

第7回プログラニューリン研究会

プログラム

日程 2025年5月24日(土)

会場 お茶の水女子大学 国際交流留学生プラザ

共催 お茶の水女子大学ヒューマンライフサイエンス研究所

プログラム概要

2025年5月24日(土)

13:00 ~	受付開始
14:00 ~ 14:05	開会挨拶
14:05 ~ 14:55	発表 1 1-1~1-3 座長：細川 雅人 (福岡大学薬学部)
15:15 ~ 16:05	発表 2 2-1~2-3 座長：大津 航 (岐阜薬科大学バイオメディカルリサーチ寄附講座)
16:25 ~ 17:25	発表 3 3-1~3-3 座長：松脇 貴志 (東京大学獣医生理学教室)
17:25 ~ 17:35	挨拶・写真撮影

※ 13:20 より世話人会を行います。世話人の先生方は 13:15 までに受付をお済ませください。

プログラム

2025年5月24日(土)

14:00～14:05 開会挨拶 橋本 恵 (お茶の水女子大学)

14:05～14:55 発表1 座長：細川 雅人 (福岡大学薬学部)

14:05～14:25

1-1 前頭側頭型変性症モデルマウスにおける肝自己免疫疾患発症メカニズムの解明

○田中千晴¹, 坂井志穂¹, 後藤真里^{2,3}, 宮本泰則^{1,3}, 橋本恵³

¹お茶の水女子大学院人間文化創成科学研究科ライフサイエンス専攻, ²帝京大学医療技術学部, ³お茶の水女子大学ヒューマンライフサイエンス研究所

14:25～14:40

1-2 酸化ストレス依存的なプログラニューリン発現増加が細胞外小胞に与える影響

○葛西柚月¹, 田辺岳海¹, 陳礼民¹, 水木徹², 根建拓¹

¹東洋大学大学院生命科学研究科, ²東洋大学バイオ・ナノエレクトロニクス研究センター

14:40～14:55

1-3 老齢プログラニューリン欠損マウスにおける血液脳関門の組織学的評価

○小迫有桂¹, 田中良法¹

岡山理科大学 獣医学科 生化学講座

14:55～15:15 休憩

15:15～16:05 発表2 座長：大津 航 (岐阜薬科大学バイオメディカルリサーチ寄附講座)

15:15～15:35

2-1 CDK4/6 阻害薬 abemaciclib が誘導する細胞死と運動した空胞形成のメカニズムの解析

○日野浩嗣¹, 田中良法², 沖本智哉¹, 池田俊勝¹, 原知世¹, 水上乃愛³, 竹谷浩介², 高野直治³, 平本正樹³, 相澤信¹, 宮澤啓介³, 江藤真澄², 平井宗一¹

¹日大・医・生体構造医学, ²岡山理大・獣医・生化学, ³東京医大・生化学

15:35～15:50

2-2 液-液相分離破綻因子である C9orf72 遺伝子由来ジペプチドリピートの新しい毒性作用機序の探索

○Shin Minsoo^{1,2}, 戸井基道^{1,2}, 新海陽一¹

¹産業技術総合研究所, ²筑波大学

15:50～16:05

2-3 未成熟終止コドン細胞モデルを用いた前頭側頭型変性症の治療薬探索

○江頭陽, 浦野綾, 古賀結可里, 盛田友里絵, 西中川拓也, 石橋大輔, 細川雅人

16:05～16:25 休憩

16:25～17:25 発表3 座長：松脇 貴志 (東京大学獣医生理学教室)

16:25～16:45

3-1 アベマシクリブはプログラニューリン産生低下によって生じるオートファジーの破綻に抑制的に作用する

○田中良法¹, 菊池美咲¹, 日野浩嗣²

¹岡山理科大学獣医学科生化学講座, ²日大医 生体構造医学

16:45～17:05

3-2 環状ホスファチジン酸誘導体を用いた前頭側頭型認知症への治療効果

○山本菜未¹, 後藤真里^{2,3}, 宮本泰則^{1,3}, 橋本恵³

¹お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科ライフサイエンス専攻, ²帝京大学医療技術学部, ³お茶の水女子大学ヒューマンライフサイエンス研究所

