

網膜再生及び発生における  
プログラニュリンの役割に関する研究

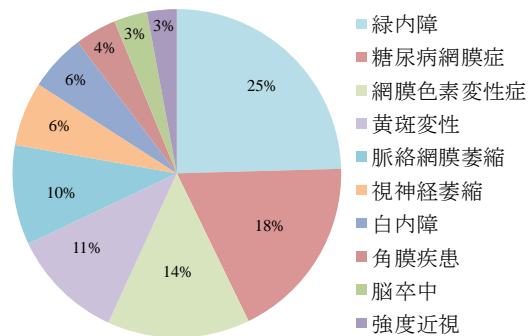
久世 祥己

## 目次

序論	1 頁
第 1 章 プログラニュリンの網膜再生促進作用	7 頁
1 節 緒言	
2 節 実験材料及び方法	
3 節 実験成績	
4 節 考察	
第 2 章 プログラニュリンの網膜発生への関与	26 頁
1 節 緒言	
2 節 実験材料及び方法	
3 節 実験成績	
4 節 考察	
第 3 章 網膜発生に対するミクログリアの関与	61 頁
1 節 緒言	
2 節 実験材料及び方法	
3 節 実験成績	
4 節 考察	
総括及び結論	80 頁
謝辞	83 頁
引用文献	84 頁
略語一覧表	92 頁

## 序論

視覚障害は高齢者で有病率が高く、高齢化が進むにつれ、さらにその障害者数は増加の一途をたどる。2007年の時点で日本には、164万人の視覚障害者、18万人の失明者がいることが推定され、2030年には視覚障害者は200万人にまで増加するといわれている。経済的な視点からも、医療費、介護保険料、研究費などを含めた視覚障害のコストは8兆円といわれ、視覚障害の治療は社会の生産性に貢献すると考えられる（日本眼科医会研究班報告2006～2008）。



日本における中途失明の原因疾患は、緑内障、糖尿病網膜症、網膜色素変性症、加齢黄斑変性症の順に患者数の数は多くなっている (Fig. 1)。中でも加齢黄斑変性症や網膜色素変性症は、視細胞が変性し、視野の一部が欠損する疾患で、近年増加傾向にある。

**Fig. 1 Cause of blindness in Japan.**

日本における視覚障害の原因と現状、日眼会誌 118 巻 6 号より引用

とくに加齢黄斑変性症は欧米において失明原因の第1位を占めており、その治療薬開発には大きな意義がある。加齢黄斑変性症はその病態によって萎縮型と滲出型の2つの種類に分けられている。萎縮型加齢黄斑変性症は加齢に伴い視細胞が不可逆的に変性し、重篤な視野の欠損または失明をもたらす疾患であり、その治療法の確立は、高齢化が進む日本において急務といえるが、未だその治療法、治療薬は存在しない。滲出型加齢黄斑変性症は病的な新生血管の増加により、網膜組織が障害されることを主な特徴とする。近年、レーザー光凝固術や光線力学療法、抗血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) 抗体による治療が行われている。以上のような治療が行われる一方、

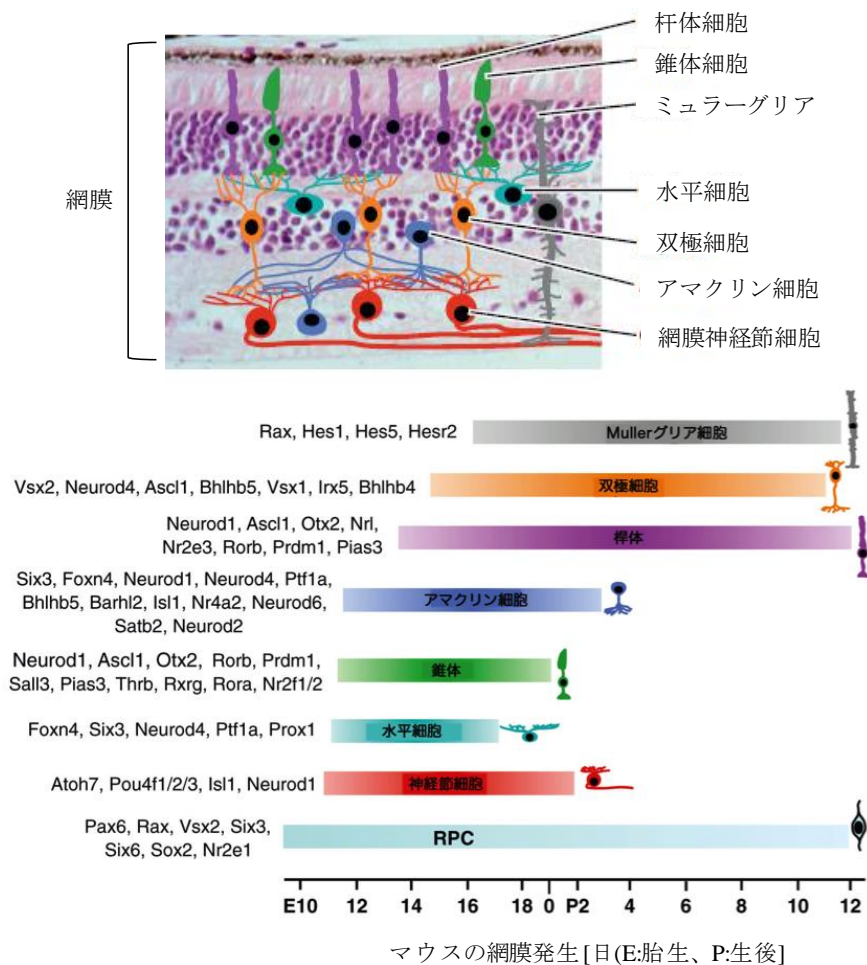
抗 VEGF 薬治療の効果があまり持続せず、再発を繰り返してしまう患者も多く、長期にわたる投与が必要になることや、治療の後に、萎縮型加齢黄斑変性症の特徴とされる地図状萎縮が出現、拡大することが報告されており (1)、未だ解決すべき課題がある。また、萎縮型と滲出型の両者には相互関係があることも、完全な治療が難しい一つの要因である。2017 年 3 月に、人工多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem: iPS) 細胞由来の網膜色素上皮細胞による加齢黄斑変性症の治療を目指した臨床試験結果が報告された (2)。本治療は、滲出型加齢黄斑変性症を対象としたものであり、病的な新生血管を抜去後、加齢黄斑変性症の発症の原因であると考えられている網膜色素上皮細胞の自己シートを移植、置換することにより行われる。現在の対象患者は 5 名であり、すでに 1 名に関しては安全性が確認されている。また自己移植だけでなく、他家移植による検討も現在進められている (3, 4)。これは先進的かつ効果的な治療法であると考えられるが、あくまで網膜色素上皮細胞が置換されるのみで、すでに変性し、失われた視細胞自体を回復させることはできない。疾患の早期診断により、できるだけ患者の視細胞を残したまま網膜色素上皮の置換を行うことにより、網膜を保存することが可能となるため早期診断技術やバイオマーカーの探索は必須であると考えられる。一方、その早期診断の技術と並行して、網膜保護薬の探索もまた必要であると考えられる。現在、基礎研究において様々な網膜神経保護の候補因子が報告されており、それらを標的とした薬剤の臨床試験が実施されている (5, 6)。しかしながら、様々な薬剤候補があるにも関わらず、萎縮型加齢黄斑変性症には未だ治療薬がないのが現状である。

成体哺乳類の中樞神経系には長い間、幹細胞が存在しないと考えられてきたが、1990 年代から限定的であるが神経新生が起きることが報告されている (7, 8)。さらに、2002 年には脳虚血障害に応答して、脳室下帯において内在的な幹

細胞が障害された神経細胞に置き換わり、神経細胞が再生することが示唆された (9)。網膜においては、2004年に初めて、網膜障害後に神経細胞が再生することが報告された (10)。脳とは異なり、網膜においては恒常的な神経新生はほとんど認められず、障害後に生じてくる神経再生も非常に限定的である。近年、網膜に存在する幹細胞源と考えられているミューラグリアの脱分化に焦点を当てて、網膜再生能を有するゼブラフィッシュにおける再生機序の解明が進んでいる (11)。一方、哺乳類における内在性幹細胞を利用した網膜再生の研究は、数種類のシグナルの関与が報告されているものの、あまり進んでいない (12, 13)。内在性幹細胞を利用した網膜再生は、網膜色素上皮の置換では達成できない視細胞の再生が期待できるという利点がある。また、近年研究が進んでいる成熟視細胞移植では神経統合が難しいこと (14) などから、仮に iPS 細胞から視細胞を誘導したとしても、移植した場合の神経統合及び機能回復に障壁があると考えられる点において補えることから大きなメリットがあると言える。実際に、内在的な幹細胞由来の神経細胞は神経統合が起きやすいことが示唆されている (15)。

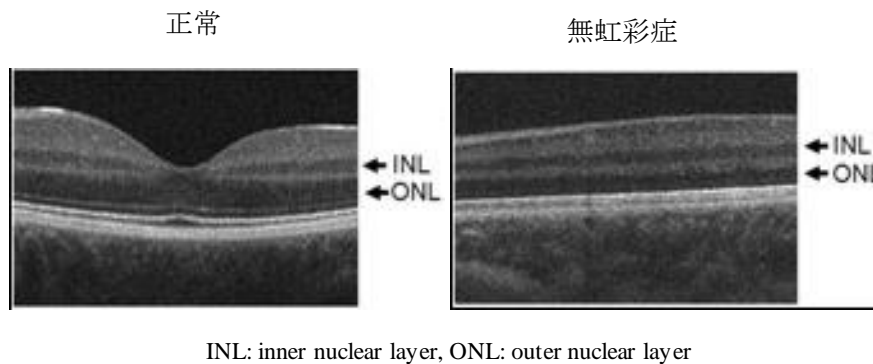
加齢に伴う網膜疾患以外に、小児期に発症する網膜疾患も存在する。中でも、小眼球症は、網膜前駆細胞の増殖や網膜細胞への分化が障害され、眼球全体が小さいだけでなく、角膜、水晶体、網膜・硝子体などの発生異常を伴って起きる。その原因遺伝子として、Retina And Anterior Neural Fold Homeobox (Rax)、Paired box protein 6 (Pax6)、Visual system homeobox 2 (Vsx2)、Orthodenticle homeobox 2 (Otx2) などが同定されている (16–19)。特に Pax6 のハプロ不全は、指定難病の一つであり、幼少期から黄斑低形成、虹彩の欠損を認める無虹彩症にも関与する (20) (Fig. 3)。無虹彩症では、黄斑の中でも特に中心視野に関わる中心窩の欠損や、網膜視細胞の存在する外顆粒層の菲薄化が認められる (21)。

これらの疾患では原因遺伝子は特定されているものの、未だ治療法は確立されていない。網膜発達期には未分化な前駆細胞の増殖や、前駆細胞の遊走、分化、成熟が進み、発現する因子は網膜再生に関与する因子に似ていることから、網膜発達期のメカニズム解明に関する研究は再生にも応用が可能であると考えられる (22)。



**Fig. 2 Retinal morphology and retinal development.**

[Bassett and Wallace, *Trends Neurosci.* 2012、脳科学辞典 (視覚系の発生) より引用]



**Fig. 3 Retina in macula with aniridia observed by optical coherence tomography.**  
 (Gregory-Evans et al. *Prog Retin Eye Res.* 2013 改変)

プログラニューリンは 593 アミノ酸で構成される糖蛋白であり、12 個のシステイン残基から成るモチーフの 7 回半の繰り返し構造と、17 アミノ酸から成るシグナルペプチドを有する (23)。プロテアーゼにより切断を受け、約 6 kDa のグラニューリンとなるが、その活性については不明な点が多い。臨床的な観点から述べると、プログラニューリンは、2006 年にその遺伝子変異が、前頭側頭型認知症 (frontotemporal lobar deneration: FTLD) の病態に関与することが示され (24)、中枢神経系の疾患との関与が初めて報告された。近年では、筋萎縮性側軸索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) の関連遺伝子としても報告されており、これら両疾患には TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) の蓄積が関与している (24, 25)。その他、プログラニューリンはアルツハイマー病との関与も示唆されており (26)、2006 年の FTLD との関与が発見されて以来、様々な中枢神経変性疾患との関連が明らかになりつつある因子である。岐阜薬科大学薬効解析学研究室での報告より、過度の光曝露で網膜を障害した後に脂肪幹細胞 (adipose-derived stem cell: ASC) を投与することにより組織障害、視機能の低下を改善することが明らかにされている (27)。本投与時に ASC の網膜への生着は認められなかったことから、ASC からの分泌因子による、網膜視細胞の保

護、再生作用の可能性が示唆された。また、脂肪幹細胞培養上清 (adipose-derived stem cell-conditioned medium: ASC-CM) 中にプログラニューリンが豊富に含まれていることを見出した (27)。これらのことから、プログラニューリンが視細胞の保護に深く寄与していることが考えられ、実際にプログラニューリンが保護的に働くことを明らかにしている (27)。一方、ASC から分泌された因子 (プログラニューリン) により再生が起きている可能性については未だ明らかにされていない。

本研究は、プログラニューリンの網膜障害後に起きる網膜再生への影響及び網膜発生期における網膜前駆細胞や視細胞分化への役割に焦点を当てて、加齢黄斑変性症モデル、網膜初代培養細胞及びプログラニューリン欠損マウスなどを用いて検討を行った。



## 第1章 プログラニューリンの網膜再生促進作用

### 第1節 緒言

網膜視細胞は視覚のために光を感受する細胞であり、光受容体とも呼ばれる。視細胞により受容された光は電気信号、神経シグナルに変換され、2次ニューロンや神経節細胞を介して脳に伝えられる。光情報を得るために視細胞は不可欠であり、視細胞が変性する萎縮型加齢黄斑変性に対して、視細胞の保護や再生を促す薬剤の開発が切望されている。

幹細胞は、様々な細胞へ分化する能力（多分化能）を有する細胞である。幹細胞の種類としては、胚性幹細胞（embryonic stem cell: ES細胞）やiPS細胞のほか、体性幹細胞の3種類が知られている。近年では、Multi-lineage differentiating Stress Enduring cell (Muse細胞)も発見され(28)、第3の多能性幹細胞として注目を集めている。骨髄由来間葉系幹細胞は体性幹細胞の一種であり、ES細胞やiPS細胞に代わる幹細胞とされ、再生医療に有用であることが示唆されている(29)。神経変性疾患モデルや網膜変性疾患モデルにおいて骨髄幹細胞の移植が神経保護作用を示すことが明らかにされているが(29-31)、網膜内に細胞自体はあまり生着しておらず(30)、間葉系幹細胞から分泌される因子が障害の抑制に寄与している可能性が高いと考えられる。しかし、骨髄幹細胞は採取できる量が非常に限られていることと、採取法の侵襲性が高く身体的負担が大きいなどの問題点がある。そこで骨髄幹細胞に代わる幹細胞源としてASCが注目されている。ASCの採取は侵襲性が少なく、大量に繰り返し採取することができる。体性幹細胞であるため、ES細胞やiPS細胞とは異なり、腫瘍化が起こりにくいという利点もある。

哺乳類において神経細胞は一度障害を受けると、不可逆性の細胞死が起き、増殖・再生は起きないと考えられてきた。しかし近年、哺乳類においてもわず

かながら神経細胞の再生が起きることが示唆されている (10, 13, 32, 33)。網膜では、ミュラーグリアが障害を受けると、一度前駆細胞へと脱分化し、前駆細胞から網膜細胞へと分化していくと考えられている (10, 13)。岐阜薬科大学薬効解析学研究室の報告により、過度の光により網膜を障害した後に ASC を投与することで組織障害、視機能の低下を改善することを明らかにしている (27)。また、序論で述べたように、ASC から主に分泌される因子の一つとしてプログラニューリンを見出し (27)、この因子は視細胞の保護作用だけでなく再生を惹起する可能性が考えられた。

本研究では、再生の観点から、網膜障害モデルにおける脂肪幹細胞培養上清 (ASC-CM) 及びプログラニューリンの作用を検討した。ASC-CM もしくはプログラニューリン投与後の細胞増殖について、各種細胞マーカーを用いることで新生細胞の細胞種を同定を試みた。

## 第2節 実験材料及び方法

### 2-1 実験動物

ddY 及び C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) マウスは、日本エスエルシー株式会社 (Shizuoka, Japan) より購入した。マウスは自由給水下に固形飼料 (CE-2; CLEA Japan, Tokyo, Japan) を用いて飼育した。すべてのマウスは設定温度: 24°C (許容範囲: 22 ~ 26°C)、設定湿度: 55% (許容範囲: 40 ~ 70%)、明暗各 12 時間 (照明: 午前 8:00 ~ 午後 8:00) に維持された岐阜薬科大学動物飼育室で飼育した。マウスはプラスチック製ケージ (縦 24.5 × 横 17.5 × 高さ 12.5 cm) を用い、自由給水下に固形飼料 (CE-2) にて飼育した。実験を行うにあたり、岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会に動物実験承認申請を行い、許可を受けた上で実施した。また、遺伝子組み換え動物の実験を行うにあたり、岐阜薬科大学バイオセーフティ委員会の審査、承認を受けた上で実施した。

### 2-2 実験材料

本実験に用いた薬物及び試薬は、以下の通りである。

Recombinant mouse progranulin は R&D systems (Minneapolis, MN, USA)、トリプシン (trypsin)、塩化カリウム [potassium chloride (KCl)]、塩酸 (HCl)、スクロース (sucrose)、パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde)、コラゲナーゼ (collagenase) は Wako (Osaka, Japan)、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、リン酸二水素カリウム [sodium dihydrogenphosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)]、リン酸水素二ナトリウム・十二水 (sodium hydrogenphosphate 12-water)、リン酸二水素ナトリウム二水和物 (sodium dihydrogenphosphate dehydrate) は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan)、塩化ナトリウム [sodium chloride (NaCl)] は Kishida Chemical (Osaka, Japan)、ペニシリン (penicillin)、ストレプトマイシン (streptomycin) は

Meiji Seika (Tokyo, Japan)、イソフルラン (isoflurane) は Nissan Kagaku (Tokyo, Japan)、Hoechst 33342、ウシ胎仔血清 (fetal bovine serum; FBS) は Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)、5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)、N-methyl-N-nitrosourea (MNU)、Mouse on Mouse (M.O.M.) Blocking Reagent, M.O.M. protein concentrate、Normal Goat Serum、Normal Horse Serum は Vector Labs (Burlingame, CA, USA)、フルオロマウント (Fluoromount) は Diagnostic Bio Systems (Pleasanton, CA, USA)、Triton X-100 は Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)、O.C.T compound は Sakura Finetek Japan (Tokyo, Japan)よりそれぞれ購入した。

## 2-3 実験方法

### 2-3-1 マウス脂肪幹細胞の単離・培養及び培養上清の調製

薬効解析学研究室にて行った過去の方法 (12) に従って、以下のように脂肪幹細胞の単離、培養、培養上清の調製を行った。脂肪幹細胞は 10 週齢雄性 C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) マウスの皮下より摘出した脂肪組織から単離した。摘出した皮下脂肪組織は phosphate buffered saline (PBS) 中でスカルペル (Feather, Osaka, Japan) を用いて平らになるまで刻み、PBS で 3 回洗浄した。その組織を 0.15% コラゲナーゼ中で 37°C、30 分間振とう溶解させ、その後、コラゲナーゼ反応停止剤として 10% FBS を含む DMEM を加えた。70  $\mu$ m セルストレーナー (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) によって溶解されなかった組織を除去し、1,200 rpm で 5 分間遠心した。この過程で成熟脂肪細胞は脂質を多く含み浮遊してくるが、幹細胞は沈殿する。したがって、遠心後最下層に沈殿している脂肪幹細胞を回収し、培養を行った。

脂肪幹細胞の培養は 10% FBS、100 U/mL ペニシリン及び 100  $\mu$ g/mL ストレプ

トマイシンを添加した DMEM を用いて、37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下にて行った。また、3 日ごとにトリプシン処理による継代を行った。

脂肪幹細胞を 10 cm シャーレ (BD Falcon) に 40,000 細胞/mL になるように播種し、FBS 不含 DMEM で 72 時間培養した。その後上清を回収し、300 rpm で 5 分間遠心ののち 0.22 µm 滅菌フィルター (Millipore, Bedford, MA, USA) を用いて濾過滅菌を行った。脂肪幹細胞培養上清の濃縮は、アミコンウルトラ-15 (Millipore) (分画分子量 3,000) を用いて行った。

### 2-3-2 *In vivo* マウス網膜障害モデルによる検討

#### 2-3-2-1 *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) 誘発網膜障害モデル

過去の報告において、本モデルを用いて再生の評価が行われていたため、それに準じて下記方法により試験を行った (32)。マウスに MNU 60 mg/kg を腹腔内投与し、同時に BrdU 50 mg/kg も腹腔内投与した。その後、150 倍に濃縮した ASC-CM 2 µL を硝子体内投与した。投与の際、マウスは 3%イソフルラン麻酔下で実験台に固定し、1.5%イソフルランで維持をした。障害から、2 日目、4 日目にも BrdU と ASC-CM を同様に投与した。溶媒投与群には MNU の代わりに PBS、ASC-CM の代わりに 150 倍に濃縮した DMEM を投与した。

#### 2-3-2-2 光誘発網膜障害モデル

加齢黄斑変性症などの病態の進行には光の暴露が関与することが知られており、光誘発網膜障害が加齢黄斑変性症や網膜色素変性症のモデルとして使用されている (34–36)。マウスを 24 時間完全な暗室で飼育し暗順応させた。光照射 30 分前に 1%シクロペントレート [Santen Pharmaceutical Co., Ltd. (Osaka, Japan)] により散瞳させた後、鏡張りの光障害モデル作製装置の中で午前 9 時

より白色蛍光灯 (Toshiba, Tokyo, Japan) を用いて、8,000 lx の光環境下で 3 時間マウスを飼育し網膜障害を惹起した。光障害後に、BrdU を 50 mg/kg 腹腔内投与した。その後、暗順応下で硝子体内投与により、プログラニューリン 250 µg/mL を 2 µL 投与した。投与の際、マウスは 3% イソフルラン麻酔下で実験台に固定し、1.5% イソフルランで維持をした。障害後から 24 時間、暗室内で飼育した。障害から、2 日目と 4 日目にも BrdU とプログラニューリンを同様に投与した。溶媒投与群にはプログラニューリンの代わりに PBS を投与した。

### 2-3-3 免疫染色用組織切片作製

障害 5 日後にマウス眼球を摘出し、4% パラホルムアルデヒド含有 0.1 M PB (pH 7.4) にて一晩放置した。ついで 25% スクロース含有 0.1 M PB (pH 7.4) 液に 48 時間放置した。その後、液体窒素を用いて O.C.T. compound により凍結し、薄切するまで -80°C にて保存した。O.C.T. compound によって凍結した眼球を固定し、クリオスタット (Leica, Wetzlar, Hesse, Germany) を用いて、-20°C で厚さ 10 µm の切片を作製し、MAS コーティングされたカバーガラス (Matsunami, Osaka, Japan) に載せ、-80°C で保存した。

### 2-3-4 免疫染色

凍結切片は染色時、-80°C より取り出し、-20°C で 1 時間放置した後、4°C で 1 時間放置し、さらに室温で 2 時間乾燥させた。その後、Super PAP pen (Daido sangyo, Osaka, Japan) にて反応液の流出を防ぐために切片の周囲を囲んだ。BrdU の染色を行う際にはまず、①室温で 2M の HCl 処理を 30 分間行った。続いて、②37°C で 30 分間 0.3% Triton X 処理を行った。さらに③37°C で 10 分間 0.1% トリプシン処理を行った。BrdU 以外の染色を行う際には①-③の行程は行

わなかった。その後、マウス由来の抗体を用いる際には、M.O.M Blocking Reagent により 1 時間ブロッキングした。それ以外の場合は、10% goat serum または horse serum により 1 時間ブロッキングを行った。ブロッキング後、一次抗体 (溶媒 : M.O.M protein concentrate を PBS で希釈またはブロッキング剤) を用いて 4°C で一晩反応させた。その後、二次抗体 (溶媒 : M.O.M protein concentrate を PBS で希釈またはブロッキング剤) によって 1 時間反応させた。続いて、Hoechst 33342 により核染色を行った。染色後、Fluoromount (水溶性封入基材) で封入した。

一次抗体には、rat anti-BrdU antibody [1:200 dilution: Abcam (Cambridge, MA, USA)], mouse anti-rhodopsin antibody [1:1000 dilution: Millipore (Bedford, MA, USA)], rabbit anti-Sox2 antibody (1:100 dilution: Millipore)、mouse anti-GFAP antibody [1:100 dilution: SantaCruz (Dallas, Texas, USA)], rabbit anti-CRX (1:20 dilution: SantaCruz)、rabbit anti-Iba-1 antibody (1:50 dilution: Wako)、rabbit anti-RAX (Rx) antibody (1:300 dilution: Abcam)、mouse anti-Pax6 antibody (1:500 dilution: Abcam) を用いた。二次抗体にはそれぞれ Alexa Fluor<sup>®</sup>546 goat anti-rat IgG、Alexa Fluor<sup>®</sup>488 goat anti-mouse IgG、Alexa Fluor<sup>®</sup>633 goat anti-mouse IgG、Alexa Fluor<sup>®</sup>633 goat anti-rabbit IgG (Thermo Scientific) を用いた。また、ネガティブコントロールとして、一次抗体を除いたコントロールを用いた。

染色した切片は共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FLUOVIEW FV10i; Olympus, Tokyo, Japan) を用いて撮影した。視神経から 500  $\mu\text{m}$  の位置、211.968  $\mu\text{m}$ ×211.968  $\mu\text{m}$  の範囲を撮影した。撮影範囲に含まれる BrdU 陽性細胞数及び rhodopsin と BrdU の二重陽性細胞数をカウントし定量した。それを単位長さ当たり (/mm) の数として算出した。

#### 2-4 統計学的解析

実験成績は平均値±標準誤差で示した。統計学的な比較は、SPSS (IBM, Armonk, NY, USA) を用いて Student's *t*-test により行った。危険率が 5%未満を有意差有りとした。

