

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03930

研究課題名(和文) 新規リソソームタンパク質による神経筋組織の恒常性維持機構の解明

研究課題名(英文) Involvement of a lysosomal protein in maintaining nervous/muscular tissues

研究代表者

西原 真杉 (NISHIHARA, Masugi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：90145673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は神経保護因子として知られるプログランユリン(PGRN)がリソソームタンパク質であることを見出した。本研究においては、PGRNの神経筋組織の恒常性維持機構における役割を解析した。その結果、PGRNの神経保護作用には過剰な神経興奮を抑制する作用が関与していること、PGRNは感染ストレス時には神経炎症を緩和することにより神経新生を維持していること、筋損傷時にはマクロファージの動態を調節することによって調和のとれた筋再生の進行に寄与していることなどが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プログランユリン(PGRN)は多様な神経保護作用をもつ分子であるが、その受容体や作用機序については不明な点が多い。我々はPGRNがリソソームの酸性化を介してその機能や生合成を調節する新規のリソソームタンパク質であることを示した。さらに、PGRNは神経組織および筋組織の損傷時や病態時に発現が上昇し、神経細胞の興奮性や免疫系細胞の動態等を制御することにより組織の修復や恒常性の維持に重要な役割を果たしていることを明らかにした。これらの知見は神経筋疾患の病態の解明や治療法の開発に資するものである。

研究成果の概要(英文)：We have found that progranulin (PGRN), which is known to have neuroprotective properties, is a kind of lysosomal proteins. In this study, we investigated the involvement of PGRN in maintaining homeostasis of nervous/muscular tissues. We found that PGRN suppresses excessive excitatory responses of neurons to seizure-inducible drugs, maintains adult hippocampal neurogenesis by attenuating neuroinflammation under acute immune stress, and promotes integrated muscular regeneration by regulating the dynamics of macrophages after muscular injury.

研究分野：獣医生理学

キーワード：生理学 神経組織 筋組織 プログランユリン

1. 研究開始当初の背景

我々は性ステロイドの作用を仲介して脳の性分化を誘導する分子として (progranulin: PGRN) を同定した。さらに近年、PGRN 遺伝子を欠失したノックアウトマウス (PGRN KO マウス) を世界で初めて作出し、性行動、攻撃行動、不安傾向などに変化が生じることを報告するとともに、PGRN が成熟動物における神経新生に関わる分子であることを見出した。一方、近年、PGRN 遺伝子の変異がヒトの神経変性疾患である前頭側頭葉変性症や、リソソーム病の一種である神経セロイドリポフスチン症の原因となることが報告された。これらのことは、PGRN が種を問わず生涯にわたって神経細胞の増殖、分化、変性、細胞死等の制御に関わる普遍的な因子であることを示唆している。

さらに我々は、PGRN は脳傷害や加齢に伴ってミクログリアで発現が上昇し、その過剰な活性化を抑制して神経炎症を制御すること、PGRN はリソソームに局在し、mTORC1 の活性化を介して転写因子 TFEB の核移行を抑制することによりリソソームの生合成を抑制すること等を明らかにした。さらに、PGRN の欠如によってオートファジーの機能不全が亢進して TDP-43 等の異常タンパク質が蓄積し、神経変性が誘起されることを示した。また、実験的筋損傷モデルや我々が作出したジストロフィン遺伝子変異ラットの骨格筋においても PGRN の発現が上昇することから、筋組織の修復過程においても重要な役割を果たしていることが示唆された。

PGRN はこれまでこれまで成長因子として理解されてきたが、受容体や作用機序の詳細は不明であった。われわれは上述のように PGRN はリソソームに局在してオートファジーの制御に関与するほか、プロモーター領域にリソソームタンパク質に特徴的な CLEAR 配列を有すること、PGRN によりリソソームの酸性化が亢進することなどを発見した。これらは全て PGRN が新規のリソソームタンパク質であることを示している。さらに最近、我々は PGRN KO マウスの脳ではアストロサイト特異的にエストロゲン受容が欠如していることを発見した。これらの知見はいずれも、不明な点が多い PGRN の作用機序の解明に大きな手掛かりとなるものである。

