

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450466

研究課題名(和文) 着床前胚における分泌型プロサポシン産生細胞の同定と細胞内動態の解明

研究課題名(英文) The expression of prosaposin in the reproductive tissues and early embryo

研究代表者

下川 哲哉 (Shimokawa, Tetsuya)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40363337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：プロサポシンは、リソソームに向かい脂質代謝に関係するサポシンA,B,C,Dの前駆体蛋白質としての機能を有する型(リソソーム型プロサポシン)と、細胞膜に向かい神経栄養因子として細胞外に分泌される型(分泌型プロサポシン)が存在する。本研究では、雌性生殖器・初期発生胚における分泌型プロサポシン産生細胞を同定し、さらにプロサポシン受容体の発現性と局在を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Prosaposin (PSAP) is a trophic factor and activator of sphingolipid hydrolase in lysosomes. G protein-coupled receptor (GPR)37 and GPR37L1 are receptors for prosaptide and prosaposin. Immunoblotting using oviduct and uterine tissues showed that the production of PSAP and its receptors was affected by the estrus cycle. Intense expression of PSAP mRNA, examined using in situ hybridization, was observed in rat oviducts, uterus and early embryo. In rats, alternative splicing generates two forms of mRNA coding for PSAP: Pro+9, containing a nine-base insertion, and Pro+0, which lacks the insertion. Both types of mRNA (Pro+9 and Pro+0) were detected, indicating that rat uterus contains various types of PSAP-producing and/or -secreting cells. This study revealed diverse pivotal functions for PSAP in the reproductive system.

研究分野：解剖学

キーワード：卵巣 卵管 子宮 初期胚 プロサポシン GPR37 GPR37L1

## 1. 研究開始当初の背景

プロサポシンは、リソソームに向かい脂質代謝に係るサポシン A, B, C, D の前駆体蛋白質としての機能を有する型(リソソーム型プロサポシン)と、細胞膜に向かい神経栄養因子として細胞外に分泌される型(分泌型プロサポシン)が存在する。我々はこれまでに分泌型プロサポシンの mRNA の配列はリソソーム型のものとは比べ 9 塩基分長いという違い(J Neurotrauma, 20:755-765, 2003)を利用して In situ hybridization 法を用い、中枢神経系における分泌型プロサポシンを同定することに成功した。また我々は、プロサポシンに対する抗体を作製し、筋系においてもプロサポシン産生細胞が存在し、筋肉の再生過程において重要な役割を担うことを示した。さらに、プロサポシンに対する特異抗体と分泌型プロサポシンに特異的な検出法を組み合わせることで、その存在のみが知られ詳細については不明であったリンパ系組織においてプロサポシン産生細胞が多数存在し、抗原提示細胞の一部が分泌型プロサポシンを産生することを明らかにした。

雌性生殖系では Western blotting 法による解析から卵巣にプロサポシンが存在することが判明しているが、その分布域、含有細胞については明らかになっていない。そして卵巣以外の雌性生殖系では、プロサポシンについての報告は一切ない。我々は雌性生殖系においてもプロサポシンが産生・分泌され、発生・分化においてプロサポシンが非常に重要であると考えている。

## 2. 研究の目的

我々は各組織におけるプロサポシン産生細胞の同定と共に、プロサポシンのアミノ酸配列中の 18 個の配列からなる合成ペプチドが、脳虚血等に治療効果があることを示すと共に、筋系の再生にも関与することを明らかにした。本研究では、雌性生殖系におけるプロサポシン及びプロサポシン受容体の発現時期・分布について詳細に解析を行うと共に、着床前胚における分泌型プロサポシン産生細胞の同定と、初期胚に取り込まれたプロサポシンの細胞内動態を解明し、胚発生調節におけるプロサポシンの機能を解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 新規抗体の作製

プロサポシン、プロサポシン受容体(GPR37、GPR37L1)について、新規抗体を作製し、それらを用いて、Immunohistochemistry、Western blotting を用いて解析を行った。

### (2) 凍結切片を用いた In situ hybridization 法による検出

既に設計してあるプロサポシンに対する Oligonucleotide プローブに対し、DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit

