

## 165. プログラニュリンによる新規脳保護脳梗塞治療薬の開発

金澤 雅人

新潟大学 脳研究所 神経内科

Key words : 脳梗塞, プログラニュリン, TDP-43, VEGF, IL-10

### 緒言

脳梗塞急性期の内科的血栓溶解薬「組織プラスミノゲン・アクチベーター (tPA)」の静注療法は、発症から 4.5 時間までのきわめて短い治療可能時間に制限されている。そのため、治療の恩恵を受ける患者数は全脳梗塞患者数のわずか 5%と少なく、治療可能時間を延長するような新規療法の開発は喫緊の課題である。治療可能時間を越えての tPA 投与は、血管破綻により、脳出血を合併する。さらに、tPA 自体は神経細胞毒性を有し、再灌流後に惹起される炎症は神経障害を拡大させる。複数の病態に関与する薬剤の開発が tPA 療法の治療の恩恵にあずかる症例の増加に不可欠である。

プログラニュリン (progranulin: PGRN) は糖タンパク成長因子であり、神経保護、組織修復、炎症などといった複数の病態に関与することが知られている<sup>1)</sup>。また近年、脳虚血や脊髄損傷においても PGRN の保護的な働きが報告されている。このなかで、マウス一過性局所脳虚血モデルにおいて、組み換え PGRN の脳室投与が脳浮腫を抑制したことから、PGRN の血管保護の可能性が示唆されている<sup>2)</sup>。また、脊髄損傷により増加した活性化ミクログリアで、PGRN の発現が誘導されたという報告<sup>3)</sup>や、脳虚血においても、グリア細胞および好中球の PGRN が神経炎症を抑制するという報告があることから、PGRN が神経炎症にも関与している可能性がある<sup>2,4)</sup>。さらに、野生型に比べ PGRN 欠損初代神経細胞の生存率が低下すること<sup>5)</sup>、PGRN 遺伝子変異は前頭側頭葉変性症の原因であることが報告されたことから、PGRN は神経細胞保護に関わるものと考えられている<sup>6)</sup>。また、当研究室では脳虚血により、神経細胞の核タンパク TAR DNA 結合蛋白-43 (TAR DNA-binding protein 43 kDa: TDP-43) が限定分解され、細胞質に異常局在することを報告しているが<sup>7)</sup>、TDP-43 の切断酵素である caspase-3 の活性化を PGRN が抑制することも報告されている<sup>8)</sup>。今回、神経細胞、血管、炎症に関わる PGRN を標的とした新規脳梗塞治療薬の開発を目指した。

### 方法

ラットとマウス再灌流一過性局所脳虚血モデルを用いた免疫染色、ウエスタンブロットにより、PGRN の虚血後の発現を確認した。また、初代培養細胞 (神経細胞、ミクログリア、アストロサイト) を用いて、低酸素低グルコース刺激 (OGD) を行い、PGRN や各種サイトカイン、血管破綻に関与する血管内皮増殖因子 (VEGF) の産生に関して、メッセンジャー RNA 量を PCR 法、ELISA にて評価した。また、PGRN 欠損マウスを用いて、PGRN 欠如による影響を確認した。最後に、遅延した tPA 投与で、脳出血合併をきたすラット脳梗塞モデルに組換え PGRN を tPA と同時投与することで、予後を改善できるかを検証した。

数値の解析には one-way ANOVA 法および two-way ANOVA 法を、頻度の解析には Fisher 法を用いた。全ての検定において、確率値 (p) が 0.05 未満のものについて有意差ありとした。結果は平均値 ± 標準誤差で示した。

### 結果

#### 1. PGRN の発現は虚血を引き金に大きく変化する

脳梗塞により PGRN の発現および糖鎖修飾がどのように変化するのかを調べた。PGRN は、分子量 ~88 kDa の完全に糖鎖修飾がされたものと、58~68 kDa の不完全な糖鎖修飾のものが存在する。虚血中心では、~88 kDa の PGRN 発現は再灌流後に徐々に減少し、再灌流 72 時間後に回復した。一方、58~68 kDa の PGRN は、再灌流 18 時間まで発

現に変化はみられないが、24時間から増え始め、72時間後には著しく増加した ( $p < 0.05$ , 図 1A, B)。虚血ペナンプラでは、~88 kDa の PGRN は再灌流後わずかに減少し、58~68 kDa の PGRN は虚血中心と同様に、再灌流 72 時間後に著しく増加した (図 1A, B)。また免疫組織学的検討では、PGRN は非虚血時では大脳皮質の神経細胞にのみ顆粒状に発現していたが、虚血再灌流 24 時間後、虚血中心の神経細胞で PGRN の発現は消失する一方、虚血ペナンプラで PGRN 陽性神経細胞が増加し、発現分布もびまん性に変化していた。また非虚血時にはミクログリアでは PGRN の発現を認めなかったが、再灌流 24 時間後から PGRN 陽性ミクログリアが増え始め、72 時間後に著増した。さらに PGRN は、再灌流 24 時間後の血管内皮細胞でも発現を認めるようになった。

