

原著論文

表題；脳虚血に対する成長因子プログラニュリンの
神経保護メカニズムの検討

著者；鳥谷部真史

新潟大学医歯学総合研究科分子細胞医学専攻

分子情報医学講座神経内科学分野専攻

(主任：小野寺 理教授)

所属；新潟大学脳研究所神経内科 (Department of
Neurology, Brain Research Institute, Niigata
University, Japan)

Neuroprotective mechanism of growth factor
progranulin against ischemic neuronal cell injury

Masafumi Toriyabe

Niigata University Graduate School of Medicine and
Dental Science/

Course for Molecular and Cellular Medicine/

Molecular Neuroscience and Brain Disease/ Neurology

(Director: Prof. Osamu Onodera)

別刷請求先：〒951-8585 新潟市中央区旭町通 1-757

新潟大学脳研究所神経内科学教室 鳥谷部真史

Reprint requests to: Masafumi Toriyabe

Department of Neurology, Brain Research Institute

Niigata University,

1-757 Asahimachi-dori, Chuoku, Niigata 951 - 8585

Japan

抄録；

【序文】プログラニュリン（PGRN）は神経栄養活性を有する成長因子である。PGRN 遺伝子変異は、核蛋白 TAR DNA 結合蛋白-43（TDP-43）が神経細胞内に蓄積する前頭側頭型変性症を引き起こすことが知られている。脳虚血に関しても、ラット血栓塞栓モデルにて、血栓溶解薬組織プラスミノゲンアクティベーター（t-PA）と組み替え PGRN 蛋白の併用投与は、脳梗塞体積の減少、出血量の減少をもたらし、PGRN が神経細胞を含む多面的な脳保護作用を有することが明らかになった。しかし PGRN による神経細胞保護作用の機序と、TDP-43 への影響については十分には明らかにされていない。今回、PGRN が TDP-43 の限定分解および細胞質内異常局在を抑制することで、虚血性神経細胞障害に対し保護作用を示すという仮説を立て、検証を行った。

【材料と方法】PGRN ノックアウトマウスと、野生型マウスの一過性脳虚血モデルにおいて、虚血 24 時間後の TDP-43 の細胞内局在を免疫染色にて比較した。次にラット血栓塞栓モデルにて、虚血 4 時間

後に，血栓溶解薬（t-PA）と組み換えマウス PGRN ないし対照蛋白（IgG）の静注を行い，虚血 24 時間後に免疫ブロットにて活性型カスパーゼ - 3，全長型および切断された TDP-43 の発現の比較を行った．さらに種の異なる，組み換えヒト PGRN 投与による脳梗塞抑制効果について，ラット血栓塞栓モデルを用いて検討を行った．

【結果】PGRN ノックアウトマウスでは，野生型と比較して，虚血後の TDP-43 の細胞質異常局在を認める神経細胞の頻度が多かった（ $P < 0.001$ ）．また血栓塞栓モデルでは，PGRN 投与群は対照群と比して，全長型 TDP-43 の虚血後の減少は抑制され（ $P < 0.05$ ），さらに活性型カスパーゼ - 3 発現が抑制された（ $P < 0.05$ ）．ラット血栓塞栓モデルにおいて，ヒト組み換え PGRN 投与は，対照群と比較して，脳梗塞体積を縮小した（ $P < 0.05$ ）．

【考察】脳虚血に対する PGRN の神経細胞保護作用の機序としては，カスパーゼ - 3 活性化を抑制し，全長型 TDP-43 の限定分解および TDP-43 の異常細胞質内局在を抑制し，TDP-43 の機能を保つことが関与

する可能性が示唆された。

キーワード（5語程度）；脳虚血，神経細胞保護，プロ
グラニューリン，TAR DNA 結合蛋白-43（TDP-43），
カスパーゼ3

序文；

脳血管障害は国内の死亡原因の 9.0%，第 4 位を占める疾患であり（厚生労働省の平成 26 年人口動態統計（確定数）の概況より），要介護の原因疾患の 21.7%，第 1 位を占め，脳梗塞後に救命できたとしても，高度の後遺障害が生じる．そのため，脳梗塞に対する有効な治療法を見出すことが急務となっている．脳梗塞急性期の治療薬として国際的に使用されているのは，血栓溶解薬（組織プラスミノゲン・アクチベーター：t-PA）のみである．しかしながら治療可能時間である 4.5 時間を超えて t-PA を投与すると，遅延した血流再開に伴い，神経細胞障害，血管破綻，炎症が生じ，かえって予後が悪化することが知られている．そのため t-PA 治療の適応となる脳梗塞患者数は全脳梗塞症例のうち 5% 未満と非常に少ない¹⁾．t-PA 治療の恩恵を受ける症例を増やすために，複数の保護作用を有する薬剤の開発が喫緊の課題である．

我々は，人の血栓性脳梗塞に類似したラット血栓塞栓モデルにて，腫瘍増生，血管新生，組織修復，

抗炎症に関わる多面的な成長因子であるプログラニユリン (PGRN)²⁾³⁾⁴⁾が神経細胞保護作用を含む多面的な脳保護作用を有することを報告した⁵⁾. PGRNは, 神経栄養活性を有し, 神経細胞死を抑制するとされていた⁶⁾⁷⁾. 我々は, これに加えて, 虚血時の脳保護作用の機序として, 第一に, 血管内皮増殖因子を介して血管透過性を調節していること, 第二に抗炎症性サイトカインであるインターロイキン 10 を介して炎症を抑制すること, 第三に *in vitro* では核蛋白 TAR DNA 結合蛋白-43 (TDP-43)の細胞質内異常局在を抑制することでの神経細胞保護効果を有することを示した.

PGRNとTDP-43の関連については, PGRN遺伝子変異によりTDP-43の細胞質内蓄積と, 限定分解を伴う, 前頭側頭型変性症 (FTLD)が生じ⁸⁾⁹⁾, このTDP-43の変化が神経細胞死と深く関与すると考えられている. この限定分解には, カスパーゼ-3やカルシウム依存性システインプロテアーゼであるカルパインで切断される可能性が報告される可能性が指摘されている¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾¹³⁾.