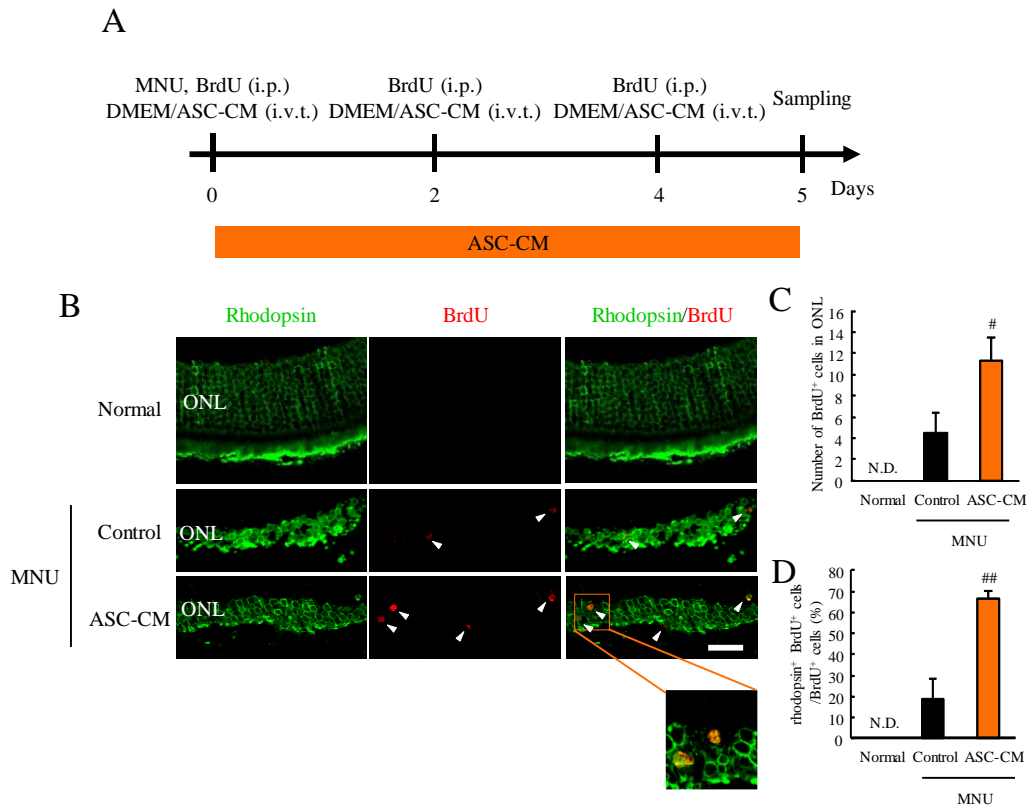


### 第3節 実験成績

#### 3-1 MNU 誘発網膜障害に対する ASC-CM の作用

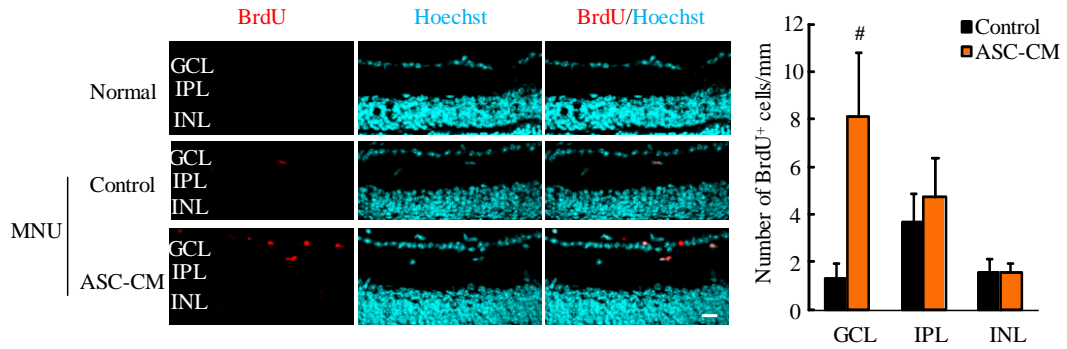
本研究では MNU 誘発網膜障害モデルを作製し検討した。本学薬効解析学研究室において、MNU は視細胞特異的に酸化ストレスを惹起することで細胞死を誘発し、外顆粒層 (outer nuclear layer: ONL) の厚みを減少させることを明らかにしている (37)。MNU 誘発網膜障害モデルは網膜再生の評価系としても用いられており (32)、本研究でも同様に、ASC-CM の再生作用について、MNU 投与後に ASC-CM を投与することにより検討を行った (Fig. 4A)。MNU による障害から 5 日後において、vehicle 群では増殖細胞のマーカーである BrdU 陽性細胞数がわずかに認められた (Fig. 4B)。MNU による障害後に ASC-CM を投与することにより vehicle 群と比べ、ONL における BrdU 陽性細胞数の有意な増加が認められた (Fig. 4C)。また、BrdU と視細胞のマーカーである rhodopsin との共染色により、BrdU と rhodopsin の二重陽性細胞数が ASC-CM 投与群において増加していることが明らかとなった (Fig. 4D)。

また、上記検討では、本モデルが視細胞特異的に細胞死を引き起こすモデルであるため、視細胞の存在する外顆粒層に着目したが、他の網膜層における増殖細胞についても検討した。脂肪幹細胞培養上清は、網膜神経節細胞の存在している層である神経節細胞層 (ganglion cell layer: GCL) における BrdU 陽性細胞数を増加させた (Fig. 5)。一方、内網状層 (inner plexiform layer: IPL) や内顆粒層 (inner nuclear layer: INL) における BrdU 陽性細胞数に変化は認められなかった。



**Fig. 4 ASC-CM promotes retinal photoreceptor differentiation after MNU-induced retinal damage.**

(A) Experimental procedure. Mice are injected MNU and BrdU by intraperitoneal (i.p.) injection. After that, mice are treated vehicle (DMEM) or ASC-CM by intravitreal (i.v.t.) injection. In 2 and 4 days after MNU treatment, mice are similarly treated vehicle or ASC-CM. In 5 days, mice eyes are enucleated. (B-D) The typical images of immunostaining show rhodopsin (green) and BrdU (red). BrdU positive cell is not observed in normal group in ONL. Some BrdU positive cells are observed in vehicle-treated group (Control) and ASC-CM increase BrdU positive cells in ONL. ASC-CM also increase the rate of BrdU and rhodopsin double positive cells. Data are shown as means  $\pm$  S.E.M. (n = 6). <sup>#</sup>;  $p < 0.05$  and <sup>##</sup>;  $p < 0.01$  vs. control (Student's *t*-test). Scale bar = 20  $\mu$ m. ONL: outer nuclear layer.



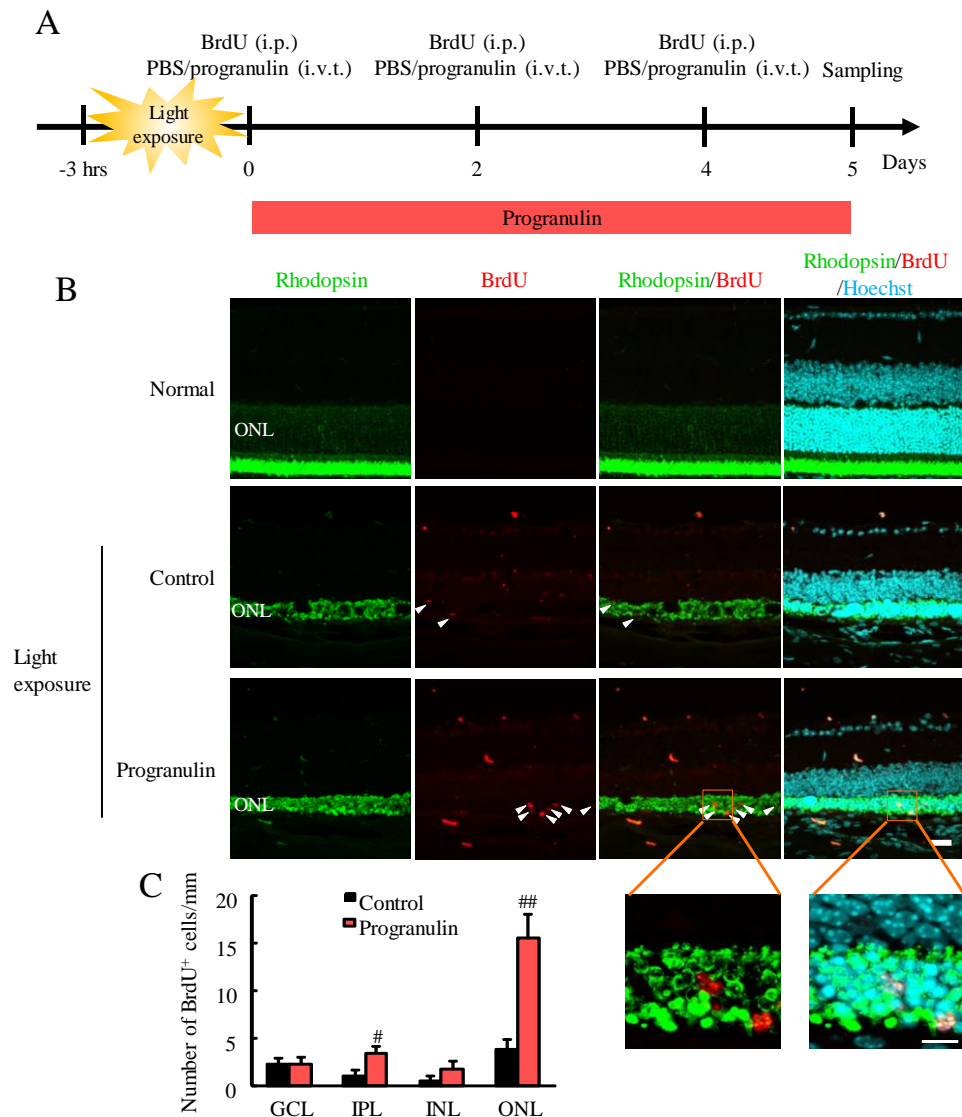
**Fig. 5 ASC-CM promotes the number of proliferative cells in GCL after MNU-induced retinal damage.**

ASC-CM increase BrdU positive cells in GCL as well as ONL. ASC-CM does not increase BrdU positive cells in IPL and INL. Data are shown as means  $\pm$  S.E.M. ( $n = 6$ ). <sup>#</sup>;  $p < 0.05$  vs. control (Student's  $t$ -test). Scale bar = 20  $\mu$ m. GCL: ganglion cell layer, IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer.

### 3-2 光誘発網膜障害後のプログラニュリンの作用

#### 3-2-1 光誘発網膜障害後のプログラニュリンの細胞増殖促進作用

網膜障害後のプログラニュリンの細胞増殖への作用を検討するために、3-1と同様の検討を行った。ここで用いた光誘発網膜障害モデルは、萎縮型加齢黄斑変性症のモデルとして広く使用されている (38, 39)。光障害後に、プログラニュリンを投与することにより vehicle 群と比べ、内網状層 (IPL) 及び外顆粒層 (ONL) における BrdU 陽性細胞数が増加した (Fig. 6B, C)。一方、BrdU 陽性細胞は rhodopsin 陰性であった。

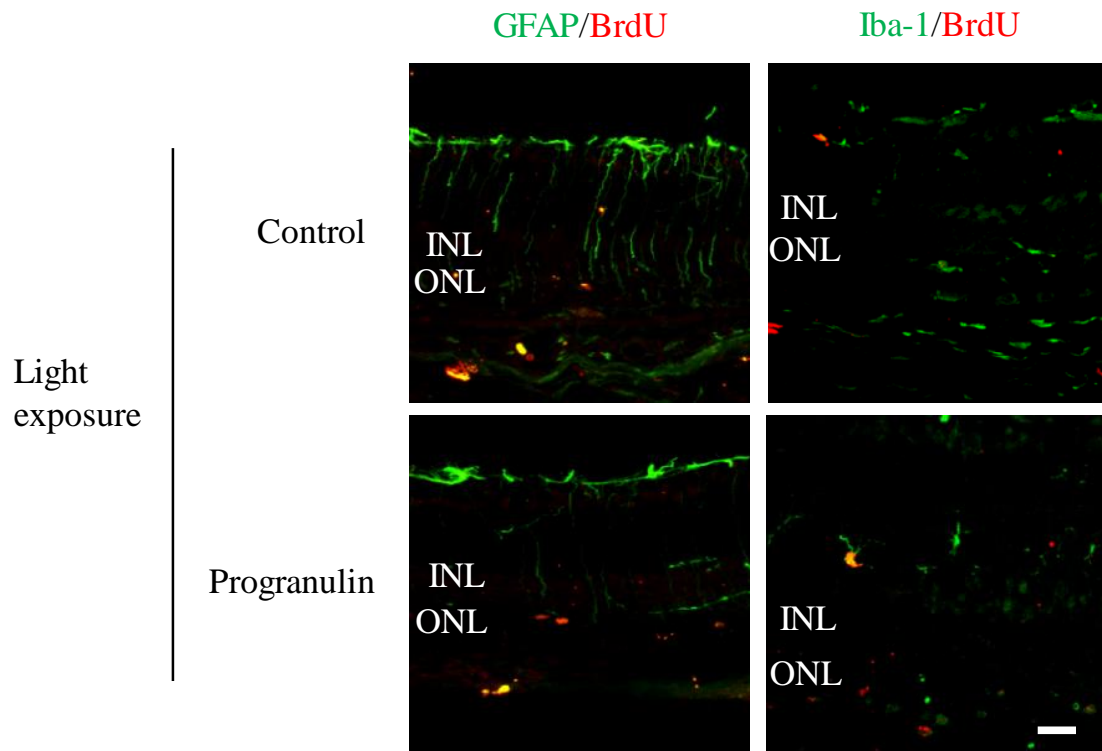


**Fig. 6 Progranulin increases BrdU positive cells after light-induced retinal damage.**

(A) Experimental procedure. Mice are exposed to visible light (8,000 lux) for 3 h. After light exposure, mice are administered BrdU by intraperitoneal (i.p.) injection and mice are treated vehicle (PBS) or progranulin by intravitreal (i.v.t.) injection. In 2 and 4 days after light-induced retinal damage, mice are similarly treated vehicle or progranulin. In 5 days, mice eyes are enucleated. (B, C) The typical images of immunostaining show rhodopsin (green) and BrdU (red). BrdU positive cell is not observed in normal group. Some BrdU positive cells are observed in vehicle-treated group (Control) and progranulin increases BrdU positive cells specially in ONL. Data are shown as means  $\pm$  S.E.M. ( $n = 9$ ). <sup>#</sup>;  $p < 0.05$  and <sup>##</sup>;  $p < 0.01$  vs. control (Student's  $t$ -test). Scale bar = 20  $\mu$ m. GCL: ganglion cell layer, IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, ONL: outer nuclear layer.

### 3-2-2 グリア細胞のマーカーを用いた検討

網膜障害後のプログランニリンの投与により ONL で増加した BrdU 陽性細胞をより詳細に検証するために、まず最初にグリア細胞のマーカーを用いて検討を行った。Glial fibrillary acidic protein (GFAP) はアストロサイトのマーカー、ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba-1) はミクログリアのマーカーとして用いた。その結果、ONL における BrdU 陽性細胞は、そのいずれのマーカーとも共局在しなかった (Fig. 7)。この結果から、ONL に存在する BrdU 陽性細胞はグリア細胞ではないことが明らかになった。

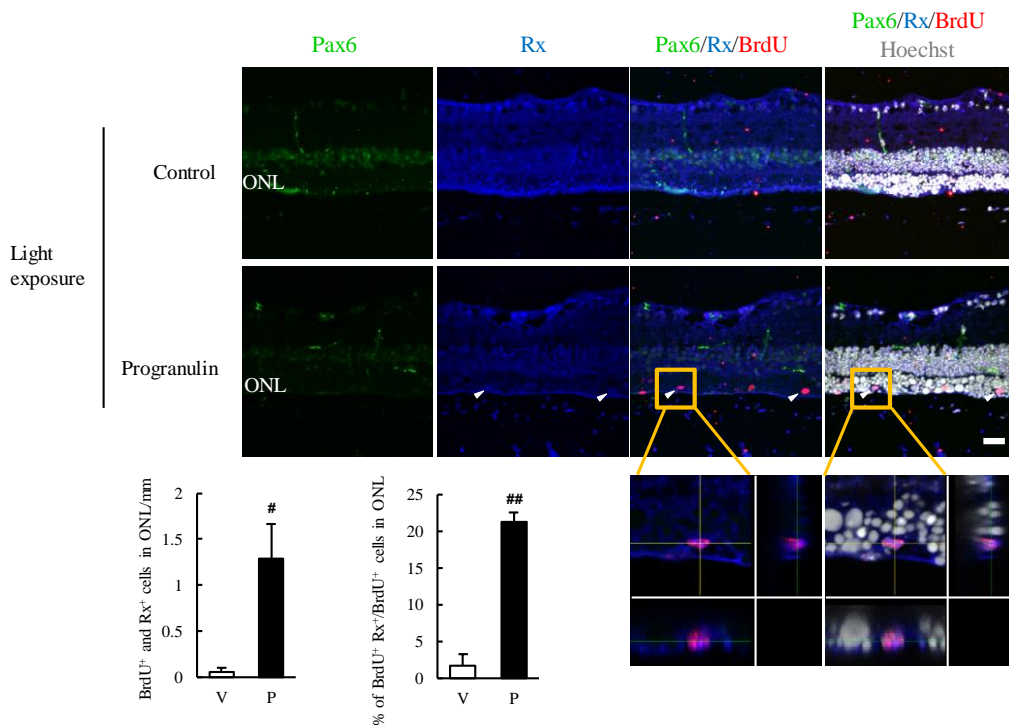


**Fig. 7 BrdU positive cells in ONL are not glial cells.**

(A) GFAP (astrocyte marker) expression (green) is observed in GCL but not ONL. Astrocytes are not BrdU positive in ONL in progranulin-treated group as well as vehicle-treated group. (B) Iba-1 (microglia marker) expression (green) was observed in IPL but not ONL. Microglia is not BrdU positive in ONL in progranulin-treated group as well as vehicle-treated group (Control). Scale bar = 20  $\mu$ m. INL: inner nuclear layer, ONL: outer nuclear layer.

### 3-2-3 網膜前駆細胞のマーカーを用いた検討

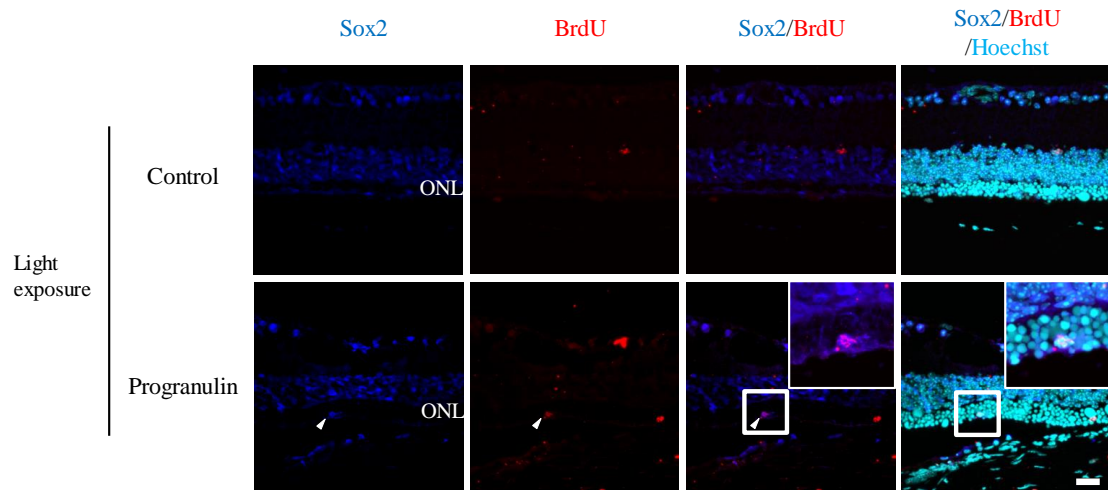
つぎに、網膜前駆細胞のマーカーを用いて検討を行った。Pax6 及び Rx は眼の発達段階において、網膜前駆細胞に必要不可欠であると考えられている転写因子である (40–42)。いずれの因子も網膜前駆細胞のマーカーと見なし、検討を行った。Pax6 は、vehicle 群及びプログラニュリン投与群いずれにおいても ONL 中では検出されなかった (Fig. 8)。また、BrdU 陽性かつ Rx 陽性の細胞は vehicle 群ではほぼ存在しなかったが、プログラニュリン投与群では、わずかではあるが認められた (Fig. 8)。



**Fig. 8 Progranulin increases BrdU and Rx double positive cells after light-induced retinal damage.**

The typical images of immunostaining show Pax6 (green), Rx (blue) and BrdU (red). Progranulin treatment increases the number and ratio of Rx (blue) and BrdU (red) but not Pax6 (green) compared to vehicle-treated group (Control). Rx and BrdU double-positive cells are confirmed by confocal images. Data are shown as means  $\pm$  S.E.M. (n = 5 or 6). <sup>#</sup>;  $p < 0.05$  and <sup>##</sup>;  $p < 0.01$  vs. control (Student's *t*-test). Scale bar = 20  $\mu$ m. ONL: outer nuclear layer.

この結果から、Fig. 2 で増加していた BrdU 陽性細胞の一部は Rx 陽性細胞であることが明らかとなった。また、少数ながら神経系の前駆細胞マーカである sex determining region Y-box 2 (Sox2) と BrdU の二重陽性細胞がプログランユリン投与群では認められた (Fig. 9)。

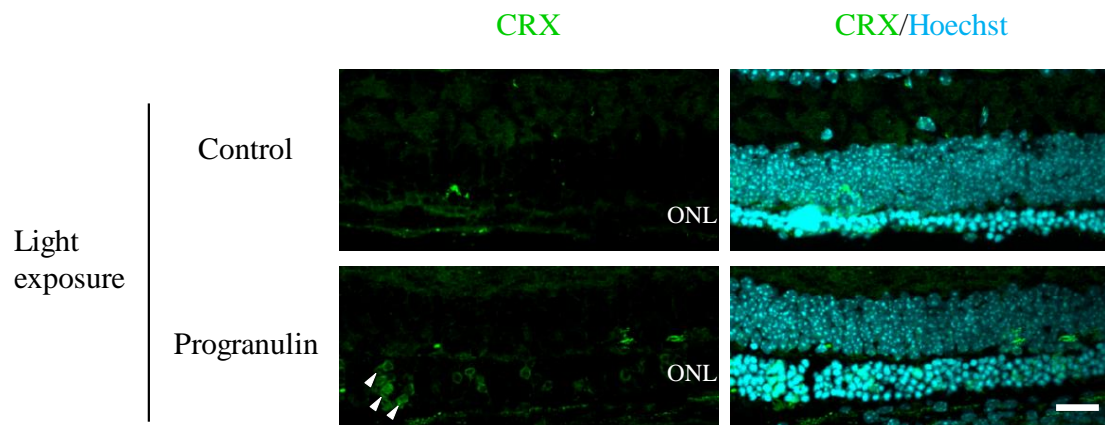


**Fig. 9 Progranulin increases BrdU and Sox2 double positive cells after light-induced retinal damage.**

The typical images of immunostaining show Sox2 (blue), a retinal precursor marker and BrdU (red). Progranulin treatment increased the number of Sox2 (blue) and BrdU (red) double positive cells but not vehicle-treated group (Control). Scale bar = 20  $\mu$ m. ONL: outer nuclear layer.

### 3-2-4 網膜視細胞前駆細胞のマーカーを用いた検討

転写因子である cone rod homeobox (CRX) は前駆細胞から視細胞への最終分化を促すことが知られており、視細胞特異的な遺伝子の発現を制御している (43)。CRX 欠損マウスでは網膜電位の消失が認められたことから、CRX は視細胞の成熟に必須と考えられている (44)。そこで、CRX の発現について検討した。プログラニューリンは、ONL における CRX 陽性の視細胞前駆細胞数を増加させた (Fig. 10)。プログラニューリンの投与によって、rhodopsin 陽性視細胞数に変化は認められなかったものの、視細胞の前駆細胞まで分化が進んでいることが示唆された。



**Fig. 10 Progranulin increases CRX positive cells after light-induced retinal damage.**

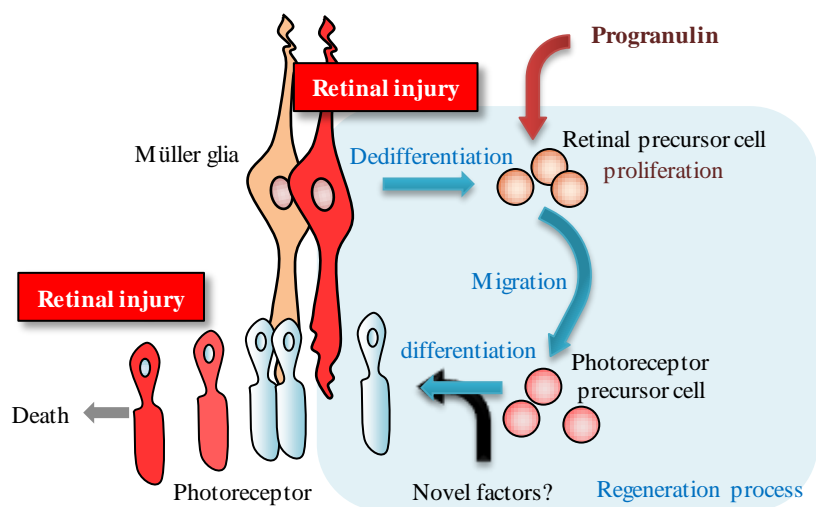
The typical images of immunostaining show CRX (green), a photoreceptor precursor cell marker. Progranulin treatment increases the number of CRX positive cells but not vehicle-treated group (Control). Scale bar = 20  $\mu$ m. ONL: outer nuclear layer.



