

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月28日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2011

課題番号：20248030

研究課題名（和文）ステロイド／成長因子システムの中枢作用機構に関する研究

研究課題名（英文）Studies on Brain Actions of the Steroid/Growth Factor System

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・教授

研究者番号：90145673

研究成果の概要（和文）：本研究においては、性ステロイドと成長因子の共役により誘導される周生期の脳の性分化や成熟後の神経保護作用の機構を解明することを目的とした。成長因子プログラニューリン（PGRN）遺伝子欠損マウス等を用いた解析の結果、エストロゲンはPGRNを介して青斑核の細胞数等に影響を与えることにより行動の性差を形成すること、PGRNは神経変性を抑制するとともに海馬歯状回の神経新生、運動学習機能、脳障害後のミクログリア活性化の制御等にも重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに、PGRNの作用はGSK3 $\beta$ のリン酸化を介して細胞内に伝達され、LIMドメインをもつ遺伝子／タンパク質を介して発現することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study was conducted to elucidate the role of sex steroid/growth factor systems in sexual differentiation of the brain during perinatal period and neuroprotection as well as neurogenesis after maturation. By the studies using progranulin (PGRN)-deficient mice we have generated, we found that PGRN mediates the brain actions of estrogens and modulates brain sexual differentiation, neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus and neurodegeneration. It is also demonstrated that PGRN plays a role in regulating the activation of microglia after traumatic brain injury. In addition, it is suggested that the actions of PGRN in the brain is transduced through glycogen synthase kinase 3 $\beta$  phosphorylation, and mediated by genes/proteins containing LIM domain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	10,900,000	3,270,000	14,170,000
2009年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2010年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2011年度	0	0	0
年度			
総計	27,300,000	8,190,000	35,490,000

研究分野：獣医生理学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：脳・神経、ステロイドホルモン、成長因子、プログラニューリン、神経新生、神経変性、性分化

## 1. 研究開始当初の背景

性ステロイドは、周生期の動物の脳に対して性分化を誘導する作用（形成作用）、成熟動物の脳に対して性行動等を誘起する作用（活性作用）および神経新生を促進し神経変性を抑制すること等により認知機能を維持する作用（保護作用）を有している。我々は新生ラット視床下部において性ステロイド依存性に発現が上昇し、脳の性分化を誘導する遺伝子として、プログラニユリン（PGRN）をはじめとする幾つかの遺伝子を同定した（Suzuki et al., *Physiol Behav*, 2000; Yonehara et al., *Neurosci Lett*, 2002; Suzuki & Nishihara, *Mol Genetic Metab*, 2002）。PGRNは成長因子の一種であるが、脳における機能的な役割を報告したのは我々が世界で初めてであった。また近年、成熟動物における脳内神経幹細胞の増殖を性ステロイドが促進することが注目を集めているが、我々は成熟ラット脳内におけるPGRNの発現も性ステロイド依存性に上昇し、神経幹細胞の増殖を促進することを示した（Chiba et al., *J Reprod Dev*, 2007）。このような研究の過程で、我々は世界に先駆けてPGRN遺伝子欠損マウスを作出するとともに（Kayasuga et al., *Behav Brain Res*, 2007）、neurosphere法により神経幹細胞を単離・培養し、*in vitro*でステロイドや成長因子の効果を評価する実験系を確立している（Chiba et al., *J Reprod Dev*, 2007）。