我々は、ラットにて、脳虚血により TDP-43 の限定分解および細胞質内異常局在が生じることを示した¹⁴⁾。さらに、PGRN が *in vitro* では低酸素低糖刺激による神経細胞の核蛋白 TDP-43 の細胞質内異常局在を抑制することを示した。しかし、PGRN が *in vivo* で核蛋白 TDP-43 の細胞質内異常局在や限定分解に影響を与えるかどうかは検討されていなかった。私は、PGRN の神経細胞保護作用は、PGRN がカスパーゼ - 3 もしくはカルパインを抑制し TDP-43 の限定分解および細胞質内異常局在を抑制することによるとする仮説を立て、検証を行った。

材料と方法；

本研究は、新潟大学動物実験倫理委員会の承認を受け、新潟大学動物実験指針および ARRIVE(Animal Research: Reporting *In vivo* Experiments) ガイドラインに従って実施した。

1. 動物実験モデル

1 - 1. 一過性局所脳虚血モデル

体重 22~28g の野生型マウス (C57/BL6J) および *PGRN* ノックアウトマウスを使用した¹⁵⁾。ハロセン 1.5% , 酸素 30% , 笑気 70% の混合気吸入で麻酔維持し , 手術を実施した。手術中 , 体温は直腸温で $37.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ に維持した。手術用顕微鏡の直視下に前頸部を正中切開後 , 左総頸動脈・外頸動脈・内頸動脈を露出し , 外頸動脈を結紮し , 断端を切断した。その後 , 外頸動脈断端を切開し , ここより左外頸動脈から左内頸動脈にナイロン糸 (EED ナイロン , 直径 0.074 mm) を挿入し , 中大脳動脈を閉塞した。90 分後に引き抜き , 血流の再開通を行った¹⁶⁾。

1 - 2 . 血栓塞栓モデル

脳梗塞作成は , 自家血栓で中大脳動脈を閉塞する Okubo らのモデル¹⁷⁾を使用した。体重 250-300g の雄性 Sprague-Dawley ラットを用いて , ハロセン 1.5% , 酸素 30% , 笑気 70% の混合気吸入で麻酔維持し , 手術を実施した。手術中 , 体温は直腸温で $37.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ に維持した。手術用顕微鏡の直視下に前頸部を正中切開後 , 左総頸動脈・外頸動脈・内頸動

脈を露出し，外頸動脈を結紮し，断端を切断した．その後，外頸動脈断端を切開し，ここより左外頸動脈から左内頸動脈にカテーテルを挿入し，血栓を注入して中大脳動脈を閉塞した．血栓はラット自家血 200 μ l にトロンビン 50 μ l を混合し，直径 0.35 mm のポリエチレンチューブカテーテル（PE-50，ベクトン・ディティンソン）に注入し，4 $^{\circ}$ C で 24～48 時間保存し作成した．作成した血栓は長さ 1 mm に切断し，1 匹あたり 15 個を 0.1% ウシ血清アルブミン含有のリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に浮遊させ，30 秒程度で中大脳動脈に注入した．

血栓注入の 4 時間後に，t-PA（10 mg/kg，田辺三菱製薬）を静注して，再灌流を行った．ラット右鼠径静脈にカテーテルを挿入し，t-PA の全投与量の 10% をボーラス投与した後，引き続き残り 90% を 30 分かけて投与した．このモデルでは，脳梗塞 1 時間後での t-PA による再灌流に比して，脳梗塞 4 時間後での再灌流による血液脳関門の破綻に伴い，出血量が有意に増加することが明らかとなっている⁵⁾．また，t-PA 静注の直前に組み換え PGRN を投与した．

免疫染色および免疫ブロットによる比較には組み換えマウス PGRN (AdipoGen, AG-40A-0080) 100 μ g を静注し, 脳梗塞体積の比較には組み換えヒト PGRN (AdipoGen, AG-40A-0068Y) 50 μ g を静注した. コントロールとしてラビット抗 IgG 抗体 (R5G10-048, OEM Concepts, Toms River, NJ, USA) 100 μ g を大腿静脈から静注した.

2. 脳血流測定

脳血流は, 脳梗塞術前にラット頭蓋骨を露出し, Bregma から 5 mm 後方, 5 mm 外側に直径 2mm のバーホールを作成し, 手術開始前と脳虚血導入 30 分後に, レーザードップラー血流計 (AFL21, 株式会社アドバンス) を用いて測定した. 脳虚血後の血流が, 虚血前血流と比較して 50% 未満となった個体を実験に使用した.

3. 免疫染色

一過性局所脳虚血モデルマウスを, 脳虚血 24 時間後にハロセン過剰投与で安楽死させた後, 4°C に

冷却した生理食塩水で経心臓的に灌流した。次に 4℃ に冷却した 4% パラフォルムアルデヒドで灌流した。灌流した脳を取り出し、4% パラフォルムアルデヒドと 20% スクロースの混合液中に一晩固定した。メタノール処理後、パラフィンに包埋した。4 μ m 厚にて切り出し、脱パラフィン後、10 mM クエン酸ナトリウム緩衝液に浸してオートクレーブ（121℃、10 分間）による抗原賦活を行った。その後、1% ウシ胎児血清にて 30 分間ブロッキングし、TDP-43 の C 末端を認識するラビットポリクローナル抗 TDP-43 抗体（Proteintech, 10782-2-AP, 2000 倍希釈）およびマウスモノクローナル抗 MAP2 抗体（Sigma-Aldrich, M9942, 250 倍希釈）を用いて、4℃ で一晩反応させ、その後、Alexa Flour 488 抗ラビット IgG 抗体（1000 倍希釈）および Alexa Flour 594 抗マウス IgG 抗体（1000 倍希釈）で染色した。観察には共焦点レーザー顕微鏡（LSM510 META; Carl Zeiss）を用い、抗 MAP2 抗体の染色性のある虚血領域において、630 倍の強拡大にて 1 サンプルにつき重複しない 7 視野を観察した¹⁴⁾。