#### 第4節 考察

本研究は、脂肪幹細胞培養上清 (ASC-CM) 及びプログラニュリンの哺乳類における視細胞の分化・再生における役割について検討することを目的として行った。魚類や鳥類などで網膜障害後にミュラーグリアが脱分化し網膜神経細胞へと分化することが明らかとなっている (11)。近年、成体哺乳類においても網膜障害後に、わずかに網膜細胞が再生することが示唆されているが (10)、このような知見はほとんどなく、神経細胞である網膜細胞は一般的に、それ自身の増殖や分化は起きないと考えられている。一方、*N-methyl-N-nitrosourea* (MNU) による網膜障害後の脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor: BDNF) の投与によりミュラーグリア由来の前駆細胞が増殖し、視細胞などに分化することが報告されている (32)。本研究では、MNU による網膜障害後の ASC-CM の投与により外顆粒層 (ONL) における BrdU 陽性細胞数の増加が認められ、その一部は rhodopsin 陽性細胞であった (Fig. 4)。また、光誘発網膜障害後にプログラニュリンを投与した場合に、ONL における BrdU 陽性細胞数が顕著に増加した (Fig. 6)。BrdU 陽性細胞は、新生した細胞であることから、ASC-CM 及びその中に含まれているプログラニュリンは、網膜障害後に発生した前駆細胞の増殖及び前駆細胞の遊走に関与することが示唆された。ASC-CM の投与では、BrdU 陽性細胞の一部は rhodopsin 陽性であったことから、視細胞として成熟していたと考えられるが、プログラニュリンを投与した場合には、視細胞の存在している層に BrdU 陽性細胞は増加していたものの、それは rhodopsin 陰性であり、一部は Rx と Sox2 陽性の前駆細胞であることが明らかとなった (Fig. 8)。一方、同じく網膜前駆細胞のマーカである Pax6 と BrdU は共局在を示さなかったが、これは Pax6 と Rx、Sox2 の発現する時期の違いのためと考えられる (45)。プログラニュリンは、肝細胞増殖因子 (hepatocyte

growth factor: HGF) 受容体に作用することを本学薬効解析学研究室において見出している (27)。HGF 受容体は筋前駆細胞の増殖や遊走促進作用を有することが報告されているため (46)、プログラニュリンが前駆細胞を ONL まで遊走させている可能性が考えられる。今回の検討において、プログラニュリンのみによる作用で視細胞の完全な再生が起きなかった理由として網膜障害後に発生してくる前駆細胞から視細胞への成熟にはプログラニュリン単体では不十分であることが考えられる。脂肪幹細胞培養上清中には、プログラニュリン以外の様々な因子 (HGF、activin A など) が含まれているため、それらが複合的に働いた結果、脂肪幹細胞培養上清の投与では、新生細胞は視細胞に分化したと考えられる。これは activin A は視細胞分化を促進させる報告に裏付けられている (47)。プログラニュリンは網膜障害後に前駆細胞増殖促進作用により、視細胞前駆細胞数を増加させることが示唆されたが (Fig. 10)、視細胞への分化促進作用は持っておらず、完全な再生には複合的な因子が重要であることが示唆された。一方、BrdU 陽性の増殖細胞の数は、プログラニュリン投与群において、1 切片あたり約 15 細胞であり、切片の厚さなどから概算すると、約 700 細胞/mm<sup>2</sup> である。これは、最近の報告において明らかになった Lin-28 や  $\beta$ -catenin のアデノ随伴ウイルスベクターによる強制発現が誘導した細胞増殖促進作用と同等である (12)。いずれも神経幹細胞の増殖に大きく寄与していることから、プログラニュリンの網膜前駆細胞増殖に対する作用は大きいと考えられる (48, 49)。



**Fig. 11 The effect of progranulin during retinal degeneration and regeneration.**

Photoreceptor cell death is occurred in the pathology of retinal degeneration. Retinal injury induces the limited dedifferentiation of Müller glia and proliferation of retinal precursor cells. Progranulin increases the proliferation of retinal precursor cells and the number of photoreceptor precursor cells but not mature photoreceptor cells. Novel factors should be needed for the differentiation of photoreceptor cells.

中枢神経系におけるプログラニューリンの作用は、明らかとなっていない部分が多く、網膜における報告は特に少ない。本研究により、プログラニューリンが網膜障害後の網膜前駆細胞増殖を促進し、網膜再生に寄与することが示唆された (Fig. 11)。本章での研究で、プログラニューリンの網膜再生への関与が示唆されたため、網膜細胞の増殖あるいは分化に作用があると考え、第2章では、網膜発生期における作用について検討した。

## 第2章 プログラニュリンの網膜発生への関与

### 第1節 緒言

網膜の大きな役割の一つは、光を感受することである。網膜に入った光は、網膜の外側に存在している光受容細胞である視細胞（杆体細胞、錐体細胞）によって電気信号、神経活動に変換される。この情報は双極細胞などを通じて、網膜神経節細胞（retinal ganglion cell: RGC）へと伝えられ、光情報はさらに脳へと送られる。そのため、脳と網膜をつなぐ RGC 及び光を感受する視細胞は、網膜の光を感受する上で重要と考えられる。RGC は神経網膜の内側に位置し、視神経を通じて脳の外側膝状体や上丘に、その軸索を投射している。グリア細胞の一つであるアストロサイトは網膜において、RGC の近傍に存在し、視神経においてもアストロサイトを含めたグリア細胞（オリゴデンドロサイト、ミクログリア）が軸索周囲に存在し、視神経を支持している。発達期において、アストロサイト前駆細胞は RGC の軸索を視神経に投射するための誘導をすることや、RGC のシナプスの形成に重要であることが報告されている (50)。一方、RGC より分泌される血小板由来成長因子 A やソニック・ヘッジホッグは、アストロサイト前駆細胞の遊走や増殖を促すことが報告されている (50-52)。以上のように、RGC とアストロサイトは相互作用する。

近年になって、老齢のプログラニュリン欠損マウス網膜において、RGC 数の減少が起きることが報告された (53, 54)。一方、プログラニュリン欠損下で若齢の成体マウス網膜や、発達期マウス網膜がどのように変化しているのかについては明らかになっていない。また、プログラニュリンは発生期において中枢神経系に豊富に存在すると報告されているが (55)、その作用についてほとんど明らかにされていない。*In vitro* 培養細胞系においてプログラニュリンによる神経細胞分化促進作用が示されているものの、*in vivo* においてそれを示した報告

や網膜における分化への関与の報告は全くない (56)。そこで本研究では、網膜発達期におけるプログラニュリンの網膜視細胞への分化に対する作用並びに網膜神経節細胞及びその近傍に位置するアストロサイトに対する作用を検討した。

## 第2節 実験材料及び方法

### 2-1 実験動物

妊娠 ddY マウスは日本エスエルシー株式会社より、プログラニューリン遺伝子を欠損したマウスは理研バイオリソースセンターより購入した。マウスはプラスチック製ケージ (縦 24.5 × 横 17.5 × 高さ 12.5 cm) を用い、自由給水下に固形飼料 (CE-2; CLEA Japan, Tokyo, Japan) を用いて飼育した。また、実験には、雄性の野生型、ヘテロ欠損型、ホモ欠損型のマウス (8-12 週齢のマウス及び生後 1、9 日目の仔マウス) を用いた。すべてのマウスは設定温度: 24°C (許容範囲: 22 ~ 26°C)、設定湿度: 55% (許容範囲: 40 ~ 70%)、明暗各 12 時間 (照明: 午前 8:00 ~ 午後 8:00) に維持された岐阜薬科大学本学動物飼育室または三田洞学舎の動物飼育舎で飼育した。実験を行うにあたっては、岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会に動物実験承認申請を行い、許可を受けた上で実施した。また、遺伝子組み換え動物の実験を行うにあたり、岐阜薬科大学バイオセーフティ委員会の審査、承認を受けた上で実施した。

### 2-2 プログラニューリン欠損マウスのジェノタイプピング

成体マウスの遺伝子型の同定のために、生後 4~6 週齢のマウスの尻尾を先端から 5 mm 切り、以下に用いた。また、仔マウスの尻尾は断首による安楽死後に採取した。Cell Lysis Solution (25 mM Tris-HCl pH 8.0、10 mM EDTA pH 8.0、1% SDS) 及び Proteinase K により溶解した。その後 7.5 M 酢酸アンモニウム溶液によりタンパク質を除去し、2-プロパノール、70%エタノールにより DNA を抽出し、以下の配列のプライマーを用いて PCR を行い、マウス遺伝子型を同定した。

PGRN (forward) : 5'-CATGTGACTGATGACTGTCC-3'

PGRN (reverse) : 5'-GAGCAAGACGCTTTTGCTTG-3'

Neo-30 : 5'-ttctatgccttcttgacgagttcttctga-3'

増幅反応は TAKARA PCR Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> Gradient (タカラバイオ株式会社, Shiga, Japan) を用いて 30 サイクル行った。1 サイクルの構成は DNA 変性: 94°C 30 秒、アニーリング: 60°C 30 秒、エクステンション: 72°C 60 秒とした。

### 2-3 薬物及び試薬

本実験に用いた薬物及び試薬は、以下の通りである。

Recombinant mouse progranulin は R&D systems (Minneapolis, MN, USA)、SU11274 (MET 阻害剤: (3Z)-N-(3-chlorophenyl)-3-[[3,5-dimethyl-4-(4-methylpiperazine-1-carbonyl)-1H-pyrrol-2-yl]methylidene]-N-methyl-2-oxo-1H-indole-5-sulfonamide)、protease inhibitor cocktail、phosphatase inhibitor cocktail II、phosphatase inhibitor cocktail III、Igepal CA-630、デオキシリボヌクレアーゼ I (Deoxyribonuclease I from bovine pancreas)、Poly-D-lysine hydrobromide、オボムコイド (Trypsin inhibitor from chicken egg white)、ヘマトキシリン液 (hematoxylin solution)、エオジン液 (eosin solution) は Merck Millipore (Billerica, MA, USA)、トリプシン (trypsin)、塩化カリウム [potassium chloride (KCl)]、塩酸 (HCl)、スクロース (sucrose)、エタノール (ethanol)、パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde)、コラゲナーゼ (collagenase)、パパイイン、Sample Buffer Solution (2ME+) (x4)、メタノール (methanol)、イムノスター<sup>®</sup>LD、デオキシコール酸ナトリウム (sodium deoxycholate)、ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate: SDS)、ドデシ

ル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル [sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel]、6-アミノヘキサノ酸 (6-aminohexanoic acid) は Wako (Osaka, Japan)、リン酸二水素カリウム [sodium dihydrogenphosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )]、リン酸水素二ナトリウム・十二水 (sodium hydrogenphosphate 12-water)、リン酸二水素ナトリウム二水和物 (sodium dihydrogenphosphate dehydrate)、Blocking One-P は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan)、塩化ナトリウム [sodium chloride ( $\text{NaCl}$ )]、L-システイン(L-cystein) は Kishida Chemical (Osaka, Japan)、Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)、Hoechst 33342、Neurobasal medium、BCA protein assay kit は Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)、ペニシリン (penicillin)、ストレプトマイシン (streptomycin) は Meiji Seika (Tokyo, Japan)、Tris-Buffered Saline (TBS) は タカラバイオ株式会社 (Shiga, Japan)、Mouse on Mouse (M.O.M.) Blocking Reagent, M.O.M. protein concentrate、Normal Goat Serum、Normal Horse Serum は Vector Labs (Burlingame, CA, USA)、フルオロマウント (Fluoromount) は Diagnostic Bio Systems (Pleasanton, CA, USA)、proteinase K solution は Qiagen (Duesseldorf, Germany)、Can get signal solution 1、Can get signal solution 2 は Toyobo (Osaka, Japan)、トリス塩基 (tris base)、Triton X-100 は Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)、Laminin は CORNING (Bedford, MA, USA)、O.C.T compound、パラフィン (paraffin) は Sakura Finetek Japan (Tokyo, Japan) よりそれぞれ購入した。

## 2-4 実験方法

### 2-4-1 網膜初代培養細胞を用いた検討

薬効解析学研究室における過去の検討 (16) を参考に、生後 8 日目の ddY マウスより網膜を摘出、細胞を単離した。網膜単離後、あらかじめ



Laminin/poly-D-lysine でコーティングしておいたスライドチャンバー (Thermo Scientific) または 12 ウェルプレートに、 $1.0 \times 10^6$  cells/well または  $2.0 \times 10^6$  cells/well の細胞密度で播種した。用いた培地は、Neurobasal medium (Thermo Scientific) [L-glutamin (Nacalai Tesque)、B27 supplement (Thermo Scientific)、100 U/mL ペニシリン (Meiji Seika) 及び 100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシン (Meiji Seika) を含む] とした。その 20 時間後に、培地交換と試薬添加を行った。試薬は、プログラニューリン 500 ng/mL、SU11274 1  $\mu$ M とした。溶媒群は、培地を添加した。網膜単離 3 日目にも同様に培地交換と試薬添加を行った。

#### 2-4-2 細胞免疫染色による評価

網膜初代培養細胞はスライドチャンバー (Thermo Scientific) に  $1.0 \times 10^6$  cells/well の細胞密度で播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で一晩培養した。20 時間後に、培地交換と試薬添加を行った。網膜単離 3 日目にも同様に培地交換と試薬添加を行った。培養から 5 日後に、4%PFA による固定を 15 分間行い、免疫染色を開始した。前処理として、0.2% Triton X-100 含有 PBS を加え室温で 10 分間、50 mM glycine 含有 PBS を加え室温で 15 分間静置した。その後、3% normal goat serum 含有 PBST (0.5% Tween 含有) で 30 分間ブロッキングした。ブロッキング後、一次抗体を用いて 4°C で一晩反応させた。その後、二次抗体にて 1 時間反応させ、Hoechst33342 で 5 分間反応させた。最後に PBS で洗浄後、chamber を取り除き、スライドガラスをマウント剤を用いてカバーガラスで封入した。

用いた 1 次抗体は、mouse anti-rhodopsin antibody (1:1000 dilution; Millipore)、rabbit anti-CRX antibody (1:20 dilution; SantaCruz)、goat anti-DCX antibody (1:20 dilution; SantaCruz)、mouse anti-nestin antibody [1:100 dilution; BD Bioscience (San

Jose, CA, USA)], 二次抗体は、Alexa Fluor<sup>®</sup>546 donkey anti-rabbit IgG、Alexa Fluor<sup>®</sup>488 donkey anti-goat IgG、Alexa Fluor<sup>®</sup>633 goat anti-mouse IgG (Thermo Scientific) とした。

#### 2-4-3 ウェスタンブロットによる評価

網膜初代培養細胞は、12 ウェルプレート中に  $2.0 \times 10^6$  cells/well になるように播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で一晩培養した。培地交換と試薬添加を行い、培養 24 または 48 時間後にサンプリングを行った。サンプリングには protease inhibitor cocktail、phosphatase inhibitor cocktail 2 及び 3 を含む RIPA buffer [50 mM Tris HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、1% Igepal CA-630] を用いた。また、マウスの網膜サンプルの場合には、網膜を摘出し、マイクロチューブの中に入れ、急速凍結した。サンプルはタンパク質抽出まで -80 °C に保存した。タンパク質抽出には上記試薬を 100 µL 用い、ホモジナイザー (Phycostron, Microtec Co., Chiba, Japan) を用いて 30 秒間破碎、均質化した。その後、20 分間氷中に静置させ、12,000 × g、4°C、20 分間遠心分離した。遠心分離した上清を回収し、タンパク質抽出液とした。

SDS ポリアクリルアミドゲルを泳動装置にセットし、容器に泳動用緩衝液 (25 mM Tris、190 mM Glycine、3.5 mM SDS) を入れ、ゲルを取り付けた泳動装置に浸した。泳動装置の中にも泳動用緩衝液を入れた。1 ウェル当りの添加量は分子量マーカーを 5 µL、各サンプルを 10 µL とした。サンプルを添加後、ゲル 1 枚当たり 20 mA で泳動した。泳動後、ゲルを cathode buffer (25 mM Tris、40 mM 6-aminohexanoic acid、20% methanol) に 15 分間浸した。転写膜は、メタノールに 15 秒間浸し、超純水に 15 分間浸した。その後、anode buffer 2 (25 mM tris、20%メタノール) に 20 分間浸した。陽極側から、anode buffer 1 (0.3 M tris、

20%メタノール) に浸したろ紙、anode buffer 2 に浸したろ紙、転写膜、ゲル、cathode buffer に浸したろ紙の順に組み、0.8 mA/cm<sup>2</sup> の条件で転写した。転写後、0.05% Tween 含有 0.01 M TBS でメンブランを洗浄し、Blocking One-P に浸し、30 分間ブロッキングした。0.05% Tween TBS で洗浄後、Can Get Signal Solution 1 で一次抗体を希釈し、4°C で一晩反応させた。0.05% Tween TBS で洗浄後、Can Get Signal Solution 2 で二次抗体を希釈して室温で 1 時間反応させた。0.05% Tween TBS で洗浄した後、イムノスターLD に 5 分間浸した。その後、LAS-4000UVmini (Fujifilm, Tokyo, Japan) を用いて検出した。

一次抗体には、anti-GS antibody (1:1000 dilution; Millipore)、mouse anti-GFAP antibody (1:1000 dilution; SantaCruz)、mouse anti-rhodopsin antibody (1:1000 dilution; Millipore)、mouse anti-MET antibody [1:500 dilution; Cell Signaling Technology (Danvers, MA,Uvc SA)]、mouse anti-β-actin antibody (1:2000 dilution; sigma-aldrich)、rabbit anti-CRX antibody (1:200 dilution; SantaCruz)、rabbit anti-p-MET antibody (1:1000 dilution; CST)、rabbit anti-GAPDH antibody (1:1000 dilution; CST)、sheep anti-progranulin antibody (1:200 dilution; R&D) を用いた。二次抗体には、Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:2000 dilution; Thermo Scientific)、HRP-conjugated goat anti mouse antibody (1:2000 dilution; Thermo Scientific)、HRP-conjugated rabbit anti-sheep IgG (1:2000 dilution; Thermo Scientific) を用いた。

タンパク質の発現強度は、Multi Gauge Ver3.0 (Fujifilm, Tokyo, Japan) を用いて解析した。バンドの強度を数値化し、個々の値を算出した。

#### 2-4-4 免疫染色用組織切片作製

マウス眼球を摘出し、4%パラホルムアルデヒド含有 0.1 M PB (pH 7.4) にて

一晩放置した。その後、25%スクロース含有 0.1 M PB (pH 7.4) 液に移し 48 時間放置した。液体窒素を用いて O.C.T. compound により凍結し、薄切するまで -80°C にて保存した。O.C.T. compound によって凍結した眼球を固定し、クリオスタット (Leica, Wetzlar, Hesse, Germany) を用いて、-20°C で厚さ 10  $\mu$ m の切片を作製し、MAS コーティングされたカバーガラス (Matsunami, Osaka, Japan) に載せ、-80°C で保存した。

#### 2-4-5 免疫染色

凍結切片は染色時、-80°C より取り出し、-20°C で 1 時間放置した後、4°C で 1 時間放置し、さらに室温で 2 時間乾燥させた。その後、Super PAP pen (Daido sangyo, Osaka, Japan) にて反応液の流出を防ぐために切片の周囲を囲んだ。Brn3a の染色を行う際には、37°C で 30 分間 0.3% Triton X 処理を行った後、37°C で 10 分間 0.1% トリプシン処理を行った。Brn3a 以外の抗体を用いた免疫染色を行う際には上記前処理は行わなかった。その後、マウス由来の抗体を用いる際には、M.O.M Blocking Reagent により 1 時間ブロッキングした。それ以外の場合は、10% goat serum または horse serum により 1 時間ブロッキングを行った。ブロッキング後、一次抗体 (溶媒: M.O.M protein concentrate を PBS で希釈またはブロッキング剤) を用いて 4°C で一晩反応させた。その後、二次抗体 (溶媒: M.O.M protein concentrate を PBS で希釈またはブロッキング剤) を 1 時間反応させた。続いて、Hoechst 33342 により核染色を行った。染色後、Fluoromount (水溶性封入基材) で封入した。

一次抗体には、mouse anti-rhodopsin antibody (1:1000 dilution; Millipore)、mouse anti-GS antibody (1:1000 dilution; Millipore)、mouse anti-MBP antibody (1:100 dilution; SantaCruz)、mouse anti-GFAP antibody (1:100 dilution; SantaCruz)、mouse

anti-CC-1 antibody (1:100 dilution; Millipore)、mouse anti-MBP antibody (1:100 dilution; Millipore)、mouse anti-p-NFH antibody (1:1000 dilution; Millipore)、rabbit anti-NFH antibody (1:1000 dilution; Millipore)、rabbit anti-CRX antibody (1:20 dilution; SantaCruz)、rabbit anti-S100 antibody (1:500 dilution; Abcam)、rabbit anti-Iba-1 antibody (1:50 dilution; Wako)、goat anti-Brn3a antibody (1:50 dilution; SantaCruz)、sheep anti-progranulin antibody (1:20 dilution; R&D) を用いた。二次抗体にはそれぞれ Alexa Fluor<sup>®</sup>488 donkey anti-goat IgG、Alexa Fluor<sup>®</sup>488 goat anti-mouse IgG、Alexa Fluor<sup>®</sup>546 goat anti-mouse IgG、Alexa Fluor<sup>®</sup>546 donkey anti-rabbit IgG、Alexa Fluor<sup>®</sup>633 goat anti-mouse IgG、Alexa Fluor<sup>®</sup>647 donkey anti-sheep IgG (Thermo Scientific) を用いた。また、ネガティブコントロールとして、一次抗体を除いたコントロールを用いた。

染色した切片は共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FLUOVIEW FV10i; Olympus, Tokyo, Japan) を用いて撮影した。視神経から 500  $\mu\text{m}$  の位置、211.968  $\mu\text{m}$ ×211.968  $\mu\text{m}$  の範囲を撮影した。撮影範囲に含まれる陽性細胞数をカウントし定量した。それを単位長さ当たり (/mm) の数として算出した。また、輝度の定量を行う際には、網膜は同位置、同範囲において、視神経の冠状切片は全体が入るように撮影を行い、Image J (NIH, Bethesda, MD, USA, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) を用いて測定した。

#### 2-4-4 プログラニューリン欠損マウスの組織学的評価

未処置のマウス眼球を摘出し、4%パラホルムアルデヒド含有 0.1 M phosphate buffer (PB) (pH 7.4) を 2  $\mu\text{L}$  硝子体内投与し、同液にて 24 時間固定した。つぎに 70%エタノール 2 時間、90%エタノール 2 時間、95%エタノール 2 時間、99%エタノール 12 時間、無水エタノール 2 時間 × 2 回、キシレン 2 時間 × 2

回、キシレン 12 時間、融解パラフィン 2 時間 × 2 回、融解パラフィン 12 時間の順に浸透させた。その後、パラフィンにて眼球を包埋し、マイクロトーム (Leica, Tokyo, Japan) を用いて、5  $\mu\text{m}$  の切片を作製し、カバーガラス (Matsunami, Osaka, Japan) に載せ 37°C にて一日乾燥し、室温にて保存した。

#### 2-4-4-1 ヘマトキシリン・エオジン染色

パラフィン切片は、キシレンに浸してパラフィンを洗浄した。つづいて段階的にアルコール濃度を下げた溶液に浸し、蒸留水に浸透した後、ヘマトキシリン液に 2 分間、エオジン液に 8 分間浸して、段階的にアルコールで脱水し、キシレンで透徹しオイキット (AS ONE, Osaka, Japan) を用いて封入した。封入後、キーエンス顕微鏡 (BZ-9000) を用いて撮影した。

#### 2-4-4-2 組織評価

網膜組織の評価はヘマトキシリン・エオジン染色した標本を用いた。各サンプルにつき 3 切片を任意に抽出し、視神経乳頭中心から 240  $\mu\text{m}$  間隔で網膜外顆粒層 (outer nuclear layer: ONL) の厚みを Image J (NIH, Bethesda, MD, USA, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) を使用して測定した。

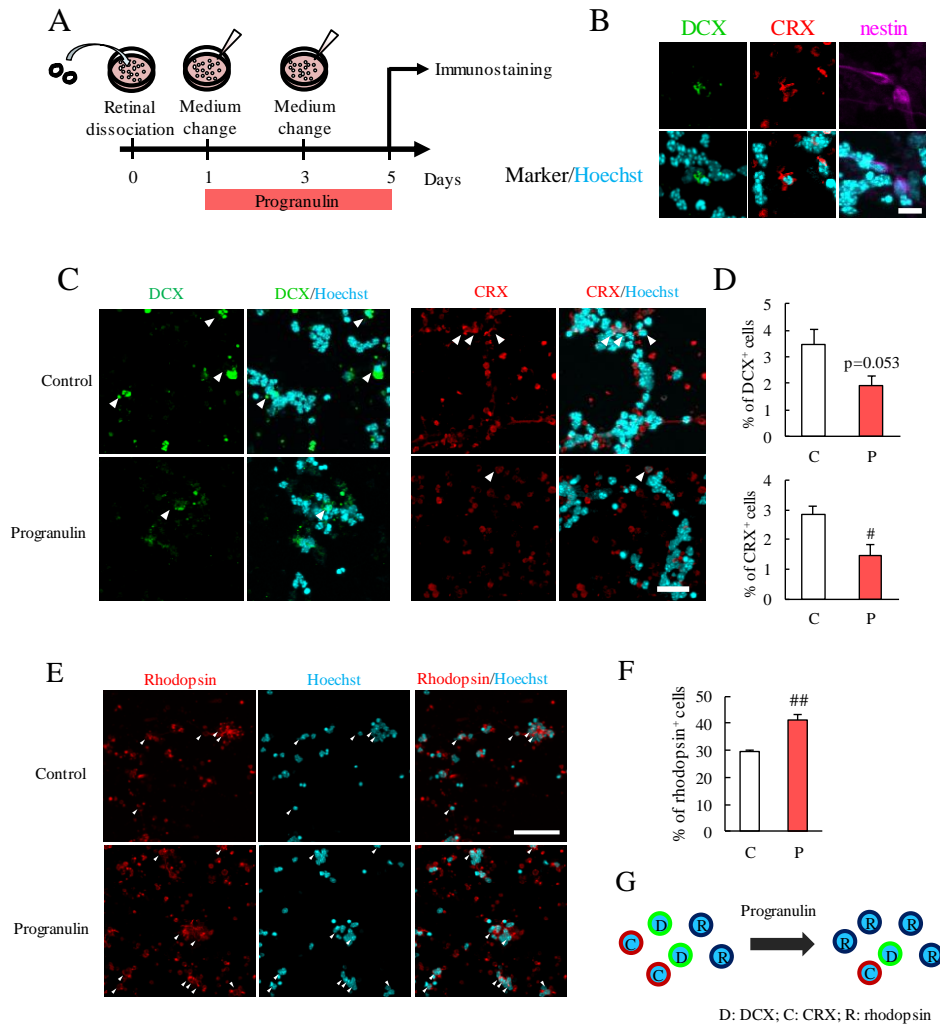
#### 2-5 統計学的解析

実験成績は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。統計学的な比較は、SPSS (IBM, Armonk, NY, USA) を用いて Student's *t*-test により行った。危険率が 5%未満を有意差有りとした。