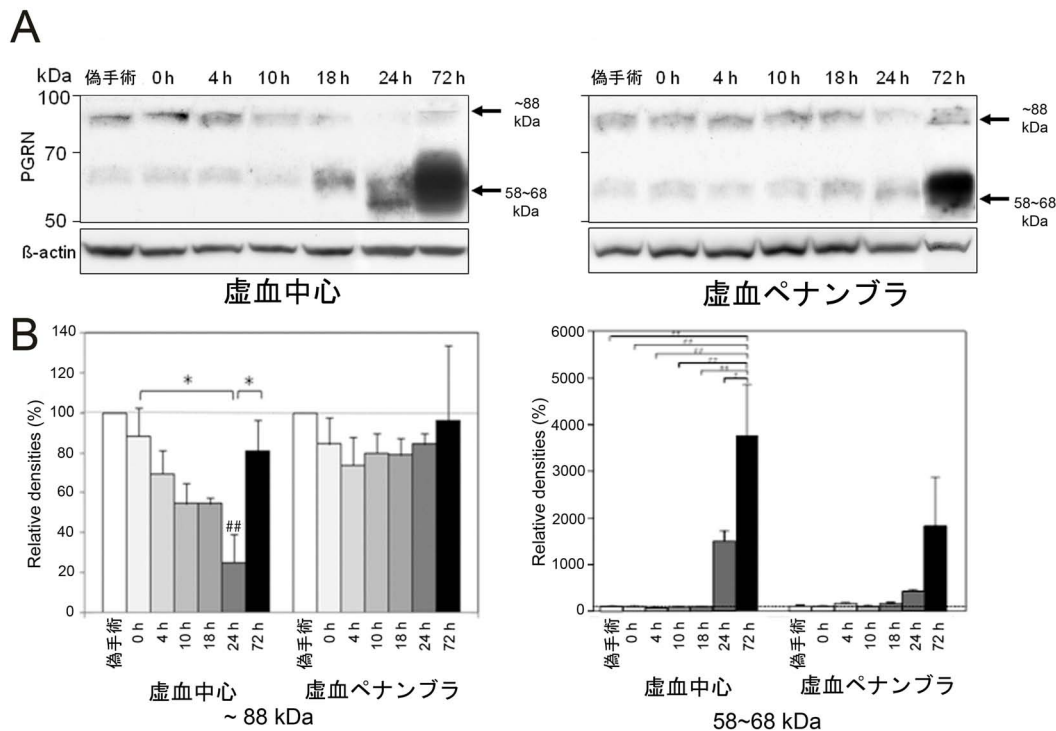


図 1. ラット大脳皮質における虚血後の Progranulin (PGRN) 発現の経時的変化

A) ラット大脳皮質の虚血中心 (左) と虚血ペナンプラ (右) における PGRN 発現のウエスタンブロットティング。~88 kDa と 58~68 kDa の 2 つのアイソフォームが検出された。ローディングコントロールとして  $\beta$ -actin を用いた。B) ~88 kDa (左) と 58~68 kDa (右) の 2 つの PGRN アイソフォームについてデンストメトリー解析を行った ( $N = 5$ )。データは、偽手術群の PGRN 発現を 100 % とした時の虚血群の相対的な発現量を表したものである。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , ## $P < 0.01$  (偽手術群との比較)。

## 2. PGRN は TDP-43 の細胞内異常局在と神経細胞死を抑制する

我々は、脳虚血後、TDP-43 が限定分解され、神経細胞核から細胞質に異常局在することで神経細胞死に関与する可能性を報告している<sup>7)</sup>。TDP-43 の切断酵素である caspase-3 の活性化を PGRN が抑制することも報告されており<sup>8)</sup>、PGRN が TDP-43 の維持を介して神経細胞死を抑制する可能性を考え検証を行った。初代神経細胞を用いた OGD 実験を行った。まず始めに、OGD 実験の条件検討を行った。OGD 条件下で 18 時間および 24 時間インキュベートした神経細胞に対し、LDH アッセイを行うことで細胞傷害がどの程度起きているのかを検討した。18 時間インキュベート群では細胞傷害が 10 % 以下で、コントロール群と比べ有意な差はみられなかったが、24 時間インキュベート群では OGD 条件下の細胞傷害は 50 % 程度にまで上昇し、コントロール群と比較して有意な差がみられた ( $p < 0.01$ , 図 2A)。PGRN の神経細胞保護効果を検討するための OGD 条件を、顕著な細胞傷害がみられる 24 時間インキュベートとした。