4. 免疫ブロット

血栓塞栓モデルラットを，血栓注入の 24 時間後にハロセン過剰投与で安楽死させた後，4℃生理食塩水で経心臓的に灌流処置を行い，脳を取り出した．採取後の大脳皮質サンプルは既報¹⁸⁾に従い，採取した脳組織に，重量の 7 倍量の 1% Triton X-100 を含む細胞溶解バッファー（Cell Signaling Tech）を加えて，ホモジナイズし，10 分間 14,000 rpm で遠心処理した．試料に 2-メルカプトエタノールを加えて煮沸し，Tris-glycine SDS-PAGE にて電気泳動した．その後，PVDF 膜に転写し，5%スキムミルクと 0.1% Tween-20 でブロッキングした¹⁸⁾．一次抗体は C 末端を認識するラビットポリクローナル抗 TDP-43 抗体（Proteintech, 10782-2-AP, 2000 倍希釈），ラビットポリクローナル抗活性化型カスパーゼ - 3 抗体（Santa Cruz, sc-22171-R），マウスモノクローナル抗カルパイン 1 抗体（Thermofisher Scientific, 2H2A7C2, 500 倍希釈），マウスモノクローナル抗カルパイン 2 抗体（Thermofisher Scientific, 107-82,

500 倍希釈) を用いて, 4°C で一晚反応させた. PBS で洗浄後, horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ラビット 2 次抗体を室温で 1 時間反応させ, Chemiluminescent HRP 基質 (Millipore) にて目的とする蛋白バンドを ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare, Life Sciences) で撮影した. 内部コントロールとして β アクチンを使用し, ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) ソフトを用いて β アクチンに対する蛋白バンドの発現強度を半定量した.

5. 脳梗塞体積の評価

脳虚血後 24 時間の時点で高濃度ハロセン吸入を行い, 深麻酔下で経心臓的に 4°C 生理食塩水を用いて灌流後, 脳を摘出した. 3 mm 厚で脳をスライスし, 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride solution (#264310; BD, Franklin Lakes) を溶解した生理食塩水で非梗塞部位を染色した. 染色後, スキャナー (CanoScanner, Canon 製) で撮影し, Swanson らの方法¹⁹⁾に従い, ImageJ を用いて脳梗塞体積を測定し,

大脳半球に占める割合で検討した。以上の操作は実験者と評価者の間で盲検法にて実施した。

6. 統計学的処理

すべてのデータは平均±標準誤差で表記し，2群間の比較にはt検定を用い，3群間以上の比較には分散分析を用いた。その後，ボンフェローニのポストホック解析を行った。統計学的処理にはSPSS (ver.21;SPSS Inc.)を用いた。P値が0.05未満のものを統計学的有意とした。

結果；

1. **PGRN** ノックマウスでは，虚血後，**TDP-43** の核内減少と細胞質内異常局在が生じる。

PGRN の有無により，脳虚血後の核蛋白 **TDP-43** の細胞内局在に変化が生じるかを検証するため，野生型マウスと **PGRN** ノックアウトマウスを用いて，一過性局所脳虚血モデルを作成した。そして虚血 24 時間後の大脳皮質に対して，**TDP-43** の C 末端を認識する抗 **TDP-43** 抗体および抗 **MAP2** 抗体にて二重

染色を行った。野生型マウスでは、虚血前には核蛋白 TDP-43 の染色性は核に限局し、細胞質には染色性を認めなかった。虚血後、野生型マウスでは核蛋白 TDP-43 の染色性はほぼ核内に保たれていた。一方、*PGRN* ノックアウトマウスでは、虚血前には TDP-43 は核内に限局し、細胞質には染色性を認めなかった。虚血後に TDP-43 の核内における染色性は減弱していた。さらに神経細胞質を染色する MAP2 に重なり合う TDP-43 の染色が認められた(図 1A)。TDP-43 の細胞質内異常局在の頻度を比較すると、虚血後の *PGRN* ノックアウトマウスで増加していた(野生型 : *PGRN* ノックアウト = 7.8 ± 2.5 : 32.8 ± 4.9 (%), $p < 0.001$, 図 1B)。

2. *PGRN* は脳梗塞急性期における全長型 TDP-43 の限定分解を抑制する

次に *PGRN* が脳虚血後の TDP-43 の限定分解を抑制するかについて検証した。ラット血栓塞栓モデルを用い、血栓注入 4 時間後に t-PA と同時に r*PGRN* 100 μ g を静注した。虚血 24 時間後の大脳皮質を用

いた抗 TDP-43 抗体による免疫ブロットを行ない、rPGRN による変化を検討した。虚血後、IgG 投与群では全長型 TDP-43 の発現量は有意に減少するのに対して、rPGRN 投与群ではその減少が抑制された (IgG 投与群 : rPGRN 投与群 = 48.5 ± 12.6 : 162.8 ± 46.1 (shame 術群に対する %), $p=0.035$)。一方、TDP-43 の C 末端 25kDa 断片の発現量には有意な変化はなかった (対照群 : rPGRN 投与群 = 164.3 ± 77.4 : 60.3 ± 13.5 (%), $p=0.23$, 図 2A, B, C)。

3. PGRN はカスパーゼ-3 の活性化を阻害する

虚血後のカスパーゼ-3 活性化に及ぼす rPGRN の効果について、検討した。対照群と比して、rPGRN 投与群では活性型カスパーゼ-3 の発現量は減少した (対照群 : rPGRN 投与群 = 33837.0 ± 11090 : 5077.8 ± 3855.9 (%), $p=0.028$, 図 3A, B)。

4. PGRN はカルパインの発現を阻害しない

C 末端 25kDa 断片は、カルシウム依存性システインプロテアーゼであるカルパインで切断される可

能性が報告されていることから（図 4）¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾，脳虚血後のカルパインの発現量を検討した．脳神経系で主として機能しているカルパイン 1 およびカルパイン 2 について検討したが，rPGRN 投与にてこれらの発現量には変化を認めなかった（カルパイン 1 では対照群：rPGRN 投与群 = 67.8 ± 16.5 : 55.0 ± 10.4 （%）， $p=0.541$ ．カルパイン 2 では対照群：rPGRN 投与群 = 244.5 ± 79.0 : 164.9 ± 55.4 （%）， $p=0.554$ ．図 5A，B，C）．

5 . PGRN は脳梗塞体積を減少させる

これまでのラット血栓塞栓モデルを用いた検討で，一過性脳虚血に対する組み換えマウス PGRN による神経細胞保護効果を報告している¹³⁾．将来の臨床応用を検討する上で，PGRN の神経細胞保護作用が種を越えて認められるかを検証した．このため，組み換えヒト PGRN 蛋白を用いて，ラット血栓塞栓モデルにおいて，ヒト rPGRN 投与群と対照群を比較した．脳梗塞体積については，ヒト rPGRN 投与群 $34.56 \pm 6.3\%$ ，対照群 $51.3 \pm 2.6\%$ で，前者において

梗塞体積の有意な縮小を認めた ($P=0.045$) (図 6A, B).