17:05～17:25

3-3 マウス視細胞の外節輸送におけるプログラニューリンの役割

○大津航¹, 大林茉由奈¹, 角崎英志¹, 嶋澤雅光^{1,2}

¹岐阜薬科大バイオメディカルリサーチ寄附講座, ²岐阜薬科大生体機能解析学薬効解析学

17:25～17:35 閉会挨拶・写真撮影 橋本 恵 (お茶の水女子大学)

お知らせ

参加者の皆さまへ

会場：お茶の水女子大学 国際交流留学生プラザ 2F

日時：2025年5月24日(土) 14:00 -17:35 (受付 13:00 から)

1. 受付にて、参加費のお支払いを済ませ、参加証とプログラムをお受け取りください。
2. クロークスペースはございますが、貴重品は各自で管理をお願いいたします。
3. Free Wifi はございません。ご了承ください。
4. 会場内での撮影や録音はお断りいたします。

発表者の皆さまへ

一般演題発表時間は、1人15分(発表12分+質疑応答3分)または20分(発表15分+質疑応答5分)です。

スムーズな進行のため、発表のひとつ前の演題時に次演者席にご移動をお願いいたします。

発表終了1分前に1度、終了時に2度ベルが鳴ります。質疑応答終了時に3度ベルが鳴ります。時間厳守にご協力をお願いいたします。

【発表データ受付】

1. 口演のスライドは日本語でも英語でも構いません。
2. 発表するデータはUSBメモリにてご持参ください。発表用のファイル名は「所属_氏名」にしてください
3. 会場で使用するパソコンのOSおよびアプリケーションはWindows 11 / PowerPoint 365です。
4. スライドサイズはワイド画面(16:9)を推奨いたします。
5. 発表セッションの開始前までに会場PCに発表データを読み込んでください。データ移行に時間がかかる場合があります。時間に余裕を持ってデータ移行を行なってください。
6. 発表中のPC操作は発表者ご自身で行なってください。

会場へのアクセス

◎JR 池袋駅から

- ・東京メトロ丸ノ内線 新宿・荻窪方面行「茗荷谷」駅下車 徒歩7分
- ・都営バス 「春日駅（一ツ橋）」行「大塚2丁目」停留所下車 徒歩1分
- ・東京メトロ有楽町線「護国寺」駅下車 徒歩10分 *護国寺からは上り坂です。茗荷谷をお薦めします。

◎JR 東京駅 又は JR 御茶ノ水駅から

- ・東京メトロ丸ノ内線 池袋方面行「茗荷谷」駅下車 徒歩7分

◎JR 大塚駅から

- ・都営バス「JR 錦糸町駅」行「大塚2丁目」停留所下車 徒歩1分

◎会場案内

お茶の水女子大学 国際交流留学生プラザ 2階（正門ではなく、正門右脇の入り口からご来場ください）
2階受付・会場へは、1階カフェのフロア内の階段またはカフェ裏手にあるエレベータをご利用ください。
注）南門は閉じておりますので、正門脇までお越しください。



抄録

発表 1-1

前頭側頭型変性症モデルマウスにおける肝自己免疫疾患発症メカニズムの解明

○田中千晴 1、坂井志穂 1、後藤真里 2,3、宮本泰則 1,3、橋本恵 3

1. お茶の水女子大学院人間文化創成科学研究科ライフサイエンス専攻、2. 帝京大学医療技術学部 3. お茶の水女子大学ヒューマンライフサイエンス研究所

[目的]

前頭側頭型変性症(FTLD)はアルツハイマー病に次いで患者数の多い若年性認知症であり、プログラニン遺伝子(タンパク質名:PGRN、遺伝子名:GRN)の変異が発症原因の1つである。FTLD患者は全身性自己免疫疾患を併発することが報告されているが、その要因は判明していない。これまで、FTLDは神経変性疾患と捉えられてきたため、PGRNの末梢器官の役割に着目した研究は少ない。しかし、2つの疾患の併発機構を解明するには、GRN変異が末梢器官に与える影響についても解析の必要がある。PGRNは脂質酸化代謝への関与が知られているため、本研究では脂質代謝の主要器官である肝臓に着目し、FTLDモデル *Gm*^{-/-}マウスを用いて、PGRNが肝臓の免疫を制御するメカニズムを解明することを目的とした。

[方法]

