引き起こすと考えられる。



実験に用いた子宮内電気穿孔法（A）とマウス網膜にて発現させた HA タグ付加 CD63 の視細胞における局在（B）

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計12件（うち査読付論文　12件／うち国際共著　3件／うちオープンアクセス　10件）

１．著者名 Araki Tomoaki、Shimazawa Masamitsu、Nakamura Shinsuke、Otsu Wataru、Numata Yosuke、Sakata Megumi、Kabayama Koji、Tsusaki Hideshi、Hara Hideaki	４．巻 154
２．論文標題 Investigation into the usefulness of cynomolgus monkeys with spontaneously elevated intraocular pressure as a model for glaucoma treatment research	５．発行年 2024年
３．雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	６．最初と最後の頁 52～60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2023.12.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Yamazaki Kanta、Ishida Kodai、Otsu Wataru、Muramatsu Aomi、Nakamura Shinsuke、Yamada Wakana、Tsusaki Hideshi、Shimoda Hiroshi、Hara Hideaki、Shimazawa Masamitsu	４．巻 24
２．論文標題 Delphinidins from Maqui Berry (Aristotelia chilensis) ameliorate the subcellular organelle damage induced by blue light exposure in murine photoreceptor-derived cells	５．発行年 2024年
３．雑誌名 BMC Complementary Medicine and Therapies	６．最初と最後の頁 3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12906-023-04322-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Otsu Wataru、Chinen Naoki、Sugisawa Emi、Kitano Haru、Nakamura Shinsuke、Umigai Naofumi、Tsusaki Hideshi、Shimazawa Masamitsu	４．巻 106
２．論文標題 Protective effect of crocetin against cytoskeletal injury induced by acrolein from cigarette smoke extract in C2C12 myoblasts	５．発行年 2023年
３．雑誌名 Journal of Functional Foods	６．最初と最後の頁 105611～105611
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jff.2023.105611	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Nishimura Yuhei、Saito Masaki、Otsu Wataru、Miyadera Keiko	４．巻 10
２．論文標題 Editorial: Primary cilia as therapeutic targets	５．発行年 2023年
３．雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	６．最初と最後の頁 1322873
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmolb.2023.1322873	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1．著者名 Saito Masaki、Otsu Wataru、Miyadera Keiko、Nishimura Yuhei	4．巻 10
2．論文標題 Recent advances in the understanding of cilia mechanisms and their applications as therapeutic targets	5．発行年 2023年
3．雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	6．最初と最後の頁 1232188
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmolb.2023.1232188	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1．著者名 Nishinaka Anri、Tanaka Miruto、Aoshima Kota、Kuriyama Aika、Sasaki Takahiro、Otsu Wataru、Yasuda Hiroto、Nakamura Shinsuke、Shimazawa Masamitsu、Hara Hideaki	4．巻 36
2．論文標題 The pathological association between the anterior eye segment and the retina in a murine model of neovascular glaucoma	5．発行年 2022年
3．雑誌名 The FASEB Journal	6．最初と最後の頁 e22323
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202101917R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

1．著者名 Otsu Wataru、Yako Tomohiro、Sugisawa Emi、Nakamura Shinsuke、Tsusaki Hideshi、Umigai Naofumi、Shimazawa Masamitsu、Hara Hideaki	4．巻 150
2．論文標題 Crocetin protects against mitochondrial damage induced by UV-A irradiation in corneal epithelial cell line HCE-T cells	5．発行年 2022年
3．雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6．最初と最後の頁 279～288
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2022.10.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

1．著者名 Chuang Jen-Zen、Yang Nan、Nakajima Nobuyuki、Otsu Wataru、Fu Cheng、Yang Howard Hua、Lee Maxwell Ping、Akbar Armaan Fazal、Badea Tudor Constantin、Guo Ziqi、Nuruzzaman Afnan、Hsu Kuo-Shun、Dunaief Joshua L.、Sung Ching-Hwa	4．巻 13
2．論文標題 Retinal pigment epithelium-specific CLIC4 mutant is a mouse model of dry age-related macular degeneration	5．発行年 2022年
3．雑誌名 Nature Communications	6．最初と最後の頁 374
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-27935-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1．著者名 Yako Tomohiro、Otsu Wataru、Nakamura Shinsuke、Shimazawa Masamitsu、Hara Hideaki	4．巻 23
2．論文標題 Lipid Droplet Accumulation Promotes RPE Dysfunction	5．発行年 2022年
3．雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6．最初と最後の頁 1790～1790
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23031790	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