(Roche)を用いて DIG 標識 Oligonucleotide プローブを作製した。

In situ hybridization は以下の通り行った。各週齢のラットの卵巣・卵管・子宮を採材し、7 $\mu$ m 厚の凍結切片を作製し、乾熱滅菌を施したシランコートスライドに貼り付けた。脱パラフィン後、4%パラフォルムアルデヒド(0.1MPB)で15分間インキュベーションし、PBSで洗浄後、5 $\times$ SSCで15分間平衡化した。hybridization bufferで42 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした後に、プローブを添加した hybridization buffer で 42 $^{\circ}$ C 一晩インキュベートした。その後、2 $\times$ SSC 室温 15 分間、2 $\times$ SSC58 $^{\circ}$ C 40 分間、0.5 $\times$ SSC58 $^{\circ}$ C 20 分間インキュベートした後に、TBSにて平衡化し、Blocking solutionを滴下後室温で30分間インキュベートした。その後、1000倍に希釈したアルカリホスファターゼ標識、抗DIGヤギ抗体を切片に滴下し、室温で1時間標識した。TBSにて5分間3回洗浄し、NBT/BCIP solution-Detection bufferにて4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。TE bufferにて発色反応を停止し、蒸留水にて洗浄後、Glycerol Mounting Medium (Dako)を用いて封入した。

### (3) パラフィン切片を用いた In situ hybridization 法による検出

ラットを生理食塩水および4%パラフォルムアルデヒド(0.1MPB)にて灌流固定後に卵巣・卵管・子宮を採材し、常法に従ってパラフィンに包埋後、7 $\mu$ m厚のパラフィン切片を作製し、シランコートスライドに貼り付けた。脱パラフィン後、ViewRNA In situ hybridization Tissue 2-Plex Assay (Panomics/Affymetrix)のプロトコールに従い染色を行った。プローブはAffymetrix社製のものを使用した。

### (4) 蛍光標識合成ペプチドの作製

サポシンC領域に含まれる18個のアミノ酸の配列が神経栄養因子として機能することが明らかとなっているので(J Neurochem 66:2197-2200, 1996)、その配列をもとにした合成ペプチドに蛍光色素であるFAM (Fluorescein Aminohexyl)標識を行った。コントロールとして、スクランブル配列の18個のアミノ酸にFAM標識を行った合成ペプチドを用いた。

### (5) 人工授精と初期胚の培養

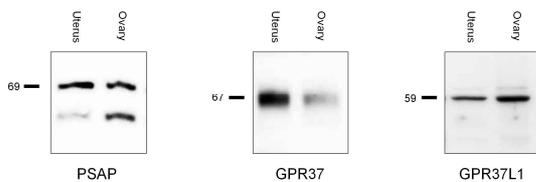
常法に従い過排卵を促したラットから未受精卵を回収し、顕微下において人工授精を行った。ラット着床前胚の培養に用いる培地は古田らによる修正R1ECMを用いた(Men Institute advanced technol 14:1-8, 2009)。

## 4. 研究成果

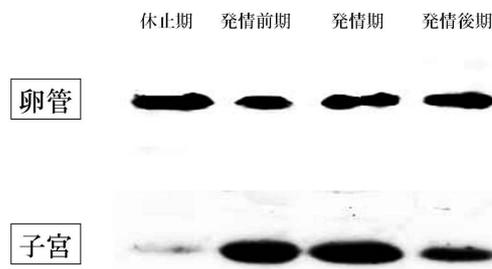
### (1) 雌性生殖系におけるプロサポシン蛋白の発現

新規に作製したプロサポシンおよびプロ

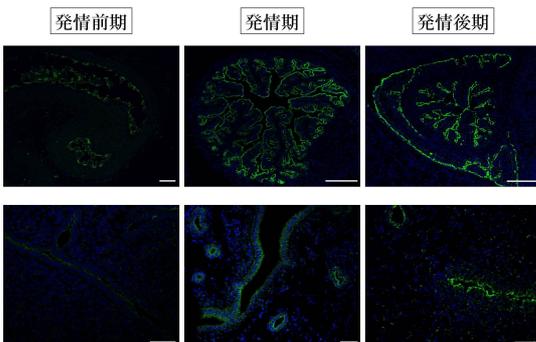
サポシン受容体 (GPR37、GPR37L1) に対する特異抗体を用いた Western blotting による検索から、プロサポシンは性周期を通じて卵巣・卵管上皮・子宮上皮・子宮腺で産生されており、卵管では性周期による発現量の変化は見られなかったが、卵巣・子宮上皮・子宮腺では発情休止期と発情期の間で発現量に有意差が見られ、生殖周期に左右されることが明らかとなった。プロサポシン受容体の発現も見られ、その動態はプロサポシンと同様であった。リンパ系組織において抗原提示細胞がプロサポシンを含有することが明らかになっているが、子宮における抗原提示細胞 (樹状細胞) においても、プロサポシンを含有する結果が得られた。