次に、OGD 負荷した神経細胞の培養上清に組換え PGRN を添加することで、神経細胞死が抑制されるのかを検討した。組み換え PGRN を 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  添加した時の神経細胞死は、コントロール群に比べ有意に抑制された ( $p < 0.05$ , 図 2B)。

最後に、神経細胞に組み換え PGRN を添加することで、核蛋白 TDP-43 の異常局在が抑制されるのかを免疫染色にて検討した。その結果、コントロール群では、OGD により TDP-43 の細胞質局在がみられたが、組み換え PGRN を添加することで異常局在は有意に抑制された ( $p < 0.05$ 、図 2C、D)。

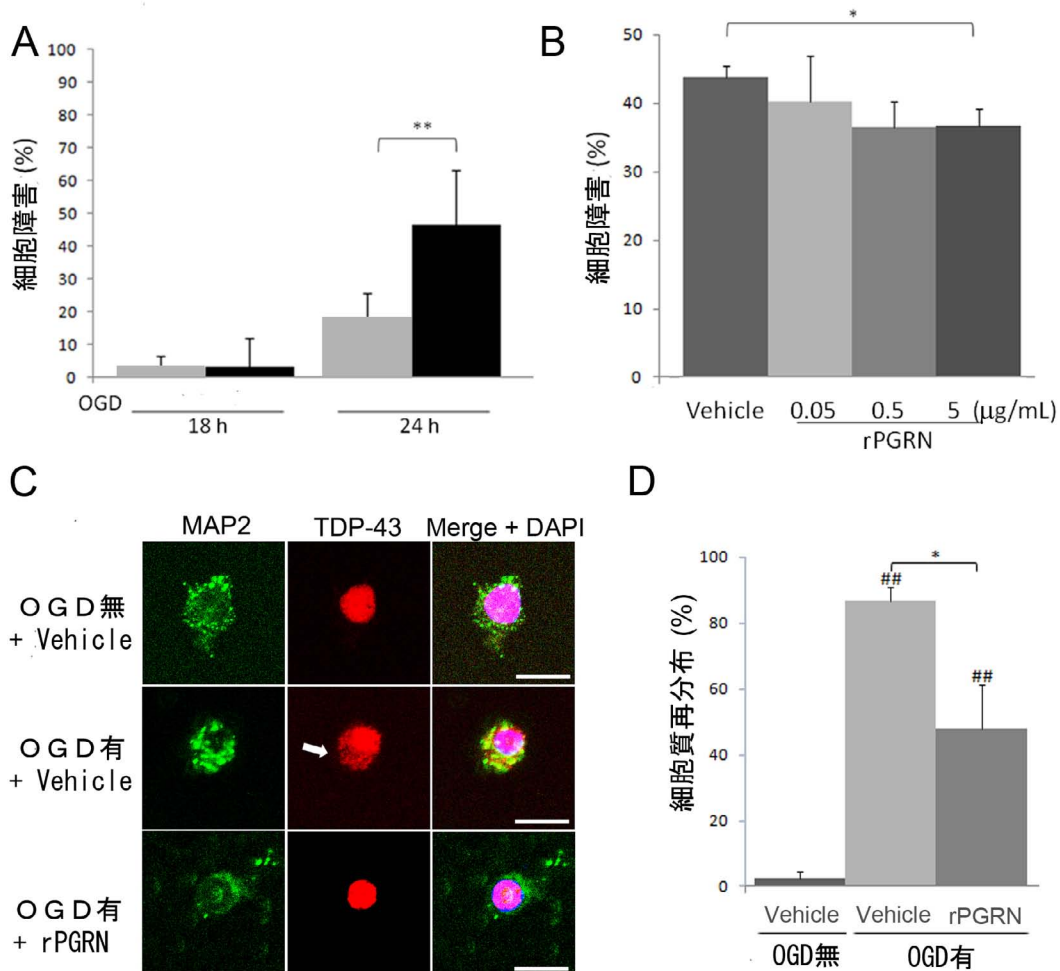


図 2. OGD 条件下の組み換え PGRN 添加による TAR DNA 結合蛋白-43 (TDP-43) 細胞内異常局在および神経細胞死の抑制

A) LDH アッセイにより、神経細胞のコントロールおよび OGD 負荷 18、24 時間における細胞傷害 (%) を測定した ( $N = 5$ )。\* $P < 0.01$ 。B) 組換え PGRN (rPGRN) は OGD 負荷 24 時間において神経細胞傷害を抑制した ( $N = 6$ )。\* $P < 0.05$ 。C) コントロールおよび OGD 負荷した神経細胞について MAP2 (緑)、TDP-43 (赤)、DAPI (青) の三重染色を行った。矢印は、OGD24 時間の神経細胞における TDP-43 の細胞内異常局在を示している。スケールバーの長さは  $20 \mu\text{m}$  である。D) グラフは、コントロールおよび OGD 負荷 24 時間の MAP2 陽性神経細胞における TDP-43 の細胞内異常局在の頻度を示している。rPGRN の添加は、TDP-43 の異常局在を抑制した ( $N = 7$ )。\* $P < 0.05$ 、## $P < 0.01$  (コントロール群との比較)。