2. 研究の目的

上記のような我々の研究から、PGRN はリソソームに局在してリソソームの生合成を制御するとともにオートファジー・リソソーム系の機能を正常に維持するリソソームタンパク質であること、さらに PGRN は神経組織や筋組織の損傷時に発現が上昇してその修復過程に関わる分子であることが強く示唆された。本研究の目的はこれらの知見を発展させ、PGRN のリソソームにおける作用機序や神経組織および筋組織の損傷時における PGRN の発現制御とその修復機構を解明し、リソソームタンパク質が興奮性組織の恒常性を維持する普遍的な仕組みを明らかにすることである。具体的には、培養細胞を用いた *in vitro* の実験系を用いて PGRN のリソソームへの輸送機構やリソソーム酵素の活性発現に必要なリソソームの酸性化に対する PGRN の作用を解明する。さらに、申請者が作出した PGRN KO マウス等を用いて成熟期、老齢期の脳における発現解析、組織学的解析等を行い、加齢に伴う各種細胞生物学的現象の制御における PGRN の役割を検討する。さらに、実験的脳傷害モデル、筋損傷モデルを用いて、傷害部位における発現細胞および発現制御機構を解析するとともに、修復過程における PGRN の作用機序を解明する。

以上のような PGRN のリソソームタンパク質としての作用機構に焦点を当てた解析により、PGRN が有する本来の生理学的な動態や機能、作用機序を解明するとともに、それらが組織の損傷時や病態時にどのように修飾され、神経組織および筋組織の修復や恒常性の維持に関与しているかを明らかにする。

3. 研究の方法

初代培養あるいは株化ミクログリアや株化神経芽細胞等を用いて、*in vitro*の実験系でリソソームの機能に対する PGRN の作用を検討する。リソソーム内の加水分解酵素の至適 pH は 5 以下で、リソソームが正常に機能するためには酸性に維持されている必要がある。PGRN のリソソーム酸性化に対する効果を pH インディケーターにより解析するとともに、リソソームの加水分解酵素の活性に対する効果を評価し、リソソーム機能に対する PGRN の作用機構を検討する。また、リソソームアルカリライザーによりリソソームの機能不全を誘起して PGRN の遺伝子発現に対する効果を解析するとともに、リソソームタンパク質の発現に対する PGRN の欠損や過剰発現の影響を検討する。一方、細胞内外のタンパク質はソルチリンやマンノース 6 リン酸受容体と結合してリソソームに運搬されることが知られている。PGRN もこれらの運搬体タンパク質を介してリソソームに運搬されているのかどうか確認するため、これらの輸送体をロックダウンした場合の PGRN の細胞内への取込み、リソソーム酸性化等を検討する。

In vivo の実験系としては、成熟期や老齢期の PGRN KO マウスの脳において、特に成熟後も神経新生が起こっている海馬歯状回に着目した解析を行う。我々は性ステロイドや自発的走行運動が PGRN を介して神経新生を促進することを見出しているが、野生型および PGRN KO マウスを用いて細胞増殖マーカーや PGRN の発現動態や発現細胞の解析、さらに神経炎症マーカーおよびリソソームタンパク質の遺伝子発現等に関する解析を行ない、これらの指標に対する加齢の影響を検討する。また、我々はリポ多糖投与による感染ストレスモデルにより海馬歯状回における神経新生が抑制されるとともに神経炎症が誘起されることを確認しており、このモデルを用いて感染ストレスによる神経前駆細胞の増殖や神経炎症、ならびに mTOR シグナリングやリソソームの生合成の制御における PGRN の作用機構を追究する。

一方、我々は PGRN KO マウスではグルタミン酸アゴニストの一種である NMDA の興奮毒性に対する感受性が亢進していることを示した。神経系の過剰興奮が神経変性の一因と考えられているため、さらに抑制性アミノ酸アンタゴニストのてんかん発作に対する影響についても検討するとともに、NMDA 受容体の各サブユニットの発現等を解析し、PGRN が神経細胞の過剰な興奮を抑えて神経障害を抑制している機構を解明する。さらに、本研究の過程でペンチレンテトラゾール (PTZ) 誘発性キンドリングモデルにおいて、IL-1 受容体 (IL-1R1) ノックアウトマウスではてんかん発作が亢進することを見出したため、IL-1 シグナリングの神経興奮性や神経炎症の制御における役割を解析するとともに、PGRN との関係について検討する。

実験的筋損傷モデルとしては、まず野生型マウスの前脛骨筋にカルジオトキシンを用いて筋損傷を行い、筋組織の損傷時における PGRN の発現パターンや発現細胞を検討する。さらに、筋組織の損傷程度や修復過程に対する PGRN の関与を明らかにするために、野生型および PGRN KO マウスを用いてカルジオトキシンによる筋損傷を行い、マクロファージの集積や炎症関連サイトカインの発現、中心核をもつ再生筋線維の直径等を遺伝子型間で比較する。