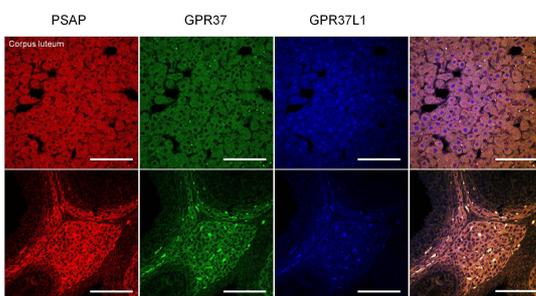
付図説明：卵巣においては分泌型プロサポシンよりも前駆体型プロサポシンが多いと考えられた。



付図説明：卵管は子宮に比べて生殖周期の影響を受けない。

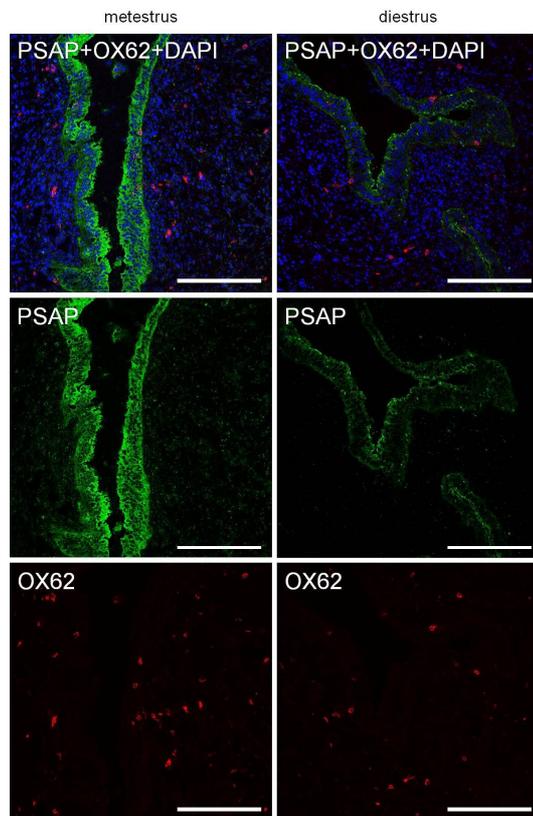


付図説明：卵管 (上段) のプロサポシン発現は発情周期の影響を受けないが、子宮 (下段) においては、顕著に違いが見られる。



付図説明：プロサポシンを発現する細胞 (卵

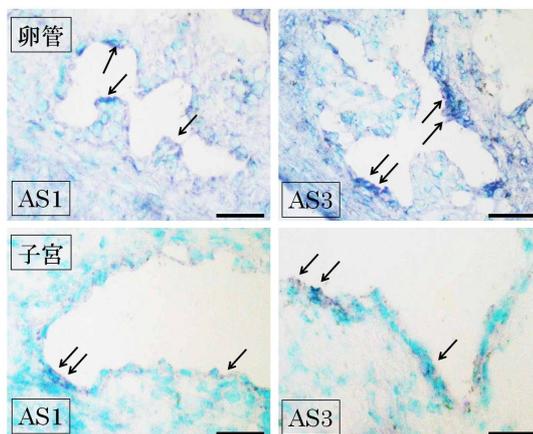
巣) はプロサポシン受容体も発現している。



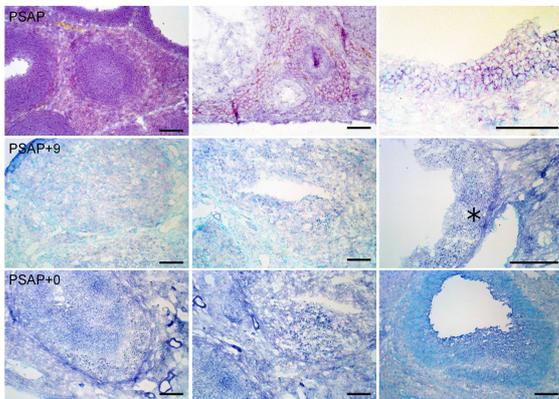
付図説明：OX62 (樹状細胞マーカー) とプロサポシンの共染像が見られた。

## (2) 分泌型プロサポシン細胞の同定

In situ hybridization 法を用いた解析により、分泌型プロサポシンの存在が明らかとなった。卵管および子宮では、前駆体型プロサポシンと共に、分泌型プロサポシンが存在していた。一方卵巣においては、分泌型プロサポシンの発現は限局的であり、多くを前駆体型プロサポシンが占めていた。このことから、プロサポシンがラット雌性生殖系において活発に分泌され、神経栄養因子とは別の機能を有していることが明らかとなった。



付図説明：分泌型プロサポシン (AS3) の存在が確認された。



付図説明：壁側の顆粒膜細胞においても分泌型プロサポシンの反応が見られた（\*）。卵の発育においてプロサポシンが何らかの機能を担っている可能性がある。

（3）ラット受精卵・初期胚においてもプロサポシンとプロサポシン受容体を発現することが明らかとなった。分泌型プロサポシンの初期胚における動態の解明を目指して FAM 標識合成ペプチドを受精卵に投与したが、安定した取り込み像を得ることが出来なかった。この取り込み能の不安定について詳しく解析してみると、受精卵の品質に大きく影響を受けていることが判明した。一見初期発生を行う受精卵が、かなりの率で品質の劣化をきたしており、機能的にみた高品質の受精卵を研究対象とするために、さらなる改善が必要である事が明らかとなった。



付図説明：初期発生においてもプロサポシンおよびプロサポシン受容体が発現している。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計5件）

Nabeka H, Shimokawa T, Doihara T, Saito S, Wakisaka H, Hamada F, Kobayashi N, Matsuda S. A prosaposin-derived Peptide alleviates kainic Acid-induced brain injury. PLoS One. 2015 May 18;10(5):e0126856.doi:10.1371/journal.pone.0126856.（査読あり）

Nabeka H, Uematsu K, Takechi H, Shimokawa T, Yamamiya K, Li C, Doihara T, Saito S, Kobayashi N, Matsuda S.