### 3. PGRN は血管内皮増殖因子 (VEGF) の発現を制御することで脳虚血後の浮腫を抑制する

脳梗塞急性期における PGRN の機能を検討するため、野生型および PGRN 欠損マウスの局所脳虚血モデルを作製し、両者の病態を比較した。PGRN 欠損マウスは虚血再灌流 24 時間後の脳浮腫体積が野生型マウスに比べて有意に増大していた (図 3A)。VEGF は、局所脳虚血において血管透過性を著しく亢進されることが報告されている。このため、この PGRN 欠損マウスの脳浮腫増大に VEGF が関与するという仮説を立て、VEGF の免疫染色を行った。偽手術群では野生型、PGRN 欠損マウスともに VEGF 発現がみられなかったが、虚血再灌流 24、72 時間で虚血周辺に VEGF の発現がみられ、野生型に比べ PGRN 欠損マウスで VEGF の染色性が亢進していた (図 3B)。

次に、培養細胞を用いて野生型および PGRN 欠損マウスの VEGF 産生量を調べた。ミクログリアを用いて OGD 実験を行ったところ、培養上清に含まれる VEGF 量は、野生型に比べ PGRN 欠損ミクログリアで有意に高かった ( $p < 0.01$ , 図 3C)。一方、アストロサイトの OGD 実験では、培養上清中の VEGF 量は野生型と PGRN 欠損で変わりなかった。さらに、アストロサイトの VEGF 産生にミクログリアが関与している可能性について調べるため、野生型および PGRN 欠損マウス由来ミクログリアの OGD 後、その培養上清をアストロサイトにそれぞれ添加したところ、PGRN 欠損アストロサイトの VEGF 産生量は、ミクログリアの培養上清を添加したことにより、野生型に比べて著増した ( $p < 0.01$ )。また、ミクログリアの培養上清を添加したアストロサイトの VEGF 産生量は、ミクログリア単独またはアストロサイト単独培養に比べて多かった。すなわち、PGRN は VEGF を抑制することで血管保護作用を有する可能性が示唆された。