### 第3節 実験成績

#### 3-1 プログラニューリンの網膜初代培養細胞への作用

本検討では、プログラニューリンの発生期における作用を明らかにするために、生後8日目のマウス網膜初代培養細胞を用いて検討した。まず初めに、網膜初代培養細胞中に網膜前駆細胞のマーカである **double cortin (DCX)**、**nestin** 及び視細胞前駆細胞のマーカである **CRX** が存在していることを確認した (Fig. 12A, B)。網膜単離の1及び3日後にプログラニューリンを添加し、5日後に免疫染色を行った。プログラニューリンの添加により溶媒添加群と比べて **DCX** 及び **CRX** 陽性細胞の数が減少した (Fig. 12C, D)。さらに、プログラニューリン添加群では視細胞のマーカである **rhodopsin** 陽性細胞数が増加していた (Fig. 11E, F)。以上の結果から、プログラニューリンは網膜前駆細胞を網膜視細胞へと分化させる作用を有することが明らかとなった (Fig. 12G)。



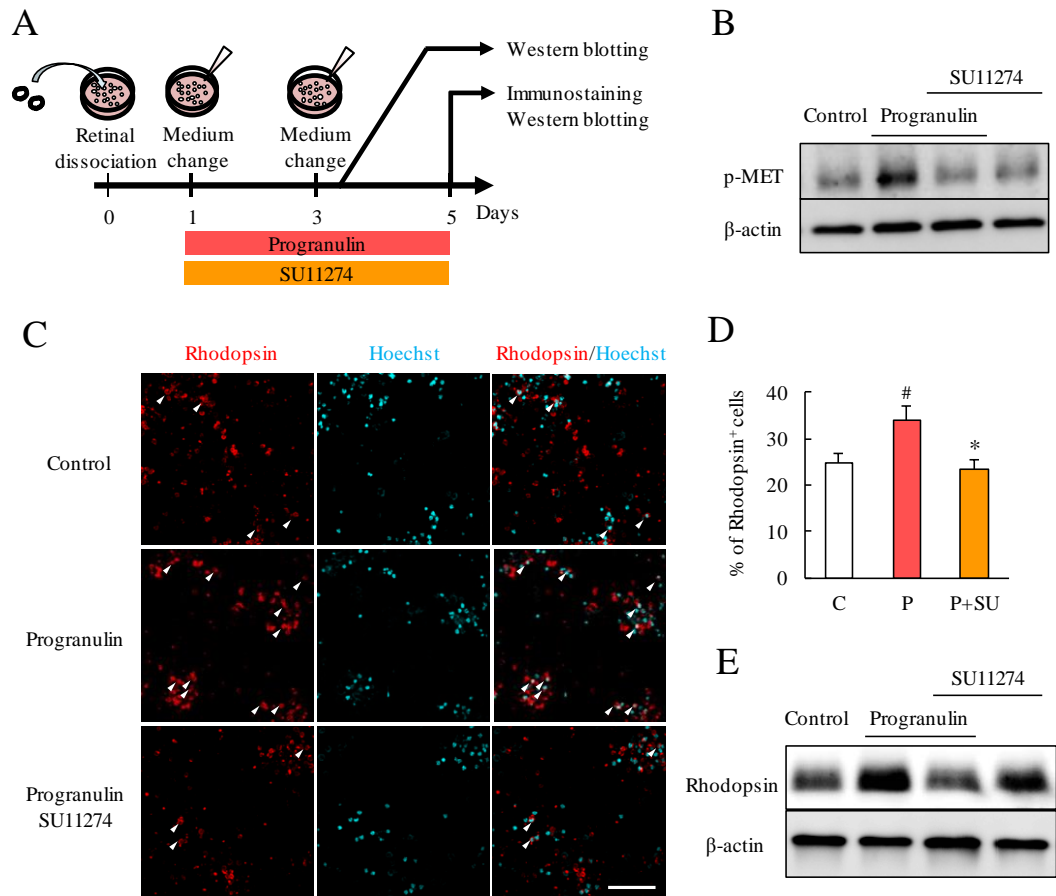
**Fig. 12 Progranulin increases the number of retinal photoreceptor cells in primary retinal cell culture.**

(A) Postnatal 8 day mice eyes are enucleated and the retina is dissected. The medium is changed and vehicle (PBS) or progranulin (500 ng/mL) are added in retinal cell culture in 1 days. In 3 days, reagents are added similarly in the culture. The cells are collected for immunostaining (in 5 days). (B) The precursor cells are confirmed by immunostaining for DCX (neural precursor cells), CRX (photoreceptor precursor cells) and nestin (neural precursor cells) in primary retinal cell culture. The images show DCX (green), CRX (red), nestin (magenta) and Hoechst 33342 (cyan). (C, D) Progranulin decreases DCX positive cells and CRX positive cells compared to control group. (E, F) The typical images of immunostaining show rhodopsin (red) and Hoechst 33342 (cyan). Progranulin increases rhodopsin positive cells in primary retinal cells. (G) Progranulin increases rhodopsin positive photoreceptor cells and decreases retinal precursor cells. Data are shown as means  $\pm$  S.E.M. (n = 3 or 4). #,  $p < 0.05$ , ##,  $p < 0.01$  vs. control (Student's *t*-test). C: Control; P: Progranulin.



### 3-2 プログラニューリンの視細胞分化促進作用機序

ゼブラフィッシュにおいてプログラニューリンのノックダウンにより HGF 受容体の発現が低下することが報告されている (57)。また、本学薬効解析学研究室において、マウス網膜視細胞株にプログラニューリンを添加し、5 分後に HGF 受容体の活性化が認められることを報告している (27)。そこで、プログラニューリンの作用機序の一つとして HGF 受容体の関与が考えられるため、本検討では HGF 受容体の阻害薬である SU11274 を用いて検討を行った。3-1 での検討と同様に網膜単離 1 及び 3 日後に培地交換と試薬添加を行った (Fig. 13A)。プログラニューリンの添加により、HGF 受容体 (MET) のリン酸化が亢進し、SU11274 はそのリン酸化を抑制した (Fig. 13B)。視細胞分化に関しては、プログラニューリンの添加により rhodopsin 陽性細胞数が増加し、SU11274 の添加により、その作用が消失した (Fig. 13C, D)。また、ウェスタンブロットの結果においても、プログラニューリンにより増加した rhodopsin 発現量は、SU11274 の添加により低下した (Fig. 13E)。以上の結果から、プログラニューリンの網膜視細胞分化促進作用は HGF 受容体を介していることが示唆された。

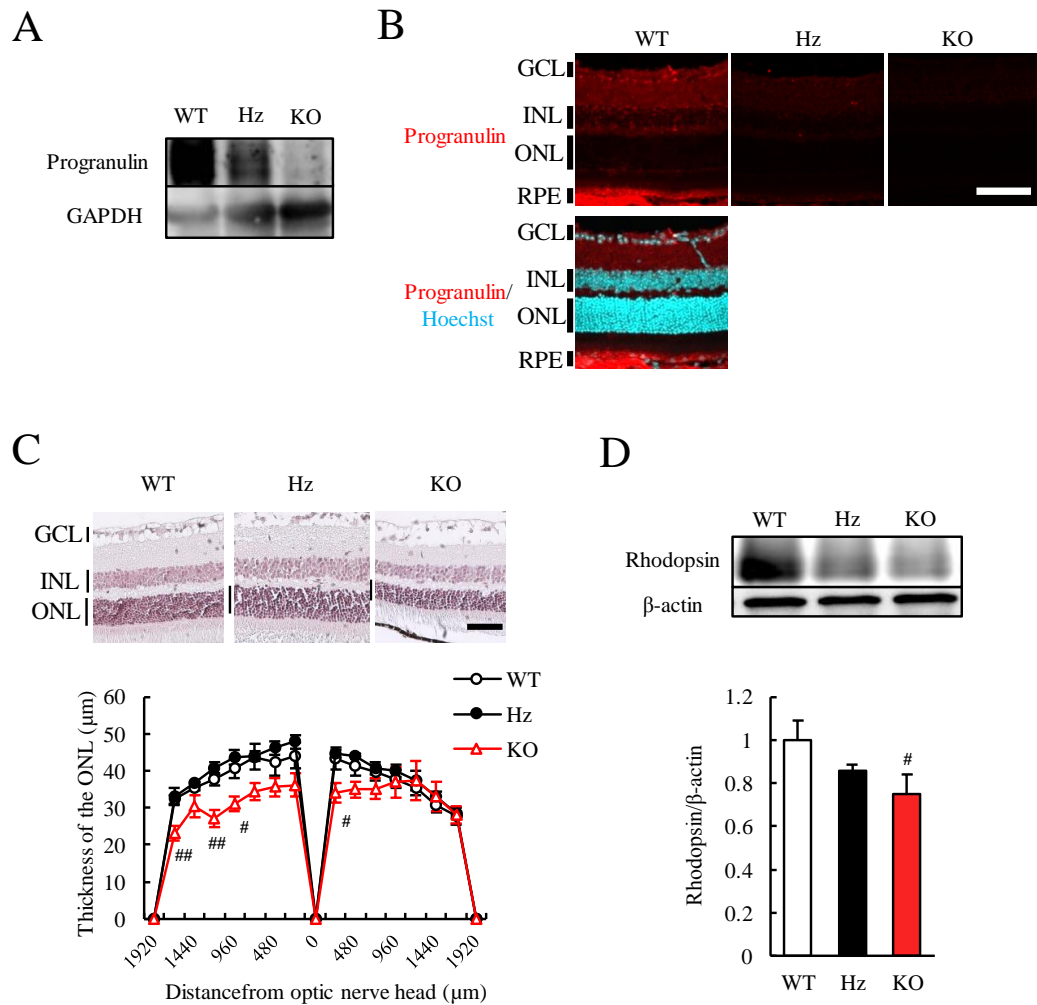


**Fig. 13 SU11274 treatment cancels the differentiation of photoreceptor cells promoted by progranulin.**

(A) After retinal dissociation and incubation, the medium is changed. SU11274 (HGFR inhibitor) 1  $\mu$ M and vehicle (PBS) or progranulin (500 ng/mL) are added in retinal cell culture. In 3 days, reagents are added similarly. The cells are collected for western blotting and for immunostaining in 5 days. (B) Western blotting results show that progranulin increases the phosphorylation of HGF receptor in 3 days. SU11274 suppresses the phosphorylation of HGF receptor by progranulin. (C, D) The typical images of immunostaining show rhodopsin (red) and Hoechst 33342 (cyan) in 5 days. Progranulin increases the rate of rhodopsin positive cells compared to control group. SU11274 cancels the effect of progranulin. (E) Western blotting results show the increase of rhodopsin expression by progranulin treatment. SU11274 suppresses the increase. Only SU11274 treatment does not change rhodopsin expression level. Data are shown as means  $\pm$  S.E.M. (n = 6 or 7). <sup>#</sup>;  $p < 0.05$  vs. control, <sup>\*</sup>;  $p < 0.05$  vs. progranulin (Tukey's test). C: Control; P: Progranulin; SU: SU11274

### 3-3 プログラニューリン欠損マウス網膜外顆粒層の変化

全身的にプログラニューリンを欠損したマウス (58) を用いて、網膜層の変化について検討を行った。ウェスタンブロット及び免疫染色により、プログラニューリン欠損マウスの網膜において、プログラニューリンが欠損していることを確認した (Fig. 14A, B)。野生型マウスとプログラニューリン欠損マウスの網膜層を測定した結果、欠損マウス網膜において視細胞の存在している網膜外顆粒層 (ONL) の厚さが低下していた (Fig. 14C)。また、rhodopsin の発現量がプログラニューリン欠損マウスにおいて低下していた (Fig. 14D)。ヘテロ欠損マウスにおいては、いずれも明らかな変化は認められなかった (Fig. 14C, D)。以上のことから、プログラニューリン欠損マウスの視細胞の発達異常または神経変性により、視細胞数の減少が認められた。

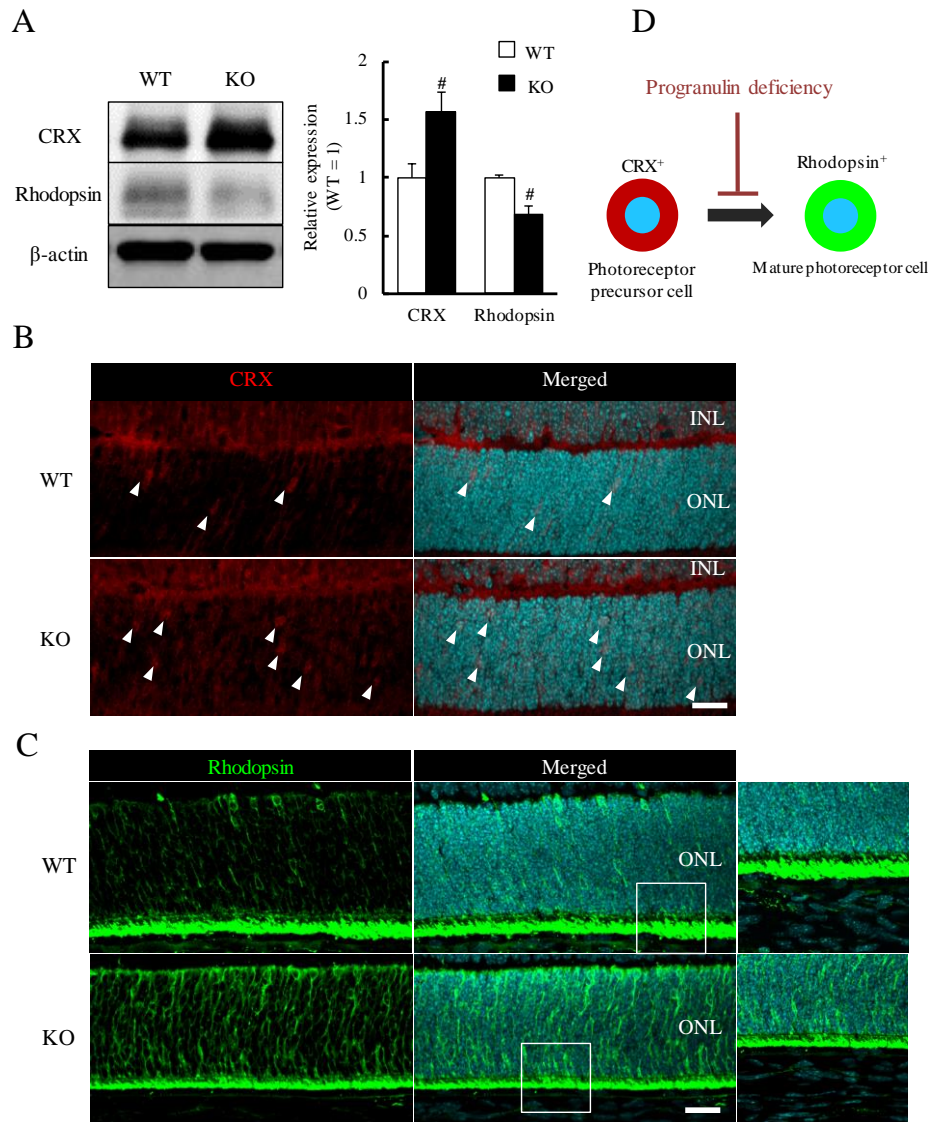


**Fig. 14 Progranulin loss decreases the photoreceptor cells.**

(A, B) The protein expression of progranulin in retina is not observed in  $Gm^{-/-}$  mice. (C, D) ONL thickness is decreased in  $Gm^{-/-}$  mice compared to wild-type mice. Rhodopsin expression is decreased in  $Gm^{-/-}$  mice. Data are shown as means  $\pm$  S.E.M. ( $n = 6$ ). #;  $p < 0.05$  and ##;  $p < 0.01$  vs. WT (Student's  $t$ -test). WT: Wild-type; Hz: Heterozygous; KO: Knockout. GCL: ganglion cell layer, IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, ONL: outer nuclear layer. Scale bar = 50  $\mu$ m.

#### 3-4 プログラニューリン欠損による網膜発達に及ぼす影響

次に、欠損マウスの発達期網膜の分化について検討した。前述 3-1 で生後 8 日目の網膜初代培養細胞へのプログラニューリン添加により視細胞分化促進が認められたことから、ほぼ同時期であると考えられる生後 9 日目において評価を行った。ウェスタンブロットによる結果から、プログラニューリン欠損マウスにおいて視細胞の前駆細胞のマーカである CRX の発現増加、視細胞のマーカである rhodopsin の発現が低下した (Fig. 15A)。また、免疫染色による結果から、視細胞外節の rhodopsin の発現量が減少し、ONL の rhodopsin の発現量が増加した (Fig. 15B, C)。以上の結果から、プログラニューリン欠損により、視細胞の発達障害 (分化障害) が起き、それが成体における外顆粒層の菲薄化につながっていることが示唆された (Fig. 15D)。

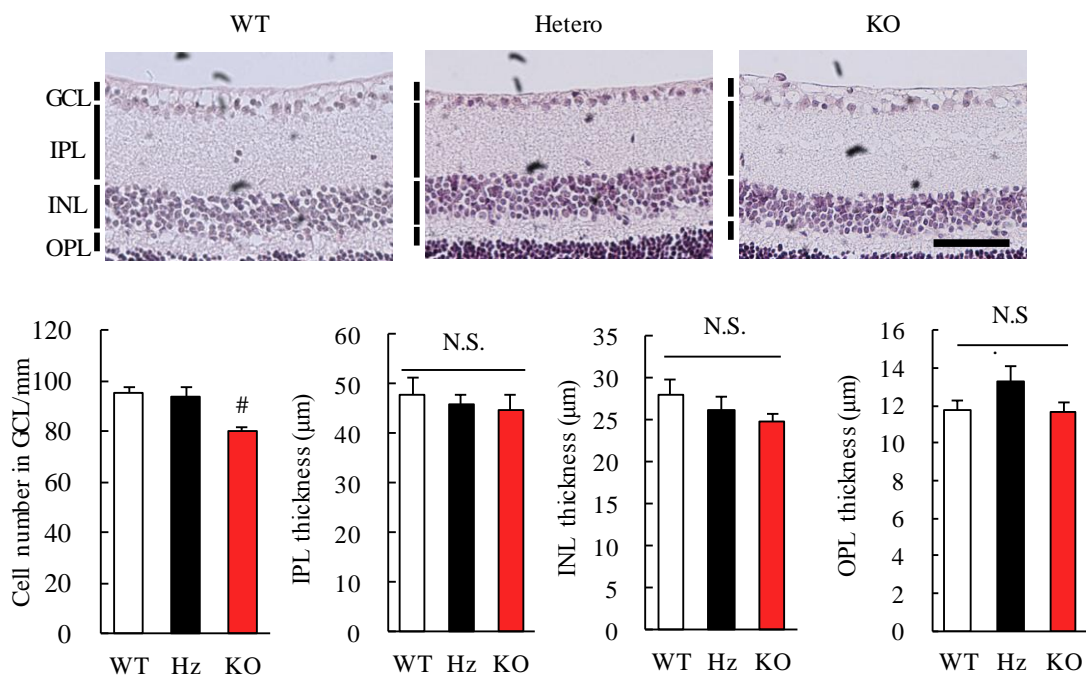


**Fig. 15 Progranulin loss suppresses the differentiation to the photoreceptor cells.**

(A, B) Western blotting results show the expression of photoreceptor precursor cell marker (CRX) and photoreceptor cell marker (rhodopsin) in WT and  $Gm^{-/-}$  mice. The expression of CRX is increased in  $Gm^{-/-}$  mice. The expression of rhodopsin is decreased in  $Gm^{-/-}$  mice. (B, C) The immunostaining data also shows that the expression of CRX is increased and the expression of rhodopsin is decreased in  $Gm^{-/-}$  mice. (D) Progranulin deficiency inhibited the differentiation of retinal photoreceptor cells to mature photoreceptor cells. Data are the means  $\pm$  S.E.M. (n = 3 or 4). <sup>#</sup>;  $p < 0.05$  vs.WT (Student's  $t$ -test). WT: Wild-type; KO: Knock-out. INL: inner nuclear layer, ONL: outer nuclear layer. Scale bar = 20  $\mu$ m.

### 3-5 成体プログラニューリン欠損マウス網膜における組織学的変化

プログラニューリン欠損マウスにおける網膜層の変化として、網膜外顆粒層だけではなく、網膜神経節細胞層 (GCL) に存在する RGC 数も減少した (Fig. 16)。一方、内網状層 (IPL)、内顆粒層 (INL) 及び外網状層 (OPL) には、明らかな変化は認められなかった (Fig. 16)。

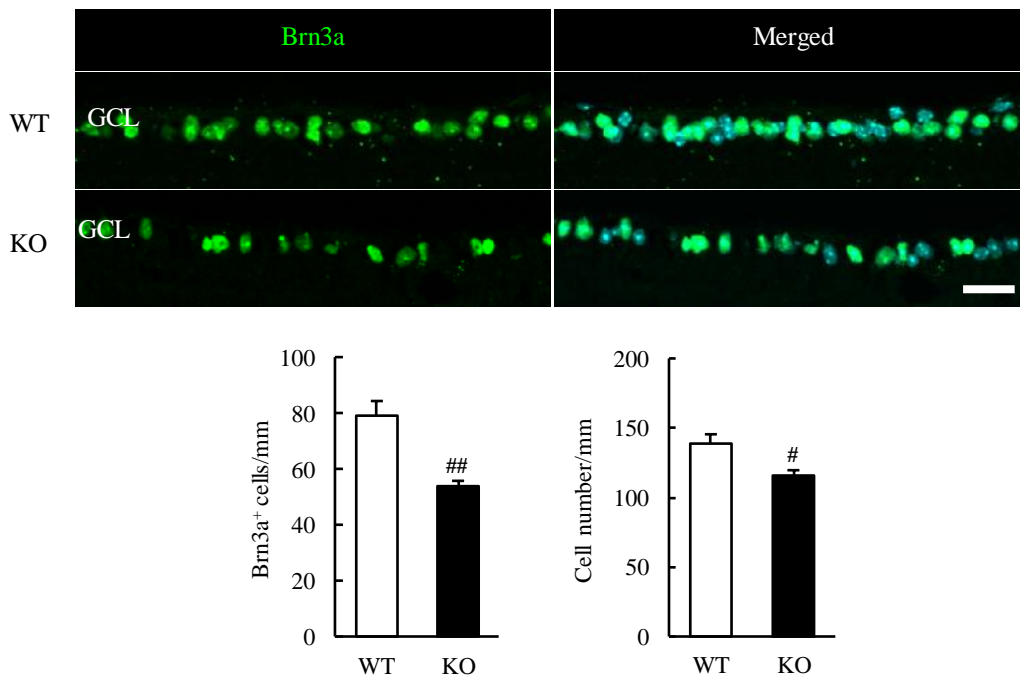


**Fig. 16** The changes in the retinal layer except for ONL in *Grn*<sup>-/-</sup> mice.

Typical images indicate the retinal inner layer in WT, Hz, and KO mice. Quantitative data demonstrates the reduction in cell number of GCL in KO mice compared to WT mice. There is no change in the inner plexiform layer (IPL), inner nuclear layer (INL) or outer plexiform layer (OPL). Data are shown as means  $\pm$  S.E.M. ( $n = 5$  to  $9$ ). #;  $p < 0.05$  vs. WT (Student's  $t$ -test). Scale bar =  $50 \mu\text{m}$ . WT: Wild-type; Hz: Heterozygous; KO: Knockout. GCL: ganglion cell layer, IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, ONL: outer nuclear layer.

### 3-6 成体プログラニューリン欠損マウスにおける組織学的変化

老齢プログラニューリン欠損マウスは、老齢の野生型マウスと比較して RGC の減少が報告されている (53, 54)。一方、若齢の成体マウスにおける RGC の変化については明らかにされていない。そこで、組織評価の結果を元に RGC の減少を確かめるために、その代表的なマーカーである brain-specific homeobox/POU domain protein 3A (Brn3a) を免疫染色により評価した。Brn3a 陽性の RGC 数は、野生型マウスと比較してプログラニューリン欠損マウスにおいて有意に減少した (Fig. 17)。



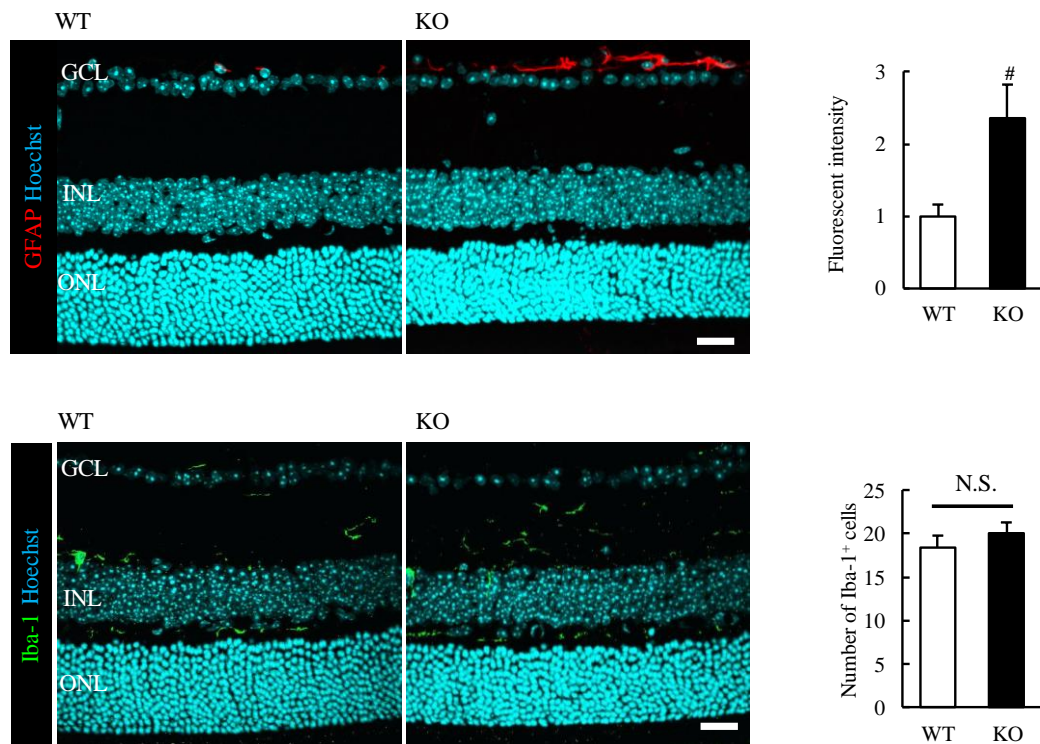
**Fig. 17 The changes of Brn3a positive RGCs in *Grn*<sup>-/-</sup> mice.**

Brn3a staining (green) indicates the RGCs in GCL of wild-type (WT) and *Grn*<sup>-/-</sup> mice. Number of Brn3a<sup>+</sup> cells and total cells are counted in the GCL. The number of Brn3a<sup>+</sup> cells and total cells in the GCL are reduced in *Grn*<sup>-/-</sup> mice. Data are the means  $\pm$  S.E.M. (n = 4 or 5). #;  $p < 0.05$ , ##;  $p < 0.01$  vs. WT (Student's *t*-test). WT: Wild-type; KO: Knock-out. GCL: ganglion cell layer. Scale bar = 20  $\mu$ m.



