

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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658090

研究課題名（和文）プログラニューリン遺伝子欠損神経細胞を用いた神経保護作用の解析

研究課題名（英文）Analysis of neuroprotective actions using progranulin-deficient neurons

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）：本研究においてはプログラニューリン遺伝子欠損神経細胞の脆弱性を利用し、神経保護作用のアッセイ系を構築するとともにその機構を解析することを目的とした。プログラニューリン遺伝子欠損マウスから分離した初代培養細胞、および siRNA を導入してプログラニューリンの発現を抑制したヒト由来株化神経細胞の SH-SY5Y 細胞を用いたアッセイ系を構築し、グルタミン酸興奮毒性下でのプログラニューリンの細胞死抑制作用を解析した。その結果、プログラニューリンは両細胞に対してともに神経保護作用を示すこと、またその作用は神経前駆細胞と分化後の成熟神経細胞で異なることが明らかとなった。プログラニューリンは種を越えて普遍的な神経保護機能を持つ成長因子であることが明らかになるとともに、細胞の分化段階により作用が異なることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We have found that neurons deficient of progranulin (PGRN), a multifunctional growth factor, are vulnerable to excitotoxicity of glutamate. In the present study, we established the assay system for analyzing neuroprotective actions using cultured neuronal cells derived from PGRN-deficient mice as well as human SH-SY5Y cells whose PGRN was reduced by siRNA. By means of these assay systems, we found that PGRN exerted neuroprotective actions on both cells, but the actions differed between neural progenitor cells and mature neurons, suggesting that PGRN plays a role in protecting neurons from excitotoxicity regardless of species, though its actions may vary depending on the stages of differentiation of neuronal cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	0	1,600,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	420,000	3,420,000

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、プログラニューリン、神経細胞、神経前駆細胞、神経変性、細胞死、興奮性アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

我々は従来、性ステロイドの中枢作用機構に関する研究を展開してきたが、その過程で脳の性分化を誘導する分子として成長因子の一種であるプログラニューリン (progranulin; PGRN) を同定した (Suzuki et al., 1998)。PGRN は新生期のラットやマウスの視床下部において性ステロイド依存性に転写が促進され、雄型行動を発現する神経回路の構築に関与している (Suzuki & Nishihara, 2002)。さらに近年、PGRN が成熟動物の脳における神経新生に関わる因子であることを見出すとともに (Chiba et al., 2007)、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した (Kayasuga et al., 2007, Chiba et al., 2009, Suzuki et al., 2009)。一方、近年、PGRN 遺伝子の変異がヒトの認知症で神経変性疾患の一種である前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration) の原因となることが報告され (Baker et al., 2006; Cruts et al., 2006)、PGRN が神経変性を抑制するなどの神経保護作用をもつことが示唆されている。

我々は最近 PGRN KO マウス由来の培養神経細胞は野生型マウス由来の細胞よりもグルタミン酸の興奮性神経毒性による細胞死が高率に起こり、この細胞死は培養液への PGRN の添加で抑制されることを見出した。また、野生型マウス由来の神経細胞は培養液中に高濃度の PGRN を分泌していることが明らかとなり、このことがグルタミン酸に対する抵抗性を付与している可能性が考えられた。これらのことは、PGRN 遺伝子欠損神経細胞は、インビトロにおいて各種の刺激に対して脆弱であることを示唆している。

2. 研究の目的

上記のような背景から、我々は PGRN 欠損神経細胞は神経障害や細胞死を誘導するような物質に対して感受性が高く、神経毒性物質等の細胞障害性から神経細胞を保護する機構を解析する優れたアッセイ系として用いることができるのではないかと着想した。そこで、本研究においては PGRN 欠損神経細胞を用いて、神経保護作用を評価するインビトロのアッセイ系を構築するとともに、その機構を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究においては、神経保護作用のインビトロアッセイ系に用いる細胞として、PGRN KO マウス由来の神経前駆細胞および初代培養

大脳皮質ニューロンを用いた。神経前駆細胞は自己複製能と、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの3系統の細胞へ分化する多分化能を有する細胞であり、胎子のみならず成熟動物の海馬歯状回や側脳室下層にも存在することが知られている。また、胎子由来の初代培養大脳皮質ニューロンは神経毒性等の評価に汎用される細胞であり、本研究においては神経前駆細胞とともに用いた。さらに、マウス由来初代培養細胞でみられた PGRN の神経保護作用のメカニズムの解明とヒトの疾患への応用を考えて、ヒト由来の神経系株化細胞である SH-SY5Y 細胞を用い、siRNA を導入して PGRN の発現を抑制することにより神経保護作用のアッセイ系の確立を試みた。SH-SY5Y 細胞はレチノイン酸により分化が誘導されるが、未分化状態と分化状態の細胞の両者をモデルとして実験に使用した。本研究では初代培養細胞と SH-SY5Y 細胞における PGRN の神経保護作用について、分化の程度の違いも考慮しながら検討した。これらの細胞の培養下における生存や細胞死についてはラクトースデヒドロゲナーゼ (LDH) の培地放出量、増殖についてはブromoデオキシウリジン (BrdU) の取り込みを指標とし、興奮性アミノ酸 (グルタミン酸) 等の神経細胞毒性を評価するとともに、それらの毒性作用に対する神経保護作用について解析を行った。さらに、幾つかのシグナル分子のリン酸化について解析し、PGRN の作用発現に関わる細胞内情報伝達機構についても検討した。