Gm^{-/-}マウスは、7ヶ月齢から神経変性が起こり、12ヶ月齢でFTLDを完全に発症する。そこで、FTLD発症前後にわたる4,7,11,16ヶ月齢の *Gm*^{-/-}マウスと野生型マウスの肝臓を摘出し、年齢依存的な肝臓の炎症レベルを解析した。

[結果]

Gm^{-/-}マウスの肝臓ではFTLD発症開始と同時期の7ヶ月齢から肝常在性マクロファージ・クッパー細胞が年齢依存的に増加していることが明らかとなった。また、免疫活性因子である補体C1、C3、C5のmRNA発現量も増加していた。さらに、肝障害は慢性的な脂質蓄積から誘発されるため、*Gm*^{-/-}肝臓の脂質蓄積レベルを解析したところ、クッパー細胞増殖前の4ヶ月齢から年齢依存的に脂質蓄積が進行しており、そのほとんどがクッパー細胞に局在していた。また、この脂質は免疫活性を誘発する役割を持つ、グルコシルセラミドであると同定された。

[考察]

本研究から、*Gm*^{-/-}マウスの肝臓では4ヶ月齢からクッパー細胞へのグルコシルセラミド蓄積が進行し、神経変性開始と同時期の7ヶ月齢からクッパー細胞が活性化されることが明らかになった。PGRN欠損はグルコシルセラミドの蓄積量を制御することで、クッパー細胞の活性化を調節し、肝臓の過剰な免疫活性を誘発することが推測される。

発表 1-2

酸化ストレス依存的なプログラニューリン発現増加が細胞外小胞に与える影響

○葛西柚月¹、田辺岳海¹、陳礼民¹、水木徹²、根建拓¹

1 東洋大学大学院生命科学研究科

2 東洋大学バイオ・ナノエレクトロニクス研究センター

[目的]

神経成長因子として知られるプログラニューリン (progranulin; PGRN) は、酸化ストレスに応答してその発現が増加し、酸化ストレスによって誘導される細胞死を抑制する作用を有することが明らかとなっている。今回、酸化ストレス依存的に発現が増加する PGRN の生理的役割をより深く解明することを目的とし、細胞外小胞 (extracellular vesicles; EVs) に着目した研究成果について報告したい。

[方法]

マウス海馬由来神経細胞株 HT22 細胞に酸化ストレスを誘導し、PGRN のタンパク質発現を解析した。HT22 細胞由来 EVs は超遠心法を用いて精製し、動的光散乱法にて EVs の放出量を測定した。また、酸化ストレスによる EVs の内包タンパク質の変化は、二次元電気泳動および MALDI/TOFMS 解析を用いた。

[結果および考察]

HT22 細胞に酸化ストレスを誘導すると、PGRN 発現量および HT22 細胞由来 EVs の放出量がいずれも増加することが確認され、両者の間に相関が認められた。一方、HT22 細胞に組み換え PGRN を HT22 細胞に添加した結果、EVs 放出量の変化は認められなかった。このことから、外来性 PGRN と内因性 PGRN では生理的機能が異なる可能性が示唆された。次に、酸化ストレスを負荷した EVs を HT22 細胞に処理した結果、コントロール由来の EVs 処理と比較して、細胞内の PGRN 発現量が増加することが明らかとなった。このことは、酸化ストレスが負荷された EVs を HT22 細胞が取り込むことで PGRN の発現を誘導し、EVs の放出が促進されるというフィードフォワード型の細胞保護機構が存在する可能性を示している。また、酸化ストレス負荷により EVs 内タンパク質プロファイルに変化が生じていたため、質量分析を行った結果、内在性レトロウイルスであるマウス白血病ウイルスの Gag (MLV-Gag) の減少が明らかとなった。さらに、酸化ストレスにより HT22 細胞内 MLV-Gag が減少し、この現象に PGRN が関与していることが示唆された。これまでの研究から、内在性レトロウイルスの活性化が異常タンパク質の凝集を促すことが分かっている。したがって、酸化ストレスによって発現が増加した PGRN が内在性レトロウイルスの量を調節することにより、神経変性疾患の進行を遅延させる可能性が考えられる。

発表 1-3

老齢プログラニューリン欠損マウスにおける血液脳関門の組織学的評価

○小迫有桂、田中良法

岡山理科大学 獣医学科 生化学講座

[目的]