### 3-7 成体プログラニューリン欠損マウス網膜におけるグリア細胞の変化

第2章の緒言で述べたように、RGCはアストロサイトの近傍に位置していることから、RGCとアストロサイトは相互に関連していることが考えられる。そのため、アストロサイトの活性化を glial fibrillary acidic protein (GFAP) を染色することにより評価した。GFAPの蛍光輝度はプログラニューリン欠損マウスにおいて有意に増加した (Fig. 18)。一方、網膜における ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba-1) 陽性ミクログリア数に明らかな変化は認められなかった (Fig. 18)。

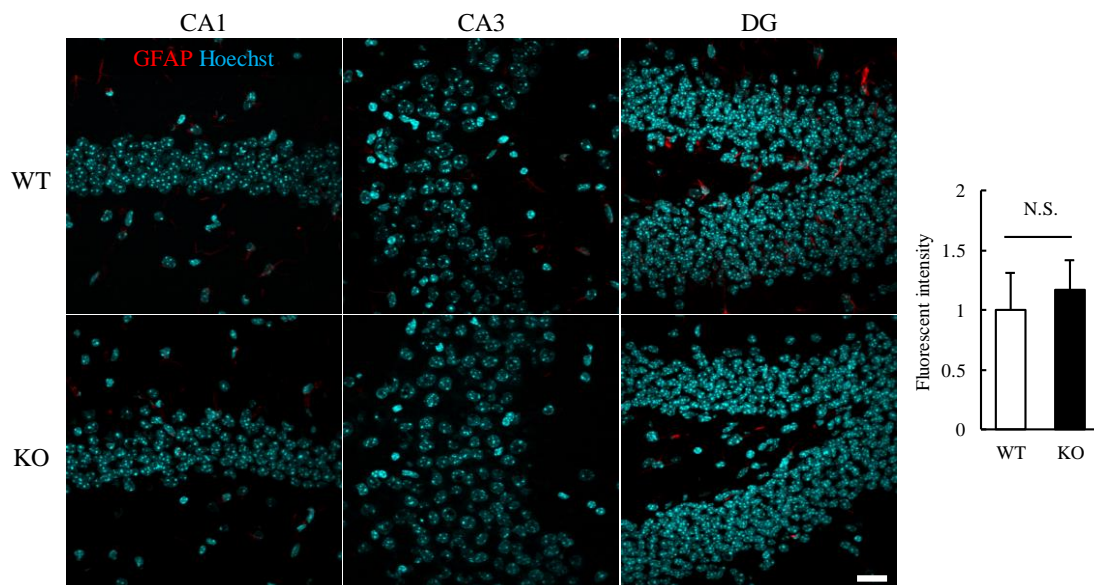


**Fig. 18** The changes of glial cells in *Grn*<sup>-/-</sup> mice.

Typical images show the expression of GFAP (red) in WT and *Grn*<sup>-/-</sup> mice. GFAP expression is almost not observed in WT mice. The fluorescent intensity of GFAP is increased in *Grn*<sup>-/-</sup> mice. Number of Iba-1<sup>+</sup> microglia (green) is not changed between WT and *Grn*<sup>-/-</sup> mice. Data are the means  $\pm$  S.E.M. (n = 4 or 5). <sup>#</sup>;  $p < 0.05$  vs. WT (Student's *t*-test). WT: Wild-type; KO: Knock-out. GCL: ganglion cell layer, INL: inner nuclear layer, ONL: outer nuclear layer. Scale bar = 20  $\mu$ m.

### 3-8 成体プログラニューリン欠損マウス脳におけるアストロサイトの変化

プログラニューリン欠損マウスと野生型マウスを比較すると、脳の海馬における GFAP の発現に明らかな差は認められなかった (Fig. 19)。既報において、プログラニューリン欠損マウス脳においては、加齢に伴い、グリア細胞 (アストロサイト、ミクログリア) の活性化が認められるが、今回用いた週齢 (8-12 週齢) では、グリア細胞の活性化は認められない (24)。すなわち、プログラニューリン欠損下の脳ではアストロサイトの活性化が起きておらず、網膜においてのみ起きていることが考えられる (Fig. 18)。

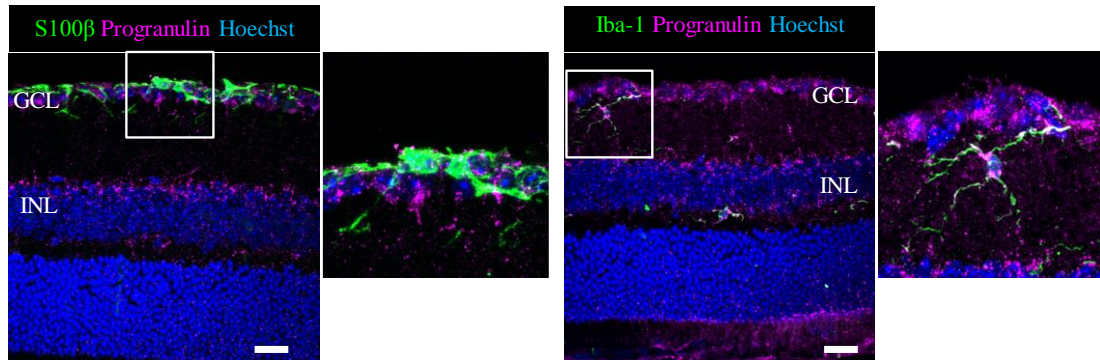


**Fig. 19 No change of GFAP expression in adult *Grn*<sup>-/-</sup> mice hippocampus.**

Typical image of the expression of GFAP in CA1, CA3, and DG of hippocampus. The expression is not changed in *Grn*<sup>-/-</sup> mice. Data are the means ± S.E.M. (n = 4 or 5), Student's *t*-test. WT: Wild-type; KO: Knock-out. CA1: Cornu ammonis 1 area, CA3: Cornu ammonis 3 area, DG: dentate gyrus, Scale bar = 20 μm.

### 3-8 成体マウス網膜におけるプログラニューリンの局在

成体の野生型マウスにおけるプログラニューリンの局在は、脳などの既報と同様に、Iba-1 陽性ミクログリアに主に局在していた (Fig. 20)。また、S100 $\beta$  陽性アストロサイトにも一部局在が認められた (Fig. 20)。



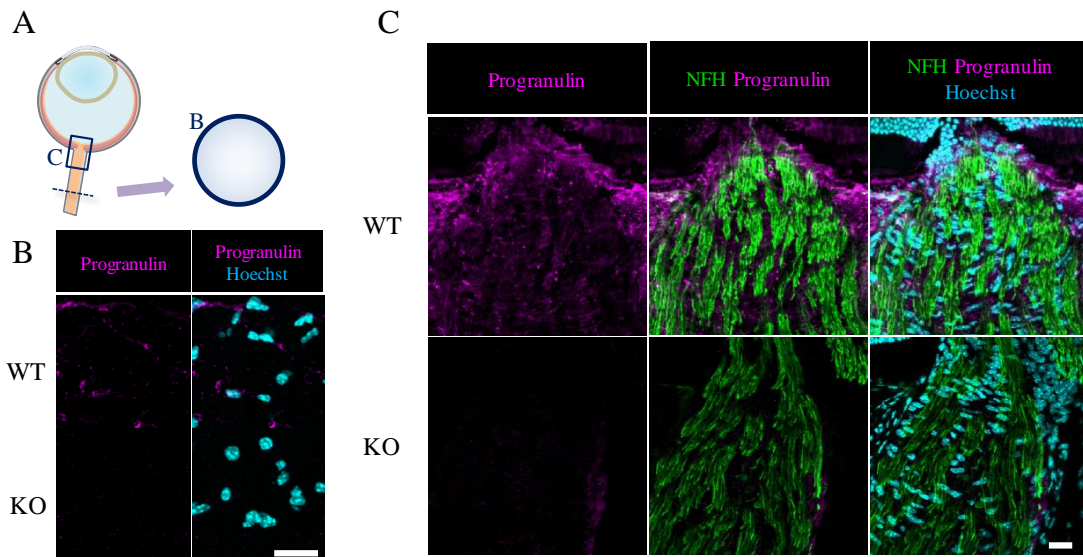
**Fig. 20 Progranulin expression in retina of adult mice.**

Progranulin expression (magenta) is observed around the S100 $\beta$ <sup>+</sup> astrocytes (green) and co-localized with Iba-1<sup>+</sup> microglia (green). GCL: ganglion cell layer, INL: inner nuclear layer.

Scale bar = 20  $\mu$ m.

### 3-9 成体プログランニューリン欠損マウス視神経におけるプログランニューリン発現変化

前述のとおり、網膜からの光刺激を神経活動に変換して脳へと伝えるために、視神経には RGC の軸索が、その周囲にはグリア細胞が存在する。そこで、図 21A に示すように視神経の冠状切片及び網膜・視神経の切片を作製し、評価に用いた (Fig. 21A)。野生型マウス切片では、プログランニューリンの発現が認められ、プログランニューリン欠損マウス切片ではプログランニューリンの明らかな発現は認められなかった (Fig. 21B, C)。

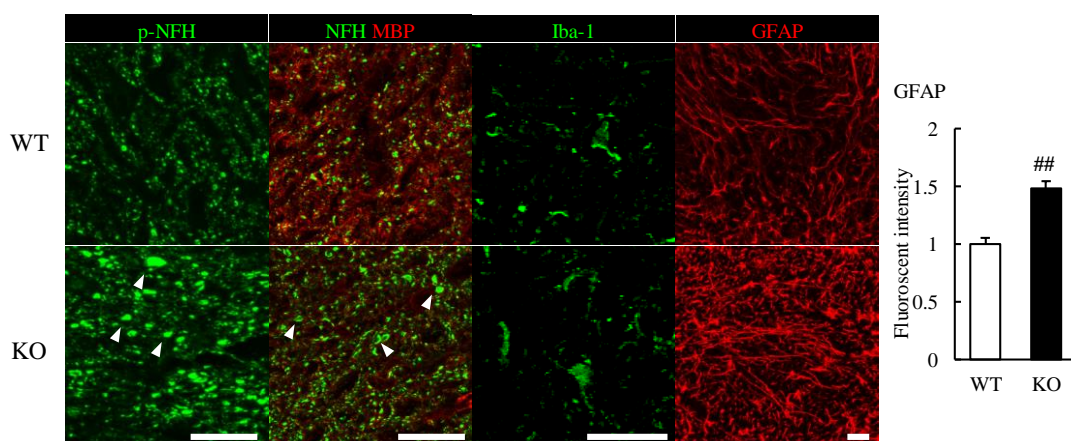


**Fig. 21 Progranulin expression in optic nerve in WT and *Grn*<sup>-/-</sup> mice.**

(A) Preparation of cross sections of optic nerve. (B) Progranulin expression (magenta) is observed in WT optic nerve as cross sections. No expression of progranulin is observed in *Grn*<sup>-/-</sup> mice. (C) The expression of progranulin in retinal sections with optic nerve. NFH (green) shows the axon of RGCs. Progranulin loss is confirmed in *Grn*<sup>-/-</sup> optic nerve. Scale bar = 20  $\mu$ m.

### 3-10 成体プログラニューリン欠損マウス視神経における軸索及びグリア細胞の変化

プログラニューリン欠損マウスは野生型マウスと比べてRGCの軸索マーカである phosphorylated neurofilament H (pNFH) 及び neurofilament H (NFH) の凝集が認められた (Fig. 22)。Myelin basic protein (MBP) は、軸索周囲に存在するミエリンのマーカとして用いた。網膜同様、野生型マウスと比べてプログラニューリン欠損マウスでは Iba-1 陽性細胞に変化は認められず、GFAP の発現が上昇していた (Fig. 22)。以上の結果から、プログラニューリンが欠損することにより RGC の軸索とアストロサイトに異常が認められたため、プログラニューリンは特に RGC とアストロサイトに対して作用を示す可能性が示された。

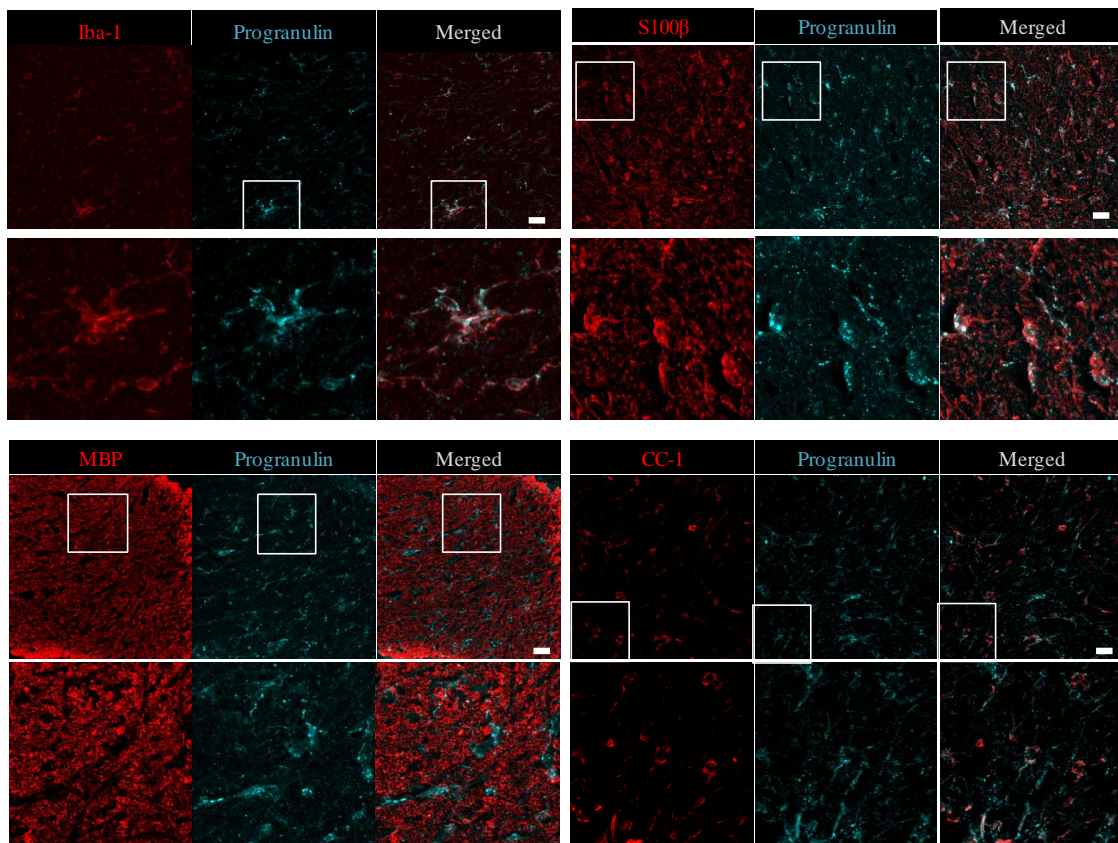


**Fig. 22** Changes of glial cells in *Grn*<sup>-/-</sup> optic nerve.

Typical images show the expression of p-NFH, NFH, MBP and GFAP in WT and *Grn*<sup>-/-</sup> mice. The accumulation of p-NFH and NFH is observed in *Grn*<sup>-/-</sup> mice. The fluorescent intensity of Iba-1 is not changed between WT and *Grn*<sup>-/-</sup> mice. The fluorescent intensity of GFAP is increased in *Grn*<sup>-/-</sup> optic nerve compared to WT optic nerve. Data are the means  $\pm$  S.E.M. (n = 3). ##;  $p < 0.01$  vs. WT (Student's *t*-test). WT: Wild-type; KO: Knock-out. NFH: neurofilament heavy, MBP: myelin basic protein, Iba-1: ionized calcium binding adapter molecule 1, GFAP: glial fibrillary acidic protein. Scale bar = 20  $\mu$ m.

### 3-11 成体マウス視神経におけるプログラニュリンの局在

視神経に存在する主な細胞種はグリアであると考えられるため、ミクログリア、アストロサイト及びオリゴデンドロサイトのマーカーを用いて、プログラニュリンの発現部位について検討を行った。プログラニュリンは網膜と同様に、Iba-1 陽性ミクログリア及び GFAP 陽性のアストロサイトに発現していた (Fig. 23)。一方、MBP、CC-1 はいずれもオリゴデンドロサイトのマーカーであるが、一部の CC-1 陽性オリゴデンドロサイトのみプログラニュリンを発現した (Fig. 23)。

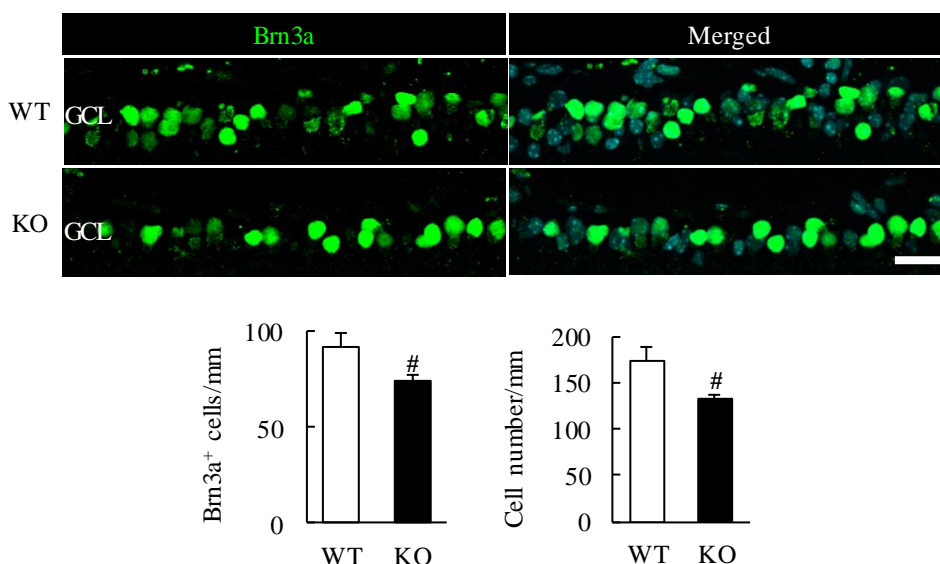


**Fig. 23 Progranulin expression in optic nerve of adult mice.**

Progranulin expression (magenta) is observed in Iba-1<sup>+</sup> microglia (red), S100β<sup>+</sup> astrocytes (red) and CC-1<sup>+</sup> oligodendrocytes (red). MBP is not co-localized with progranulin. Iba-1: ionized calcium binding adapter molecule 1, MBP: myelin basic protein. Scale bar = 20 μm.

### 3-12 網膜発達期 (生後 9 日目) におけるプログラニューリン欠損マウス網膜神経節細胞 (RGC) の変化

プログラニューリン欠損により認められた網膜組織における異常は、発達期に生じているのではないかと考え、網膜発達期におけるプログラニューリンの欠損の影響を検討した。初めに、成体プログラニューリン欠損マウスにおいて認められた RGC 数の減少が発達期網膜においても認められるかについて検討した。網膜発達の後期であると考えられる生後 9 日目において、プログラニューリン欠損網膜は RGC 数が減少した (Fig. 24)。



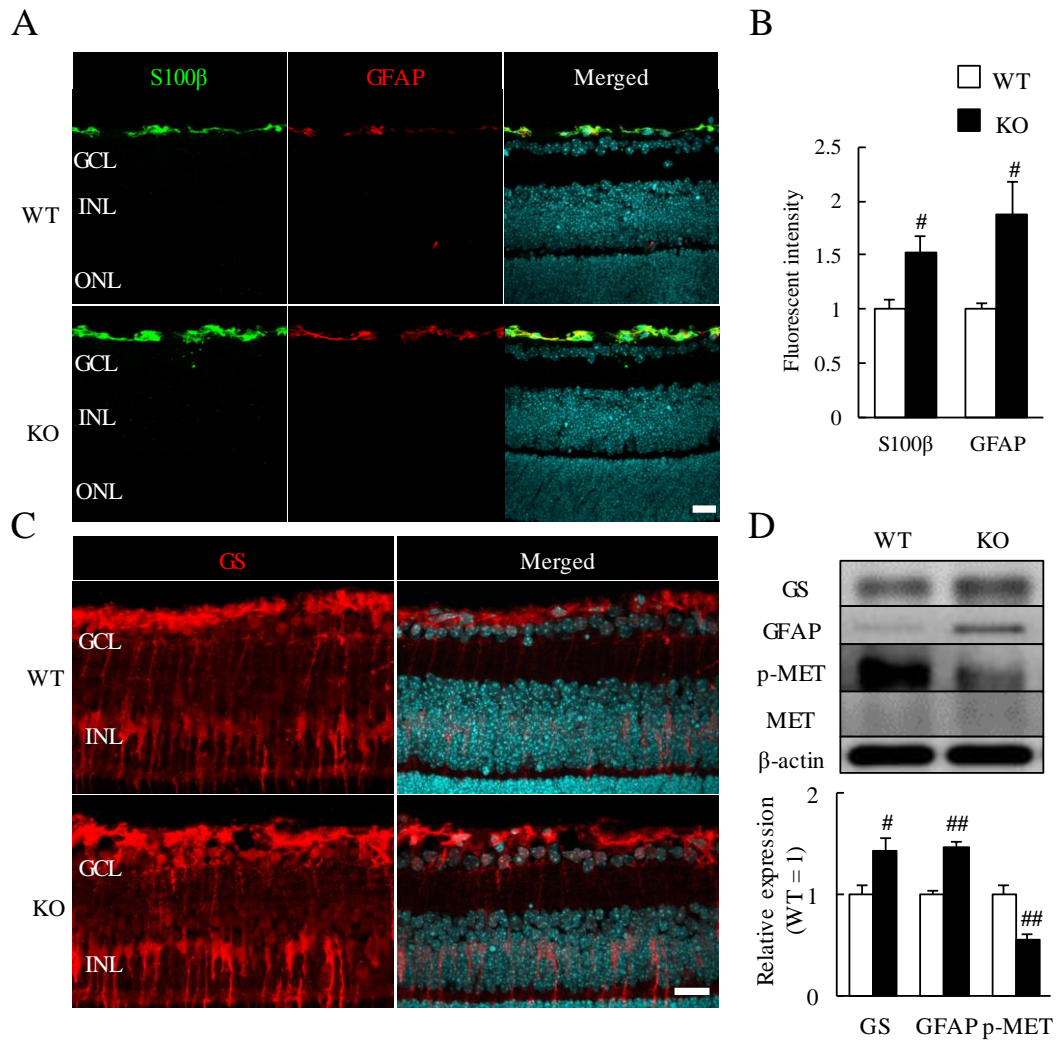
**Fig. 24 The changes of Brn3a positive RGCs in *Grn*<sup>-/-</sup> mice at postnatal day 9.**

Brn3a staining (green) indicates the RGCs in GCL of wild-type (WT) and *Grn*<sup>-/-</sup> mice. Number of Brn3a<sup>+</sup> cells and total cells are counted in the GCL. The number of Brn3a<sup>+</sup> cells and total cells in the GCL are reduced in *Grn*<sup>-/-</sup> mice. Data are the means  $\pm$  S.E.M. (n = 5). <sup>#</sup>;  $p < 0.05$  vs. WT (Student's *t*-test). WT: Wild-type; KO: Knock-out. GCL: ganglion cell layer. Scale bar = 20  $\mu$ m.

