

博士論文（要約）

エストロゲンの神経保護作用における  
プログラニュリンの役割

道家 未央

本博士論文の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5 年以内に出版予定。

性ステロイドホルモンの一種であるエストロゲンは、周生期の脳の性分化や雌性動物の性成熟に関わる一方で、神経保護作用を併せ持つ。例えば、げっ歯類において、外傷性脳障害時に過剰な炎症を抑制する作用や脳梗塞部位を減少させる作用を持つ。また、リポ多糖（LPS）を用いた感染モデルでは神経炎症を抑制すること、成体の脳における神経新生を促進することが知られている。ヒトでもエストロゲンの補充療法でアルツハイマー病の発症リスクを軽減させることが報告されている。エストロゲンは種を超えて多様な神経保護作用を持ち、その機序の解明が求められている。また、エストロゲンは、特に女性において、その生涯で血中濃度がダイナミックに変化する。閉経後はエストロゲンが減少するため、近年にみられる寿命の延長により、女性の生涯において女性ホルモンが減少している期間は増加している。したがって、エストロゲンの神経保護作用の詳細な機序を検討することは、生涯にわたり女性の Quality of Life を向上させることにもつながる。

一方で、当研究室では以前、エストロゲンが持つ脳の性分化誘導作用をプログラニュリン（PGRN）というタンパク質が仲介することを見出した。PGRN は腫瘍形成、創傷治癒、抗炎症など様々な生理作用を有する成長因子で、その産生低下が神経変性疾患の一つである前頭側頭葉変性症を引き起こすなど、神経保護作用が報告されている。当研究室でも PGRN の中枢における神経保護作用を詳細に検討したところ、PGRN は運動による神経新生促進に関与することや外傷性脳障害時に脳内の免疫細胞であるミクログリアの過剰な活性化を抑制することで炎症を抑制していることが明らかになった。これらの知見から、本研究においては PGRN がエストロゲンの神経保護作用にも関与していると仮説を立て、エストロゲンの神経保護作用における PGRN の役割を解明することでエストロゲンの神経保護作用の機序の詳細を明らかにすることを目的とした。

第 1 章では、エストロゲンの神経保護作用の中から神経新生促進作用および抗炎症作用に着目し、この作用に PGRN が関与するかを検討した。まず、神経新生促進作用への PGRN の関与を検討するために、成体雌の野生型（WT）マウスおよび PGRN 欠損（KO）マウスに卵巣除去手術を施し、約 1 週間後にエストロゲン処置をした。神経新生促進作用がみられたエストロゲン処置後 4 時間の条件で、海馬歯状回における細胞増殖マーカー BrdU の陽性細胞数を遺伝子型間で比較した。その結果、WT マウスでのみエストロゲンによる BrdU 陽性細胞数の増加がみられ、エストロゲンの神経新生促進作用への PGRN の関与が示唆された。またこの条件下で、PGRN および神経新生に関わるとの報告がある成長

因子である NGF、BDNF、IGF1、VEGFB の遺伝子発現量を評価した結果、エストロゲン処置群と対照群との間でいずれの遺伝子発現にも有意な差はみられず、本作用に遺伝子発現量の上昇は必須ではないことが示唆された。次に、感染モデルとして LPS を投与したマウスを用い、エストロゲンの抗炎症作用に対する PGRN の役割を検討した。成体雌の WT マウスおよび KO マウスの卵巣を除去し、その 2 週間後にエストロゲン処置をした。24 時間後に LPS もしくは対照群として Saline を投与し、さらに 24 時間後に海馬と視床下部を採材した。それぞれの部位におけるサイトカインや成長因子の遺伝子発現量およびグリオシスの程度を RT-qPCR で評価した。その結果、LPS 投与群において、抗炎症性サイトカインの一種である TGF- $\beta$ 1 の海馬におけるエストロゲン依存的な上昇が WT マウスでのみ認められた。これらの検討から、エストロゲンの神経保護作用の少なくとも一部は PGRN により仲介されていると考えられた。