さらに近年、アルツハイマー病に次いで頻度の高い神経変性を原因とするヒトの認知症である前頭側頭葉変性症（frontotemporal lobar degeneration）が、PGRN遺伝子の変異によるものであることが2つのグループから同時にNature誌に発表された（Baker et al., *Nature*, 2006; Cruts et al., *Nature*, 2006）。これらのことは、成長因子PGRNが種を問わず生涯にわたって神経細胞の増殖、分化、あるいは変性の制御に重要な役割を果たしている普遍的な因子であることを示唆している。さらにこれらの知見から、我々は哺乳類における脳の性分化では、この普遍的な仕組みを利用して脳の形態的、機能的性差を形成しているとの着想に至った。すなわち、性ステロイドの脳に対する形成作用と保護作用はともに成長因子PGRNを介して発現すること、すなわち作用メカニズムを共有していることが考えられ、我々の形成作用および保護作用に関する知見を統合することにより、両者の機構解明を併せて促進できるものと考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究はステロイドと成長因子の共役、すなわちステロイド／成長因子システムによる神経細胞の分化と再生の神経生物学的基盤を確立するとともに、高齢の動物やヒトにおける脳機能の維持、回復のための方法論を構築することを目的としたものである。具体的には、PGRN遺伝子欠損マウスや神経幹細胞の培養系などを用いた*in vivo*および*in vitro*の実験系を駆使して、(1)ステロイド／成長因子システムの中核作用と作用機序、(2)PGRNの下流でその作用発現に関与する遺伝子／タンパク質群、(3)PGRNの神経幹細胞に対する作用と細胞内情報伝達機構、を明らかにすることにより、ステロイド／成長因子システムによる脳の形成作用と保護作用に共通する普遍的分子機構を解明することを目的としている。

## 3. 研究の方法

上記の研究目的(1)～(3)に対応して、以下のような方法で研究を行った。

(1)我々が作出したPGRN遺伝子欠損マウス等を用いて、脳の性分化期である周生期や成熟期、さらに老齢期における脳の組織学的解析や行動学的解析、また遺伝子／タンパク質の発現解析等を行い、ステロイド／成長因子システムによる脳の形成作用や神経保護作用の機構を解析する。さらに、海馬歯状回に存在する神経前駆細胞の増殖、分化、あるいは実験的な外傷性脳障害後の神経細胞の細胞死や再生、ミクログリアの活性化等についても解析を行い、成熟動物における神経新生や脳障害後の修復過程におけるステロイド／成長因子システムの役割についても検討する。

(2)PGRN遺伝子欠損マウスと野生型マウスの脳内で発現に差のある遺伝子をジーン・チップにより、またタンパク質をプロテオミクス解析により網羅的に解析し、PGRNの作用発現に関わる遺伝子／タンパク質を同定する。同定された遺伝子／タンパク質に関してはさらに発現解析や脳における組織学的解析も行う。これらの解析により、ステロイド／成長因子システムの作用発現機構の解明を目指す。

(3)PGRN遺伝子欠損マウスおよび野生型マウス由来の胎子海馬神経細胞および神経幹細胞の培養系を作出し、*in vitro*で性ステロイドやPGRNの細胞の増殖、神経細胞やグリア細胞への分化や生存等に対する作用を解析するとともに、Akt、Erk1/2、GSK3 $\beta$ 等の各種シグナル分子のリン酸化について検討し、PGRNの細胞内情報伝達機構について解析を行う。

#### 4. 研究成果

上記の研究目的(1)～(3)に対応して、以下のような研究成果が得られた。

(1) PGRN の脳内各部位における発現を解析した結果、PGRN は大脳皮質、海馬、扁桃核、視床下部、小脳などで強く発現していること、またその発現は遺伝子、タンパク質ともに加齢依存的に減少することが明らかとなった。PGRN は性ステロイド依存的に発現することから、加齢に伴う性ステロイドの低下による PGRN の発現低下が、老齢期での神経保護作用の低下の一因となっている可能性が考えられた。また、PGRN 遺伝子欠損マウス老齢個体では神経細胞にリポフスチン沈着やグリオシスが観察され、ステロイド/成長因子システムが加齢による神経変性を抑制していることが示唆された。

また、野生型マウスでは不安傾向に雌雄差があり、雌マウスの方が高い不安傾向を示すことが知られているが、PGRN 遺伝子欠損マウスでは雄の不安傾向が高くなり雌雄差が観察されなかった。また、不安傾向の誘起に関与すると考えられているノルアドレナリン神経細胞の細胞体が存在する青斑核の大きさが、PGRN 遺伝子欠損マウスでは野生型マウスよりも有意に大きいことが明らかとなった。以上の結果より、PGRN は青斑核の神経細胞数に影響を与えることにより不安行動の雌雄差を形成することが考えられ、エストロゲンの脳の性分化誘導作用の少なくとも一部は PGRN を介して発現することが示唆された。