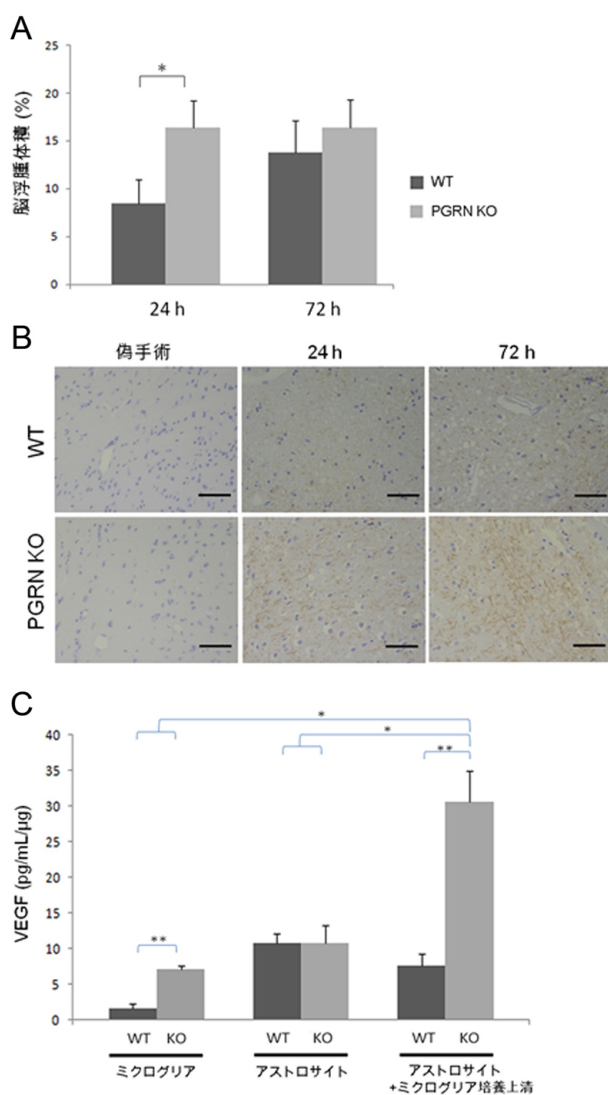


図 3. 野生型と PGRN 欠損マウスの脳虚血における浮腫体積と VEGF 発現量の比較

A) 野生型および PGRN 欠損マウスの虚血再灌流 24、72 時間後の脳浮腫体積を測定した ( $N \geq 9$ )。浮腫体積は、虚血側の脳半球体積から反対側の体積を差し引くことで算出した。B) 野生型および PGRN 欠損マウスの偽手術、虚血再灌流 24 時間、72 時間後の vascular endothelial growth factor (VEGF) 発現を解析した ( $N = 3$ ) スケールバーの長さは  $200 \mu\text{m}$  である。C) 野生型および PGRN 欠損マウス由来のミクログリア、アストロサイト、ミクログリアの培養上清を添加したアストロサイトの VEGF 産生量を ELISA にて定量した ( $N = 6 \sim 7$ )。\* $P = 0.01$ , \*\* $P < 0.01$ 。

#### 4. PGRN は IL-10 の遺伝子発現を制御することで抗炎症に働く

脳内の免疫応答に関与するミクログリアには、炎症に働く M1 型と抗炎症に働く M2 型 2 つの表現型が存在し、この 2 つのミクログリアのバランスが梗塞病変の拡大に関係していると考えられている。脳梗塞急性期の炎症における PGRN の役割を調べるために、野生型および PGRN 欠損マウス由来のミクログリアのサイトカイン遺伝子発現量を検討した。炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 (TNF) - $\alpha$ 、抗炎症性サイトカインであるトランスフォーミング増殖因子 (TGF) - $\beta$  とインターロイキン-10 (IL-10) について RT-PCR を行った結果、野生型と PGRN 欠損ミクログリアの TNF- $\alpha$  と TGF- $\beta$  の mRNA 量に差はなかった (図 4A, B)。しかし、OGD 条件下において PGRN 欠損ミクログリアの IL-10 発現量は野生型に比べ有意に減少した ( $p < 0.05$ )。この結果は、PGRN は IL-10 分泌を介した炎症抑制により、脳虚血に対し保護効果をもたらすものと考えた。