プログラニューリン(PGRN)遺伝子のハプロ不全による PGRN 産生低下によって核タンパク質 TDP-43 の細胞質内蓄積を特徴とする前頭側頭葉変性症(FTLD-GRN)が生じる。FTLD-GRN ではグリオースシスや血液脳関門の機能低下が生じることも報告されているが、これらの病理形成が生じるメカニズムは明らかとなっていない。TDP-43 病理、グリオースシス、血液脳関門の機能低下は相互作用によって疾患の進行を促進することが示唆されている。本研究では、血液脳関門の組織学的評価から、FTLD-GRN の病理形成メカニズムにアプローチした。

[方法]

老齢マウスとして 16 ヶ月齢以上の野生型 (WT) および PGRN フレームシフト変異型 (FS) マウスを使用し、大脳皮質 (S1BF) の組織学的評価および生化学的評価を行った。免疫染色により、毛細血管、アストロサイト、ミクログリアを評価した。イムノブロットにより、TDP-43 およびタイトジャンクション形成タンパク質を評価した。

[結果・考察]

大脳皮質における毛細血管 ($\sim 10 \mu\text{m}$) 密度、毛細血管長、毛細血管分岐数に遺伝子型間の差は認められなかったが、FS マウスでは WT マウスと比較して微小な径の毛細血管(直径: $1.43\text{-}2.86 \mu\text{m}$)が有意に減少し、中間から大きめの径の毛細血管 (直径: $4.29\text{-}5.71 \mu\text{m}$, $7.14\text{-}8.57 \mu\text{m}$) が有意に増加した。アストロサイトマーカー S100 β 陽性細胞数は遺伝子型間に有意な差は認められなかったが、S100 β 免疫反応性は FS マウスで有意に低下していた。一方で、反応性アストロサイトマーカー GFAP 免疫反応性は、FS マウスで有意に増加していた。ミクログリアマーカー Iba1 陽性細胞数は FS マウスでわずかに増加していたが、免疫反応性は遺伝子型間で有意な差は認められなかった。FS マウスでは WT マウスと比較して毛細血管に局在する GFAP 陽性細胞や Iba1 陽性細胞数が有意に増加していた。イムノブロット解析では、FS マウスの大脳皮質における occludin 発現量が有意に増加し、TDP-43 の発現量が減少する傾向が認められた。

老齢の FS マウスでは血液脳関門の機能低下を発端とする病理形成を示唆する表現型が認められた。

発表 2-1

CDK4/6 阻害薬 abemaciclib が誘導する細胞死と連動した空胞形成のメカニズムの解析

○日野浩嗣¹⁾、田中良法²⁾、沖本智哉¹⁾、池田俊勝¹⁾、原知世¹⁾、水上乃愛³⁾、竹谷浩介²⁾、高野直治³⁾、平本正樹³⁾、相澤信¹⁾、宮澤啓介³⁾、江藤真澄²⁾、平井宗一¹⁾

1) 日大・医・生体構造医学、2) 岡山理大・獣医・生化学、3) 東京医大・生化学

[目的]

細胞周期において、CDK4/6 は G1/S 期移行を制御しており、遺伝子変異等による持続的な CDK4/6 の活性化は細胞のがん化を誘導する原因となることが知られている。最近、3 種類の CDK4/6 阻害薬 (abemaciclib, ribociclib, palbociclib) が開発され、すでに乳がん治療への臨床応用も行われている。しかしながら、これら阻害薬の抗がん作用の分子メカニズムについては、細胞周期抑制効果のみに依存するのかも含め、不明な点が多く残されている。本研究では、CDK4/6 阻害薬の抗がん作用の詳細な機序の解明を目指した。

[方法]

肺癌細胞株 A549 および子宮頸癌細胞株 HeLa について、主に abemaciclib による細胞死誘導機序の検討を行った。各種細胞死阻害薬等を用いたレスキュー実験により細胞死の様式を検討した。また、abemaciclib 作用時に特徴的に認められた細胞質内巨大空胞について、オートファジーとの関連を蛍光標識タンパク質発現細胞を用いた経時的観察等により検討した。加えて、abemaciclib による空胞形成が阻害される条件 (プログラニュリンのノックダウン、栄養飢餓等) を見だし、空胞形成と細胞死との関連について検討した。さらに、空胞がリソソームに由来することに着目し、abemaciclib 存在下で免疫沈降法によりリソソーム画分を回収し、含有タンパク質の解析を行った。