4. 研究成果

(1) 培養ミクログリアや神経細胞を用いた解析により、リソソームアルカリライザーによりリソソームの生合成とともに PGRN の発現が上昇すること、一方、リソソームタンパク質の発現は PGRN の欠損により上昇し過剰により減少することが明らかとなった。カテプシン D のレベルは PGRN レベルに依存して変化し、PGRN のトランスフェクションによりリソソームの酸性化が起こるとともに、カテプシン D の分解が亢進した。細胞外に分泌された PGRN はソルチリンあるいはカチ

オン非依存性マンノース 6 リン酸受容体により細胞に取り込まれてリソソームに移行し、リソソームの酸性化とカテプシン D の分解を促進した。これらの知見は、PGRN はリソソームの酸性化を介してリソソームの機能や生合成を制御していることを示唆している。

(2) 感染ストレス時や老齢期における神経炎症、および海馬歯状回の神経新生における PGRN の役割について検討した。マウスを用いたリポ多糖投与による感染ストレスモデルにおいては、活性化ミクログリアにおける PGRN の発現上昇とともに、神経新生の抑制、mTOR シグナリングの抑制を介したリソソーム生合成の促進、炎症性サイトカイン遺伝子の発現上昇が起こるが、PGRN KO マウスにおいてはこれらの反応が増悪することから、PGRN は感染ストレス時には神経炎症を緩和することにより神経新生を維持していることが示唆された。一方、加齢とともに脳内ではミクログリアの活性化や神経新生の減少が起こるが、PGRN KO マウスでは CD68 陽性活性化ミクログリア数、リソソーム生合成、炎症性サイトカイン遺伝子発現がいずれも上昇していたが神経新生には差がなかったことから、PGRN は加齢に伴う神経炎症は抑制するが神経新生の減少には影響しないことが示唆された。

(3) 我々は興奮性アミノ酸アゴニストや抑制性アミノ酸アンタゴニストにより誘起されるてんかん発作が PGRN KO マウスにおいて増悪することを見出し、PGRN の神経保護作用には過剰な神経興奮を抑制する作用が関与していることを示唆するとともに、興奮性アミノ酸受容体である NMDA 受容体のサブユニットの一種である NR2A のタンパク質量が海馬で増加していることを見出した。そこで海馬における NMDA 受容体のサブユニットおよび転写調節因子の mRNA 量を定量したところ、いずれも PGRN KO マウスにおいて有意に低値を示し、また受容体のリン酸化状態にも遺伝子型間で有意な差が認められなかったことから、PGRN KO マウスの海馬における NR2A タンパク質量増加の原因は転写の亢進ではなく、リソソームの機能不全によるタンパク質分解の抑制による可能性が考えられた。

(4) 我々はペンチレンテトラゾール (PTZ) 誘発性キンドリングモデルにおいて、IL-1 受容体 (IL-1R1) ノックアウトマウスでは神経炎症やてんかん発作が亢進することを見出した。そこで、PTZ キンドリングについてさらに検討した結果、IL-1 シグナリングは健常脳ではてんかん原性の獲得を抑制するが、ひとたびてんかん原性を獲得した脳ではグリオシスを誘導し、脳の炎症とてんかん発作の発現を促進していることが示唆された。PGRN と IL-1 は両者ともに細胞外に放出されて作用を示す液性因子であり、海馬での主な産生源は神経細胞およびミクログリアである。我々は PGRN 欠損脳ではミクログリアが過剰に活性化していることを報告しているが、今回の結果と合わせると、PGRN 欠損による内因的な神経系の過剰興奮が IL-1 の放出を促進し、神経炎症が誘導されていることが考えられた。

