

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06418

研究課題名(和文) セクレトグラニン の機能的多様性と疾患関連性の解析

研究課題名(英文) Analysis of functional diversity and disease relevance of secretogranin III

研究代表者

五味 浩司 (GOMI, Hiroshi)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：90293240

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：セクレトグラニン (Sg3) ジーントラップマウスのLacZレポーター遺伝子の発現解析を行い、既知ペプチドホルモン分泌細胞の他に、神経細胞および神経膠細胞、副腎髄質細胞での発現を認めた。グリオーマにおいて、グルタミン酸刺激による発現増強を確認した。イヌ副腎髄質細胞で小胞モノアミントランスポーター2との共発現を免疫組織化学的に検出したが、Sg2のパターンとは異なっており、共免疫沈降法とプルダウン法では分子相互作用は検出されなかった。イヌ褐色細胞腫では、Sg3の発現動態はクロモグラニンAと類似したが、Sg2とは異なっていた。得られた成果はSg3の分子特性の新たな理解と関連疾患の病態理解に貢献する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Sg3はペプチドホルモン産生細胞においてホルモン顆粒の形成に関与する分子として知られている。ニワトリ、マウス、イヌおよびウシといった動物種における個体レベルでの発現解析によってペプチドホルモン産生細胞以外の多様な細胞でSg3が発現し、神経膠細胞や副腎カテコラミン細胞での発現動態からSg3の機能的多様性が示唆された。また、Sg3の機能的類似分子として位置付けられるSg2との明確な差異が組織学レベルで明らかとなった。伴侶動物の腫瘍組織におけるグラニタンパク質の発現動態の解析は初めての報告であり、獣医学領域の神経内分泌疾患の病態病理の理解につながる知見である。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the expression of the LacZ reporter gene in secretogranin III (Sg3) gene-trap mice and found expression in neurons, glial cells, and adrenal medullary cells, in addition to known peptide hormone-secreting cells. In glioma cells, Sg3 expression was enhanced by glutamate stimulation. Co-expression with vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) was detected immunohistochemically in canine adrenal medullary cells, but the coexpression pattern was different from that of Sg2. There was no significant interaction between Sg3 and VMAT2 detected by co-immunoprecipitation and pull-down assay. In patient dogs with pheochromocytoma, Sg3 showed similar expression kinetics to chromogranin A, but different from Sg2. Our results contribute to a new understanding of the molecular characteristics of Sg3 and the pathogenesis of related diseases in veterinary fields.

研究分野：内分泌細胞学

キーワード：内分泌顆粒 色細胞腫 伴侶動物 セクレトグラニン3 セクレトグラニン2 副腎髄質 神経膠細胞 クロム親和性細胞 褐色細胞腫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

内分泌細胞における分泌顆粒の形成は、分泌刺激によってホルモンを適時適量で分泌するという調節性分泌経路の基礎をなす。例えば、ペプチドホルモン産生細胞では、粗面小胞体で分子量の大きい前駆体としてのプロホルモンが合成された後、ゴルジ装置、トランスゴルジネットワークを経て分泌顆粒に選別輸送・濃縮される。グラニタンパク質の1つであるセクレトグラニン (Sg3) は、下垂体や膵島などの内分泌細胞におけるペプチドホルモンの分泌顆粒への選別輸送に関わる分子である。申請者および共同研究者は、個体レベルで Sg3 の機能解析を進めてきた。最近、Sg3 が神経組織や副腎髄質において活性アミン分泌細胞やグリア細胞の機能と関わりがあることが分かった。本研究では、グリア系培養細胞や Sg3 ジェントラップマウス (Sg3-gtK0) 由来の神経・副腎組織および個体を用い、形態学的、分子生化学的並びに行動学的解析を行い、Sg3 の機能的多様性を明らかにする。これまで、ヒトでは Sg3 が腫瘍組織における有用なバイオマーカーとなりうるという報告や糖尿病性網膜症における疾患組織特有の血管新生因子として作用するという疾患との関連性を示す報告がなされているが、伴侶動物では健常組織あるいは疾患組織における Sg3 に関する知見の報告は皆無である。