考察 ;

今回の検討で、一過性脳虚血後、*PGRN* ノックアウトマウスでは、TDP-43 の細胞質における異常局在が増加した (図 1). これは、虚血後の核蛋白 TDP-43 の細胞質への移動を *PGRN* が抑制している可能性を示唆する。さらに、私は *rPGRN* を再灌流時に *tPA* とともに静注することにより、全長型 TDP-43 量の減少が抑制され、カスパーゼ-3 の活性化が抑制されることを示した (図 2, 3).

これまでの検討で、脳虚血後に細胞透過性カスパーゼ-3 阻害薬を脳室投与すると、TDP-43 の限定分解が抑制されることが報告されている¹⁴⁾。TDP-43 にはカスパーゼ-3 の認識部位が少なくとも 2ヶ所あることが知られているが¹⁰⁾¹¹⁾、*rPGRN* が脳虚血後のカスパーゼ-3 活性化を阻害することにより、TDP-43 の限定分解を抑制し、全長型 TDP-43 の機能が保持されるものと考えられた。*rPGRN* による

TDP-43 の限定分解の抑制は *in vitro* では報告がなされているが，その機序については不明である¹¹⁾．今後，rPGRN がカスパーゼ-3 の活性化を抑制する機序に関して検討する必要がある．

rPGRN が脳虚血後，TDP-43 の 25kDa 断片の生成を抑制しなかった理由の一つとして，蛋白分解酵素カルパインによって TDP-25kDa 断片がさらに切断された可能性がある (図 4)¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾⁾．一方，TDP-43 は ALS や FTLD では，TDP-43 の異常リン酸化や不溶化，凝集体形成を介して，toxic gain of function による神経細胞障害をもたらすことが知られている²⁰⁾．特に異常リン酸化は，オリゴマー形成を促進し，神経細胞毒性を発揮する可能性もあるが²¹⁾，これまでの検討で，脳虚血後に TDP-43 の異常リン酸化や不溶化は認められないことが確認されている¹²⁾．本研究の結果では，ラット血栓塞栓モデルにおいて TDP-43 25kDa 断片が有意には増加しなかったことから，脳虚血においては，神経変性疾患にて考えられている toxic gain of function の機序ではなく，TDP-43 の loss of function であり，PGRN はその抑制

に作用する可能性が考えられた。

最後に，本研究では，ラット血栓塞栓モデルにおいて，ヒト PGRN を投与し，盲検にてその効果を評価した．ヒト PGRN は 593 アミノ酸から成り，ラット PGRN に対して 84% は相同性がある²⁰⁾．今回，対照と比較して梗塞体積の有意な減少を認めたことから，プログラニューリンは，種を越えて，神経細胞保護作用を示すことが確認された．今後，臨床応用を目指す必要がある．

結論；

脳虚血に対する PGRN の神経細胞保護作用の機序としては，TDP-43 の loss of function の抑制，すなわちカスパーゼ-3 の活性化を阻害し，核蛋白 TDP-43 の限定分解を抑制することにより，全長型 TDP-43 を核内に保持することで，その機能を保つことが重要であるものと考えられた．

謝辞；

本研究全般にわたり，ご指導ご助言をいただきましたし

た,新潟大学脳研究所神経内科西澤正豊前教授,小野寺理教授,下畑享良准教授,高橋哲哉助教,金澤雅人助教に深謝申し上げます.

参 考 文 献

- 1) Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, de Ferranti S, Després JP, Fullerton HJ, Howard VJ, Huffman MD, Judd SE, Kissela BM, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Liu S, Mackey RH, Matchar DB, McGuire DK, Mohler ER 3rd, Moy CS, Muntner P, Mussolino ME, Nasir K, Neumar RW, Nichol G, Palaniappan L, Pandey DK, Reeves MJ, Rodriguez CJ, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Willey JZ, Woo D, Yeh RW, Turner MB. American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 131:e29-322, 2015.
- 2) He Z, Bateman A. Progranulin Gene Expression Regulates Epithelial Cell Growth and Promotes Tumor Growth in Vivo. *Cancer Res*. 59: 3222-9, 1999.
- 3) Díaz-Cueto L, Stein P, Jacobs A, Schultz RM, Gerton GL. Modulation of Mouse Preimplantation Embryo Development by Acrogranin (Epithelin/Granulin Precursor). *Dev Biol*. 217:

406-418, 2000.

4) He Z, Bateman A. Progranulin (granulin-epithelin precursor, PC-cell-derived growth factor, acrogranin) mediates tissue repair and tumorigenesis. *J Mol Med.* 81: 600-612, 2003.

5) Kanazawa M, Kawamura K, Takahashi T, Miura M, Tanaka Y, Koyama M, Toriyabe M, Igarashi H, Nakada T, Nishihara M, Nishizawa M, Shimohata T. Multiple therapeutic effects of progranulin on experimental acute ischaemic stroke. *Brain.* 138:1932-48, 2015.

6) Damme PV, Hoecke AV, Lambrechts D, Vanacker P, Bogaert E, van Swieten J, Carmeliet P, Van Den Bosch L, Robberecht W. Progranulin functions as a neurotrophic factor to regulate neurite outgrowth and enhance neuronal survival. *J Cell Bio.* 181: 37-41, 2008.

7) Laird AS, Van Hoecke A, De Muyenck L, Timmers M, Van Den Bosch L, Van Damme P, Robberecht W. Progranulin is neurotrophic in vivo and protects against a mutant TDP-43 induced axonopathy. *PloS*

One. 5:e13368, 2010.

8) Mackenzie IR, Baker M, Pickering-Brown S, Hsiung GY, Lindholm C, Dwosh E, Gass J, Cannon A, Rademakers A, Hutton M, Feldman HH. The neuropathology of frontotemporal lobar degeneration caused by mutations in the progranulin gene. *Brain*. 129:3081-90, 2006.

9) Cruts M, Gijselinck I, van der Zee J, Engelborghs S, Wils H, Pirici D, Rademakers R, Vandenberghe R, Dermaut B, Martin JJ, van Duijn C, Peeters K, Sciot R, Santens P, De Pooter T, Mattheijssens M, Van den Broeck M, Cuijt I, Vennekens K, De Deyn PP, Kumar-Singh S, Van Broeckhoven C. Null mutations in progranulin cause ubiquitinpositive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature*. 442:920-4, 2006.