1．著者名 Yako Tomohiro、Nakamura Maho、Otsu Wataru、Nakamura Shinsuke、Shimazawa Masamitsu、Hara Hideaki	4．巻 213
2．論文標題 Mitochondria dynamics in the aged mice eye and the role in the RPE phagocytosis	5．発行年 2021年
3．雑誌名 Experimental Eye Research	6．最初と最後の頁 108800～108800
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.exer.2021.108800	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

1．著者名 Otsu Wataru、Ishida Kodai、Chinen Naoki、Nakamura Shinsuke、Shimazawa Masamitsu、Tsusaki Hideshi、Hara Hideaki	4．巻 11
2．論文標題 Cigarette smoke extract and heated tobacco products promote ferritin cleavage and iron accumulation in human corneal epithelial cells	5．発行年 2021年
3．雑誌名 Scientific Reports	6．最初と最後の頁 18555
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-97956-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

1．著者名 Takahashi Kei、Nakamura Shinsuke、Otsu Wataru、Shimazawa Masamitsu、Hara Hideaki	4．巻 18
2．論文標題 Progranulin deficiency in Iba-1+ myeloid cells exacerbates choroidal neovascularization by perturbation of lysosomal function and abnormal inflammation	5．発行年 2021年
3．雑誌名 Journal of Neuroinflammation	6．最初と最後の頁 164
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12974-021-02203-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

〔学会発表〕　計21件（うち招待講演　0件／うち国際学会　3件）

１．発表者名 Otsu W., Tsusaki H., Shimazawa M.
２．発表標題 Progranulin regulates the ciliary transport of tetraspanins in murine photoreceptors
３．学会等名 ARVO Annual Meeting 2023（国際学会）
４．発表年 2023年

１．発表者名 大津 航，角崎 英志，嶋澤 雅光
２．発表標題 マウス視細胞の外節タンパク質輸送におけるプログラニュリンの役割
３．学会等名 第２回Ocular Scientific Meeting ～眼科創薬研究会～
４．発表年 2023年

１．発表者名 山崎 幹大、石田 紘大、大津 航、矢古宇 智弘、中村 信介、山田 和佳奈、角崎 英志、下田 博司、原 英彰、嶋澤 雅光
２．発表標題 マキベリー（Aristotelia chilensis）由来デルフィニジンの青色LED曝露によって誘発されるマウス光受容体由来細胞における細胞内器官の損傷に対する保護作用
３．学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2023
４．発表年 2023年

１．発表者名 山崎 幹大、石田 紘大、大津 航、矢古宇 智弘、中村 信介、山田 和佳奈、角崎 英志、下田 博司、原 英彰、嶋澤 雅光
２．発表標題 マキベリー（Aristotelia chilensis）由来デルフィニジンの青色LED曝露によって誘発されるマウス光受容体由来細胞における細胞内器官の損傷に対する保護作用
３．学会等名 次世代を担う若手のための創薬・医療薬理シンポジウム2023
４．発表年 2023年

１．発表者名 Otsu W., Obayashi M., Tsusaki H., Shimazawa M.
２．発表標題 The expression of E50K optineurin affects the lysosome-related organelles in murine retinal cells
３．学会等名 Neuroscience 2023（国際学会）
４．発表年 2023年

１．発表者名 Obayashi M., Yamazaki K, Otsu W., Nakamura S., Ishikawa Y., Sakata Y., Tsuboi M., Tsusaki H., Shimazawa M.
２．発表標題 Protective effect of active components of microalgae against photoreceptor damage induced by blue LED light and endoplasmic reticulum stress
３．学会等名 Neuroscience 2023（国際学会）
４．発表年 2023年

１．発表者名 大津 航，大林 茉由奈，角崎 英志，嶋澤 雅光
２．発表標題 マウス視細胞外節の形態とテトラスパニン輸送におけるプログラニュリンの役割
３．学会等名 第46回日本分子生物学会年会
４．発表年 2023年

１．発表者名 大林 茉由奈，大津 航，角崎 英志，嶋澤 雅光
２．発表標題 網膜細胞におけるオプチニューリンE50K変異体よるリソソーム関連膜小器官異常の解析
３．学会等名 第46回日本分子生物学会年会
４．発表年 2023年