### 3-13 網膜発達期 (生後 9 日目) におけるプログラニューリン欠損マウス網膜アストロサイトの変化

生後 9 日目におけるアストロサイトの活性化について検討した。プログラニューリン欠損マウス網膜において、野生型マウスと比較して S100 $\beta$  及び GFAP で示されるアストロサイトマーカーは有意に上昇した (Fig. 25A, B)。さらに、アストロサイト及びミュラーグリアのマーカーである glutamine synthetase (GS) の発現が上昇することが、免疫染色及びウェスタンブロットの結果から明らかとなった (Fig. 25C, D)。プログラニューリン欠損下で変化しているシグナルを検討するため、3-2 で述べたプログラニューリンと関連があると考えられる HGF 受容体 (MET) のリン酸化について評価した。プログラニューリン欠損下では HGF 受容体のリン酸化が低下していた (Fig. 25D)。



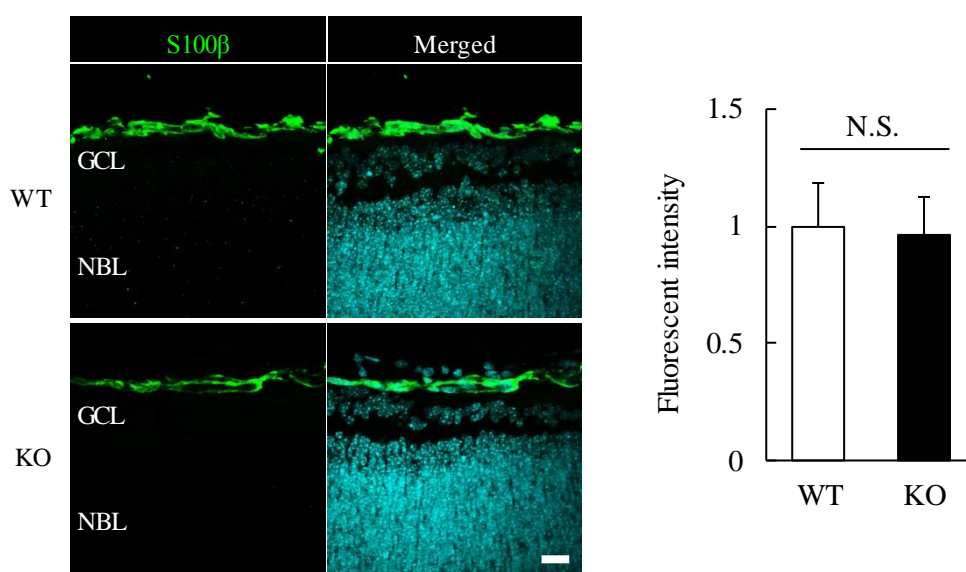


**Fig. 25 Astrocytes in  $Grn^{-/-}$  retina at postnatal day 9.**

(A, B) S100 $\beta^+$  and GFAP $^+$  astrocytes in mice retina at postnatal day 9. Fluorescent intensity of S100 $\beta$  and GFAP expression is increased in  $Grn^{-/-}$  mice. Data are the means  $\pm$  S.E.M. ( $n = 5$  or  $6$ ). (C) GS stained astrocytes and Muller glia. The increase of GS expression is observed in  $Grn^{-/-}$  mice at P9. (D) Typical band showed GS, GFAP, p-MET, MET, and  $\beta$ -actin. The quantitative data indicate the relative expression of GS and GFAP per  $\beta$ -actin and p-MET per MET. GS and GFAP expressions are increased in  $Grn^{-/-}$  mice retina. The phosphorylation of MET is decreased in  $Grn^{-/-}$  mice retina at P9. Data are the means  $\pm$  S.E.M. ( $n = 3$  to  $5$ ). #;  $p < 0.05$ , ##;  $p < 0.01$  vs. WT (Student's  $t$ -test). WT: Wild-type; KO: Knock-out. GCL: ganglion cell layer, INL: inner nuclear layer, ONL: outer nuclear layer. GFAP: glial fibrillary acidic protein, GS: glutamine synthetase. Scale bar = 20  $\mu$ m.

### 3-14 網膜発達期 (生後 1 日目) におけるプログラニューリン欠損マウス網膜アストロサイトの変化

生後 9 日目よりも発達早期である生後 1 日目において、プログラニューリン欠損マウス網膜のアストロサイトマーカーの S100 $\beta$  の発現に明らかな変化は認められなかった (Fig. 26)。このことから、プログラニューリンは生後 1 日目には作用せず、生後 9 日目までの間にアストロサイトや網膜神経節細胞に影響を及ぼしていることが示唆された。

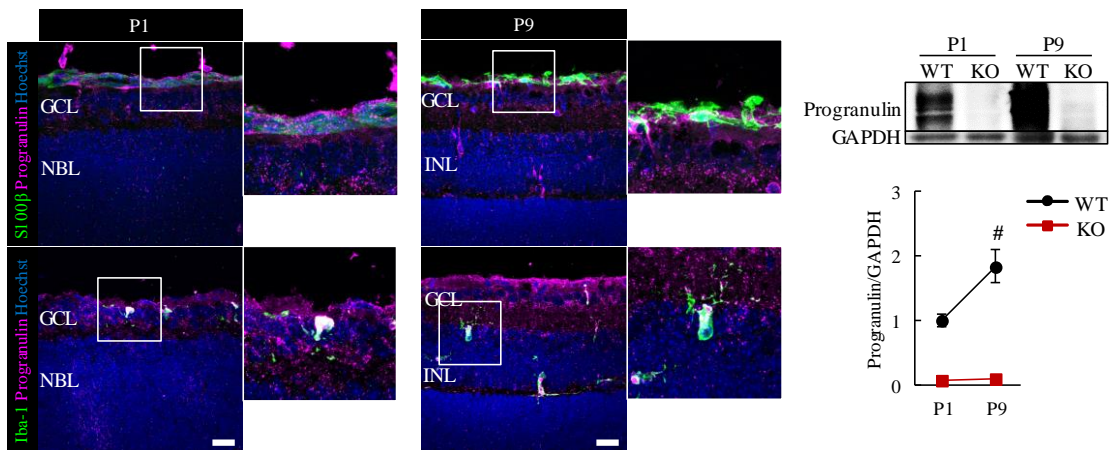


**Fig. 26 No alteration in retinal astrocytes in  $Grn^{-/-}$  mice at postnatal day 1.**

Representative images of S100 $\beta$ <sup>+</sup> astrocytes (green) in retina at postnatal day 1. No change was observed in the expression of S100 $\beta$  in  $Grn^{-/-}$  mice at P1. Data are the means  $\pm$  S.E.M. (n = 4, 5). Student's *t*-test. WT: Wild-type; KO: Knock-out. GCL: ganglion cell layer, NBL: neural blast layer. Scale bar = 20  $\mu$ m.

### 3-15 網膜発達期 (生後 1 及び 9 日目) におけるプログラニューリンの発現変化

3-14 の結果から、プログラニューリン欠損下において生後早期 (生後 1 日目) でのアストロサイトに変化は認められなかったことから、生後後期 (生後 9 日目) においてプログラニューリンは何らかの作用を有していることが考えられる。そこで、生後 1 及び 9 日目の網膜におけるプログラニューリンの発現について検討した。プログラニューリンの発現量は、生後 1 日目から 9 日目において増加し、その発現は生後 9 日目においてのみ、アストロサイト周囲に認められた (Fig. 27)。



**Fig. 27 The expression of progranulin in retina at postnatal day 1 and 9.**

Progranulin expression (magenta) in retina at postnatal day 1 and 9 by immunostaining.  $S100\beta^+$  astrocyte (green) is partly co-localized with progranulin in WT retina at postnatal day 9 but not in postnatal day 1.  $Iba-1^+$  microglia (green) are almost fully co-localized with progranulin. Western blotting results showed that the expression of progranulin is higher at postnatal day 9 than postnatal day 1 in WT retina. . Progranulin expression is not observed in  $Gm^{-/-}$  mice. Data are the means  $\pm$  S.E.M. (WT:  $n = 3$  or  $4$ , KO:  $n = 2$ ). # $p < 0.05$  vs. P1 WT (Student's  $t$ -test). GCL: ganglion cell layer, NBL: neural blast layer. INL: inner nuclear layer. Scale bar = 20  $\mu$ m.

#### 第4節 考察

本研究から、プログラニュリンが網膜視細胞分化に関与することを明らかにした。視細胞（杆体細胞）の分化は生後に起きると考えられ、網膜前駆細胞が視細胞前駆細胞となり、さらに視細胞へと分化していく。生後8日目の仔マウス網膜から調製した網膜初代培養細胞へのプログラニュリン添加により、視細胞前駆細胞（CRX陽性細胞）の減少及び視細胞（rhodopsin陽性細胞）の増加が認められた（Fig. 12）。これは、視細胞への分化を促進した結果、前駆細胞の減少が起きたと考えられる。この分化促進作用は、HGF受容体阻害薬により消失したことから、プログラニュリンによる視細胞分化促進作用の一端にHGF受容体の関与が考えられる（Fig. 13）。HGF受容体は生後7日目において視細胞の存在するONLに豊富に存在することから（59）、生後9日目のプログラニュリン欠損マウス網膜において、HGF受容体のリン酸化の減少、CRXの発現増加、rhodopsinの発現減少が認められたことから、HGF受容体を介して視細胞への分化が阻害されていることが示唆された（Figs. 15、25）。このことが、成体プログラニュリン欠損マウス網膜における網膜外顆粒層の菲薄化につながったと考えられる（Fig. 14）。プログラニュリンの分化に関連する機序としては、Wnt/ $\beta$ -cateninシグナルの関与が考えられるが、網膜視細胞分化においても本シグナルが関与していると考えられる（56）。

また、網膜視細胞への作用以外に、プログラニュリン欠損により、アストロサイトの活性化及びRGCの減少が起きることを明らかにした。さらに、その変化は発生期の生後9日目から起きていることが示された。アストロサイトは、前駆細胞の状態で胎生期に視神経から網膜内に遊走し、生後まで末梢網膜へと遊走を続け、その後成熟する（50）。RGCは血小板由来成長因子Aやソニック・ヘッジホッグを放出して、アストロサイト前駆細胞の遊走を促進させる（51、

52)。本研究において、RGC の分化がほぼ完了するとされる生後 1 日目において、プログラニュリンの欠損はアストロサイトマーカーである S100 $\beta$  の発現に影響を及ぼさなかった (Fig. 26)。同時期において、アストロサイトの活性化マーカーであり、成熟のマーカーとも考えられる GFAP の発現は、野生型マウス網膜でも認められなかったことから、生後 1 日目ではアストロサイトの分化は完了していないと考えられる (50)。そのため、生後 1 日目から 9 日目の間に、プログラニュリン欠損により、アストロサイトの遊走異常が起き、生後 9 日目のプログラニュリン欠損マウス網膜においてはアストロサイトマーカー及びグリア細胞マーカーである S100 $\beta$ 、GFAP 及び GS の発現増加が認められたことが考えられる (Fig. 25)。また、プログラニュリン欠損により、Brn3a 陽性の RGC 数の減少が認められた (Fig. 24)。以上のことから、プログラニュリンの欠損は生後後期 (生後 9 日目) に強く影響を及ぼしたことが示唆された。実際に、野生型マウス網膜において、生後 1 日目から 9 日目でプログラニュリンの発現が増加していることから、プログラニュリンは生後後期 (生後 9 日目) において、その作用を発揮している可能性が高い (Fig. 27)。すなわち、プログラニュリンの発現増加は、ミクログリアの網膜への侵入が増加する生後 7 日目と同時期であること (60)、プログラニュリンはミクログリアに豊富に発現することから、ミクログリア由来のプログラニュリンが網膜細胞の分化、生存及びアストロサイトの活性化を調節している可能性が考えられる。

近年の報告により、プログラニュリンは直接的にアストロサイトの活性化を抑制する (61)。そのため、プログラニュリンはアストロサイトに直接作用して、RGC の細胞死や軸索変性に対して保護的に働いている可能性が考えられる。一方、プログラニュリン欠損により、HGF 受容体のリン酸化の低下が認められた (Fig. 25D)。HGF 受容体は RGC の生存に寄与することが報告されているため

(62, 63)、プログラニューリンは RGC の HGF 受容体に直接作用して生存に働いている可能性もあるが、プログラニューリンの作用点については今後検討すべき課題である。

以上のことから、プログラニューリンは発生期の視細胞分化に関与し、RGC の生存やアストロサイトの活性化を調節していることが示唆された。プログラニューリンの欠損は脳のアストロサイトに変化を及ぼさなかったことから、プログラニューリンは網膜及び視神経のアストロサイトに特異的に作用していることが示唆された。プログラニューリンの発生期における発現上昇とミクログリアの網膜での増加には相関があると考えられるため、第3章ではミクログリアの網膜発生への影響とプログラニューリンの関与について検討した。

### 第3章 網膜発生に対するミクログリアの関与

#### 第1節 緒言

網膜発生は胎生期から始まるが、生後までその発生は続く。生後に、多くの細胞は成熟な網膜細胞となるが、一部の網膜前駆細胞は増殖し続ける。その分化は中心部網膜より進行していき、周辺部網膜は生後6日目においても増殖細胞が認められる(64)。生後の増殖は発達後期で成熟する網膜細胞(杆体視細胞、ミュラーグリア、双極細胞及び一部のアマクリン細胞)にとって重要であると考えられる(65)。

生後の発達期の網膜内層にミクログリアは多く認められる。ミクログリアが網膜の血管形成に重要であることが報告されている一方で、ミクログリアは網膜が無血管である胎生期から存在している(66, 67)。そのため、発達期のミクログリアの役割は血管形成以外にもあると考えられる。また、ミクログリアの数は胎生期に多いものの、生後すぐに減少し、その後再び増加する(60)。なぜ生後にミクログリアが増加し、どのような役割を担っているのか明らかではない。

近年になって、ミクログリアが脳の神経新生に関与することが示唆されている。それにはインスリン様成長因子1 (insulin-like growth factors-1: IGF-1) などのミクログリア由来の成長因子が関与すると考えられていた。ミクログリアは2つのタイプに大別される。炎症促進的なM1型と抗炎症的なM2型である。M2ミクログリアは様々な成長因子を放出する。リポ多糖 (lipopolysaccharide: LPS) の腹腔内投与により、脳室下帯においてトランスフォーミング増殖因子 $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ : TGF- $\beta$ ) を発現するM2型ミクログリアが増加し、神経新生が促進されることが報告されている(68)。一方、神経新生にはミクログリア由来のIGF-1は関与せず、炎症性サイトカインが関与することが報告さ

れている (69)。さらに、ゼブラフィッシュにおける網膜の神経新生へのミクログリアの関与も示唆されている (70)。

プログラニューリンは中枢神経系において、ミクログリアに豊富に発現しており、神経変性疾患においてミクログリアにおけるプログラニューリンの役割が注目されている (71)。第 2 章に示したように、プログラニューリンは生後 1 日目から生後 9 日目にかけて、その発現が増加する。興味深いことに、この増加は、過去の報告を参照すると、ミクログリアの増加の時期と一致している (60)。また、プログラニューリンはミクログリアの遊走に関与することが報告されている (72)。

以上、ミクログリアが神経新生に関与することが明らかにされつつある。本研究では、ミクログリアのマウス網膜発生における役割を明らかにするために、LPS によりミクログリアを増加させた場合と colony stimulating factor 1 receptor (CSF1R) の阻害薬である PLX3397 によりミクログリアを減少させた場合の影響について検討した。また、プログラニューリン欠損下でのミクログリアと網膜前駆細胞の変化についても検討を行った。



## 第2節 実験材料及び方法

### 2-1 実験動物

妊娠 C57BL/6 マウスは日本エスエルシー株式会社より購入し、その仔マウスを実験に用いた。プログラニューリン欠損マウスは第2章に示した動物を用いた。動物は岐阜薬科大学本学動物飼育室または岐阜大学生命科学棟 5F の動物飼育舎で飼育した。実験を行うにあたっては、岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会に動物実験承認申請を行い、許可を得た上で実施した。また、遺伝子組み換え動物の実験を行うにあたり、岐阜薬科大学バイオセーフティ委員会の審査、承認を受けた上で実施した。

### 2-2 実験材料

本実験に用いた薬物及び試薬は、以下の通りである。

PLX3397 (Pexidartinib) は Selleck Chemicals (Houston, TX, USA)、protease inhibitor cocktail、phosphatase inhibitor cocktail II、 phosphatase inhibitor cocktail III、Igepal CA-630、lipopolysaccharide (LPS)、5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) は Merck Millipore (Billerica, MA, USA)、トリプシン (trypsin)、塩化カリウム [potassium chloride (KCl)]、塩酸 (HCl)、スクロース (sucrose)、エタノール (ethanol)、パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde)、Sample Buffer Solution (2ME+) (x4)、メタノール (methanol)、イムノスター<sup>®</sup>LD、デオキシコール酸ナトリウム (sodium deoxycholate)、ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate: SDS)、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル [sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel]、トリス塩基 (tris base)、6-アミノヘキサ酸 (6-aminohexanoic acid) は Wako (Osaka, Japan)、リン酸二水素カリウム [sodium dihydrogenphosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)]、リン酸水素二ナトリウム・十二水

(sodium hydrogenphosphate 12-water)、リン酸二水素ナトリウム二水和物 (sodium dihydrogenphosphate dehydrate)、Blocking One-P は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan)、塩化ナトリウム [sodium chloride (NaCl)] は Kishida Chemical (Osaka, Japan)、Hoechst 33342、BCA protein assay kit は Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)、Tris-Buffered Saline (TBS) は タカラバイオ株式会社 (Shiga, Japan)、Mouse on Mouse (M.O.M.) Blocking Reagent, M.O.M. protein concentrate、Normal Goat Serum、Normal Horse Serum は Vector Labs (Burlingame, CA, USA)、フルオロマウント (Fluoromount) は Diagnostic Bio Systems (Pleasanton, CA, USA)、proteinase K solution は Qiagen (Duesseldorf, Germany)、Can get signal solution 1、Can get signal solution 2 は Toyobo (Osaka, Japan)、Triton X-100 は Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)、O.C.T compound は Sakura Finetek Japan (Tokyo, Japan) よりそれぞれ購入した。

## 2-3 実験方法

### 2-4-1 LPS、PLX3397 投与

生後 3 日目の仔マウスに LPS 1 mg/kg を腹腔内投与した。また、増殖細胞のマーカールとして BrdU 50 mg/kg を腹腔内投与した。BrdU の投与は生後 7 日目まで 1 日 1 回投与した。

生後 0 日目から 7 日目まで、仔マウスに PLX3397 0.25、1 mg/kg を 1 日 2 回腹腔内投与した。BrdU の投与は上記と同様に行った。

いずれの実験においても生後 7 日目に仔マウスの眼球を摘出した。

### 2-4-2 免疫染色用組織切片作製

マウス眼球を摘出し、4%パラホルムアルデヒド含有 0.1 M PB (pH 7.4) にて

一晩放置した。その後、25%スクロース含有 0.1 M PB (pH 7.4) 液に移し 24 時間放置した。液体窒素を用いて O.C.T. compound により凍結し、薄切するまで -80°C にて保存した。凍結した眼球を O.C.T. compound を用いて -20°C 下で固定し、クリオスタット (Leica, Wetzlar, Hesse, Germany) を用いて厚さ 10  $\mu$ m の切片を作製し、MAS コーティングされたカバーガラス (Matsunami, Osaka, Japan) に載せ、-80°C で保存した。

#### 2-4-3 免疫染色

染色時、-80°C より凍結切片を取り出し、-20°C で 1 時間放置した後、4°C で 1 時間放置し、さらに室温で 2 時間乾燥させた。その後、Super PAP pen (Daido sangyo, Osaka, Japan) にて反応液の流出を防ぐために切片の周囲を囲んだ。Pax6、Chx10 の染色を行う際には、37°C で 30 分間 0.2% Triton X 処理を行った後、37°C で 10 分間 0.1% トリプシン処理を行った。Pax6、Chx10 以外の染色を行う際には上記前処理は行わなかった。その後、マウス由来の抗体を用いる際には、M.O.M Blocking Reagent により 1 時間ブロッキングした。それ以外の場合、10% goat serum または horse serum により 1 時間ブロッキングを行った。ブロッキング後、一次抗体 (溶媒: M.O.M protein concentrate を PBS で希釈またはブロッキング剤) を用いて 4°C で一晩反応させた。その後、二次抗体 (溶媒: M.O.M protein concentrate を PBS で希釈またはブロッキング剤) を 1 時間反応させた。つづいて、Hoechst 33342 により核染色を行った。染色後、Fluoromount (水溶性封入基材) で封入した。

一次抗体には、mouse anti-rhodopsin antibody (1:1000 dilution; Millipore)、mouse anti-Chx10 antibody (1:200 dilution; SantaCruz)、mouse anti-Pax6 antibody (1:300 dilution; Abcam)、rabbit anti-Iba-1 antibody (1:200 dilution; Wako)、rat

anti-BrdU antibody (1:200 dilution; Abcam)、sheep anti-progranulin antibody (1:20 dilution; R&D) を用いた。二次抗体にはそれぞれ Alexa Fluor<sup>®</sup>488 goat anti-mouse IgG、Alexa Fluor<sup>®</sup>546 goat anti-rat IgG、Alexa Fluor<sup>®</sup>546 donkey anti-rabbit IgG、Alexa Fluor<sup>®</sup>647 donkey anti-sheep IgG (Thermo Scientific) を用いた。また、一次抗体を除いたネガティブコントロールを用意した。

染色した切片はキーエンス顕微鏡 (BZ-X710) または共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FLUOVIEW FV10i; Olympus, Tokyo, Japan) を用いて撮影した。視神経から 500, 1000  $\mu\text{m}$  の位置または末端部網膜における 211.968  $\mu\text{m}$ ×211.968  $\mu\text{m}$  の範囲を撮影した。撮影範囲に含まれる BrdU 陽性細胞数または BrdU と Chx10 の二重陽性細胞数を計測し定量した。それを単位長さ当たり (/mm) の数として算出した。

#### 2-4-4 ウェスタンブロットによる評価

マウス網膜を摘出し、マイクロチューブの中に入れ急速凍結した。サンプルはタンパク質抽出まで-80 °C に保存した。タンパク質抽出には細胞溶解液として、protease inhibitor cocktail、phosphatase inhibitor cocktail 2 及び 3 を含む RIPA buffer [50 mM Tris HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、1% Igepal CA-630] を 100  $\mu\text{L}$  用い、ホモジナイザー (Phycostron, Microtec Co., Chiba, Japan) により 30 秒間破碎、均質化した。その後、20 分間氷中に静置させ、12,000  $\times$  g、4°C、20 分間遠心分離した。遠心分離した上清を回収し、タンパク質抽出液とした。

SDS ポリアクリルアミドゲルを泳動装置にセットし、容器に泳動用緩衝液 (25 mM Tris、190 mM Glycine、3.5 mM SDS) を入れ、ゲルを取り付けた泳動装置に浸した。泳動装置の中にも泳動用緩衝液を入れた。1 ウェル当りの添加量

は分子量マーカーを 5  $\mu$ L、各サンプルを 10  $\mu$ L とした。サンプルを添加後、ゲル 1 枚当たり 20 mA で泳動した。泳動後、ゲルを cathode buffer (25 mM Tris、40 mM 6-aminohexanoic acid、20% methanol) に 15 分間浸した。転写膜は、メタノールに 15 秒間浸し、超純水に 15 分間浸した。その後、anode buffer 2 (25 mM tris、20%メタノール) に 20 分間浸した。陽極側から、anode buffer 1 (0.3 M tris、20%メタノール) に浸したろ紙、anode buffer 2 に浸したろ紙、転写膜、ゲル、cathode buffer に浸したろ紙の順に組み、0.8 mA/cm<sup>2</sup> の条件で転写した。転写後、0.05% Tween 含有 0.01 M TBS でメンブランを洗浄し、Blocking One-P に浸し、30 分間ブロッキングした。0.05% Tween TBS で洗浄後、Can Get Signal Solution 1 で一次抗体を希釈し、4°C で一晩反応させた。0.05% Tween TBS で洗浄後、Can Get Signal Solution 2 で二次抗体を希釈して室温で 1 時間反応させた。0.05% Tween TBS で洗浄した後、イムノスターLD に 5 分間浸した。その後、LAS-4000UVmini (Fujifilm, Tokyo, Japan) を用いて検出した。

一次抗体には、mouse anti-rhodopsin antibody (1:1000 dilution; Millipore)、mouse anti-Pax6 (1:1000 dilution; Abcam)、mouse anti-GS (1:1000 dilution; Millipore)、mouse anti-calbindin (1:1000 dilution; Abcam)、mouse anti-nestin [1:200 dilution; BD Biosciences (San Jose, CA, USA)]、mouse anti- $\beta$ -actin (1:2000 dilution; Sigma-Aldrich)、rabbit anti-Iba-1 (1:200 dilution; Wako)、rabbit anti-GAPDH [1: 1000 dilution; Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)]、sheep anti-progranulin (1:200 dilution; R&D systems) を用いた。二次抗体には、Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:2000 dilution; Thermo Scientific)、HRP-conjugated goat anti mouse antibody (1:2000 dilution; Thermo Scientific)、HRP-conjugated rabbit anti-sheep IgG (1:2000 dilution; Thermo Scientific) を用いた。

タンパク質の発現強度は、Multi Gauge Ver3.0 (Fujifilm, Tokyo, Japan) を用い

て解析した。バンドの強度を数値化し、個々の値を算出した。

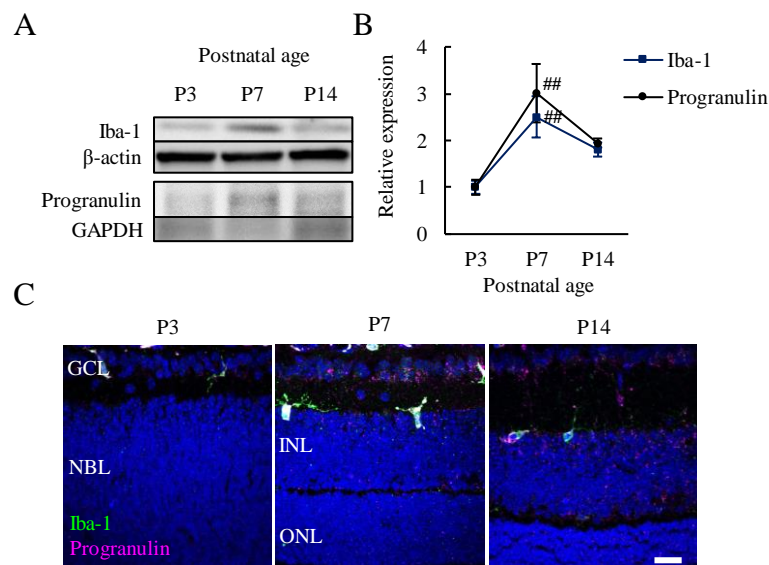
## 2-5 統計学的解析

実験成績は平均値±標準誤差で示した。統計学的な比較は、SPSS (IBM, Armonk, NY, USA) を用いて Student's *t*-test または Dunnett's test により行った。危険率が 5%未満を有意差有りとした。

### 第3節 結果

#### 3-1 生後網膜におけるミクログリアマーカー (Iba-1) とプログラニューリンの発現及び局在の変化

生後網膜においてミクログリアは、生後7日目に増加することが示されている (60)。本結果の確認と、プログラニューリンの発現変化がどのように関連しているか検討するために、ミクログリアマーカーである Iba-1 とプログラニューリンの発現について検討した。ウェスタンブロットの結果から、Iba-1 とプログラニューリンのタンパク発現が生後7日目に増加していた (Fig. 28A, B)。免疫染色の結果からも、両因子ともウェスタンブロットの結果と相関して、生後7日目に最も発現増加していた (Fig. 28C)。また Iba-1 陽性ミクログリアは網膜内層に局在し、プログラニューリンを高発現していることが示されたことから網膜発達期においてミクログリアへのプログラニューリンの関与が示唆された。

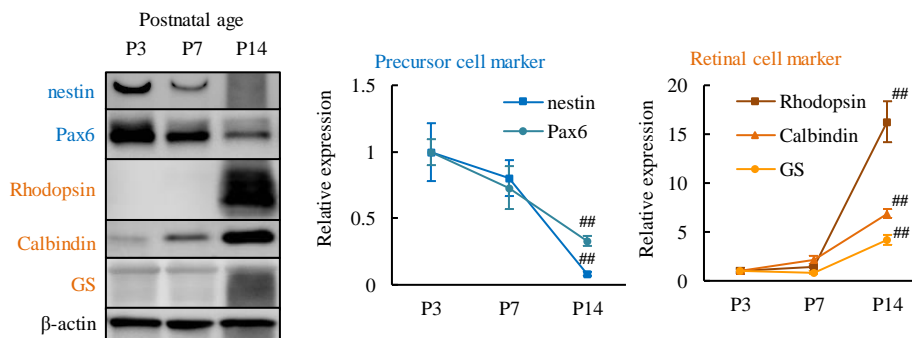


**Fig. 28 The expression of Iba-1 and progranulin in retina at postnatal day 3, 7 and 14.**

(A, B) Western blotting results show the expression of Iba-1 and progranulin during the postnatal development. Typical bands and quantitative data indicate that the expression of Iba-1 and progranulin is significantly increased at P7. (C) Immunostaining of Iba-1 (green) and progranulin (magenta) demonstrate that Iba-1<sup>+</sup> microglia is increased at P7 and express progranulin. Data are the means  $\pm$  S.E.M. ( $n = 4$  to  $6$ ). <sup>##</sup>;  $p < 0.01$  vs. P3 (Dunnett's test). Scale bar = 20  $\mu$ m.