[結果]

培養がん細胞株に対して、これらの CDK 阻害薬は細胞周期抑制作用のみならず、直接的な細胞死誘導効果も示した。特に、abemaciclib 作用時には、リソソームに由来する多数の大きな特異的空胞が細胞質に形成された。Abemaciclib による細胞死は、アポトーシスやネクロトーシスといった典型的細胞死の阻害剤ではレスキューされなかったが、V-ATPase 阻害薬である bafilomycin A₁ や飢餓条件、プログラニュリンのノックダウンにより、abemaciclib による空胞形成と細胞死の両方が抑制された。また、局在分子の検討から、この空胞はオートファゴソームとは異なるものの、オートリソソームの特徴を持ち、リソソームに由来することが示唆された。この空胞を含む、リソソーム画分の解析からも上記特徴が裏付けられ、関連するタンパク質の同定を目指して質量分析計による解析を進めている。

[考察]

abemaciclib に誘導される空胞はオートファゴソームにリソソームが過剰に融合した物である可能性が示唆され、形成にプログラニュリンの関与が示唆された。また、空胞形成が細胞死と連動していることが強く示唆される結果が得られた。

発表 2-2

液-液相分離破綻因子である *C9orf72* 遺伝子由来ジペプチドリピートの新しい毒性作用機序の探索

○Shin Minsoo^{1,2}、戸井基道^{1,2}、新海陽一¹

1.産業技術総合研究所、2.筑波大学

[目的]

家族性の前頭側頭葉変性症(FTLD)や筋萎縮性側索硬化症(Amyotrophic Lateral Sclerosis: ALS)において *C9orf72* 遺伝子内の GGGGCC 配列の繰り返し変異が最も頻度の高い原因遺伝子変異として知られている。この繰り返し配列から生じるジペプチドリピート(DPR)は神経変性を引き起こす原因の一つであると考えられている。近年、生体分子による液-液相分離は正常な細胞機能の発現に極めて重要であり、その破綻が ALS を含む神経変性疾患の引き金として着目されている。これまでの我々の線虫 *C. elegans* を用いた解析から、DPR が相分離シャペロンの機能阻害によって神経機能異常を引き起こすことを明らかにしてきた。インスリン抵抗性もまた神経変性疾患の制御因子として知られているが、そのメカニズムについては未解明な点が多く残されている。そこで、我々の DPR 発現線虫株を用いて、神経変性を引き起こす直接的な因子である DPR がインスリン抵抗性とどのようにクロストークするのかを明らかにすることを目的として解析を行った。

[方法]

我々は、運動ニューロンを含む GABA 作動性ニューロンにおいて DPR または hTDP-43(G348C)を発現する線虫株を作製した。また、インスリン抵抗性との関連を調べるためには、インスリン受容体の機能低下変異を有する DR1572[*daf-2(e1368)*]株を使用した。体長測定や行動測定、寿命測定には生育ステージを揃えた成虫期の線虫を用いた。RNA-seq には成虫期第一日の線虫を約 1800 匹使用し、野生型線虫株、*daf-2*変異株、DPR 発現野生型線虫株、DPR 発現 *daf-2*変異線虫株について実施した。

[結果]

GABA 作動性ニューロンにおける DPR または hTDP-43(G348C)の発現は野生型に比べて体長の減少に加えて、運動機能の低下を引き起こした。*daf-2*変異体では野生型に比べて約 50%の寿命延長がみられるものの、DPR または hTDP-43(G348C)の発現によってその延長効果がキャンセルされた。その一方で、メトホルミン投与による寿命延長に対しては、DPR 発現は影響を及ぼさなかったことから、DPR がインスリン経路に対して特異的に作用することが示唆された。この DPR 発現の作用を明らかにするために、RNA-seq による解析を進めたところ、DPR 発現によって様々な経路における遺伝子発現変動が観察された。

[考察]