(5) 筋組織については損傷後の修復過程における PGRN の役割について検討した。野生型マウスの前脛骨筋にカルジオトキシンを投与して筋損傷を行ったところ、PGRN の発現は一過的に増加して損傷後 3 日目に最大に達した。マクロファージのマーカーである CD68 および PGRN の二重免疫染色を行ったところ、PGRN は主に損傷部位に集積するマクロファージに発現することが明らかになった。さらに、PGRN KO マウスを用いた解析の結果、筋再生過程における PGRN の欠損は炎症関連サイトカインの遺伝子発現パターンの変化、抗炎症性マクロファージの残存、および再生筋線維径の肥大につながることを示唆された。PGRN は筋損傷後の炎症やサイトカイン発現量、マクロファージのサブタイプの動態を制御することによって、調和のとれた筋再生の進行に寄与している可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kuroda M, Matsuwaki T, Tanaka Y, Yamanouchi K, Nishihara M	4. 巻 31
2. 論文標題 Convulsive responses to seizure-inducible drugs are exacerbated in progranulin-deficient mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroreport	6. 最初と最後の頁 478-483
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/WNR.0000000000001425	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 Takeuchi S, Yamanouchi K, Sugihara H, Matsuwaki T, Nishihara M	4. 巻 91
2. 論文標題 Differentiation of skeletal muscle mesenchymal progenitor cells to myofibroblasts is reversible	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 e13368
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/asj.13368	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 Sugihara H, Teramoto N, Yamanouchi K, Matsuwaki T, Nishihara M	4. 巻 10
2. 論文標題 Oxidative stress-mediated senescence in mesenchymal progenitor cells causes the loss of their fibro/adipogenic potential and abrogates the fusion of myoblasts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Aging	6. 最初と最後の頁 747-763
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/aging.101425	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 Sugihara H, Miyaji K, Yamanouchi K, Matsuwaki T, Nishihara M	4. 巻 80
2. 論文標題 Progranulin deficiency leads to prolonged persistence of macrophages, accompanied with muscle hypertrophy in regenerating muscle	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 346-353
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.17-0638	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 Ma Y, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M	4. 巻 95
2. 論文標題 Involvement of progranulin in modulating neuroinflammatory responses but not neurogenesis in the hippocampus of aged mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Experimental Gerontology	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exger.2017.05.003	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 Ma Y, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M	4. 巻 54
2. 論文標題 Progranulin protects hippocampal neurogenesis via suppression of neuroinflammatory responses under acute immune stress	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 3717-3728
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12035-016-9939-6	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 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 黒田万智、松脇貴志、山内啓太郎、西原真杉
2. 発表標題 NMDA受容体発現制御機構に対するプログラニューリンの関与
3. 学会等名 第4回プログラニューリン研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒田万智、松脇貴志、山内啓太郎、西原真杉
2. 発表標題 プログラニューリンによる神経細胞の興奮性制御機構の解析
3. 学会等名 第31回日本行動神経内分泌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺本奈保美、山内啓太郎、杉原英俊、松脇貴志、西原真杉
2. 発表標題 ベッカー型筋ジストロフィーモデルラット骨格筋における新規ジストロフィンアイソフォームの発現
3. 学会等名 第162回日本獣医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉原英俊、宮地慧、松脇貴志、山内啓太郎、西原真杉
2. 発表標題 骨格筋の再生過程におけるプログラニュリンの役割
3. 学会等名 第3回プログラニュリン研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒田万智、松脇貴志、山内啓太郎、西原真杉
2. 発表標題 神経細胞の興奮性調節に対するプログラニュリン及びIL-1の関与
3. 学会等名 第3回プログラニュリン研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sugihara H, Teramoto N, Yamanouchi K, Matsuwaki T, Nishihara M
2. 発表標題 Potential role of senescent mesenchymal progenitor cells in the progression of sarcopenia
3. 学会等名 FASEB science research conference "Skeletal Muscle Satellite Cells and Regeneration" (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeuchi S, Yamanouchi K, Matsuwaki T, Nishihara M
2. 発表標題 Fibroblastic differentiation of mesenchymal progenitor cells may be reversible
3. 学会等名 FASEB science research conference "Skeletal Muscle Satellite Cells and Regeneration" (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉原英俊、寺本奈保美、松脇貴志、山内啓太郎、西原真杉
2. 発表標題 老化間葉系前駆細胞は筋衛星細胞の分化能低下を引き起こす
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒田万智、大島拓真、松脇貴志、山内啓太郎、Fang-Chia Chang、西原真杉
2. 発表標題 ベンチレンテトラゾール誘発キンドリングにおけるアストログリオシスに対するIL-1シグナリングの関与
3. 学会等名 第160回日本獣医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ma Y, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M
2. 発表標題 Roles of progranulin in regulating hippocampal neurogenesis and neuroinflammatory responses in aged mice
3. 学会等名 The 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 道家未央、松脇貴志、山内啓太郎、西原真杉
2. 発表標題 プログラニユリンのアストロサイト特異的エストロゲン受容体発現に対する関与
3. 学会等名 第2回プログラニユリン研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 黒田万智、松脇貴志、山内啓太郎、西原真杉
2. 発表標題 プログラニユリンが薬物誘導性てんかん様発作に与える影響
3. 学会等名 第2回プログラニユリン研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松脇貴志、馬彦博、山内啓太郎、西原真杉
2. 発表標題 ノックアウトマウスを用いたプログラニユリン脳内作用の研究
3. 学会等名 第2回プログラニユリン研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Nishihara M	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 183
3. 書名 Progranulin and Central Nervous System Disorders	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
連携研究者	山内 啓太郎 (YAMANOUCHI Keitaro) (70272440)	東京大学・農学生命科学研究科・准教授 (12601)	
連携研究者	松脇 貴志 (MATSUWAKI Takashi) (20447361)	東京大学・農学生命科学研究科・助教 (12601)	