### 3-2 生後の網膜前駆細胞と網膜細胞マーカーの発現変化

ミクログリアの増加が網膜発生のどの時期に対応するのかを明確にするために、網膜前駆細胞のマーカーと網膜細胞のマーカーを用いて、その生後の発現量を検討した。網膜前駆細胞のマーカーである Pax6、nestin は生後 14 日目に減少し、網膜細胞のマーカーである rhodopsin、calbindin、GS (それぞれ視細胞、アマクリン細胞、ミュラーグリアのマーカー) は顕著に増加した (Fig. 29)。本結果から、生後の網膜細胞の分化は生後 7 日目から 14 日目の間に大きく進むことが確認された。以上の結果から、ミクログリアは生後 7 日目までの時期に増加し、分化ではなく増殖に何らかの役割を担っていることが示唆された。



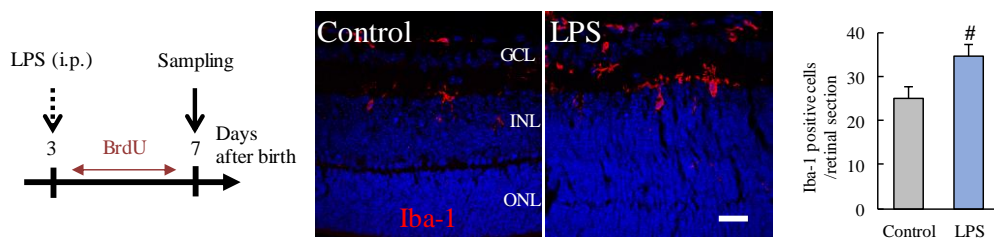
**Fig. 29 The expression of retinal precursor cell markers and retinal cell markers at postnatal day 3, 7 and 14.**

Western blotting results show the expression of retinal precursor cell markers and retinal cell markers. Retinal precursor cell markers (nestin and Pax6) are decreased at P14 compared to P7. Retinal cell markers (rhodopsin, calbindin and GS) are increased at P14. These markers indicate the photoreceptor cells, the amacrine cells and Müller glia respectively. Data are the means  $\pm$  S.E.M. ( $n = 4$  to 6). ##;  $p < 0.01$  vs. P3 (Dunnett's test). Scale bar = 20  $\mu$ m.



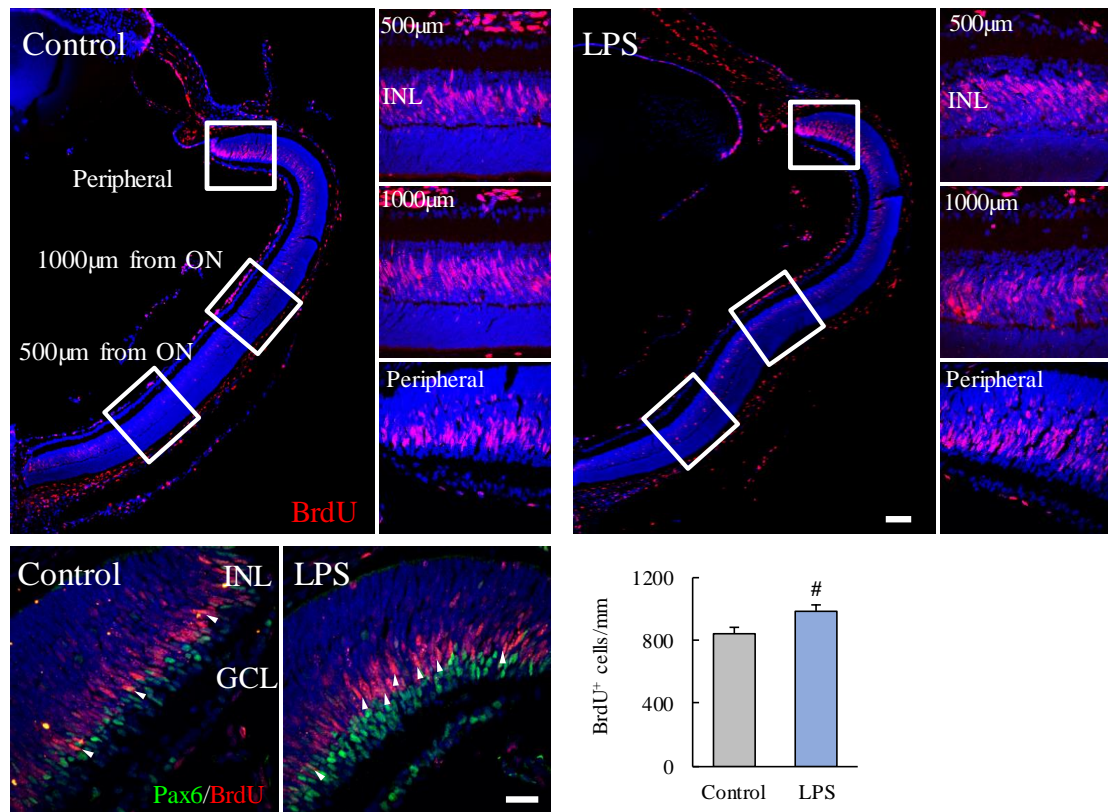
### 3-3 ミクログリアの増加が網膜前駆細胞増殖に及ぼす影響

LPS の腹腔内投与により、脳室下帯で、M2 型ミクログリアが増加し、神経新生が促進されることが報告されている (68)。本試験系を用いて、LPS 投与により網膜においても神経新生及び前駆細胞増殖が促進されるかについて検討した。生後 3 日目の仔マウスに LPS を腹腔内投与し、7 日目に網膜をサンプリングし、評価した (Fig. 30)。なお、増殖細胞の変化を検討するために、生後 3 日目から 7 日目にかけて BrdU を腹腔内投与した。LPS の投与は、網膜ミクログリアを増加させた (Fig. 30)。また、BrdU 陽性の増殖細胞数は LPS 投与により増加した (Fig. 31)。その BrdU 陽性細胞は Pax6 と共染色されることから、前駆細胞であることが示唆された (Fig. 31)。以上の結果から、LPS はミクログリアを増加させ、前駆細胞の増殖を促進させることが明らかとなった。



**Fig. 30 The increase of retinal microglia by LPS treatment.**

LPS is injected intraperitoneally at P3 and BrdU is incorporated from P3 to P7. Retina is evaluated at P7. Immunostaining shows Iba-1<sup>+</sup> microglia (red). LPS treatment increases the number of microglia in retina at P7. Data are the means  $\pm$  S.E.M. ( $n = 4$  or  $5$ ). <sup>#</sup>;  $p < 0.05$  vs. control (Student's  $t$ -test). GCL: ganglion cell layer, INL: inner nuclear layer, ONL: outer nuclear layer. Scale bar = 20  $\mu$ m.

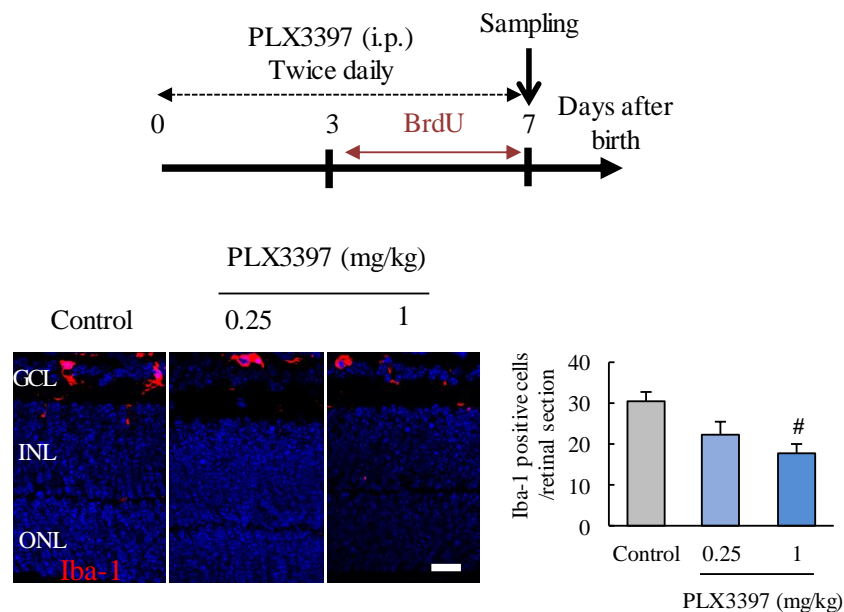


**Fig. 31 The increase of proliferative precursor cells in retina by LPS treatment.**

Immunostaining shows BrdU<sup>+</sup> proliferative cells (red) in retina at each area from optic nerve. LPS treatment increases the number of BrdU<sup>+</sup> proliferative cells in peripheral area. Increased BrdU<sup>+</sup> proliferative cells are expressed with retinal precursor cell marker, Pax6. Data are the means  $\pm$  S.E.M. ( $n = 4$  or  $5$ ). #;  $p < 0.05$  vs. control (Student's  $t$ -test). GCL: ganglion cell layer, INL: inner nuclear layer. Scale bar = 20  $\mu$ m.

### 3-3 ミクログリアの減少が網膜前駆細胞増殖に及ぼす影響

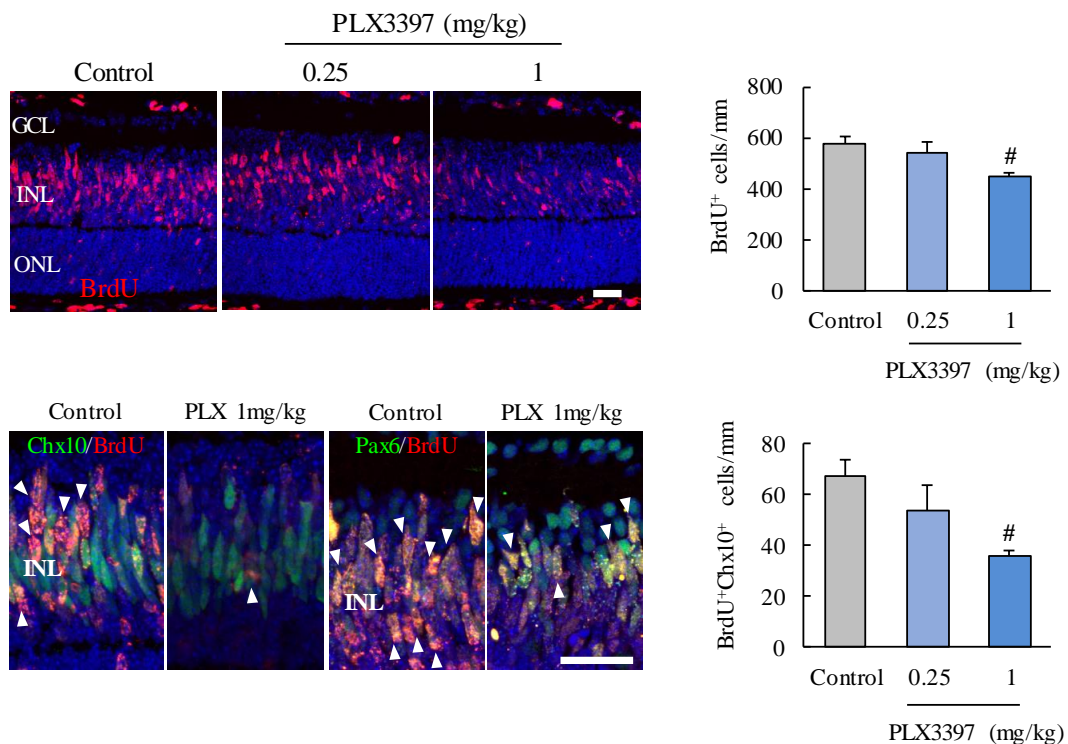
PLX3397 は colony stimulating factor 1 receptor (CSF1R) の阻害薬である。CSF1R はミクログリアの生存などに関与するシグナルであり (73)、CSF1R 阻害薬である PLX3397 の投与により、脳内のミクログリアが枯渇することが報告されている (74)。本研究では、生後 0 日目から 7 日目まで PLX3397 を 1 日に 2 回腹腔内投与し、BrdU は生後 3 日目から 7 日目まで腹腔内投与した (Fig. 32)。PLX3397 投与により、正常な形態を保つ Iba-1 陽性ミクログリアが減少した (Fig. 32)。また、Iba-1 陽性細胞数は、PLX3397 1 mg/kg の投与により、有意に減少した (Fig. 32)。



**Fig. 32 The decrease of retinal microglia by PLX3397 treatment.**

PLX3397, a colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitor is treated to neonatal mice by intraperitoneal injection (twice daily) to deplete microglia. BrdU is incorporated from P3 to P7. The treatment decreases the number of Iba-1<sup>+</sup> microglia (red). Data are the means  $\pm$  S.E.M. ( $n = 4$ ). <sup>#</sup>;  $p < 0.05$  vs. control (Dunnett's test). GCL: ganglion cell layer, INL: inner nuclear layer, ONL: outer nuclear layer. Scale bar = 20  $\mu$ m.

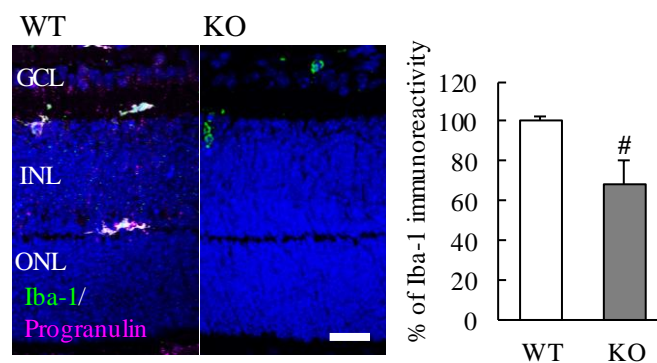
PLX3397 投与は、BrdU 陽性増殖細胞数を減少させた (Fig. 33)。また、この増殖細胞が前駆細胞であることを確認するために前駆細胞のマーカである Chx10 (Vsx2) 及び Pax6 と BrdU を共染色することにより評価した。PLX3397 の投与により、Pax6 と BrdU の両陽性細胞が減少し、Chx10 と BrdU の両陽性細胞も減少した (Fig. 33)。以上の結果から、PLX3397 はミクログリアを減少させ、前駆細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。



**Fig. 33 The decrease of proliferative precursor cells in retina by PLX3397 treatment.** PLX3397 decreases the number of BrdU<sup>+</sup> proliferative cells (red). PLX3397 decreases the BrdU and Chx10 or Pax6 (retinal precursor cell markers, green) double positive cells. The quantitative data indicates the decrease of BrdU and Chx10 double positive cells by PLX3397 treatment. Data are the means  $\pm$  S.E.M. ( $n = 4$ ). <sup>#</sup>;  $p < 0.05$  vs. control (Dunnett's test). GCL: ganglion cell layer, INL: inner nuclear layer, ONL: outer nuclear layer. Scale bar = 20  $\mu$ m.

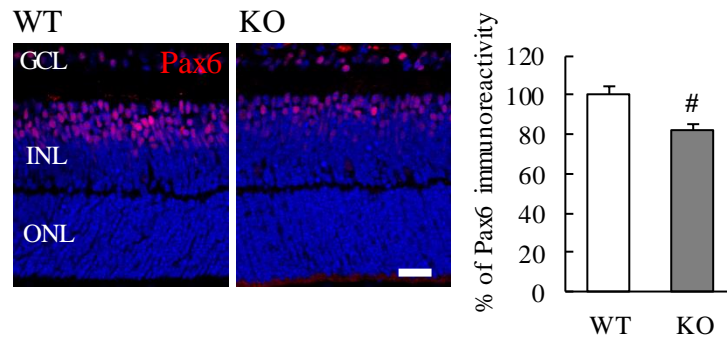
### 3-5 ミクログリア及び網膜前駆細胞に及ぼすプログラニューリン欠損の影響

緒言でも述べたように、プログラニューリンはミクログリアの遊走に關与する(72)。そこで、プログラニューリン欠損下では網膜内のミクログリアの減少が起きていることが考えられる。これまでの検討と整合性をとるために、生後7日目のマウスを用いて評価を行った。野生型ではプログラニューリンの発現が、網膜において認められ、特にミクログリアでの高発現が認められた (Fig. 34)。プログラニューリン欠損マウスでは、網膜内でプログラニューリンの発現がないことを確認し (Fig. 34)、さらに、網膜ミクログリアの減少が認められた (Fig. 34)。これまでの結果から、ミクログリアの減少が、前駆細胞の減少を導くことが考えられたため、プログラニューリン欠損マウスにおいても同様に前駆細胞が減少するかについて検討した。プログラニューリン欠損マウスは、網膜前駆細胞のマーカである Pax6 陽性細胞数が減少した (Fig. 35)。以上の結果から、プログラニューリンはミクログリアの網膜への遊走を介して、前駆細胞の数を調節していることが示唆された。



**Fig. 34 The decrease of retinal microglia in  $Grn^{-/-}$  mice.**

Progranulin (magenta) is observed in microglia and inner retinal layer in WT retina but not in  $Grn^{-/-}$  retina at P7. The number of Iba-1<sup>+</sup> microglia (green) is decreased in  $Grn^{-/-}$  mice. Data are the means  $\pm$  S.E.M. ( $n = 5$  or  $6$ ). <sup>#</sup>;  $p < 0.05$  vs. WT (Student's  $t$ -test). GCL: ganglion cell layer, INL: inner nuclear layer, ONL: outer nuclear layer. WT: Wild-type; KO: Knock-out. Scale bar = 20  $\mu$ m.



**Fig. 35 The decrease of retinal precursor cells in *Grn*<sup>-/-</sup> mice.**

The retinal precursor cell marker, Pax6 (red) is decreased in *Grn*<sup>-/-</sup> mice. Data are the means ± S.E.M. ( $n = 5$  or  $6$ ). #;  $p < 0.05$  vs. WT (Student's  $t$ -test). GCL: ganglion cell layer, INL: inner nuclear layer, ONL: outer nuclear layer. Scale bar = 20  $\mu$ m.

#### 第4節 考察

今回の研究から、ミクログリアが生後の網膜前駆細胞の増殖に関与していることが明らかとなった。LPS の投与は、ミクログリアを増加させ、網膜前駆細胞の増殖を促進させた。一方、PLX3397 の投与は、ミクログリアを減少させ、網膜前駆細胞の増殖を抑制した。先行研究より、LPS の腹腔内投与により、M2 型ミクログリアが増加し、神経新生が促進されることが報告されている (68)。一方、ミクログリアを減少させるミノサイクリンの投与により、神経新生が低下する (69)。LPS を投与して、神経新生が増加した作用機序としては、M2 型ミクログリアの増加に伴う成長因子の放出が関与していると考えられている (68)。それに対して、ミノサイクリンを投与し、神経新生が低下した作用機序としては、ミノサイクリンの投与により炎症性サイトカインが減少し、*in vitro* において神経幹細胞に炎症性サイトカインを添加すると、神経新生が亢進したことからサイトカインの関与が考えられている (69)。ミクログリアから放出されるどの因子が神経新生に重要であるかについては議論の余地があるが、上記のようにミクログリアの神経新生への関与は明らかになりつつある。

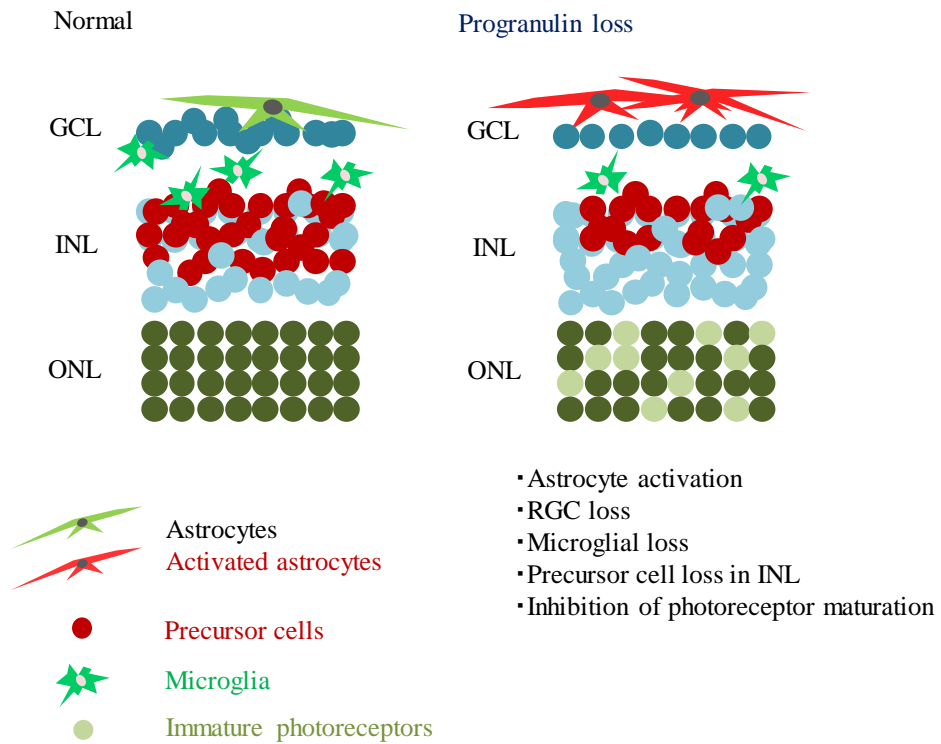
本研究から、プログラニューリン欠損下で網膜ミクログリアが減少していたこと、プログラニューリンはミクログリアの遊走に関与することが報告されていることから、プログラニューリンはミクログリアの網膜内への遊走に関与している可能性が考えられる (72)。とくに、本章で明らかになったように、網膜のプログラニューリンの発現は生後3日目から生後7日目にかけて上昇しており、これはミクログリアの数が増加する時期と一致している (Fig. 28)。また、プログラニューリンは神経細胞に作用して、ミクログリアの遊走に関与するフラクタルカインを放出させることが報告されている (72, 75)。プログラニューリンはミクログリアへの直接的な作用と、神経細胞を介した作用により、ミクログリアの網膜

内への遊走を促進させた可能性が考えられる。

序論で述べたように、プログラニューリンのハプロ不全が原因となる frontotemporal lobar degeneration (FTLD) の疾患を対象として、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である FRM-0334 のプログラニューリン誘導薬としての治療が期待されている (76)。そのため、プログラニューリン自体の投与あるいはプログラニューリン誘導薬を用いることにより、発達期におけるミクログリアの補充や、第 2 章で認められた変化 (視細胞分化異常、アストロサイト活性化、網膜神経節細胞の減少) を回復させることが可能かもしれない (Fig. 36)。

以上のことから、神経系譜の細胞ではないミクログリアが、網膜神経前駆細胞の増殖に影響を与えていることが明らかとなった。近年の報告において、ゼブラフィッシュを用いた検討により、同様にミクログリアが眼の神経新生に関与する結果が示されている (70)。そのため、ミクログリアは神経発達期において、シナプスの刈り込みや血管新生に関与するだけでなく (67, 77)、前駆細胞の増殖にも関与していることが示唆された。本研究により、網膜発生期の新たなミクログリアの役割と、その一端にプログラニューリンが関与していることを明らかにすることができた。





**Fig. 36 Summary of progranulin deficient retina during development.**

During development, progranulin loss caused the abnormality in retina such as astrocyte activation, RGC loss, microglial loss, retinal precursor cell loss in INL and impairment of photoreceptor maturation. Progranulin may have the potential to regulate the balance in retina. GCL: ganglion cell layer, INL: inner nuclear layer, ONL: outer nuclear layer.