2. 研究の目的

グラニンファミリータンパク質群における Sg3 の機能解析に関する報告は限られている。申請者と研究協力者のグループは遺伝学的手法をベースに、細胞・組織レベルから個体レベルまでの解析アプローチで研究を先導してきた。これまでに得た知見から Sg3 の多機能性が窺えたので、本研究ではその究明を目的とする。具体的には、神経・副腎組織における Sg3 の詳細な発現様式や遺伝子欠損効果による生理機能および病態生理の変化を解析することにより、これまで明らかにされていない Sg3 の新たな機能の解明に迫る。特に、活性アミンを産生・分泌する神経・内分泌細胞において、なぜ Sg3 が発現しているのか？さらに、損傷脳において、なぜ活性化アストロサイトでの発現が亢進するのか？について、細胞生物学的および病態生理学的に理解する。また、伴侶動物であるイヌにおいて、健常組織および内分泌腫瘍組織における Sg3 の発現特性を他のグラニタンパク質との関連性を踏まえて解析する。これらの解析から、従来のペプチドホルモン産生細胞における Sg3 機能に新たな機能を追加し、獣医学領域における関連疾患の病態理解にも結びつける。

3. 研究の方法

(1) 活性アミンを産生・分泌する神経・内分泌細胞における Sg3 発現の解析

副腎髄質において、免疫組織化学的に Sg3 の発現強度から強弱 2 タイプの細胞に分類できることを見出しているため、アドレナリンマーカーであるフェニルエタノールアミン-N-メチルトランスフェラーゼ (PNMT) を指標に、アドレナリン産生細胞とノルアドレナリン産生細胞での Sg3 発現タイプとの関連を明らかにする。また、クロマフィン顆粒の形成に関わる小胞モノアミントランスポーター (VMAT) とグラニン発現との関連性を解析する。さらに、ウシ副腎髄質組織を用い、グラニタンパク質間の相互作用について免疫共沈反応により生化学的に解析する。

(2) Sg3 発現細胞種の網羅的同定

Sg3-gtK0 に挿入されている Sg3 内在性プロモーター制御下で発現するレポーター遺伝子 LacZ の発現を x-gal 染色により組織化学的に明らかにし、全身各臓器で発現細胞種の同定を行う。中枢神経系においては、スライス標本の解析により発現領域を同定する。

(3) 神経グリア細胞における Sg3 の発現および機能解析

アストロサイトマーカー (グリア線維性酸性タンパク質、グルタミン合成酵素) の抗体を用い、脳および末梢神経における Sg3 発現グリア細胞を組織レベルで同定する。また Sg3-gtK0 の LacZ 発現を指標に、グリア細胞マーカーとの二重染色を行い、グリア細胞サブタイプを同定する。培養系でラットアストロサイト由来グリオーマ細胞株 (C6, RGC-6) を用い、各種刺激薬剤による活性化グリオシス誘導下で Sg3 の発現動態をタンパク質レベルで解析する。

(4) 新規作製した Sg3 モノクローナル抗体の性状解析とグラニタンパク質間の共発現解析

既に作製している新規モノクローナル抗体の免疫組織学的および生化学的反応性の解析を行い、その性状を明らかにする。その上で、従来用いてきたウサギ抗 Sg3 ポリクローナル抗体との併用による他のグラニタンパク質との共発現解析を行う。

(5) 副腎カテコールアミン産生細胞における Sg3 局在の電子顕微鏡レベルでの解析

Sg3-gtK0 副腎組織のエポキシ樹脂包埋した電顕標本を作成し、クロマフィン顆粒の微細構造や分布密度について、野生型対照群と比較解析する。また、親水性樹脂 LR-white に包埋した標本を

