

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430066

研究課題名(和文) 脳梗塞に対する新規治療標的分子としてのプログラニューリンの検討

研究課題名(英文) Analysis of progranulin as novel therapeutic target against ischemic stroke

研究代表者

下畑 享良 (SHIMOHATA, Takayoshi)

新潟大学・脳研究所・准教授

研究者番号：60361911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：急性局所虚血に対し、成長因子プログラニューリン(PGRN)は、PGRNノックアウトマウスを用いた実験で、TDP43の細胞質への異常局在を抑制すること、ミクログリアにおけるIL-10を介した抗炎症作用、そしてVEGF抑制を介した血管保護作用を含む、さまざまなメカニズムにて脳保護効果を有することを明らかにした。さらにラット自家血栓を用いた脳梗塞モデルにおいて、組織プラスミノゲン・アクチベーターとPGRNの併用は、脳梗塞サイズ、浮腫サイズ、出血量を有意に抑制した。PGRNは神経細胞保護、血管保護、抗炎症効果を併せ持つ、これまでにない脳保護薬になる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We observed that progranulin (PGRN) could protect against acute focal cerebral ischemia by variety of mechanisms, which we call "brain protection", including neuroprotection in part by inhibition of cytoplasmic redistribution of TDP-43 using PGRN knock-out mice, suppression of neuroinflammation via anti-inflammatory interleukin-10 in microglia, and attenuation of blood-brain barrier disruption via vascular endothelial growth factor. We also demonstrated the therapeutic potential of PGRN against acute focal cerebral ischemia using a rat autologous thromboembolic model with delayed tissue plasminogen activator treatment. Intravenously administered recombinant PGRN significantly reduced volumes of cerebral infarct and edema, suppressed hemorrhagic transformation, and improved motor outcome. PGRN may be a novel therapeutic target that provides brain protection such as vascular protection, anti-neuroinflammation, and neuroprotection.

研究分野：神経内科

キーワード：脳虚血 プログラニューリン 神経細胞保護 血管保護 抗炎症

1. 研究開始当初の背景

申請者らは筋萎縮側索硬化症等の神経変性疾患の下忍遺伝子産物、かつ治療標的分子とされる TDP43 (TAR-DNA binding protein 43 kDa) 蛋白が、脳虚血により限定分解をされる結果、虚血性神経細胞死にも関与する可能性を示した (J Neurochem 2011)。その後、TDP43 シグナルの上流に存在し、caspase 3 を素材することによりその限定分解を阻害するプログランリン (progranulin; PGRN) に関心を持ち、脳虚血下の分子病態について予備実験を行ったところ、急性期においては神経細胞での発現が減少し、逆に血管内皮細胞では発現が誘導され、さらに亜急性期においてはミクログリアにおいて顕著に発現が増加することを免疫プロットおよび免疫染色により見出していた。また応募者らは予備実験において、さらに以下の3点を明らかにした。

(1) PGRN は非虚血時のラット脳では神経細胞 (小胞体・ゴルジ体に局在) にのみ発現する。免疫プロットでは糖鎖の負荷の程度により 88kDa (分泌型) と 55~66kDa (非分泌型) の2つのバンドが認められる。

(2) 脳虚血後 24h では神経細胞由来の PGRN の発現は低下するが、免疫染色では血管内皮細胞に発現が認められるようになる。72h では PGRN 陽性のミクログリアが著明に増加し、これに対応し非分泌型 PGRN が顕著に増加する。

(3) 東京大学農学部西原教授より供与された PGRN ノックアウト (KO) マウス (Behav Brain Res 2007) を用いた検討で、虚血後 24h において野生型と比較し脳浮腫が高度であることから、PGRN は急性期における血液脳関門の血管透過性亢進の抑制に関与する。

以上の結果に加え、既報告において PGRN は神経細胞保護作用と炎症抑制作用を持つことが指摘されていることから、PGRN は「神経細胞死」「血液脳関門破綻」「炎症」のいずれの病態にも作用する理想的な治療標的分子となる可能性が示唆されていた。

