

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 鳥谷部 真史
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 707 号
学位授与の日付 平成 28 年 9 月 20 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名 脳虚血に対する成長因子プログラニューリンの神経保護メカニズムの検討

論文審査委員 主査 教授 五十嵐 博中
副査 教授 笹岡 俊邦
副査 教授 小野寺 理

博士論文の要旨

【背景と目的】脳血管障害は国内の死亡原因の第 4 位、要介護の原因の第 1 位を占め、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使用されている血栓溶解薬（組織プラスミノゲン・アクチベーター：t-PA）治療の適応となる脳梗塞患者数は非常に少ない。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。申請者らは、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ューリン (PGRN) 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。PGRN 遺伝子変異は、核蛋白 TAR DNA 結合蛋白-43 (TDP-43) の神経細胞質内蓄積と、限定分解を伴う、前頭側頭型変性症 (FTLD) が生じる。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おり、カスパーゼ-3 やカルパインが仲介している可能性が指摘されている。一方では、虚血性神経細胞障害においても TDP-43 の限定分解および細胞質内異常局在で生じる可能性が指摘されている。申請者らは、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。申請者は、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。

【方法】PGRN ノックアウトマウスと、野生型マウスの一過性局所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、血栓注入による虚血 4 時間後に、血栓溶解薬 (t-PA, 10 mg/kg) と組み換えマウス PGRN (100 μ g/body) ないし対照蛋白 (IgG, 100 μ g/body) の静注を行い、虚血 24 時間後に免疫プ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にて血栓注入による虚血 4 時間後に血栓溶解薬 (t-PA, 10 mg/kg) と組み換えヒト PGRN (50 μ g/body) ないし対照蛋白 (IgG, 100 μ g/body) の静注を行い、検討を行った。

【結果】PGRN ノックアウトマウスでは、野生型マウスと比較して、虚血後に 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 ($P < 0.001$)。またラット血栓塞栓モデルにおいて、組換え PGRN 投与群は対照群と比較して、全長型 TDP-43 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 ($P < 0.05$)。一方では、TDP-43 の 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、脳虚血後のカルパインの発現を比較したが、組換え PGRN 投与でもカルパインの発現は抑制されなかった。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。ラット血栓塞栓モデルに対する組み換えヒト PGRN 投与による脳梗塞抑制効果については、組み換えヒト PGRN 投与群では、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 の限定分解を抑制することにより、TDP-43 を核内に保持し、TDP-43 の機能を保つ可能性が示唆された。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 TDP-43 の toxic gain of function ではなく、loss of function が神経細胞死に関わり、PGRN はその抑制に作用する可能性が考えられた。ヒト PGRN はラット PGRN に対して 84% の相同性があり、組換えヒト PGRN 投与により脳梗塞体積の有意な減少を認めたことから、PGRN 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。

審査結果の要旨

申請者らは、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ューリン (PGRN) 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。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おり、カスパーゼ-3 やカルパインが仲介している可能性が指摘されている。一方では、虚血性神経細胞障害においても TDP-43 の限定分解および細胞質内異常局在で生じる可能性が指摘されているが 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い。

申請者は、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。さらに組み換えヒト PGRN 投与による動物種を異にした脳梗塞抑制効果について、ラット血栓塞栓モデルにて血栓注入による虚血 4 時間後に血栓溶解薬と組み換えヒト PGRN ないし対照蛋白の静注を行い、検討を行い、PGRN ノックアウトマウスでは、野生型マウスと比較して、虚血後に TDP-43 の細胞質異常局在を認める神経細胞の頻度が有意に多かったこと、およびまたラット血栓塞栓モデルにおいて、組換え PGRN 投与群は対照群と比較して、全長型 TDP-43 の減少は抑制され、さらに活性型カスパーゼ - 3 発現が抑制されたことを証明したが、一方で組換え PGRN 投与でもカルパインの発現は抑制されなかった。また、ラット血栓塞栓モデルに対する組み換えヒト PGRN 投与による脳梗塞抑制効果については、組み換えヒト PGRN 投与群では、対照群と比較して、脳梗塞体積を縮小した。

これらの結果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 TDP-43 の toxic gain of function ではなく、loss of function が神経細胞死に関わり、PGRN はその抑制に作用する可能性が考えられ、また PGRN 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。この結果は将来の PGRN を用いた臨床における脳梗塞治療の可能性を開くものであり、博士課程論文として妥当であると判断した。