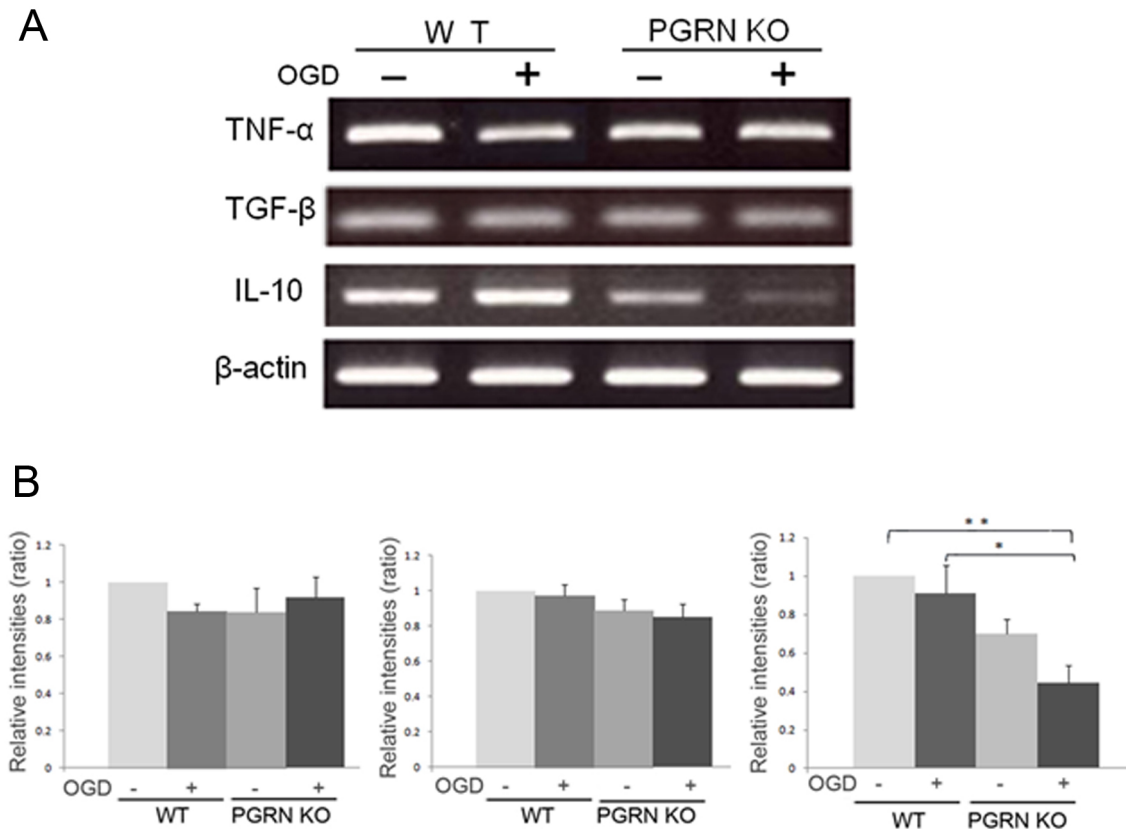


図 4. 野生型および PGRN 欠損マウス由来ミクログリアにおける oxygen-glucose deprivation (OGD) 後のサイトカイン遺伝子発現の比較

A) コントロール群と OGD 群の初代培養ミクログリアにおけるサイトカイン mRNA 量を RT-PCR によって解析した。ローディングコントロールには  $\beta$ -actin を用いた。B) A の結果についてデンストメトリー解析を行った ( $N = 5 \sim 7$ )。データは野生型のコントロールサンプルの mRNA 量を 1 としたときの相対量を表している。 $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ 。

#### 5. PGRN は tPA 併用で脳保護効果を示す

最後に、ラット脳塞栓モデルを用いて、PGRN の tPA との併用効果について検討を行った。このモデルは tPA で再灌流を行い、ヒトの脳梗塞に類似した治療可能時間を有するモデルである。治療可能時間を越えた虚血 4 時間の時点で、t-PA と組み換え PGRN 蛋白を同時に投与すると、脳梗塞、脳浮腫や脳出血合併症は軽減した (図 5A, B, C)。前者は神経細胞保護や炎症抑制による効果、後者は、血管保護によるものと考えられた。さらに、機能予後、生命予後も有意に改善した (図 5D)。