一方、成熟動物の海馬歯状回における神経新生は、環境の多様化や運動により促進されることが示されている。野生型マウスではランニングホイールによる走行運動により神経新生の促進が観察されたが、PGRN 遺伝子欠損マウスでは走行運動によっても神経新生に変化は見られなかった。また、ロータロッドを用いて小脳が関与するとされている運動学習機能を評価したところ、PGRN 遺伝子欠損マウスでは野生型マウスよりも運動学習機能が有意に低下していることが示された。これらの結果は、PGRN は海馬歯状回における神経新生、および小脳における運動学習機能の制御においても重要な役割を担う因子であることを示唆している。

さらに、外傷性脳障害モデルを用いた解析により、脳障害時には PGRN は CD68 陽性の活性化ミクログリアにおいて発現が高まること、また PGRN 遺伝子欠損マウスでは CD68 陽性ミクログリアの過剰な活性化が起り、活性化ミクログリアにおける TGF $\beta$ 1 の産生や酸化ストレス、血管のリモデリングも亢進していることが明らかとなった。以上の結果か

ら、PGRN は脳障害時には CD68 陽性の活性化ミクログリアにより産生され、同ミクログリア自身の過剰な活性化を抑制していることが示唆され、PGRN は脳の修復過程の制御に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

(2) 周生期の野生型および PGRN 遺伝子欠損マウスを用いて遺伝子およびタンパク質の網羅的発現解析を行い、PGRN の下流に存在する分子の同定を試みた。その結果、PGRN 遺伝子欠損マウスでは細胞増殖、脂質代謝、神経伝達、軸索輸送などに関連する遺伝子群の発現に変化が認められた。また、LIM ホメオボックス遺伝子 Lhx1 および LIM ドメインを持つタンパク質である LASP1 の発現が PGRN 遺伝子欠損マウスにおいて減少していた。神経細胞の分化や発達に関与していると考えられている LIM ドメインをもつタンパク質が PGRN の機能発現に関与し、性ステロイドの脳の性分化誘導作用を仲介していることが示唆された。

(3) 野生型マウスおよび PGRN 遺伝子欠損マウス由来の培養神経幹細胞に PGRN を添加した場合、後者でのみ細胞増殖が促進された。野生型培養神経幹細胞では比較的高濃度の PGRN が分泌されていることも明らかとなり、この内因性の PGRN により PGRN 添加の効果が観察されなかったものと考えられた。PGRN の作用機序を調べるために Akt、Erk1/2、GSK3 $\beta$  等の各種シグナル分子のリン酸化を解析した結果、PGRN に応答した GSK3 $\beta$  のリン酸化(不活性化)が観察された。さらに、GSK3 $\beta$  阻害剤も神経幹細胞の増殖を促進することが明らかとなった。PGRN は GSK3 $\beta$  の不活性化を介して神経幹細胞の増殖を促進するという生理活性を持つことが示唆され、発生段階や成長後の神経新生の促進に重要な役割を果たしていると考えられた。

#### 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20件)

① Nedachi T, Kawai T, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M (2011) Progranulin enhances neural progenitor cell proliferation through glycogen synthase kinase 3 $\beta$  phosphorylation. *Neuroscience* 185, 106-115. 査読有  
DOI:10.1016/j.neuroscience.2011.04.037

② Asakura R, Matsuwaki T, Shim JH, Yamanouchi K, Nishihara M (2011) Involvement of progranulin in the enhancement of hippocampal neurogenesis

by voluntary exercise. *NeuroReport* 22, 881-886. 査読有  
DOI:10.1097/WNR.0b013e32834bf4ca

③ Park B, Buti L, Lee S, Matsuwaki T, Spooner E, Brinkmann MM, Nishihara M, Ploegh HL (2011) Granulin is a novel soluble cofactor for toll-like receptor 9 signaling. *Immunity* 34, 505-513. 査読有  
DOI:10.1016/j.immuni.2011.01.018