10) Zhang YJ, Xu YF, Dickey CA, Buratti E, Baralle F, Bailey R, Pickering-Brown S, Dickson D, Petrucelli L. Progranulin mediates caspase dependent cleavage of TAR DNA binding protein-43. *J Neurosci*.

27:10530 -10534, 2007.

1 1) Yamashita T, Hideyama T, Hachiga K, Teramoto S, Takano J, Iwata N, Saïdo TC, Kwak S. A role for calpain-dependent cleavage of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis pathology. Nat Commun. 3:1307, 2012.

1 2) Yang Z, Lin F, Robertson CS, Wang KK. Dual vulnerability of TDP-43 to calpain and caspase-3 proteolysis after neurotoxic conditions and traumatic brain injury. J Cereb Blood Flow Metab. 34, 1444-1452, 2014.

1 3) Zhang YJ, Xu YF, Cook C, Gendron TF, Roettges P, Link CD, Lin WL, Tong J, Castanedes-Casey M, Ash P, Gass J, Rangachari V, Buratti E, Baralle F, Golde TE, Dickson DW, Petrucelli L. Aberrant cleavage of TDP-43 enhances aggregation and cellular toxicity. Proc Natl Acad Sci USA. 106: 7607-7612, 2009

1 4) Kanazawa M, Kakita A, Igarashi H, Takahashi T, Kawamura K, Takahashi H, Nakada T, Nishizawa M, Shimohata T. Biochemical and histopathological

alterations in TAR DNA-binding protein-43 after acute ischemic stroke in rats. *J Neurochem.* 116:957-65, 2011.

1 5) Kayasuga Y, Chiba S, Suzuki M, Kikusui T, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Kotaki H, Horai R, Iwakura Y, Nishihara M. Alteration of behavioural phenotype in mice by targeted disruption of the progranulin gene. *Behav Brain Res.* 185: 110-118, 2007.

1 6) Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn Stroke.* 8:1-8, 1986.

1 7) Okubo S, Igarashi H, Kanamatsu T, Hasegawa D, Orima H, Katayama Y. FK-506 extended the therapeutic time window for thrombolysis without increasing the risk of hemorrhagic transformation in an embolic rat stroke model. *Brain Res.* 1143:221-7, 2007.

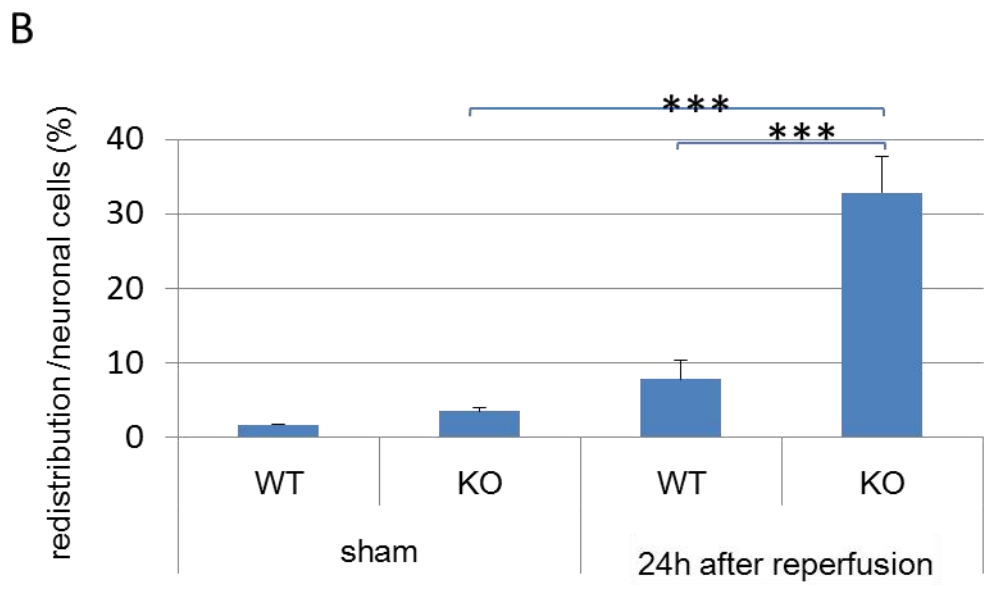
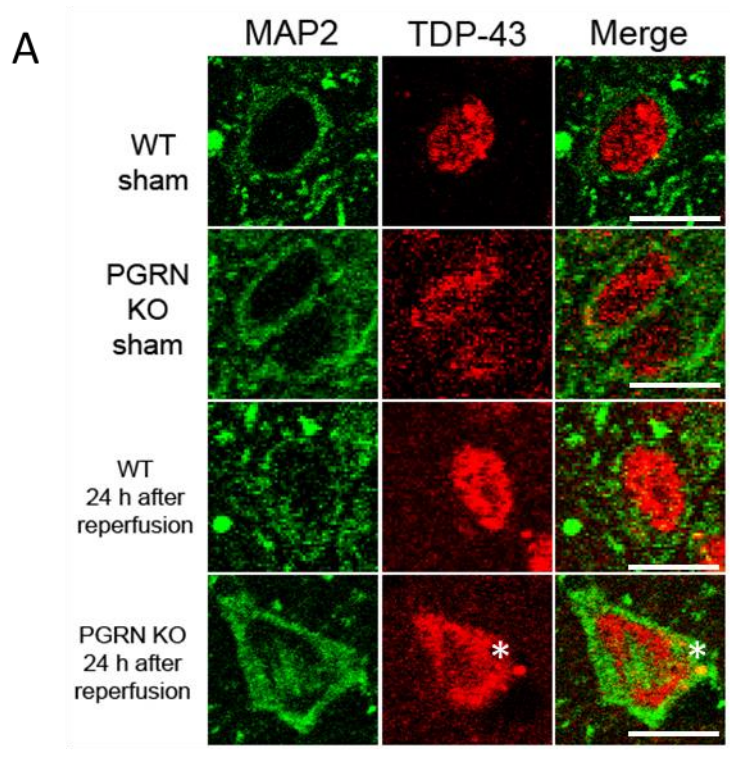
1 8) Shimohata T, Zhao H, Sung JH, Sun G, Mochly-Rosen D, Steinberg GK. Suppression of deltaPKC activation after focal cerebral ischemia contributes to the protective effect of hypothermia. J Cereb Blood Flow Metab. 27:1463-75, 2007.