第 2 章では、PGRN がエストロゲン作用を仲介する機序を追究するため、エストロゲンの作用に共通してみられるエストロゲン受容体に着目し、古典的受容体である  $\alpha$  型エストロゲン受容体 (ER $\alpha$ ) に焦点を当て、その発現を遺伝子型間で評価した。まず、成体雌の WT マウスおよび KO マウスを用い、神経細胞、ミクログリアおよびアストロサイトにおける ER $\alpha$  の発現を免疫組織学的に評価した。その結果、神経細胞およびミクログリアでの ER $\alpha$  の発現には遺伝子型間で差はみられなかったが、アストロサイトにおける ER $\alpha$  は WT でのみ発現しており、遺伝子型間で差がみられた。このことから、PGRN はアストロサイトにおける ER $\alpha$  の発現に関与していることが示唆された。さらに、アストロサイトにおける ER $\alpha$  の発現に対する性別、内因性エストロゲン、性成熟の影響を検討した結果、これらの影響はいずれも認められなかった。次に、PGRN の投与により KO マウスのアストロサイトにおいても ER $\alpha$  が発現するかを調べるため、PGRN の脳室内投与実験を行った。成体雄 KO マウスの側脳室に PGRN もしくは対照群として Saline を投与し、24 時間後に脳を採材してアストロサイトにおける ER $\alpha$  の発現を免疫組織学的に解析した。その結果、PGRN の投与によってもアストロサイトにおける ER $\alpha$  の発現は誘導されなかった。一方で、PGRN によるアストロサイト特異的な ER $\alpha$  の発現機構を詳細に調べるために、新生仔よりアストロサイトを分離、培養したところ、KO マウス由来のものにも ER $\alpha$  の発現みられた。In vitro と in vivo の環境の違いを考慮し、KO マウス由来のミクログリアとアストロサイトを共培養してアストロサイトにおける ER $\alpha$  の発現を解析した結果、この条件下でも KO マウス由来のアストロサイトにおいて ER $\alpha$  が発現していた。これらのことから、KO マウス由来のアストロサイトも ER $\alpha$  の発現能を持っているが、in vivo の環境下では PGRN の欠損より発現が抑制されることが示唆された。

第3章では、エストロゲン投与時のアストロサイトにおける PGRN の役割をさらに追求するため、アストロサイトにおけるエストロゲン応答性を DNA チップにより網羅的に解析し、遺伝子型間で評価した。成体雌の WT マウスおよび KO マウスに卵巣除去手術を施し、その2週間後にエストロゲン処置をした。その72時間後にアストロサイトを分離し、RNA を抽出した。DNA チップにより網羅的に遺伝子発現を評価し、発現に変動があった遺伝子についてパスウェイ解析を行った。その結果、WT でのみエストロゲン応答性が増加していたものは該当なしであったが、減少していたものとしては9つのパスウェイが該当し、その中にサイトカイン-サイトカイン受容体相互作用が含まれていたことから、PGRN はアストロサイトの過剰な炎症反応を抑えることでエストロゲンの神経保護作用の一部を担っていることが示唆された。

本研究により、PGRN はアストロサイトにおける ER $\alpha$  の発現を調節することおよびサイトカインに対する応答性を低下させることで、エストロゲンの神経保護作用を仲介している可能性が示された。多発性硬化症モデルマウスにおいて、エストロゲンはアストロサイトの ER $\alpha$  を介して軸索喪失を抑制することが報告されている。また、エストロゲンは外傷性脳障害時にアストロサイトの過剰な活性化を抑制し、神経保護的に作用することが明らかになっている。これらの知見も、PGRN はアストロサイトにおける ER $\alpha$  を介してエストロゲンの神経保護作用に関与しているという考えを支持している。PGRN は神経細胞やミクログリアでは発現しているが、アストロサイトには発現がみられない。それにも関わらず PGRN がアストロサイトの表現型を変化させていることは興味深い。PGRN は長らく分泌性の成長因子として認識されてきており、当研究室でも以前、PGRN が GSK3 $\beta$  のリン酸化を亢進させることで神経前駆細胞の増殖に関与することを報告した。一方で PGRN の受容体は特定に至っておらず、代わりに Trafficking protein として SORT1、M6PR が候補に挙がっている。しかしながら、本研究で PGRN を成体の KO マウスの脳室内に投与したところ、アストロサイトで ER $\alpha$  は発現しなかった。一方で、*in vitro* での実験により、KO 由来のアストロサイトでも ER $\alpha$  の発現能を有することが示唆され、また同時に *in vivo* での結果との差異の観点から、細胞間の相互作用が ER $\alpha$  の発現に関与する可能性が考えられた。これらのことから、アストロサイトにおける ER $\alpha$  の発現には、神経細胞が関与している可能性を考えた。アストロサイトは神経細胞と接触し、血管からの神経栄養因子運搬に関与することが報告されている。神経細胞が細胞間接触を介してアストロサイトの ER $\alpha$  の発現を誘導しており、その機構に PGRN が関与している可能性が考えられる。

本研究により、PGRN がアストロサイト特異的な ER $\alpha$  の発現に関わっていることが初め

て示され、エストロゲンの神経保護作用における PGRN の新たな作用点が明らかになった。また、本研究では、通常 PGRN を発現しないアストロサイトにおいても PGRN がその性質を制御していることを示した。今後、エストロゲンと PGRN の関係および PGRN とアストロサイトの関係に着目して制御機構を解析していくことで、エストロゲンおよび PGRN が関与する神経疾患に対する新たな治療法の提案が期待できるとともに、女性の Quality of Life の向上へと貢献できると考えられる。