④ Yonezawa T, Mogi K, Li JY, Sako R, Manabe N, Yamanouchi K, Nishihara M (2011) Effects of estrogen on growth hormone pulsatility in peripheral blood and neuropeptide profiles in the cerebrospinal fluid of goats. *J Reprod Dev* 57, 280-287. 査読有  
DOI:10.1262/jrd.10-118S

⑤ Matsuwaki T, Asakura R, Suzuki M, Yamanouchi K, Nishihara M (2011) Age-dependent changes in progranulin expression in mouse brain. *J Reprod Dev* 57, 113-119. 査読有  
DOI:10.1262/jrd.10-116S

⑥ 根建拓、松脇貴志、西原真杉 (2011) プログラニューリンと行動・神経変性. *Cognition Dementia* 10, 140-146. 査読無

⑦ Ahmed Z, Sheng H, Xu YF, Lin WL, Innes A, Yu X, Hou H, Chiba S, Yamanouchi K, Petrucelli L, Nishihara M, Hutton ML, McGowan E, Dickson D, Lewis J (2010) Accelerated lipofuscinosis and ubiquitination in granulin knockout mice suggests a role for progranulin in successful aging. *Am J Pathol* 177, 311-324. 査読有  
DOI:10.2353/ajpath.2010.090915

⑧ Matsuwaki T, Nishihara M, Sato T, Yoda T, Iwakura Y, Chida D (2010) Functional hypothalamic amenorrhea due to increased CRH tone in melanocortin receptor 2-deficient mice. *Endocrinology* 151, 5489-5496. 査読有  
DOI:10.1210/en.2010-0687

⑨ Yonezawa T, Mogi K, Li JY, Sako R, Manabe N, Yamanouchi K, Nishihara M (2010) Correlation between neuropeptide Y profile in the cerebrospinal fluid and growth hormone pulses in the peripheral circulation. *Neuroendocrinology* 91, 308-317. 査読有

DOI:10.1159/000279311

⑩ 根建拓、松脇貴志、朝倉麗、西原真杉 (2010) 認知症の発症にかかわる遺伝子：プログラニューリン. *老年精神医学雑誌* 21, 555-560. 査読無

⑪ Suzuki M, Lee H-C, Kayasuga Y, Chiba S, Nedachi T, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M (2009) Roles of progranulin in sexual differentiation of the developing brain and adult neurogenesis. *J Reprod Dev* 55, 351-355. 査読有  
DOI:10.1262/jrd.20249

⑫ Chiba S, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M (2009) Alteration in anxiety with relation to the volume of the locus ceruleus in progranulin-deficient mice. *J Reprod Dev* 55, 518-522. 査読有  
DOI:10.1262/jrd.20239

⑬ Dormann D, Capell A, Carlson AM, Shankaran SS, Rodde R, Neumann M, Kremmer E, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M, Haass C (2009) Proteolytic processing of tau DNA binding protein-43 by caspases produces C-terminal fragments with disease defining properties independent of progranulin. *J Neurochem* 110, 1082-1094. 査読有  
DOI:10.1111/j.1471-4159.2009.06211.x

⑭ 根建拓、河合隆徳、西原真杉 (2009) 成長因子プログラニューリンの機能と神経変性. *実験医学* 27, 1345-1349. 査読無

⑮ Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M (2008) The effect of glucocorticoids on bradykinesia induced by immobilization stress. *Horm Behav* 54, 41-46. 査読有  
DOI:10.1016/j.yhbeh.2008.01.005

⑯ 千葉秀一、西原真杉 (2008) ホルモンによる成体神経新生の制御. *Clin Neurosci* 26, 893-895. 査読無

[学会発表] (計22件)

① 田中良法、松脇貴志、山内啓太郎、西原真杉. プログラニューリンが外傷性脳傷害後のミクログリアの活性化と血管新生に与える影響. 第38回日本神経内分泌学会, 2011年11月25日, 東京.