我々の発見は、DPR 発現が線虫において神経細胞機能不全を引き起こし、TDP-43 毒性とは部分的に類似した表現型を示すが、寿命への影響からは異なる作用機序を有することが示唆された。今回使用した線虫株において DPR または TDP-43(G348C)の発現は GABA 作動性ニューロンに限局されるため、

寿命のコントロールに神経機能が関与し、神経系と多組織間のクロストークが DPR や TDP-43(G348C)発現によって阻害されることを示唆している。また、RNA-seq トランスクリプトーム解析からは、DPR 毒性が相分離シャペロン以外の作用点として、蛋白質ホメオスタシスの障害を引き起こすことによって、相加的に ALS/FTD 神経変性疾患に共通して観察される TDP-43 病態に寄与する可能性を支持するものである。

発表 2-3

未成熟終止コドン細胞モデルを用いた前頭側頭型変性症の治療薬探索

○江頭 陽、浦野 綾、古賀 結可里、盛田 友里絵、西中川 拓也、石橋 大輔、細川 雅人
福岡大学 薬学部 免疫・分子治療学研究室

[目的]

前頭側頭葉変性症 (FTLD) は、若年性認知症の中でアルツハイマー型認知症に次いで頻度の高い神経変性疾患である。この疾患は、成長因子の一種であるグラニューリンの変異により、タンパク質であるプログラニューリン発現量の半減が発症の原因とされている。グラニューリン変異の約 40%では、正常な終止コドンよりも上流に未成熟終止コドン(Premature Termination Codon, PTC) が発生する。この PTC を読み飛ばし、完全長タンパク質の合成を進める化合物が Translational readthrough-inducing drugs (TRIDs) である。したがって TRIDs によって PTC が読み飛ばされ、少量でもプログラニューリンタンパク質の合成を進めることができれば FTLD の治療につながると考えられる。そこで本研究では、FTLD の新規治療薬探索のための細胞モデル作製し、新規治療薬探索を目的とした。

[方法]

DsRed-stop-GFP/Piggy Bac のプラスミドを作製し、Transposase とともに SH-SY5Y 細胞株へトランスフェクションした。Puromycin によるセレクション後、限界希釈法によってクローニングを行い、細胞株を樹立した。この細胞は TRIDs 添加時には終止コドンが読み飛ばされる為、緑の蛍光を発するようになる。その細胞を 24 well プレートに $2.0 \times 10^4 / 500 \mu\text{l/well}$ となるように播種し、24 時間インキュベーターで培養後、ネガティブコントロールとして新規治療薬候補薬剤の溶媒である Dimethyl sulfoxide (DMSO)、ポジティブコントロールとして Amlexanox、新規治療薬候補をそれぞれ最終濃度が $10 \mu\text{M/well}$ となるように添加した。インキュベーターで 4 日間培養後に medium を交換し、再度 DMSO、Amlexanox、新規治療薬候補をそれぞれ $10 \mu\text{M/well}$ で添加し、さらに 3 日間インキュベーターで培養後、フローサイトメトリー解析を行った。薬剤添加群と DMSO の蛍光強度を比較し、薬剤添加により GFP 発現が増加したものをリードスルー活性陽性とした。さらに、それらの薬剤の二次スクリーニングを行い、マン=ホイットニーの U 検定により統計学的有意差の有無を検証した。

[結果]

既存の TRIDs 添加後に行ったフローサイトメトリー解析では、3 日後に GFP の発現が増加していることが分かった。これは添加した TRIDs の作用により終始コドンが読み飛ばされ、GFP が発現したことを示している。この細胞を用いて 100 種の薬剤のスクリーニングを行った結果、Amlexanox よりも GFP 発現が増加した薬剤は 12 種類あった。この 12 種類の薬剤を一次スクリーニングと同じ条件で各 3 well に増やし、二次スクリーニングを行った結果、4 種類の薬剤で GFP の蛍光強度が Amlexanox の値より大きく統計学的に有意差が認められた。

[考察]

二次スクリーニングで陽性であった4種類の薬剤は、リードスルー活性が既存のTRIDsより強く、FTLDの新規治療薬となる可能性があることが明らかとなった。これらの薬剤はFTLDに限らず、PTCが現れる他の遺伝性疾患の治療薬となり得ると考えられた。また、4種類の薬剤の内、6-B-02は細胞数の大幅な減少が確認されたため、本実験の濃度での使用は適切ではないと考えられた。今後、詳細な解析を行う予定である。