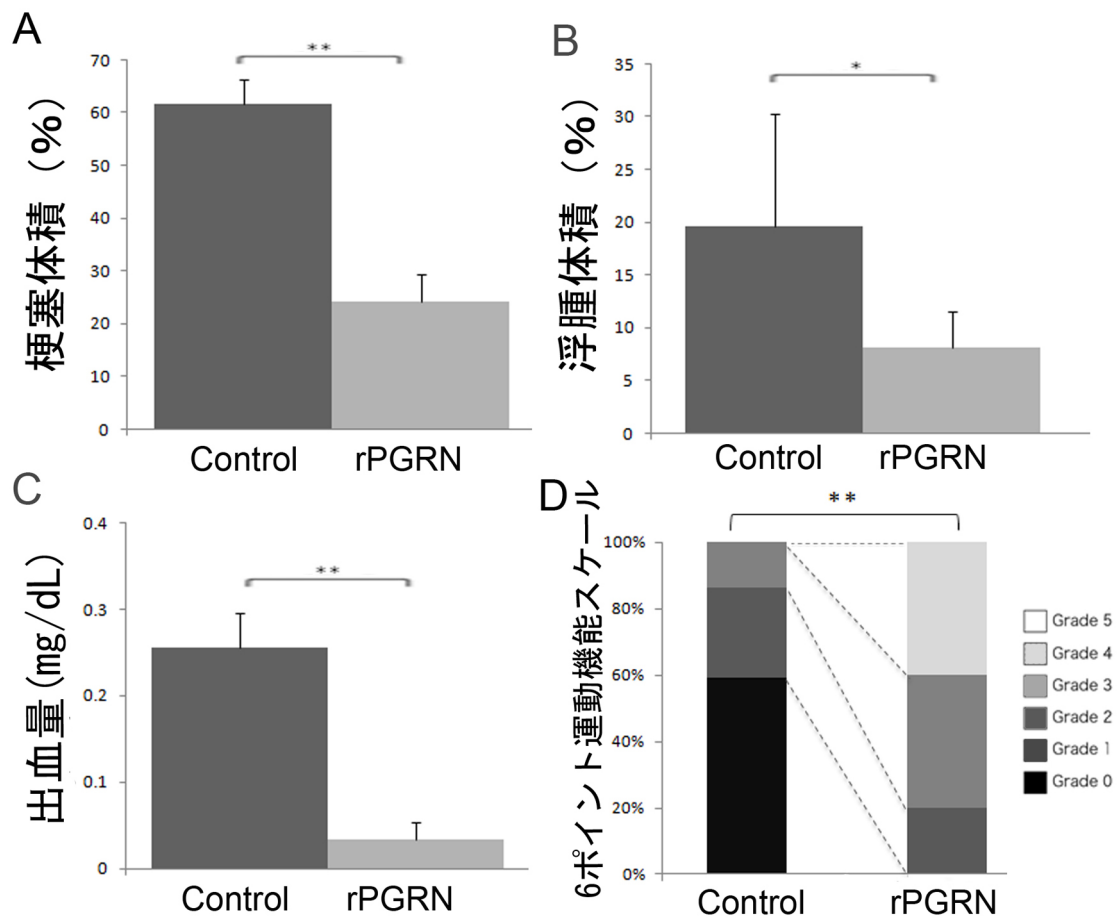


図5. PGRNはtPA併用で、機能予後を改善する

tPAの治療可能時間を越えたtPA投与に組み換えPGRN(rPGRN)を併用することで、対照蛋白と比べて、脳梗塞体積(A)、浮腫体積(B)、出血量(C)を軽減させた。さらに、死亡(Grade0)も含めて、機能予後(D)を有意に改善させた(N=5)。\*P<0.05,\*\*P<0.01.

## 考 察

本研究では、PGRNの発現が脳虚血を引き金に神経細胞、ミクログリア、血管内皮細胞で大きく変化し、核タンパクTDP-43の細胞内異常局在を抑制することによる神経細胞保護効果を持つ可能性、グリア細胞のVEGF産生を抑制することによる血管保護効果、そして、IL-10遺伝子発現を制御することによる抗炎症効果を持つ可能性を示した。すなわち、PGRNは脳梗塞に対し、多面的な保護作用を有すること、さらに脳保護療法を実現する治療標的分子として有望であることを示した。

PGRNは非虚血時、大脳皮質の神経細胞にのみに発現しているが、脳虚血後、虚血中心の辺縁部で経時的にPGRN陽性ミクログリアが増加し、虚血ペナンプラで神経細胞、ミクログリア、血管内皮細胞のPGRNの発現が増加した。また、ウエスタンブロッティングにより、虚血後に完全糖鎖修飾型PGRN(~88kDa)の発現が減少する一方で、虚血中心、虚血ペナンプラ共に、不完全糖鎖修飾型PGRN(58~68kDa)の発現が再灌流72時間後に著しく増加することが分かった。

神経細胞におけるPGRNに関しては、組織が壊死状態にある虚血中心では発現しておらず、再灌流によって改善される虚血ペナンプラで発現が増加していた。また神経細胞を用いたOGD実験では、組換えPGRNを添加することで神経細胞死が有意に抑制されたことから、PGRNが神経細胞保護的に作用する可能性が示唆された。神経変性疾患においても、PGRNの神経栄養因子としての働きは以前から報告されてきたが、その詳しいメカニズムは未だ明らかとなっていない。当研究室では、脳虚血後に核タンパクTDP-43がcaspase-3によって限定分解され、神経細胞のTDP-43異常

局在と細胞死に関与することを報告している<sup>7)</sup>。この caspase-3 の活性化を PGRN が抑制する可能性が報告されていることから<sup>8)</sup>、本研究では PGRN-TDP-43 経路について検討した。虚血中心の神経細胞における PGRN 発現レベルの低下は、TDP-43 の生理機能の欠失を引き起こし、その結果、神経細胞死につながるものと考えられる。PGRN は、PGRN-TDP-43 経路により、神経細胞保護に関わる可能性がある。

健全な血管内皮細胞には PGRN が発現しないが、皮膚損傷部位の肉芽組織の微小血管内皮細胞に PGRN が発現し、血管内皮細胞の増殖と遊走に関与すると考えられている<sup>9)</sup>。この既報から、虚血ペナンプラの血管内皮細胞に発現する PGRN が血管保護に働く可能性を考えた。一方、PGRN 欠損マウスでは、野生型に比して脳虚血後の浮腫が大きいことが明らかとなり、PGRN が血管透過性の調節に関与することが示唆された。この機序については、PGRN 欠損マウスの脳虚血後の VEGF 発現量が野生型に比べて多く、また *in vitro* の OGD 実験で、野生型と比べ PGRN 欠損マイクログリアの VEGF 産生量が多く、さらに、PGRN 欠損マイクログリアの培養上清が、PGRN 欠損アストロサイトの VEGF 産生を相乗的に増加させた。これらの結果から、PGRN がマイクログリアおよびアストロサイトの VEGF 産生を制御することで、脳虚血における血管透過性の抑制に作用する可能性が考えられた。PGRN の発現低下は、脳虚血後に VEGF を増加させることにより、脳浮腫に関与する可能性がある。