１．発表者名 大津 航、知念 尚希、杉澤 えみ、北野 晴、中村 信介、海貝 尚史、角崎 英志、嶋澤 雅光
２．発表標題 タバコ煙に含まれるカルボニル化合物によるアクチン骨格異常と筋管成熟阻害に対するクロセチンの保護作用
３．学会等名 日本薬学会 第143回年会
４．発表年 2022年

１．発表者名 大津 航、杉澤 えみ、知念 尚希、中村 信介、角崎 英志、嶋澤 雅光
２．発表標題 マウス網膜由来細胞株661W細胞における加熱式タバコ産物とその成分による鉄依存性細胞死
３．学会等名 第49回 日本毒性学会学術年会
４．発表年 2022年

１．発表者名 山﨑 幹大、大津 航、大林 茉由奈、青島 弘汰、中村 信介、角崎 英志、石川 英明 、阪田 泰子、坪井 誠 、嶋澤 雅光
２．発表標題 青色LED光による視細胞の小胞体ストレス障害に対する微細藻類由来活性成分の保護作用
３．学会等名 第15回 小胞体ストレス研究会
４．発表年 2022年

１．発表者名 大津 航
２．発表標題 加齢黄斑変性の新規モデル開発と網膜変性病態進行における後期エンドサイトーシス経路の役割
３．学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2022
４．発表年 2022年

１．発表者名 大林 茉由奈、大津 航、山﨑 幹大、青島 弘汰、中村 信介、石川 英明 、阪田 泰子、坪井 誠 、角崎 英志、嶋澤 雅光
２．発表標題 青色LED 光及び小胞体ストレスによる視細胞の障害に対する微細藻類由来活性成分の保護作用
３．学会等名 第142回日本薬理学会・近畿部会
４．発表年 2022年

１．発表者名 杉澤 えみ、大津 航、矢古宇 智弘、中村 信介、角崎 英志、海貝 尚史 、嶋澤 雅光 、原 英彰
２．発表標題 角膜上皮細胞におけるUV-A 誘発ミトコンドリア障害に対するクロセチンの保護作用
３．学会等名 第142回日本薬理学会・近畿部会
４．発表年 2022年

１．発表者名 大津 航
２．発表標題 繊毛病の新規治療標的としての後期エンドソームの可能性
３．学会等名 第96回日本薬理学会年会，JPW2022
４．発表年 2022年

１．発表者名 中村 信介、髙橋 慶、大津 航、原 英彰、嶋澤 雅光
２．発表標題 網脈絡膜変性病態におけるプログラニュリンの役割に関する研究
３．学会等名 第5回プログラニュリン研究会
４．発表年 2022年

１．発表者名 中村 信介、稲垣 賢、青山 八雲、青島 弘汰、大津 航、船戸 道徳、嶋澤 雅光、高橋 一浩、原 英彰
２．発表標題 網膜オルガノイドを用いた糖尿病網膜症モデルの開発
３．学会等名 第95回日本薬理学会年会
４．発表年 2022年

１．発表者名 大津 航、知念 尚希、石田 紘大、中村 信介、嶋澤 雅光、角崎 英志、原 英彰
２．発表標題 タバコ煙水抽出物および加熱式タバコ産物による筋芽細胞C2C12の細胞骨格形成障害に対するN-アセチルシステインの保護作用
３．学会等名 第95回日本薬理学会年会
４．発表年 2022年

１．発表者名 大津 航
２．発表標題 網膜変性疾患における細胞内ストレス応答機構の役割
３．学会等名 日本薬学会第142年会
４．発表年 2022年

１．発表者名 大津 航、山﨑 幹大、矢古宇 智弘、中村 信介、嶋澤 雅光、角崎 英志、原 英彰
２．発表標題 マウス視細胞と網膜色素上皮における青色LED光ストレスの早期影響の解析
３．学会等名 第44回日本分子生物学会年会
４．発表年 2021年

１．発表者名 山﨑 幹大、石田 紘大、大津 航、矢古宇 智弘、中村 信介、山田 和佳奈、角崎 英志、下田 博司、原 英彰、嶋澤 雅光
２．発表標題 青色LED光誘発視細胞障害に対するマキベリー抽出物とその成分の保護効果
３．学会等名 第12回岐阜薬科大学機能性健康食品研究講演会
４．発表年 2021年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岐阜薬科大学・バイオメディカルリサーチ講座ウェブサイト https://bmrgpu.wixsite.com/website

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関