② Nedachi T, Kawai T, Kojima H, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M. Roles of progranulin in differentiated and

undifferentiated neural cells. The 41st Annual Meeting of Society for Neuroscience, November 14, 2011, Washington DC, USA.

③ Tanaka Y, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M. Progranulin suppresses excessive activation of CD68-positive microglia following traumatic brain injury in mice. The 41st Annual Meeting of Society for Neuroscience, November 14, 2011, Washington DC, USA

④ 田中良法, 松脇貴志, 山内啓太郎, 西原真杉. プログラニューリンは外傷性脳傷害後の CD68 陽性ミクログリアの過剰な活性化を抑制する. 第 152 回日本獣医学会, 2011 年 9 月 20 日, 大阪.

⑤ Matsuwaki T, Asakura R, Yamanouchi K, Nishihara M. Progranulin mediates the effect of voluntary exercise on neurogenesis in the hippocampus. The 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, November 13, 2010, San Diego, CA, USA.

⑥ 松脇貴志, 朝倉麗, 山内啓太郎, 西原真杉. 成長因子プログラニューリンの脳内分布と海馬神経新生における役割. 第 37 回日本神経内分泌学会学術集会, 2010 年 10 月 22 日, 京都.

⑦ 小林晃, 松脇貴志, 山内啓太郎, 西原真杉. 運動学習における成長因子プログラニューリンの役割. 第 37 回日本神経内分泌学会, 2010 年 10 月 22 日, 京都.

⑧ 西原真杉. 脳の性分化と神経新生におけるプログラニューリンの役割. シンポジウム: 神経発生研究の現在と未来, 2010 年 10 月 1 日, 群馬.

⑨ 根建拓, 河合隆徳, 松脇貴志, 山内啓太郎, 西原真杉. 神経前駆細胞におけるプログラニューリンの生理作用の解析. 第 149 回日本獣医学会, 2010 年 3 月 26 日, 東京.

⑩ 朝倉麗, 松脇貴志, 山内啓太郎, 西原真杉. 走行運動により促進される神経新生におけるプログラニューリンの役割. 第 149 回日本獣医学会, 2010 年 3 月 26 日, 東京.

⑪ Nedachi T, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M. Potential role of progranulin in neural progenitor cells. 39th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, October 17, 2009, Chicago, IL, USA.

⑫ 小林晃, 松脇貴志, 山内啓太郎, 西原真杉. 協調運動制御におけるプログラニューリンの役割. 第 10 回行動神経内分泌研究会, 2009 年 7 月 18 日, 宮城.

⑬ 朝倉麗, 松脇貴志, 山内啓太郎, 西原真杉. 自発走行運動により促進される神経新生におけるプログラニューリンの役割. 第 10 回行動神経内分泌研究会, 2009 年 7 月 18 日, 宮城.

⑭ 板村理央, 松脇貴志, 山内啓太郎, 西原真杉. グラニューリンノックアウトマウス視床下部における遺伝子およびタンパク質の網羅的発現解析. 第 146 回日本獣医学会学術集会, 2008 年 9 月 25 日, 宮崎.

⑮ 松脇貴志, 坂内慎, 山内啓太郎, 西原真杉. 走行運動による海馬歯状回の神経新生促進におけるグラニューリンの役割. 第 146 回日本獣医学会, 2008 年 9 月 25 日, 宮崎.

[図書] (計 0 件)

[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://www.vm.a.u-tokyo.ac.jp/seiri/>

## 6. 研究組織

### (1) 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・教授  
研究者番号: 9 0 1 4 5 6 7 3

### (2) 研究分担者

該当無し

### (3) 連携研究者

山内 啓太郎 (YAMANOUCI KEITARO)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授  
研究者番号: 7 0 2 7 2 4 4 0  
松脇 貴志 (MATSUWAKI TAKASHI)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任助教  
研究者番号: 2 0 4 4 7 3 6 1  
高橋 伸一郎 (TAKAHASHI SHIN-ICHIRO)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准

教授  
研究者番号：00197146