2. 研究の目的

以下の3点が目的である。

(1) PGRN KO マウスの局所脳虚血モデル (in vivo)、およびその初代培養細胞 (神経細胞、血管内皮細胞、ミクログリア) の脱酸素・脱グルコース (oxygen glucose deprivation; OGD) モデル (in vitro) を用いて、PGRN が神経細胞の生存、血液脳関門機能の保持、および炎症制御に果たす役割や機序を明らかにする。

(2) 上記の in vivo および in vitro モデルにおいて、マウス組み換え PGRN の投与が局所脳虚血や OGD 負荷に対して保護的に作用するか、神経細胞・血液脳関門の保護、炎症

制御の観点から明らかにする。

(3) PGRN の病態への関与を検証する橋渡し研究として、ヒト脳梗塞患者の tPA 療法前後の血液を試料とした PGRN と炎症性サイトカイン定量を超急性期と亜急性期に行い、その変化を確認して、臨床試験の実現へつなげる。

3. 研究の方法

(1) PGRN の脳虚血に対する保護作用を確認することを目的として、PGRN KO マウスに対して一過性局所脳虚血 (90 分の虚血と再灌流) を行い、亜急性期における機能・生命予後および各種病態への影響を野生型マウスと比較する。

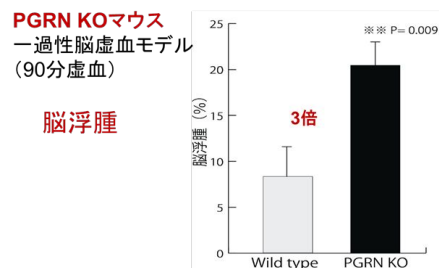
(2) PGRN の神経細胞、血液脳関門、ミクログリアにおける機能を明らかにすることを目的として、PGRN KO および野生型マウス由来の各種初代培養細胞に対して OGD 負荷を行い、神経細胞および血管内皮細胞の脆弱性、ミクログリアにおける各種サイトカイン発現の相違を調べる。

(3) PGRN の脳虚血に対する保護作用を確認することを目的として、ラット脳塞栓モデルにおいて tPA とともにマウス組み換え PGRN を経静脈的に投与し、脳梗塞・脳浮腫サイズ、脳出血量 (大脳半球におけるヘモグロビン濃度)、および運動機能・生命予後への影響を確認する。

(4) PGRN を治療標的分子とした臨床試験の実現のための橋渡し研究として、脳梗塞患者から経時的に血液を収集し、PGRN と炎症性サイトカインの定量を行い、脳梗塞サイズ、浮腫サイズ、出血合併症の有無、出血を認めた場合には血腫推定量との相関を確認する。

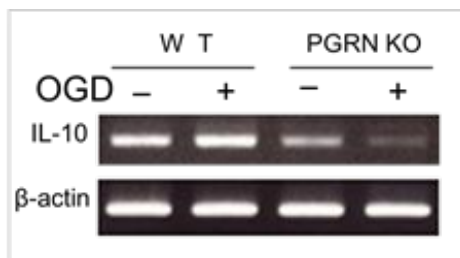
4. 研究成果

(1) PGRN KO マウスに対して一過性局所脳虚血を負荷したところ、脳梗塞サイズのおよび脳浮腫サイズ (図) が野生型と比較して有意に大きいことが判明した。すなわち PGRN は脳梗塞に対し、脳保護的に作用することが裏付けられた。



(2) PGRN KO マウス由来の初代培養ミクログリアに対して OGD 負荷を行い、抗炎症性サイトカインである IL-10 の mRNA の OGD 刺激後の発現が、野生型と比較して有意に低下していることがわかった。この結果は PGRN が IL-10 を介した抗炎症作用を有することを示