また本研究では、虚血再灌流 72 時間後に PGRN 陽性マイクログリアが著増することを明らかにし、虚血後の炎症応答に PGRN が関与している可能性が示唆された。野生型と PGRN 欠損マウス由来マイクログリアの OGD 下におけるサイトカイン遺伝子発現量を比較したところ、抗炎症性サイトカイン IL-10 の mRNA 量が野生型と比べ PGRN 欠損マイクログリアで低下していた。最近、PGRN を過剰発現させたグリア細胞の IL-10 発現量が、野生型と比較して高いことが報告された<sup>4)</sup>。この報告は本研究の結果とも一貫しており、PGRN は IL-10 の遺伝子発現を制御することにより、抗炎症に働く可能性がある。今回、炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  の遺伝子発現量は、野生型と PGRN 欠損マウスで有意な差はみられなかったが、炎症性サイトカインに対する PGRN の関与の有無は引き続き検討が必要である。

以上、本研究において、PGRN は TDP-43、VEGF、IL-10 を介して、神経細胞保護、血管保護、抗炎症という多面的な脳保護作用を有することを示した。PGRN は、脳虚血による複数の病態を同時に改善させる可能性があるという点で、脳梗塞に対する新規治療標的になる可能性が示唆された<sup>10)</sup>。

PGRN 併用の t-PA 療法により、t-PA の治療可能時間は今の 4.5 時間から 6~8 時間に延長し、t-PA 投与の適応可能症例は今の 3 倍ほどになることが期待できる。これにより、脳梗塞の症状改善、さらに寝たきり患者の減少、医療費の抑制に貢献できる可能性がある。産学官連携を通して、この創薬シーズを発展させ、日本発の臨床試験を目指したいと考えている。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、新潟大学脳研究所神経内科の川村邦雄、高橋哲哉、三浦南、小山美咲、鳥谷部真史、西澤正豊、下畑享良、新潟大学脳研究所統合脳機能研究センター五十嵐博中、中田力、東京大学大学院農学生命科学研究科田中良法および西原眞杉である。本稿を終えるにあたり、本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) He Z, Bateman A. Progranulin (granulin-epithelin precursor, PC-cell-derived growth factor, acrogranin) mediates tissue repair and tumorigenesis. *J Mol Med (Berl)*. 2003 Oct;81(10):600-12. Epub 2003 Aug 19. PMID: 12928786. DOI: 10.1007/s00109-003-0474-3.
- 2) Egashira Y, Suzuki Y, Azuma Y, Takagi T, Mishiro K, Sugitani S, et al. The growth factor progranulin attenuates neuronal injury induced by cerebral ischemia-reperfusion through the suppression of neutrophil recruitment. *J Neuroinflammation* 2013; 10: 105. doi: 10.1186/1742-2094-10-105.
- 3) Naphade SB, Kigerl KA, Jakeman LB, Kostyk SK, Popovich PG, Kuret J. Progranulin expression is upregulated after spinal contusion in mice. *Acta Neuropathol* 2010; 119: 123-33. doi: 10.1007/s00401-009-0616-y.
- 4) Tao J, Ji F, Liu B, Zhu Y. Neuroprotective effects of progranulin in ischemic mice. *Brain Res* 2012; 1436: 130-6. doi: 10.1016/j.brainres.2011.11.063.
- 5) Kleinberger G, Wils H, Ponsaerts P, Joris G, Timmermans JP, Van Broeckhoven C, et al. Increased caspase activation and decreased TDP-43 solubility in progranulin knockout cortical cultures. *J Neurochem* 2010; 115: 735-47. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06961.x.
- 6) Baker M, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM, Gass J, Rademakers R, Lindholm C, Snowden J, Adamson J, Sadovnick AD, Rollinson S, Cannon A, Dwosh E, Neary D, Melquist S, Richardson A, Dickson D, Berger Z,

- Eriksen J, Robinson T, Zehr C, Dickey CA, Crook R, McGowan E, Mann D, Boeve B, Feldman H, Hutton M. Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature*. 2006 Aug 24;442(7105):916-9. Epub 2006 Jul 16. PMID: 16862116. DOI: 10.1038/nature05016.
- 7) Kanazawa M, Kakita A, Igarashi H, Takahashi T, Kawamura K, Takahashi H, et al. Biochemical and histopathological alterations in TAR DNA binding protein-43 after acute ischemic stroke in rats. *J Neurochem* 2011; 116: 957-65. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06860.x.
  - 8) 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*. 2007 Sep 26;27(39):10530-4. PMID: 17898224. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3421-07.2007.
  - 9) He Z, Ong CH, Halper J, Bateman A. Progranulin is a mediator of the wound response. *Nat Med*. 2003 Feb; 9(2):225-9. Epub 2003 Jan 13. PMID: 12524533. DOI: 10.1038/nm816.
  - 10) 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*. 2015 Jul;138(Pt 7):1932-48. doi: 10.1093/brain/awv079.