Prosaposin overexpression following kainic acid-induced neurotoxicity. PLoS One. 2014 Dec 2;9(12):e110534.doi:10.1371/journal.pone.0110534.（査読あり）

Morishita M, Nabeka H, Shimokawa T, Miyawaki K, Doihara T, Saito S, Kobayashi N, Matsuda S. Temporal changes in prosaposin expression in the rat dentate gyrus after birth. PLoS One. 2014 May 28;9(5):e95883.doi:10.1371/journal.pone.0095883.（査読あり）

Saito S, Saito K, Nabeka H, Shimokawa T, Kobayashi N, Matsuda S. Differential expression of the alternatively spliced forms of prosaposin mRNAs in rat choroid plexus. Cell Tissue Res. 2014 Apr;356(1):231-42.doi:10.1007/s00441-013-1773-9.（査読あり）

Gao HL, Li C, Nabeka H, Shimokawa T, Kobayashi N, Saito S, Wang ZY, Cao YM, Matsuda S. Decrease in prosaposin in the Dystrophic mdx mouse brain. PLoS One. 2013 Nov14;8(11):e80032.doi:10.1371/journal.pone.0080032.（査読あり）

〔学会発表〕（計2件）

下川哲哉、鍋加浩明、MSI カーン、土居原拓也、脇坂浩之、小林直人、松田正司. 2016. 卵巣におけるプロサポシンの分布. 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会. ビッグパレットふくしま（福島県・郡山市）. 2016年3月28日～30日.

下川哲哉、鍋加浩明、MSI カーン、土居原拓也、小林直人、松田正司. 2015. Distribution of prosaposin and its receptors in rat uterus. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会. 神戸国際会議場（兵庫県・神戸市）. 2015年3月21日～25日.

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

下川 哲哉 ( Shimokawa , Tetsuya )

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：40363337