## 総括及び結論

加齢黄斑変性症は欧米において失明原因の第1位を占めており、その病態によって萎縮型と滲出型の二種類に大別される。萎縮型加齢黄斑変性症は加齢に伴い視細胞が不可逆的に変性し、未だその治療法及び治療薬は存在しない。

加齢に伴う網膜疾患以外にも、小児期に発症する網膜疾患も存在する。小眼球症や無虹彩症など、網膜前駆細胞の増殖や網膜細胞への分化の障害、黄斑低形成を認める疾患である。これらの疾患は原因遺伝子は特定されているものの、未だ治療法は確立されていない。また、網膜発達期には未分化な前駆細胞の増殖や、前駆細胞の遊走、分化、成熟が起きており、発現する因子も網膜再生に類似していることから再生にも応用が可能であると考えられる。

本研究では、本学薬効解析学研究室において過去に得られた知見を基に、脂肪幹細胞及びその主要な分泌因子であるプログラニュリンの新規作用を明らかにする目的で、再生及び発生という観点から検討を行った。

第1章では、脂肪幹細胞培養上清及びプログラニュリンの網膜障害モデルにおける再生作用の検討を行った。

- 1) マウス網膜障害後の脂肪幹細胞培養上清 (ASC-CM) の投与により、細胞増殖が亢進し、視細胞への分化が促進した。
- 2) マウス網膜障害後のプログラニュリンの投与により、視細胞が存在する層である外顆粒層における網膜前駆細胞の増殖が促進した。

第2章では、プログラニュリンの網膜発生期における作用の検討を行った。

- 1) プログラニュリンは、HGF 受容体を介して網膜前駆細胞の視細胞への分化を促進させた。

- 2) 成体プログラニューリン欠損マウスは、野生型マウスと比較して網膜外顆粒層の厚さが減少し、発生期プログラニューリン欠損マウス (P9) は、視細胞分化が阻害された。
- 3) 成体プログラニューリン欠損マウスは、網膜神経節細胞数が減少し、アストロサイトの活性化が起きた。
- 4) 成体プログラニューリン欠損マウス視神経は、網膜神経節細胞の軸索マーカータンパク (NFH) が凝集し、アストロサイトの活性化が起きた。
- 5) 生後 9 日目のプログラニューリン欠損マウスは、網膜神経節細胞数の減少とアストロサイトの活性化が認められ、生後 1 日目では認められなかった。
- 6) 生後 1 日目から生後 9 日目のプログラニューリン欠損マウス網膜において、プログラニューリンの発現量が増加した。

第 3 章では、網膜発生期におけるミクログリアの影響及びプログラニューリンの関与について検討した。

- 1) 生後 7 日目にミクログリアのマーカーである Iba-1 及びプログラニューリンの発現が上昇した。
- 2) 仔マウスへの lipopolysaccharide (LPS) の投与によって、生後 7 日目にミクログリアが増加し、網膜前駆細胞増殖が亢進した。
- 3) 仔マウスへの PLX3397 の投与によって、生後 7 日目にミクログリアが減少し、網膜前駆細胞増殖が減少した。
- 4) 生後 7 日目のプログラニューリン欠損マウス網膜では、ミクログリア及び網膜前駆細胞数がともに減少した。

本研究において、プログラニューリンは網膜障害後の網膜前駆細胞増殖促進作用を介して、網膜再生に寄与することが示唆された。また、網膜発生期には、特に網膜神経節細胞、網膜視細胞及びアストロサイトへの関与が示唆された。その他、別の作用としてミクログリアへの作用も考えられ、様々な観点から、プログラニューリンは網膜発生に重要であることが示唆された。

以上、プログラニューリンは網膜前駆細胞増殖促進作用を示し、網膜再生に寄与することを明らかにした。また、プログラニューリンは網膜発生期に網膜細胞分化や生存を促進することを明らかにした。上述のようなヒストン脱アセチル化酵素阻害剤によるプログラニューリンの網膜神経細胞での誘導や、後眼部送達を目的としたリポソーム点眼剤を用いることで、眼内へとプログラニューリンを送達することができる。プログラニューリンは加齢黄斑変性症などの網膜変性疾患における治療標的の候補となることが期待される。

## 謝辞

本稿を終えるに臨み、本研究の遂行にあたり終始御懇篤なる御指導、ご鞭撻を賜りました恩師 岐阜薬科大学学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室教授 原英彰博士に深甚なる謝意を表します。

本実験に際して終始御懇切なる御指導並びに御助言を賜りました岐阜薬科大学学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室准教授 嶋澤雅光博士、助教 中村信介博士、前講師 鶴間一寛博士に感謝致します。また、諸種のご協力を頂きました薬効解析学研究室諸氏に深謝致します。

本論文の審査にあたり、有益なるご助言を賜りました岐阜薬科大学学生体機能解析学大講座分子生物学研究室教授 福光秀文博士、岐阜薬科大学医療薬剤学大講座薬物動態学研究室教授 北市清幸博士、並びに岐阜薬科大学医療薬剤学大講座薬物治療学研究室准教授 位田雅俊博士に深謝致します。

本研究は JSPS 科研費 15J07651 の助成を受けたものです。

## 引用文献

1. Grunwald, J. E., Daniel, E., Huang, J., Ying, G.-S., Maguire, M. G., Toth, C. A., Jaffe, G. J., Fine, S. L., Blodi, B., Klein, M. L., Martin, A. A., Hagstrom, S. A., Martin, D. F., and CATT Research Group. (2014) Risk of geographic atrophy in the comparison of age-related macular degeneration treatments trials. *Ophthalmology* **121**, 150–161.
2. Mandai, M., Watanabe, A., Kurimoto, Y., Hiramami, Y., Morinaga, C., Daimon, T., Fujihara, M., Akimaru, H., Sakai, N., Shibata, Y., Terada, M., Nomiyama, Y., Tanishima, S., Nakamura, M., Kamao, H., Sugita, S., Onishi, A., Ito, T., Fujita, K., Kawamata, S., Go, M. J., Shinohara, C., Hata, K., Sawada, M., Yamamoto, M., Ohta, S., Ohara, Y., Yoshida, K., Kuwahara, J., Kitano, Y., Amano, N., Umekage, M., Kitaoka, F., Tanaka, A., Okada, C., Takasu, N., Ogawa, S., Yamanaka, S., and Takahashi, M. (2017) Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N. Engl. J. Med.* **376**, 1038–1046.
3. Sugita, S., Iwasaki, Y., Makabe, K., Kamao, H., Mandai, M., Shiina, T., Ogasawara, K., Hiramami, Y., Kurimoto, Y., and Takahashi, M. (2016) Successful Transplantation of Retinal Pigment Epithelial Cells from MHC Homozygote iPSCs in MHC-Matched Models. *Stem Cell Reports* **7**, 635–648.
4. Sugita, S., Iwasaki, Y., Makabe, K., Kimura, T., Futagami, T., Suegami, S., and Takahashi, M. (2016) Lack of T Cell Response to iPSC-Derived Retinal Pigment Epithelial Cells from HLA Homozygous Donors. *Stem Cell Reports* **7**, 619–634.
5. Taskintuna, I., Elsayed, M. E. A. A., and Schatz, P. (2016) Update on Clinical Trials in Dry Age-related Macular Degeneration. *Middle East Afr. J. Ophthalmol.* **23**, 13–26.
6. Li, H., Chintalapudi, S. R., and Jablonski, M. M. (2017) Current drug and molecular therapies for the treatment of atrophic age-related macular degeneration: phase I to phase III clinical development. *Expert Opin. Investig. Drugs* **26**, 1103–1114.
7. Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., and Gage, F. H. (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* **4**, 1313–1317.
8. Bhardwaj, R. D., Curtis, M. A., Spalding, K. L., Buchholz, B. A., Fink, D., Bjork-Eriksson, T., Nordborg, C., Gage, F. H., Druid, H., Eriksson, P. S., and Frisen, J. (2006) Neocortical neurogenesis in humans is restricted to

- development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 12564–12568.
9. Arvidsson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z., and Lindvall, O. (2002) Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat. Med.* **8**, 963–970.
  10. Ooto, S., Akagi, T., Kageyama, R., Akita, J., Mandai, M., Honda, Y., and Takahashi, M. (2004) Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mammalian retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 13654–13659
  11. Goldman, D. (2014) Müller glial cell reprogramming and retina regeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* **15**, 431–442.
  12. Yao, K., Qiu, S., Tian, L., Snider, W. D., Flannery, J. G., Schaffer, D. V., and Chen, B. (2016) Wnt Regulates Proliferation and Neurogenic Potential of Müller Glial Cells via a Lin28/let-7 miRNA-Dependent Pathway in Adult Mammalian Retinas. *Cell Rep.* **17**, 165–178.
  13. Osakada, F., Ooto, S., Akagi, T., Mandai, M., Akaike, A., and Takahashi, M. (2007) Wnt signaling promotes regeneration in the retina of adult mammals. *J. Neurosci.* **27**, 4210–4219.
  14. Gust, J. and Reh, T. A. (2011) Adult donor rod photoreceptors integrate into the mature mouse retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 5266–5272.
  15. Dengke, M. k., Bonaguidi, M. A., Ming, G., and Song, H. (2009) Adult neural stem cells in the mammalian central nervous system. *Cell Res.* **19**, 672–682.
  16. Ragge, N. K., Brown, A. G., Poloschek, C. M., Lorenz, B., Henderson, R. A., Clarke, M. P., Russell-Eggitt, I., Fielder, A., Gerrelli, D., Martinez-Barbera, J. P., Ruddle, P., Hurst, J., Collin, J. R. O., Salt, A., Cooper, S. T., Thompson, P. J., Sisodiya, S. M., Williamson, K. a, Fitzpatrick, D. R., van Heyningen, V., and Hanson, I. M. (2005) Heterozygous mutations of OTX2 cause severe ocular malformations. *Am. J. Hum. Genet.* **76**, 1008–1022.
  17. Ferda Percin, E., Ploder, L. A., Yu, J. J., Arici, K., Horsford, D. J., Rutherford, A., Bapat, B., Cox, D. W., Duncan, A. M., Kalnins, V. I., Kocak-Altintas, A., Sowden, J. C., Traboulsi, E., Sarfarazi, M., and McInnes, R. R. (2000) Human microphthalmia associated with mutations in the retinal homeobox gene CHX10. *Nat. Genet.* **25**, 397–401.
  18. Voronina, V. A., Kozhemyakina, E. A., O’Kernick, C. M., Kahn, N. D., Wenger, S. L., Linberg, J. V., Schneider, A. S., and Mathers, P. H. (2004) Mutations in the human RAX homeobox gene in a patient with anophthalmia and sclerocornea. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 315–322.
  19. Glaser, T., Jepeal, L., Edwards, J. G., Young, S. R., Favor, J., and Maas, R. L.

- (1994) PAX6 gene dosage effect in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia and central nervous system defects. *Nat. Genet.* **7**, 463–471.
20. Jordan, T., Hanson, I., Zaletayev, D., Hodgson, S., Prosser, J., Seawright, A., Hastie, N., and van Heyningen, V. (1992) The human PAX6 gene is mutated in two patients with aniridia. *Nat. Genet.* **1**, 328–332.
21. Gregory-Evans, C. Y., Wallace, V. A., and Gregory-Evans, K. (2013) Gene networks: dissecting pathways in retinal development and disease. *Prog. Retin. Eye Res.* **33**, 40–66.
22. Löffler, K., Schäfer, P., Völkner, M., Holdt, T., and Karl, M. O. (2015) Age-dependent Müller glia neurogenic competence in the mouse retina. *Glia* **63**, 1809–1824.
23. Kleinberger, G., Capell, A., Haass, C., and Van Broeckhoven, C. (2013) Mechanisms of granulin deficiency: Lessons from cellular and animal models. *Mol. Neurobiol.* **47**, 337–360.
24. Ahmed, Z., Sheng, H., Xu, Y., Lin, W.-L., Innes, A. E., Gass, J., Yu, X., Hou, H., Chiba, S., Yamanouchi, K., Leissring, M., Petrucelli, L., Nishihara, M., Hutton, M. L., McGowan, E., Dickson, D. W., and Lewis, J. (2010) Accelerated Lipofuscinosis and Ubiquitination in Granulin Knockout Mice Suggest a Role for Progranulin in Successful Aging. *Am. J. Pathol.* **177**, 311–324.
25. Wilson, A. C., Dugger, B. N., Dickson, D. W., and Wang, D.-S. (2011) TDP-43 in aging and Alzheimer's disease - a review. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **4**, 147–155.
26. Salter, M. W. and Stevens, B. (2017) Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat. Med.* **23**, 1018–1027.
27. Tsuruma, K., Yamauchi, M., Sugitani, S., Otsuka, T., Ohno, Y., Nagahara, Y., Ikegame, Y., Shimazawa, M., Yoshimura, S., Iwama, T., and Hara, H. (2014) Progranulin, a major secreted protein of mouse adipose-derived stem cells, inhibits light-induced retinal degeneration. *Stem Cells Transl. Med.* **3**, 42–53.
28. Kuroda, Y., Kitada, M., Wakao, S., Nishikawa, K., Tanimura, Y., Makinoshima, H., Goda, M., Akashi, H., Inutsuka, A., Niwa, A., Shigemoto, T., Nabeshima, Y., Nakahata, T., Nabeshima, Y.-I., Fujiyoshi, Y., and Dezawa, M. (2010) Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 8639–8643.
29. Parr, A. M., Tator, C. H., and Keating, A. (2007) Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury. *Bone Marrow Transplant.* **40**, 609–619.



30. Inoue, Y., Iriyama, A., Ueno, S., Takahashi, H., Kondo, M., Tamaki, Y., Araie, M., and Yanagi, Y. (2007) Subretinal transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells delays retinal degeneration in the RCS rat model of retinal degeneration. *Exp. Eye Res.* **85**, 234–241.
31. Zhang, Y. and Wang, W. (2010) Effects of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation on light-damaged retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **51**, 3742–3748.
32. Harada, C., Guo, X., Namekata, K., Kimura, A., Nakamura, K., Tanaka, K., Parada, L. F., and Harada, T. (2011) Glia- and neuron-specific functions of TrkB signalling during retinal degeneration and regeneration. *Nat. Commun.* **2**, 189.
33. Niu, W., Zang, T., Zou, Y., Fang, S., Smith, D. K., Bachoo, R., and Zhang, C.-L. (2013) In vivo reprogramming of astrocytes to neuroblasts in the adult brain. *Nat. Cell Biol.* **15**, 1164–1175.
34. Hirakawa, M., Tanaka, M., Tanaka, Y., Okubo, A., Koriyama, C., Tsuji, M., Akiba, S., Miyamoto, K., Hillebrand, G., Yamashita, T., and Sakamoto, T. (2008) Age-related maculopathy and sunlight exposure evaluated by objective measurement. *Br. J. Ophthalmol.* **92**, 630–634.
35. Noell, W. K., Walker, V. S., Kang, B. S., and Berman, S. (1966) Retinal damage by light in rats. *Invest. Ophthalmol.* **5**, 450–473.
36. Paskowitz, D. M., LaVail, M. M., and Duncan, J. L. (2006) Light and inherited retinal degeneration. *Br. J. Ophthalmol.* **90**, 1060–1066.
37. Tsuruma, K., Yamauchi, M., Inokuchi, Y., Sugitani, S., Shimazawa, M., and Hara, H. (2012) Role of Oxidative Stress in Retinal Photoreceptor Cell Death in N-Methyl-N-nitrosourea-Treated Mice. *J. Pharmacol. Sci.* **118**, 351–362.
38. Zhao, L., Wang, C., Song, D., Li, Y., Song, Y., Su, G., and Dunaief, J. L. (2014) Systemic administration of the antioxidant/iron chelator  $\alpha$ -lipoic acid protects against light-induced photoreceptor degeneration in the mouse retina. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **55**, 5979–5988.
39. Shahinfar, S., Edward, D. P., and Tso, M. O. (1991) A pathologic study of photoreceptor cell death in retinal photic injury. *Curr. Eye Res.* **10**, 47–59.
40. Gehring, W. J. and Ikeo, K. (1999) Pax 6: Mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet.* **15**, 371–377.
41. Furukawa, T., Kozak, C. A., and Cepko, C. L. (1997) rax, a novel paired-type homeobox gene, shows expression in the anterior neural fold and developing retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 3088–3093.

42. Marquardt, T., Ashery-Padan, R., Andrejewski, N., Scardigli, R., Guillemot, F., and Gruss, P. (2001) Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell* **105**, 43–55.
43. Furukawa, T., Morrow, E. M., and Cepko, C. L. (1997) Crx, a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation. *Cell* **91**, 531–541.
44. Furukawa, T., Morrow, E. M., Li, T., Davis, F. C., and Cepko, C. L. (1999) Retinopathy and attenuated circadian entrainment in Crx-deficient mice. *Nat. Genet.* **23**, 466–470.
45. Medina-Martinez, O., Amaya-Manzanares, F., Liu, C., Mendoza, M., Shah, R., Zhang, L., Behringer, R. R., Mahon, K. A., and Jamrich, M. (2009) Cell-autonomous requirement for Rx function in the mammalian retina and posterior pituitary. *PLoS One* **4**, 1–7.
46. Tatsumi, R., Anderson, J. E., Nevoret, C. J., Halevy, O., and Allen, R. E. (1998) HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Dev. Biol.* **194**, 114–128.
47. Davis, a a, Matzuk, M. M., and Reh, T. a. (2000) Activin A promotes progenitor differentiation into photoreceptors in rodent retina. *Mol. Cell. Neurosci.* **15**, 11–21.
48. Yang, M., Yang, S.-L., Herrlinger, S., Liang, C., Dzieciatkowska, M., Hansen, K. C., Desai, R., Nagy, A., Niswander, L., Moss, E. G., and Chen, J.-F. (2015) Lin28 promotes the proliferative capacity of neural progenitor cells in brain development. *Development* **142**, 1616–1627.
49. Hirabayashi, Y., Itoh, Y., Tabata, H., Nakajima, K., Akiyama, T., Masuyama, N., and Gotoh, Y. (2004) The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Development* **131**, 2791–2801.
50. Tao, C. and Zhang, X. (2014) Development of astrocytes in the vertebrate eye. *Dev. Dyn.* **243**, 1501–1510.
51. Fruttiger, M., Calver, A. R., Krüger, W. H., Mudhar, H. S., Michalovich, D., Takakura, N., Nishikawa, S., and Richardson, W. D. (1996) PDGF mediates a neuron-astrocyte interaction in the developing retina. *Neuron* **17**, 1117–1131.
52. Wallace, V. a and Raff, M. C. (1999) A role for Sonic hedgehog in axon-to-astrocyte signalling in the rodent optic nerve. *Development* **126**, 2901–2909.
53. Hafler, B. P., Klein, Z. a, Jimmy Zhou, Z., and Strittmatter, S. M. (2014) Progressive retinal degeneration and accumulation of autofluorescent

- lipopigments in Progranulin deficient mice. *Brain Res.* 1–7.
54. Ward, M. E., Taubes, a., Chen, R., Miller, B. L., Sephton, C. F., Gelfand, J. M., Minami, S., Boscardin, J., Martens, L. H., Seeley, W. W., Yu, G., Herz, J., Filiano, a. J., Arrant, a. E., Roberson, E. D., Kraft, T. W., Farese, R. V., Green, a., and Gan, L. (2014) Early retinal neurodegeneration and impaired Ran-mediated nuclear import of TDP-43 in progranulin-deficient FTL. *J. Exp. Med.* **211**, 1937–1945.
  55. Daniel, R., Daniels, E., He, Z., and Bateman, A. (2003) Progranulin (acroganin/PC cell-derived growth factor/granulin-epithelin precursor) is expressed in the placenta, epidermis, microvasculature, and brain during murine development. *Dev. Dyn.* **227**, 593–599.
  56. Gao, X., Joselin, A. P., Wang, L., Kar, A., Ray, P., Bateman, A., Goate, A. M., and Wu, J. Y. (2010) Progranulin promotes neurite outgrowth and neuronal differentiation by regulating GSK-3 $\beta$ . *Protein Cell* **1**, 552–562.
  57. Li, Y. H., Chen, M. H. C., Gong, H. Y., Hu, S. Y., Li, Y. W., Lin, G. H., Lin, C. C., Liu, W., and Wu, J. L. (2010) Progranulin A-mediated MET signaling is essential for liver morphogenesis in zebrafish. *J. Biol. Chem.* **285**, 41001–41009.
  58. Kayasuga, Y., Chiba, S., Suzuki, M., Kikusui, T., Matsuwaki, T., Yamanouchi, K., Kotaki, H., Horai, R., Iwakura, Y., and Nishihara, M. (2007) Alteration of behavioural phenotype in mice by targeted disruption of the progranulin gene. *Behav. Brain Res.* **185**, 110–118.
  59. Sun, W., Funakoshi, H., and Nakamura, T. (1999) Differential expression of hepatocyte growth factor and its receptor, c-Met in the rat retina during development. *Brain Res.* **851**, 46–53.
  60. Santos, A. M., Calvente, R., Tassi, M., Carrasco, M.-C., Martín-Oliva, D., Marín-Teva, J. L., Navascués, J., and Cuadros, M. A. (2008) Embryonic and postnatal development of microglial cells in the mouse retina. *J. Comp. Neurol.* **506**, 224–239.
  61. Menzel, L., Kleber, L., Friedrich, C., Hummel, R., Dangel, L., Winter, J., Schmitz, K., Tegeder, I., and Schäfer, M. K. E. (2017) Progranulin protects against exaggerated axonal injury and astrogliosis following traumatic brain injury. *Glia* **65**, 278–292.
  62. Wong, W.-K., Cheung, A. W.-S., Yu, S.-W., Sha, O., and Cho, E. Y. P. (2014) Hepatocyte growth factor promotes long-term survival and axonal regeneration of retinal ganglion cells after optic nerve injury: comparison with CNTF and

- BDNF. *CNS Neurosci. Ther.* **20**, 916–929.
63. Tönges, L., Ostendorf, T., Lamballe, F., Genestine, M., Dono, R., Koch, J.-C., Bähr, M., Maina, F., and Lingor, P. (2011) Hepatocyte growth factor protects retinal ganglion cells by increasing neuronal survival and axonal regeneration in vitro and in vivo. *J. Neurochem.* **117**, 892–903.
  64. Close, J. L., Gumuscu, B., and Reh, T. a. (2005) Retinal neurons regulate proliferation of postnatal progenitors and Müller glia in the rat retina via TGF beta signaling. *Development* **132**, 3015–3026.
  65. Bassett, E. A. and Wallace, V. A. (2012) Cell fate determination in the vertebrate retina. *Trends Neurosci.* **35**, 565–573.
  66. Sapiha, P. (2012) Eyeing central neurons in vascular growth and reparative angiogenesis. *Blood* **120**, 2182–2194.
  67. Checchin, D., Sennlaub, F., Levavasseur, E., Leduc, M., and Chemtob, S. (2006) Potential role of microglia in retinal blood vessel formation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **47**, 3595–3602.
  68. Pang, Y., Dai, X., Roller, A., Carter, K., Paul, I., Bhatt, A. J., Lin, R. C. S., and Fan, L.-W. (2016) Early Postnatal Lipopolysaccharide Exposure Leads to Enhanced Neurogenesis and Impaired Communicative Functions in Rats. *PLoS One* **11**, e0164403.
  69. Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Goldman, J. E., Sekino, Y., and Sato, K. (2014) Microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. *J. Neurosci.* **34**, 2231–2243.
  70. Huanga, T., Cuia, J., Lia, L., Hitchcockc, P. F., and Lia, Y. (2012) The role of microglia in the neurogenesis of zebrafish retina. *Biochem Biophys Res Commun.* **421**, 214–220.
  71. Petkau, T. L. and Leavitt, B. R. (2014) Progranulin in neurodegenerative disease. *Trends Neurosci.* **37**, 388–398.
  72. Pickford, F., Marcus, J., Camargo, L. M., Xiao, Q., Graham, D., Mo, J. R., Burkhardt, M., Kulkarni, V., Crispino, J., Hering, H., and Hutton, M. (2011) Progranulin is a chemoattractant for microglia and stimulates their endocytic activity. *Am. J. Pathol.* **178**, 284–295.
  73. Prinz, M. and Priller, J. (2014) Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **15**, 300–312.
  74. Renee, M., Elmore, P., Najafi, A. R., Koike, M. A., Nazih, N., Spangenberg, E. E., Rice, R. A., Kitazawa, M., Nguyen, H., West, B. L., and Green, K. N.

- (2015) CSF1 receptor signaling is necessary for microglia viability, which unmasks a cell that rapidly repopulates the microglia- depleted adult brain. *Neuron* **82**, 380–397.
75. Ruitenbergh, M. J., Vukovic, J., Blomster, L., Hall, J. M., Jung, S., Filgueira, L., McMenamin, P. G., and Plant, G. W. (2008) CX3CL1/fractalkine regulates branching and migration of monocyte-derived cells in the mouse olfactory epithelium. *J. Neuroimmunol.* **205**, 80–85.
76. Cenik, B., Sephton, C. F., Dewey, C. M., Xian, X., Wei, S., Yu, K., Niu, W., Coppola, G., Coughlin, S. E., Lee, S. E., Dries, D. R., Almeida, S., Geschwind, D. H., Gao, F. B., Miller, B. L., Farese, R. V., Posner, B. A., Yu, G., and Herz, J. (2011) Suberoylanilide hydroxamic acid (vorinostat) up-regulates progranulin transcription: Rational therapeutic approach to frontotemporal dementia. *J. Biol. Chem.* **286**, 16101–16108.
77. Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T. A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D., and Gross, C. T. (2011) Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* **333**, 1456–1458.

### 略語一覽表

ASC	Adipose-derived stem cell
ASC-CM	Adipose-derived stem cell-conditioned medium
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridine
Brn3a	Brain-specific homeobox/POU domain protein 3A
BSA	Bovine serum albumin
CRX	Cone rod homeobox
DMEM	Dulbeco's modified Eagles's medium
ES	Embryonic stem
FBS	Fetal bovine serum
FTLD	Frontotemporal lobar deneration
GCL	Ganglion cell layer
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GS	Glutamine synthetase
HGF	Hepatocyte growth factor
Iba-1	Ionized calcium binding adapter molecule 1
INL	Inner nucler layer
IPL	Inner plexiform layer
iPS	induced Pluripotent Stem
KO	Knockout
LPS	Lipopolysaccharide
MNU	<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -nitrosourea
MBP	Myelin basic protein
NFH	Neurofilament H

ONL	Outer nuclear layer
Pax6	Paired box protein 6
Rx	Retina and anterior neural fold homeobox
RGC	Retinal ganglion cell
Sox2	Sex determining region Y-box 2
Vsx2	Visual system homeobox 2
WT	Wild type