発表 3-1

アベマシクリブはプログラニューリン産生低下によって生じるオートファジーの破綻に抑制的に作用する

○田中良法¹、菊池美咲¹、日野浩嗣²

¹岡山理科大学 獣医学科 生化学講座、²日大医 生体構造医学

[目的]

プログラニューリン (PGRN) の産生低下によって生じる神経変性疾患の治療法開発に向けて、PGRN の補充療法が進められている。しかし、過剰な PGRN は神経変性を促進することがあるため、失われた PGRN 機能を回復する治療法の開発が求められている。オートファジーは、不要な細胞内成分を包み込んだオートファゴソームがリソソームと融合し、オートリソソームを形成して内容物を分解する機構であり、神経変性を抑制する働きがある。近年、PGRN がオートファジーを制御する可能性が示唆されているが、統一された見解は得られていない。本研究では、オートファジー制御における PGRN の役割を明らかにするとともに、我々が見出したオートファジー促進薬物 abemaciclib (Abe) が、PGRN 産生低下により引き起こされるオートファジー異常を改善できるかを検討した。

[方法]

マウス神経芽細胞腫 Neuro-2a 細胞を使用した。オメガソーム形成は GFP-ATG13 の集積により評価し、オートリソソーム形成は DALGreen の発光シグナルを用いて評価した。さらに、LAMP1-GFP および mCherry-LC3 の共発現細胞を用いて、オートファゴソームおよびオートリソソーム形成を評価した。外来性 PGRN として PGRN-myc を、易凝集性 TDP-43 として GFP-TDP-43 (アミノ酸 162-414) を発現させた。16 ヶ月齢以降の野生型 (WT) 及び PGRN フレームシフト変異 (FS) マウスに隔週で 9 回 Abe を経口投与後、10 週目に灌流固定を行った。凍結切片を作製し、視床 (VPM/VPL) の組織学的評価を行った。

[結果・考察]

PGRN 産生が低下した細胞では、オートファジーの抑制および易凝集性 TDP-43 の病的なリン酸化の亢進が認められた。これらの表現型は、外来性 PGRN の発現や Abe の添加によって抑制された。FS マウスでは、ミクログリアにおけるオートファゴソームマーカー LC3 の蓄積が認められたが、Abe の投与によりオートリソソーム形成が促進され、LC3 の蓄積が抑制された。また、Abe はミクログリアの形態変化にも影響を与えた。

以上より、Abe は PGRN 産生低下によって抑制されたオートファジーを回復することで、病理形成を抑制する可能性が示唆された。

発表 3-2

環状ホスファチジン酸誘導体を用いた前頭側頭型認知症への治療効果

○山本菜未¹, 後藤真里², 宮本泰則^{1,3}, 橋本恵³

1. お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科ライフサイエンス専攻
2. 帝京大学医療技術学部
3. お茶の水女子大学ヒューマンライフサイエンス研究所

[目的]

前頭側頭型認知症(FTD)は、アルツハイマー型認知症に次いで患者数の多い若年性認知症である。FTDの原因遺伝子の一つにプログラニューリン(タンパク質名: PGRN、遺伝子名: GRN)がある。GRN変異型FTD(FTD-GRN)は、ミクログリアが異常増殖し補体を過剰分泌することで神経細胞死を誘発するという特徴から、FTD治療にはミクログリア異常活性の抑制が重要視されるべき点である。そこで我々は、FTD治療薬候補としてミクログリア異常活性を抑制する作用を有する環状ホスファチジン酸誘導体・2-カルバ環状ホスファチジン酸(2ccPA)に着目し、FTD-GRNにおけるミクログリア異常活性に対する2ccPAの効果を解明することを本研究の目的とした。

[結果・方法]