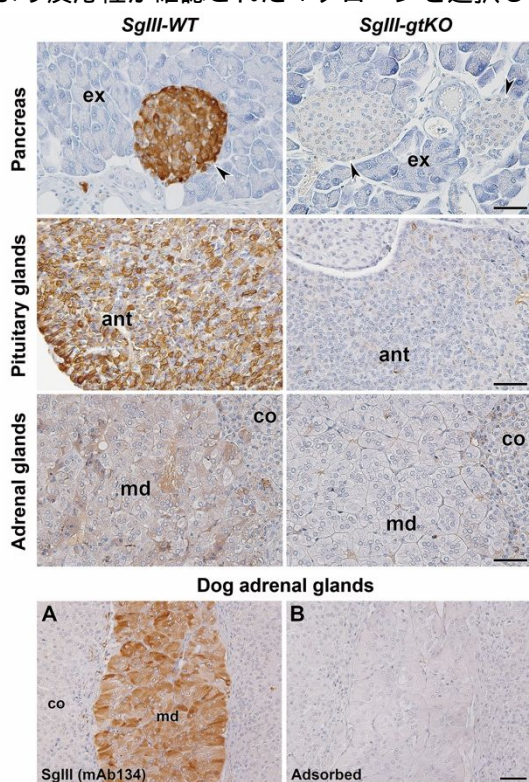
作成し、免疫電顕染色（ポストエンベディング法）により Sg3 の分布局在について解析する。さらに、Sg3-gtKO 細胞において、Sg3 以外のグラニンタンパク質（Chromogranin A; CgA, Chromogranin B; CgB, Sg2）や PNMT の局在についても解析する。

(6) 伴侶動物の内分泌組織における Sg3 の発現および病態解析

イヌの正常および内分泌腫瘍組織で Sg3 の発現変化を免疫組織化学的に解析し、疾患病態との関連性を明らかにする。本学動物病院にて副腎褐色細胞腫と診断され、外科的に摘出された病理組織標本について、グラニンタンパク質、細胞増殖マーカー、神経内分泌マーカー等の分子について免疫組織化学的解析を行い、内分泌腫瘍組織におけるグラニンタンパク質発現のプロファイリング、Sg3 発現と血中カテコールアミン濃度変化といった臨床所見との対応を明らかにする。

4. 研究成果

(1) Sg3 解析の新たなツールとなる新規モノクローナル抗体の性状解析については、最初の ELISA スクリーニングによりハイブリドーマ 288 個の混合クローンのうち 10 個を選択し、限界希釈培養や拡大培養により単クローンを確立した後、免疫組織化学染色のスクリーニングにより反応性が確認された 4 クローンを選択した。そのうちの 1 つである mAb134 は免疫組織化学

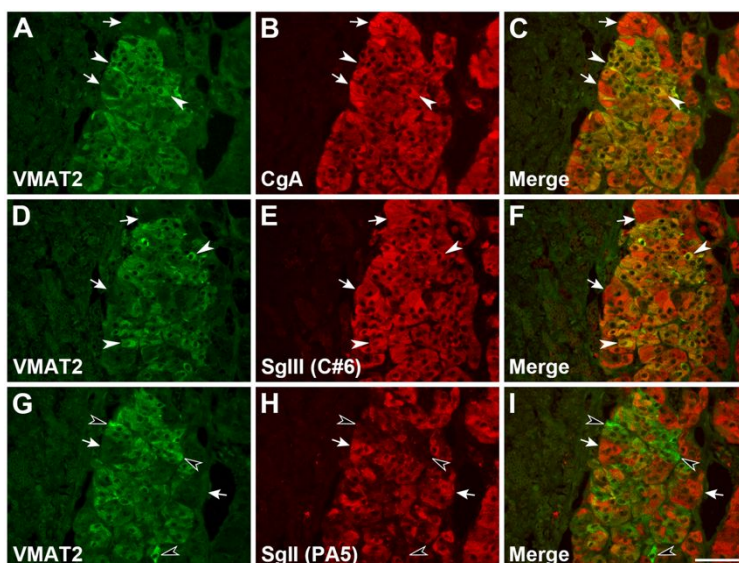


〔図1〕 新規Sg3モノクローナル抗体mAb134の反応性

的に野生型マウス(Sg3-WT)の細胞のみで反応し、Sg3-gtKO 細胞では反応を示さない良好な反応性を示した。この抗体はマウス、ラットおよびイヌの膵島、腺性下垂体および副腎においても交差反応性を示したことから、共発現解析といった組織学的二重染色に有用であることが分かった(図1)。

