

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 田中 良法

プログラニューリン(PGRN)は 7.5 個のグラニューリンモチーフから構成される分子量約 68.5 kDa の多機能な糖タンパク質である。近年ヒトにおいて、PGRN 遺伝子のハプロ不全による PGRN 産生低下は前頭側頭葉変性症(FTLD)の原因となること、変異型 PGRN 遺伝子のホモ接合により神経セロイドリポフスチン症(NCL)を発症することが報告された。PGRN の産生低下が神経変性を誘起していることが考えられるが、その機構は未だ明らかとなっていない。そこで本研究では PGRN の脳内における神経保護作用について研究を行った。

第 1 章では、神経炎症における PGRN の役割を調べるために、マウスに実験的外傷性脳傷害(TBI)を適用した。その結果、PGRN の発現は TBI 後の神経炎症に伴い増加すること、主要な産生源は CD68 陽性の活性化ミクログリアであることが明らかとなった。次に、活性化ミクログリアの制御における PGRN の役割を調べるために、野生型(WT)マウスと PGRN 遺伝子欠損(KO)マウスの比較を行った。ミクログリアマーカーのうち、Iba1、CD11b の陽性細胞数及び発現量は遺伝子型間で有意な差は認められなかったが、CD68 陽性細胞数及び発現量は PGRN 欠如により増加した。さらに、PGRN 欠如によって TBI 後に TGF β 1-Smad3 シグナルがアストロサイトにおいて亢進し、タンパク質の酸化を反映するカルボニル化タンパク質量や血管新生を反映するラミニンの免疫反応性も増加した。これらの結果は、TBI 後に CD68 陽性ミクログリアで産生された PGRN はミクログリアの過剰な活性化を抑制し、アストログリオシス、酸化ストレス、血管新生などの TGF β 1 により仲介される神経炎症反応を抑制することを示唆している。

第 2 章では、CD68 がリソソーム関連膜タンパク質ファミリーに属するタンパク質であることから、活性化ミクログリアのリソソーム生合成制御における PGRN の役割について検討した。TBI 後のリソソームマーカーである Lamp1 陽性面積とリソソーム関連遺伝子の発現量は PGRN 欠如により増加した。リソソーム生合成は主要調節因子とされる転写因子 TFEB が細胞質から核へ移行することで増加するため、TFEB が核に局在する活性化ミクログリアの数を調べたところ、PGRN 欠如によってその数は増加した。TFEB の核移行はリソソームに局在する mTORC1 の活性低下によって亢進する。そこで、mTORC1 の活性を反映する S6K1 のリン酸化を遺伝子型間で比較したところ、TBI 後の S6K1 のリン酸化は PGRN 欠如によって低下した。さらに、PGRN 欠如により TBI 後の生存神経細胞数は減少し、変

性神経細胞数は増加した。一方で、マウス *Grn* 遺伝子のプロモーター領域には TFEB 結合領域である CLEAR 配列が2つ存在すること、TBI 後に発現増加した PGRN は Lamp1 と共局在することが明らかとなった。これらの結果は、PGRN はリソソーム生合成時に発現増加することを示すとともに、リソソームに局在して mTORC1 を活性化することにより TFEB の核移行を抑制し、活性化ミクログリアにおけるリソソーム生合成を抑制することを示している。これらの機構により PGRN は TBI 後の大脳皮質における神経損傷を抑制することが示唆された。

第3章では、PGRN 欠如に起因して加齢に伴い発現する病態とリソソームとの関係を、10 週齢と 90 週齢の WT と KO マウスを用いて調べた。NCL モデル動物で脆弱性を示すことが知られている視床の後内/外側腹側核(VPM/VPL)では、加齢に伴うリソソーム生合成とグリオーシスが PGRN 欠如によって亢進した。さらに、90 週齢の KO マウスでは VPM/VPL においてオートファジー・リソソーム経路で選択的に分解される p62 の蓄積や、PGRN 欠如型の FTLD で特徴的に観察されることが知られている TDP-43 の細胞質内凝集物が神経細胞において認められた。また、細胞質内に凝集した TDP-43 は p62 と共局在した。さらに、90 週齢の KO マウスでは、リポフスチノーシス、ミエリン形成不全といった NCL 様の病理が観察された。これらの結果は、PGRN の欠如によって加齢に伴うリソソーム機能不全が亢進し、神経炎症の増悪、神経細胞の細胞質における TDP-43 凝集物の形成や NCL 様の病理の発現に関与していることを示唆している。

本研究によって、PGRN は脳傷害や加齢に伴い活性化ミクログリアで発現してリソソーム機能の制御に関与し、神経炎症、TDP-43 の細胞質内蓄積、NCL 様病理を抑制していることが示唆された。リソソームの機能不全は、PGRN 欠如に起因する神経変性疾患に共通の過程である可能性が想定されている。本研究により得られた知見は、神経変性疾患や認知症の発症機構の解明やそれらの予防法、治療法の開発に大きく貢献するもので、学術的、応用的意義は少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。