2ccPAは腹腔内投与後速やかに脳実質へ輸送されることから、*in vivo*への応用が容易である。そこで、*Grn*^{-/-}マウスを用いて2ccPAの薬理試験を行った。FTD発症が始まる6ヶ月齢*Grn*^{-/-}マウスに対し、6ヶ月間2ccPAの腹腔内投与を行った。この*Grn*^{-/-}マウス視床におけるミクログリア異常増殖や活性化ミクログリアに特徴的な形態変化は、2ccPA投与により抑制された。またTDP-43の細胞質蓄積はFTDの特徴のひとつであるが、*Grn*^{-/-}マウス視床における神経細胞質内TDP-43局在や神経細胞死に関しても2ccPA投与により抑制・軽減されていた。次に、2ccPAが直接ミクログリアに作用するのを確認するため、リポ多糖(LPS)により活性化させた*Grn*^{-/-}初代培養ミクログリアに2ccPAを添加し、RNA-seq解析を行った結果、2ccPA添加によりサイトカイン産生や食食、脂質輸送といった炎症に関連する遺伝子発現が抑制されていた。そこでこれらを調べたところ、LPS添加により活性化した*Grn*^{-/-}ミクログリアに特徴的な過剰なサイトカイン産生や食食能の亢進、脂質蓄積、βガラクトシダーゼの増加が2ccPA添加により有意に抑制された。以上のことから2ccPAは*Grn*^{-/-}ミクログリア異常活性を軽減する働きを有することが示された。

[考察]

2ccPAは過剰なサイトカイン産生や食食能の亢進、脂質蓄積、細胞老化を軽減することで*Grn*^{-/-}ミクログリア異常活性を抑制し、神経細胞内のTDP-43細胞質蓄積および神経細胞死を軽減することが示唆された。

発表 3-3

マウス視細胞の外節輸送におけるプログラニューリンの役割

○大津 航¹、大林 茉由奈¹、角崎 英志¹、嶋澤 雅光^{1,2}

1 岐阜薬科大・バイオメディカルリサーチ寄附講座

2 岐阜薬科大・生体機能解析学・薬効解析学

[目的] プログラニューリン (PGRN) のホモ接合変異により神経セロイドリポフスチン症の成人型 CLN11 が発症するが、その症状のひとつに視力障害が知られている。さらに成体 *Grn* 欠損マウスにおいても視細胞の密集する外顆粒層の菲薄化が認められているが、視細胞変性に至る分子メカニズムについては明らかになっていない。視細胞特異的テトラスパニンであるペリフェリン-2 (peripherin-2/*rds*, PRPH2) は、光受容の場である外節の形成・維持と視細胞の生存に不可欠な膜タンパク質であるが、近年になって PRPH2 が後期エンドソームやリソソームに局在し、その外節への輸送にエンドソーム経路が関わるということが報告された。本研究では、PRPH2 や代表的なテトラスパニンである CD63 の細胞内局在における PGRN の役割について検証した。

[方法] ヒト *GRN*、*PRPH2*、*CD63* 遺伝子やマウス *Grn* 遺伝子に対する shRNA は、pCAG-IRES-GFP を背景とするベクターにサブクローニングし、目的に応じて付加タンパク質を組み換えて実験に使用した。これらのプラスミド DNA の培養細胞への遺伝子導入には Neon NxT システムを用いた。マウス網膜への遺伝子導入は既報 (Otsu *et al.*, 2019, *J. Neurosci.*) に基づいて、岐阜薬科大学の動物実験委員会の承認の後に実施した。マウス網膜は免疫蛍光染色の後に、共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV3000 により画像を取得した。

[結果] mCherry タグ付加 PGRN はマウス網膜由来細胞株 661W 細胞において LysoTracker で染色されるリソソームに局在した。マウス網膜にて発現させた PGRN は錐体および桿体細胞においてリソソームマーカーである Lamp1 と局在を共にした。続いて PGRN に対する shRNA 発現プラスミドを用い 661W 細胞において PGRN の発現を抑制したところ、同時に発現させた PRPH2 や CD63 の酸性オルガネラへの局在が低下した。マウス網膜において PGRN の発現抑制したところ、錐体細胞において外節が菲薄化し、内節が膨化する像が観察された。加えて、対照群では錐体細胞の外節に局在していた CD63 は PGRN 発現抑制により内節で小胞様の分布を示し、PRPH2 においても似たような局在異常を示した。

[考察] PGRN と PRPH2 はともに視細胞の Lamp1 陽性顆粒に存在し、PGRN の発現抑制が PRPH2 の局在異常を引き起こした。PRPH2 の外節輸送に PGRN が重要な役割を果たすことが示唆された。