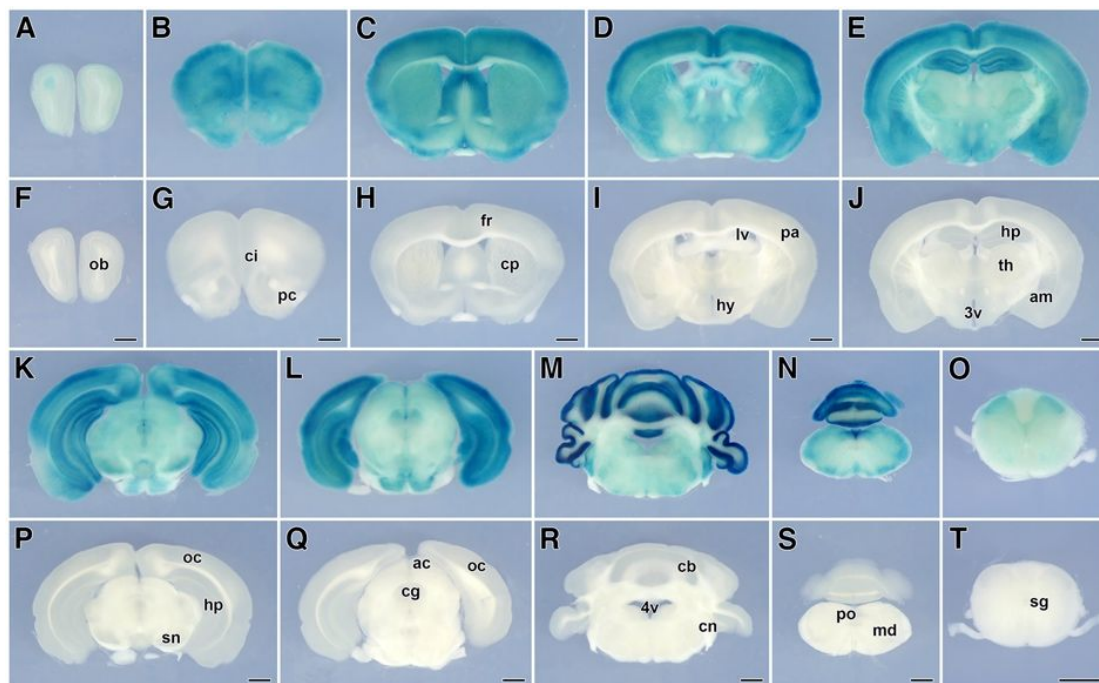
(2) 副腎髄質のカテコールアミン産生細胞における Sg3 発現の解析については、Sg3 発現がペプチドホルモン分泌細胞のホルモンの選別輸送に関わる以外に、何故アミン産生細胞で発現しているのかはよく分かっていなかったが、免疫組織化学的二重染色によって副腎髄質 VMAT と Sg3 または Sg2 との共発現パターンに差があることが見出されたので、VMAT と何らかの関連があると考えられた。特に図 2 に示すように、正常イヌ副腎髄質において、Sg3 と機能的相補性が推測されている Sg2 とは VMAT2 との共発現パターンが異なっており、分子間の相互作用が疑われた。そこで、試料の大量調整が可能なウシの副腎髄質を用いて Sg3-GST 融合タンパク質によるプルダウン法と免疫共沈法により生化学的な解析を行なったが、有意な結合は検出されなかつ

た。したがって、Sg3 は少なくとも活性アミン類を分泌顆粒内へ引き込む際に直接的に関わるというよりも、カテコールアミン産生細胞でも発現している CgA の選別輸送に関わっていると解釈することが合理的であると考えられた。また、Sg3 の発現強度には細胞ごとに強弱のばらつきがあったが、これがアドレナリンまたはノルアドレナリンの産生細胞間での差異と関連するののかという疑問に対して、PNMT との共発現を解析したが、特に偏在性は検出されなかった。



〔図2〕 CgAとSg3ではVMAT2との共発現パターンは同じであるが、Sg2では異なる(黒矢頭はSg2が発現していない細胞を示す)

(3) Sg3-gtK0 の神経系において、LacZ レポーター遺伝子の発現を指標に Sg3 発現細胞種の網羅的同定を行ったところ(図3)、ペプチドホルモン分泌細胞に加え、視床下部内分泌ニューロン、小脳の梨状細胞、ゴルジ細胞、バスケット細胞およびバグマンゲリア、大脳皮質錐体細胞、脳室上衣細胞などで発現を認めた。特に、海馬の星状膠細胞では強い発現を認め、星状膠細胞マーカータンパク質との共発現が確認された。末梢では、網膜ニューロン、視神経星状膠細胞、神