1 9) Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu G, Savalos RA, Davidson C, Sharp FR. A semiautomated method for measuring brain infarct volume. J Cereb Blood Flow Metab. 10:290-3, 1990.

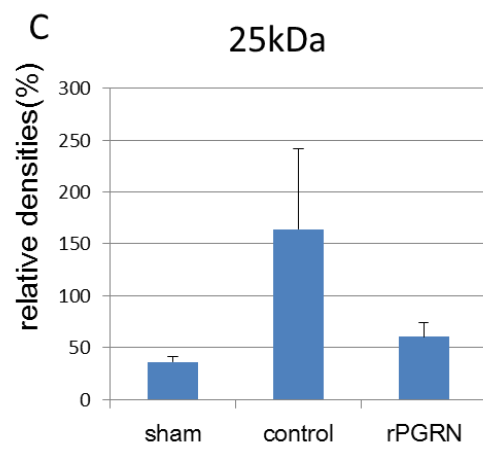
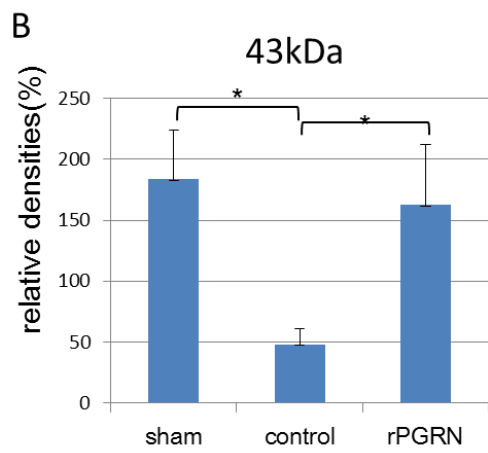
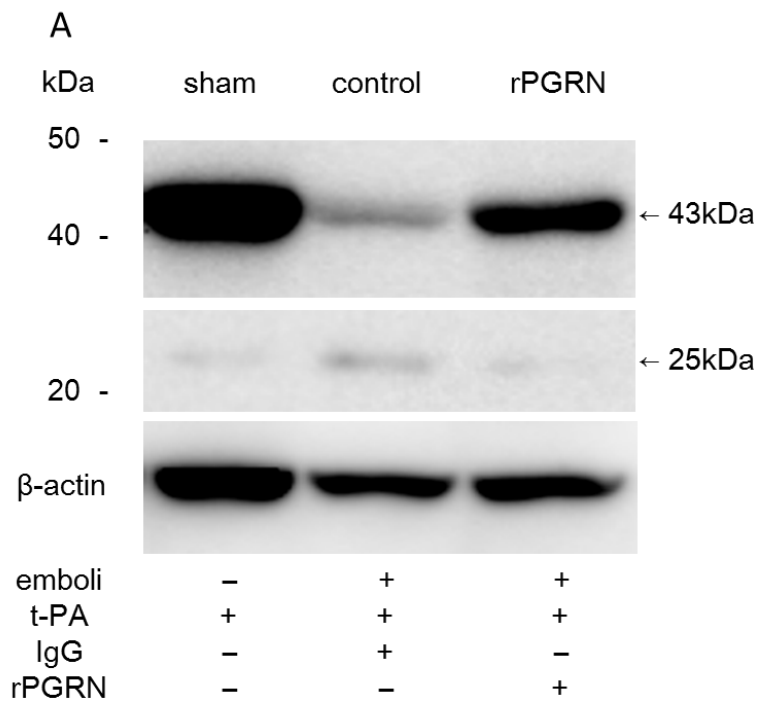
2 0) Pickford F, Marcus J, Camargo LM, Xiao Q, Graham D, Mo JR, Burkhardt M, Kulkarni V, Crispino J, Hering H, Hutton M. Progranulin is a chemoattractant for microglia and stimulates their endocytic activity. Am J Pathol. 178: 284-295, 2011

2 1) Goedert M. The significance of tau and alpha-synuclein inclusions in neurodegenerative diseases. Curr Opin Genet Dev. 11: 343-351, 2001.

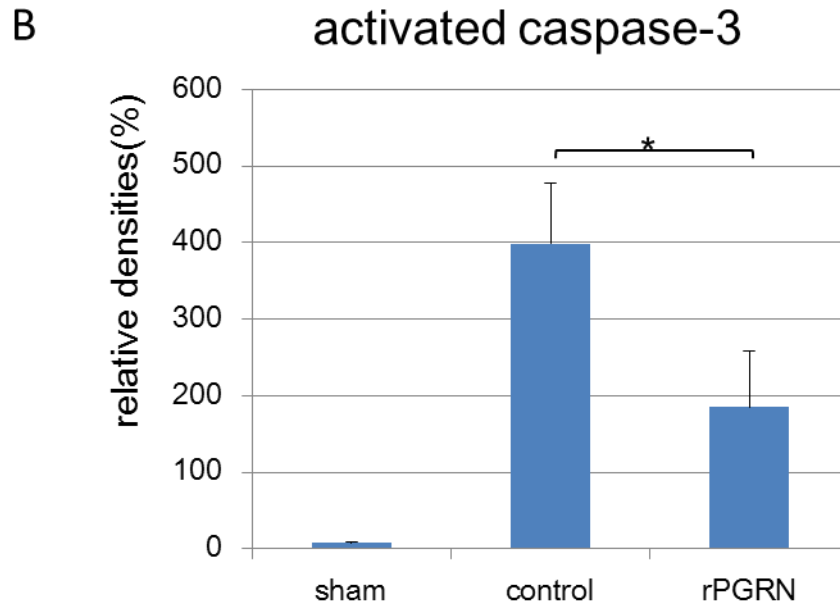
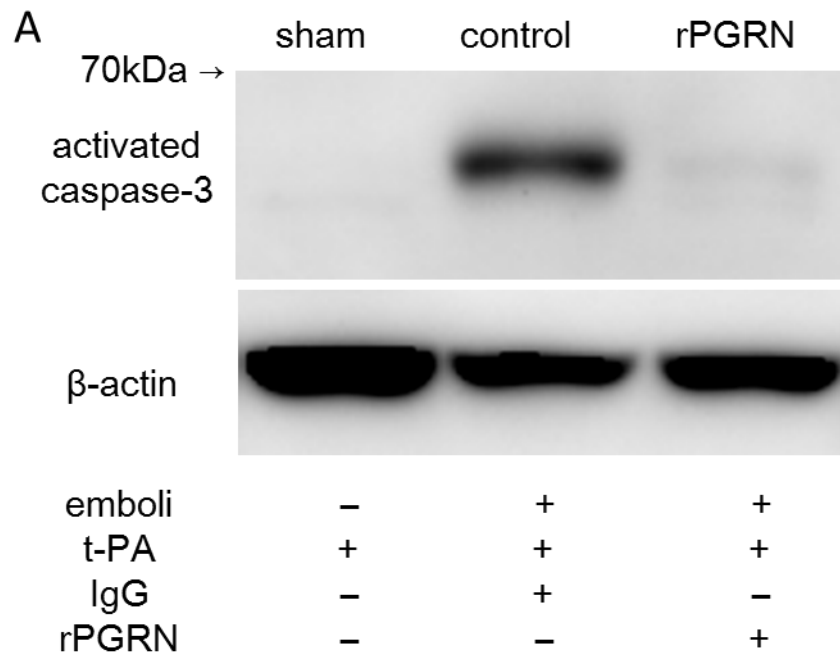
☒ 1