4. 研究成果

マウス由来初代培養細胞を用いた研究より PGRN が神経前駆細胞の増殖を促進すること、基底状態での細胞死を抑制すること、大脳皮質ニューロンにおいてグルタミン酸毒性による細胞死を抑制する効果を示すことが明らかになった。すなわち、野生型マウスおよび PGRN KO マウスの胎子由来の初代培養大脳皮質ニューロンを用いてグルタミン酸の興奮性毒性による細胞死を比較したところ、基底状態では両者に差は見られなかったが、グルタミン酸処置により PGRN KO マウスでは野生型マウスよりも有意に高い細胞死の割合が見られた。これらの細胞に PGRN を添加したところ、PGRN KO マウスでのみグルタミン酸による細胞死が抑制され、内因性 PGRN の欠損が外来性の PGRN によって補われることにより細胞死が抑制されることが示唆された。次に、神経前駆細胞において同様に細胞死を比較したところ、基底状態において既に野生型マウスに比べ PGRN KO マウスで高い細胞死が見られた。さらにグルタミン酸

存在下においても野生型マウスよりも PGRN KO マウスで高い細胞死が観察され、両遺伝子型間においてグルタミン酸の興奮性毒性に対する感受性が異なることが示唆された。しかし、この差は 24 時間の PGRN 処置によっては消失しなかった。これらのことから、短期的な PGRN 作用では回復できない、長期的な作用で生じる細胞状態の変化がグルタミン酸の興奮性毒性に対する抵抗性を付与している可能性が考えられた。なお、今回の実験ではいずれの細胞種においてもエストロゲンの細胞死抑制作用は観察されなかった。また、PGRN の放出量は神経前駆細胞の方が大脳皮質ニューロンより多いことが明らかになった。以上のように、PGRN の神経保護作用は神経前駆細胞においては基底状態のみで認められ、大脳皮質ニューロンにおいてはグルタミン酸毒性に対してのみ認められた。神経系の細胞に対するこのような PGRN の神経保護作用のメカニズムの解明は、神経変性疾患の病態発現機構への理解を深めることに繋がると考えられる。

初代培養細胞を用いたアッセイ系において、PGRN の保護作用は神経前駆細胞と成熟神経細胞で異なっていることが明らかになったため、次にヒト由来の株化神経細胞である SH-SY5Y 細胞を用いて、未分化型およびレチノイン酸添加による分化型 SH-SY5Y 細胞のそれぞれについて、基底状態およびグルタミン酸興奮性毒性下での PGRN の細胞死抑制作用を検討した。その結果、未分化型細胞では siRNA 導入により PGRN の発現を抑制した場合、基底状態での細胞死率が増加したが、グルタミン酸に対する応答性には変化は見られなかった。一方、レチノイン酸添加後の分化型細胞では未分化型細胞で見られたようなグルタミン酸による細胞死率の増加は観察されなかった。SH-SY5Y 細胞では分化に伴い PGRN の発現量が有意に増加していたことから、この増加した PGRN がグルタミン酸からの保護作用に関与することが考えられた。また、PGRN は多様な糖鎖修飾を受けることや、断片化されてグラニューリンペプチドとなることから、PGRN の機能獲得には分子修飾が関わる可能性も考えられた。さらに、培養神経前駆細胞を用いて PGRN の細胞内情報伝達機構について解析したところ、PGRN により GSK3 β のリン酸化が起こっていることが明らかとなった。GSK3 β はリン酸化により不活性化することから、PGRN は GSK3 β の不活性化を介して作用が発現していることが考えられた。

以上、本研究により、PGRN は神経前駆細胞と未分化型 SH-SY5Y 細胞において基底状態において神経保護作用を持つことが示された。一方、分化による PGRN の発現動態はマウス由来初代培養細胞と SH-SY5Y 細胞では異なっ

ていた。SH-SY5Y 細胞は分化によりグルタミン酸抵抗性を獲得したことから、分化によって増加する PGRN は細胞死抑制効果を持つ可能性が考えられた。生体において神経系の細胞が障害を受けた場合、神経前駆細胞の増殖が活性化し、増殖した細胞が分化することで欠損部分を補償することが想定されている。本研究により、増殖、分化、細胞死抑制という異なる 3 つの現象に、いずれも PGRN が関与する共通の分子メカニズムが存在する可能性が考えられ、さらにその作用の少なくとも一部は GSK3 β のリン酸化を介して発現することが示唆された。これらの分子メカニズムの解明をさらに進めることにより、脳虚血等に際してのグルタミン酸の興奮性毒性による神経障害や、異常蛋白質の蓄積による神経変性疾患等の機構解明や病態の回復に貢献できるものと考えられる。

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 6 件)

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

② 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

③ 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

④ 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

⑤ 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

⑥ 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

[学会発表] (計7件)

① 小嶋春佳、根建拓、山内啓太郎、西原真杉。培養神経細胞を用いたプログラニューリンの神経保護作用の解析。第153回日本獣医学会学術集会。2012年3月27日、大宮。

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 Hosokawa M, Arai T, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Matsuwaki T, Nishihara M, Hasegawa M, Akiyama H. Progranulin reduction affects tau phosphorylation in P301L tau transgenic mice. Society for Neuroscience, 41th annual meeting, 2011, November 14, Washington DC, USA.

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 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。

[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：90145673

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し