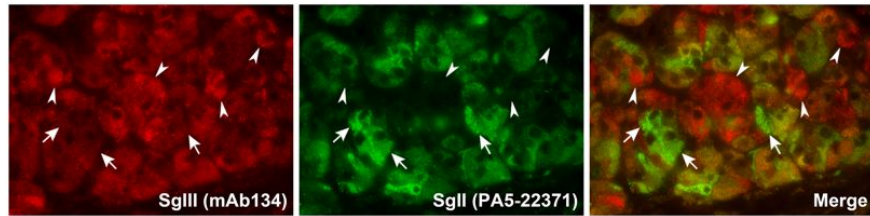
[図3] 嗅球(A, F)から頸髄(O, T)までのSg3-gtK0(青染)とSg3-WT(白染)の前脳断スライスのLacZ染色

経節ニューロンおよび視神経膠細胞での発現を認めた。培養グリオーマ2株(C6およびRGC-6、いずれもRIKEN BRCより供与を受けた)において、1-2 mM グルタミン酸刺激によるSg3発現の増加(1.5-2倍程度)が確認され、反応性グリオーシス誘導時にSg3の発現亢進が認められるという結果が確認され、星状膠細胞におけるSg3の機能的多様性が予測された。個体レベルでSg3-gtK0にカイニン酸腹腔内投与によるニューロンの過剰興奮と細胞死、反応性グリオーシス惹起後の病態反応について、海馬におけるLacZ遺伝子の発現変化を組織レベルでin vivo解析したが、発現の顕著な亢進像は見出されなかった。

(4) 電子顕微鏡レベルでの副腎カテコールアミン産生細胞におけるSg3局在の解析については、Sg3-gtK0と対照マウス間で分泌顆粒の微細構造や分布密度について解析したが、Sg3欠損による顕著な変化は認められなかった。今後、カテコールアミン産生細胞種の違いにおける分泌顆粒形態、顆粒密度、ホルモン凝集像の差異などについて細かく定量解析する必要があると考えている。また、免疫電顕解析においては、Sg3-gtK0と対照マウスから親水性樹脂に包埋した標本を作成し、粒径の異なる金コロイド標識二次抗体を用いた免疫染色を行い、Sg3およびPNMTが分泌顆粒上に局在することが観察できた。今後、Sg3以外のグラニタンパク質(CgA, CgB, Sg2)やVMATの分布局在についても解析を進める予定である。また、同法を用いた神経細胞や神経膠細胞におけるSg3の標識は成功していないが、これはSg3の発現量がペプチドホルモン産生細胞やカテコールアミン産生細胞と比べてかなり低いことに関連すると考えており、固定法やプレエンベディング法などを含め、さらなる検討が必要である。

(5) イヌの副腎髄質におけるSg3とSg2の発現様式の違いについて、ビーグル犬の正常組織と内分泌腫瘍である副腎褐色細胞腫の病理組織について解析した。Sg3とSg2の検出には、それぞれに対するモノクローナル(Sg3; mAb134, Sg2; 9G3/3)およびポリクローナル(Sg3; C#6, Sg2; PA5-22371)抗体をインターディジェレートに組み合わせて解析した。ペプチドホルモン産生細胞では、Sg3とSg2の両分子は分泌顆粒形成において相補的な作用を有することが推測されてきたが、カテコールアミン産生細胞では両分子の発現細胞は完全に一致せず、副腎髄質における両グラニタンパク質の差異が初めて明らかとなった(図4)。一方、褐色細胞腫組織では、正常組織のような規制的な発現パターンが失われており、全体として発現量の減弱が認められた。臨床病態としての血中カテコールアミン濃度により高低2群に分けた群間(高値群; HCL: n=3, 低値

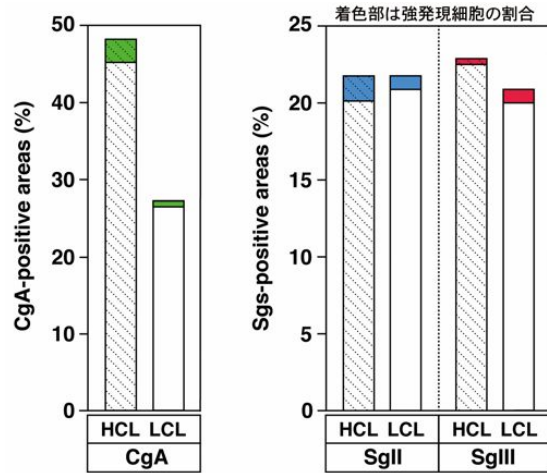
群; LCL: n=2)において、両タンパク質の発現動態を解析したところ、Sg3とSg2の変化は似たような挙動を示さず、Sg3は相互作用タンパク質である