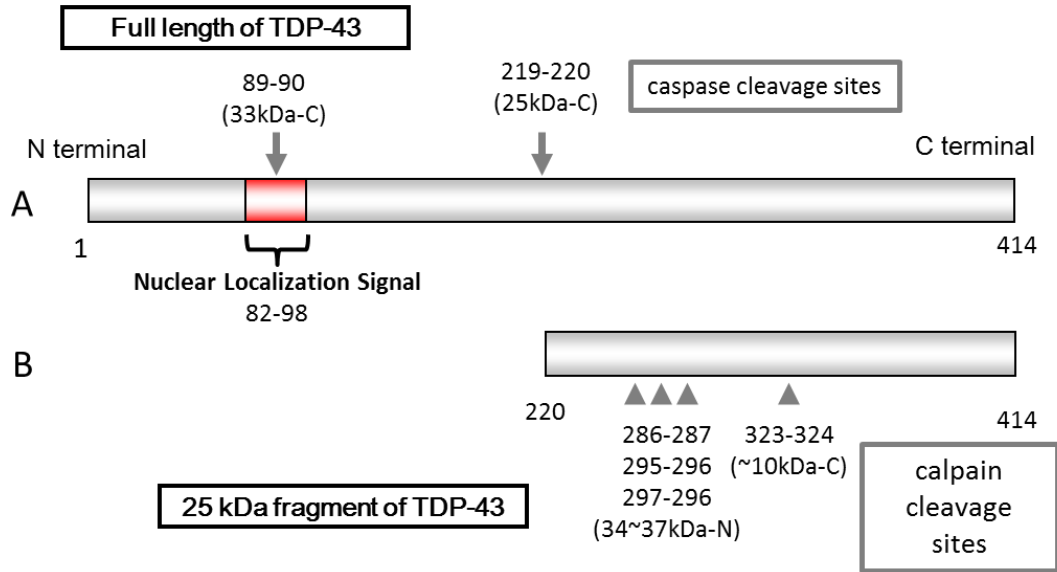
☒ 2



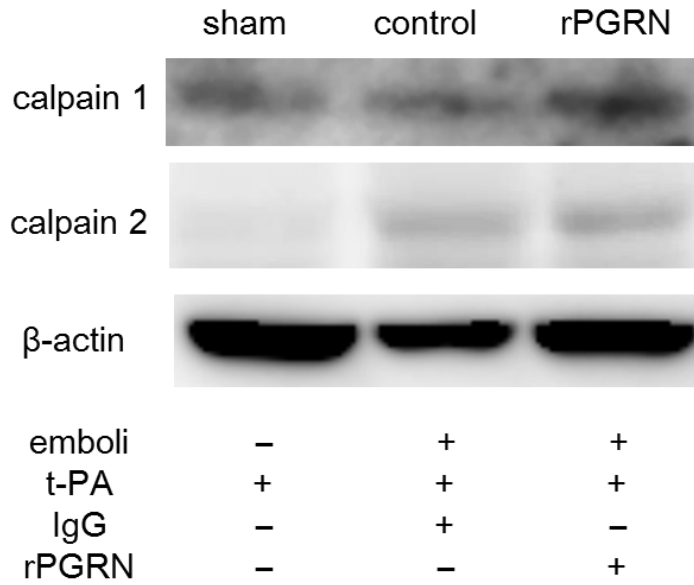
☒ 3



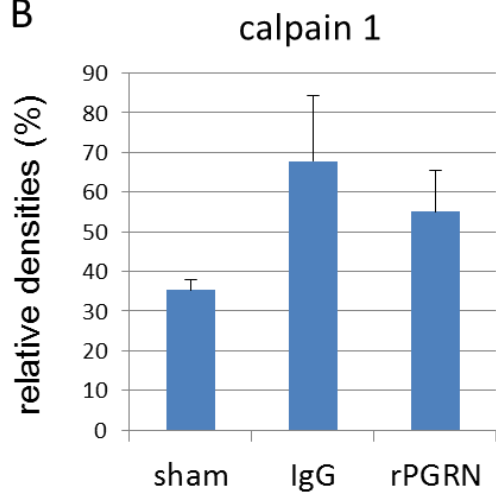
☒ 4



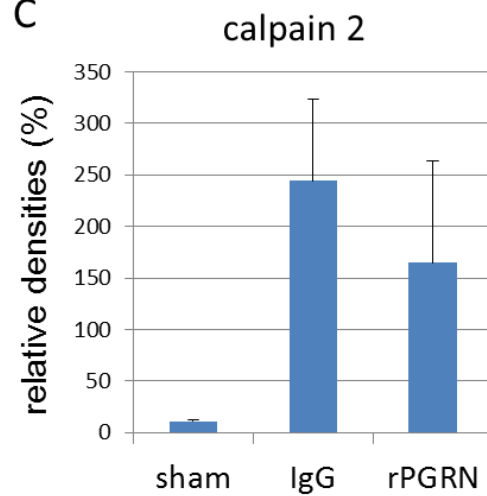
A



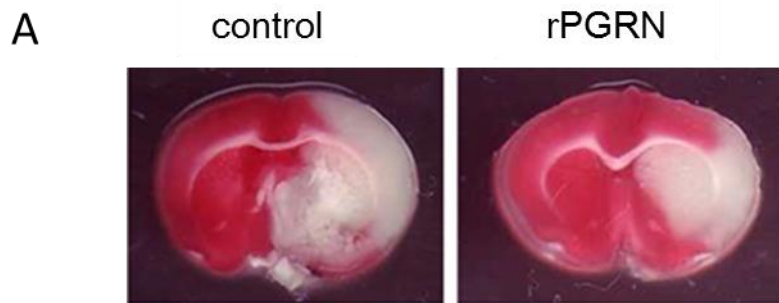
B



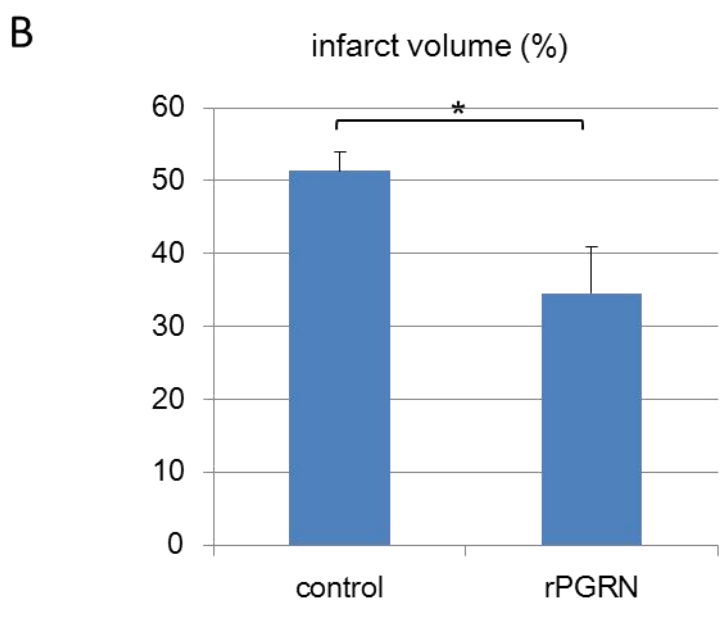
C



☒ 6



	control	rPGRN
emboli	+	+
t-PA	+	+
IgG	+	-
rPGRN	-	+



図の説明

図 1 虚血 24 時間後における神経細胞の TDP-43 細胞内局在.

A) 抗 MAP2 抗体 (緑), 抗 TDP-43 抗体 (赤) による二重染色. *PGRN* ノックアウトマウスでは核内 TDP-43 の染色性は減少した. さらに MAP2 の染色に重なり, 細胞質にも局在を認めた (*). スケールバー: 10 μ m.

B) TDP-43 の細胞質内異常局在の頻度. TDP-43 の細胞質内異常局在を有する神経細胞の頻度は, 野生型と比較して, *PGRN* ノックアウトマウスで有意に多く認められた. *** $p < 0.001$. N=21.

図 2 rPGRN による TDP-43 の限定分解の抑制

A) ラット血栓塞栓モデルにおける TDP-43 の免疫ブロット. 血栓注入 4 時間後に t-PA と同時に rPGRN または対照 IgG を投与した. 矢印: TDP-43 の全長型 43kDa および 25kDa C 末端断片を示す. t-PA: tissue plasminogen activator, IgG: control protein, rPGRN: recombinant progranulin.

B) β アクチンに対する全長型 TDP-43 43kDa 断片の
デンシトメトリー. 対照群では全長型 TDP-43 は
sham 群と比較して有意に減少するが (* $p < 0.05$),
rPGRN 投与により全長型 TDP-43 の減少が抑制さ
れる (* $p < 0.05$). N=4.

C) β アクチンに対する TDP-43 25 kDa 断片のデンシ
トメトリー. 対照群では sham 群と比較して 25kDa
断片は増加し ($p = 0.24$), rPGRN 投与により減少す