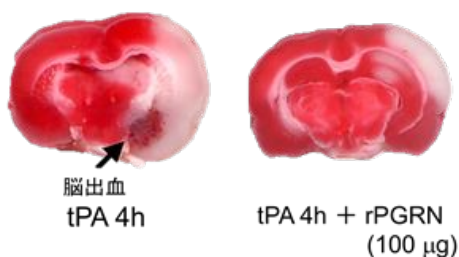
すものである。



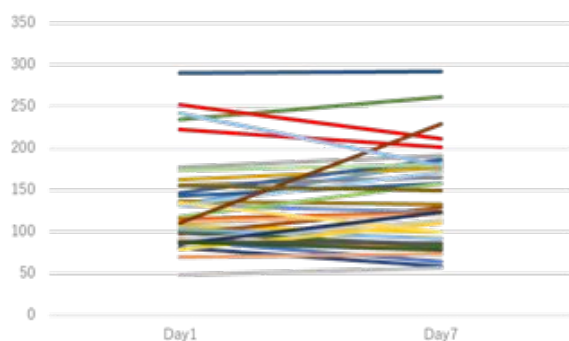
PGRN KO : ノックアウトマウス由来

(3) ラット脳塞栓モデルにおいて tPA とマウス組み換え PGRN の経静脈的に投与は、脳梗塞・脳浮腫サイズ、脳出血量、および機能・生命予後のすべての項目を、tPA と偽薬の併用と比較して有意に改善した。

出血防止に加え脳梗塞縮小効果あり



(4) 脳梗塞患者 38 例 (男 28 例, 女 10 例; 平均年齢 74 ± 12.9 歳, うち tPA による治療を受けた症例は 2 名) に対し, 入院 24 時間以内と 7 日目の血液を採取, 血清を保存し, ELISA 法により, 発症 1 日目と亜急性期 (7 日目) の血清 PGRN 濃度 (ng/ml) を比較したところ, 有意な変化は確認できなかった。



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 3 件)

Kanazawa M, Kawamura K, Takahashi T, Miura M, Tanaka Y, Koyama M, Toriyabe M, Igarashi H, Nakada T, Nishihara M, Nishizawa M, Shimohata T. Multiple therapeutic effects of progranulin on experimental acute ischemic stroke. *Brain* 138:1932-1948, 2015 (査読あり)

下畑 享良, 金澤 雅人, 鳥谷部 真史, 小山 美咲, 高橋 哲哉, 西澤 正豊. 成長因子プログラニューリンによる脳保護療法. *脳循環代謝* 27: 265-269, 2016 (査読なし)

金澤 雅人, 川村 邦雄, 高橋 哲哉, 西澤 正豊, 下畑 享良. プログラニューリン. *日本臨床* 74: 579-582, 2016 (査読なし)

〔学会発表〕(計 3 件)

下畑 享良, 金澤 雅人, 鳥谷部 真史, 小山 美咲, 高橋 哲哉, 西澤 正豊. 成長因子プログラニューリンによる脳保護療法. 第 27 回日本脳循環代謝学会総会 (富山県富山市) 2015 シンポジウム

下畑 享良, 西澤 正豊. プログラニューリンは脳虚血に対し多面的脳保護効果をもつ. 第 33 回神経治療学会 (愛知県名古屋市) 2015 神経治療学会会長賞受賞

下畑 享良, 金澤 雅人, 鳥谷部 真史, 高橋 哲哉. 脳虚血に対する新規脳保護薬としてのプログラニューリン. 第 1 回プログラニューリン研究会 (岐阜県岐阜市) 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 細胞製剤および細胞製剤の製造方法

発明者: 下畑 享良

権利者: 新潟大学

種類: 特許

番号: 2016-168543

出願年月日: 2016 年 8 月 30 日

国内外の別: 海外

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

フェイスブックページ「新潟大学脳研究所神経内科 脳循環代謝チーム」
<https://www.facebook.com/NiigataCBFM>
にて研究成果を報告した。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下畑 享良 (SHIMOHATA, Takayoshi)
新潟大学・脳研究所・准教授
研究者番号：60361911

(2) 研究分担者

高橋 哲哉 (TAKAHASHI, Tetsuya)
新潟大学・医歯学総合病院・助教
研究者番号：20515663

(3) 連携研究者

金澤 雅人 (KANAZAWA, Masato)
新潟大学・医歯学総合病院・助教
研究者番号：80645101