[図4] イヌ副腎髄質におけるSg3発現細胞(矢頭)とSg2発現細胞(矢印)は完全には一致しない

CgAと似た挙動を示したが、Sg2ではそのような傾向は認められず、褐色細胞腫におけるSg3とSg2の発現制御が異なっていることが明らかとなった(図5)。また、細胞増殖マーカー(PCNA)陽性率と血中カテコールアミン濃度の高低との間には正の相関は認められなかった。

(6) Sg3-gtK0の副腎髄質において、免疫組織化学的にPNMT、CgA、Sg2およびVMATの発現解析を行なった。対照群Sg3-WTとの比較において、これらのうち、Sg2の染色強度の低下が認められた。そこで、免疫プロット解析により発現量を調べたところ、Sg3-gtK0ではおよそ30%の有意な低下が検出された。これまでペプチドホルモン産生細胞では、Sg3欠失によって、Sg2の発現が増加することが分かっていたが、副腎カテコールアミン産生細胞ではこれとは逆の現象が起きており、今後、Sg3とSg2の発現細胞種の差異や両分子の相補性などと関連付けてその意義について明らかにする必要がある。



[図5] 褐色細胞腫の血中カテコールアミン高値群(HCL)と低値群(LCL)におけるグラニタンパク質発現動態

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Hiroshi Gomi, Airi Hinata, Tadashi Yasui, Seiji Torii, Masahiro Hosaka. | 4. 巻 69 |
| 2. 論文標題 Expression pattern of the LacZ reporter in secretogranin III gene-trapped mice. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Histochemistry & Cytochemistry | 6. 最初と最後の頁 229-243 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1369/0022155421996845 | 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 Tadashi Yasui, Kenya Miyata, Chie Nakatsuka, Azuma Tsukise, Hiroshi Gomi. | 4. 巻 65 |
| 2. 論文標題 Morphological and histochemical characterization of the secretory epithelium in the canine lacrimal gland. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 European Journal of Histochemistry | 6. 最初と最後の頁 298-308 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4081/ejh.2021.3320 | 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 Hiroshi Gomi, Takahiro Nagumo, Kazushi Asano, Makoto Konos, Tadashi Yasui, Seiji Torii, Masahiro Hosaka. | 4. 巻 70 |
| 2. 論文標題 Differential Expression of Secretogranins II and III in Canine Adrenal Chromaffin Cells and Pheochromocytomas. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Histochemistry & Cytochemistry | 6. 最初と最後の頁 335-356 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1369/00221554221091000 | 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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 五味浩司, 安井禎, 日當愛梨, 鳥居征司, 穂坂正博 |
| 2. 発表標題 Secretogranin ジェントラップマウスにおけるLacZ遺伝子発現パターンの解析 |
| 3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 安井禎, 宮田健也, 中塚千枝, 高橋直紀, 五味浩司 |
| 2. 発表標題 イヌ涙腺上皮の形態ならびに組織化学的解析 |
| 3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 高橋直紀, 安井禎, 五味浩司 |
| 2. 発表標題 フリーソフトを用いた腎小体の3次元構築の試み |
| 3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 五味浩司, 植田弘美, 中島崇行, 尼崎肇, 吉岡一機, 渡邊敬文, 小澤秋沙, 細谷実里奈, 安井禎, 杉山真言, 坂上元栄 | 4. 発行年 2022年 |
| 2. 出版社 学窓社 | 5. 総ページ数 225 |
| 3. 書名 獣医組織学実習マニュアル(第2版) | |

〔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 |
|-------|--|--|----|
| 研究協力者 | 穂坂 正博 (HOSAKA Masahiro) (80311603) | 秋田県立大学・生物資源科学部・教授 (21401) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 |
|-------|--|--|----|
| 研究協力者 | 鳥居 征司 (TORII Seiji) (40312904) | 群馬大学・食健康科学教育研究センター・教授 (12301) | |

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 |
|---------|---------|
| | |