るが有意な変化ではなかった ($p = 0.31$). N=4 .

図 3 rPGRN によるカスパーゼ - 3 活性化の阻害

A) ラット血栓塞栓モデルにおける活性型カスパー
ゼ -3 の免疫ブロット. 血栓注入 4 時間後に t-PA
と同時に rPGRN または対照 IgG を投与した.
t-PA : tissue plasminogen activator, IgG : control
protein, rPGRN : recombinant progranulin.

B) β アクチンに対する活性型カスパーゼ -3 のデン
シトメトリー. 虚血により発現が誘導された活性
型カスパーゼ -3 は, rPGRN 投与により有意に減少

した (* $p < 0.05$). N=4.

図 4 TDP-43 におけるカスパーゼとカルパインの切断認識部位

A) 全長型 TDP-43 にはカスパーゼの切断認識部位が存在する (矢印). 25kDa C 末端断片は核局在シグナルを有さない.

B) 25kDa C 末端断片には, 複数のカルパインの切断認識部位が存在する (矢頭).

図 5 血栓塞栓モデルにおけるカルパイン発現の比較

A) ラット血栓塞栓モデルにおけるカルパイン 1 およびカルパイン 2 の免疫ブロット. 血栓注入 4 時間後に t-PA と同時に rPGRN または対照 IgG を投与した. t-PA: tissue plasminogen activator, IgG: control protein, rPGRN: recombinant progranulin.

B) β アクチンに対するカルパイン 1 のデンシトメトリー. rPGRN 投与はカルパイン 1 の増加を抑制しない ($p = 0.54$). N=4.

C) β アクチンに対するカルパイン 2 のデンシトメトリー . rPGRN 投与はカルパイン 2 の増加を抑制しない ($p=0.55$). N=4.

図 6 血栓塞栓モデルにおける rPGRN の効果

A) TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) 染色による脳梗塞の比較 . control ; 自家血血栓注入 4 時間後に IgG 100 μ g を静注し , その直後に t-PA を静注した群 . rPGRN ; 自家血血栓注入 4 時間後にヒト rPGRN 50 μ g を静注し , その直後に t-PA を静注した群 .

B) 血栓塞栓モデルにおける脳梗塞体積の比較 . rPGRN 投与により脳梗塞体積が減少した (* $p<0.05$). N=7.