

平成 21 年 4 月 15 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19700338

研究課題名（和文）網膜におけるレチノイン酸誘導の一酸化窒素合成酵素の生理機能と神経再生への応用

研究課題名（英文）Physiological function of retinoic acid-induced nNOS expression in the retina: Application for CNS regeneration

研究代表者 郡山 恵樹（KORIYAMA YOSHIKI）

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：70397199

研究成果の概要：ほ乳類と異なり、魚類では中枢神経の再生が可能である。これまで我々は魚類視神経損傷後の網膜内で一酸化窒素合成酵素（NOS）の発現が高まることを見つけていた。本研究では NOS と神経再生の関連について詳細なシグナル解析とともに調べた。その結果、視神経損傷後の網膜神経節細胞層で増加する神経型の NOS はレチノイン酸で誘導され細胞内で産生された一酸化窒素がグアニル産シクラーゼ活性化を介して cGMP 依存的な軸索伸長を示すことがわかった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	0	1,500,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	390,000	3,190,000

研究分野：神経再生

科研費の分科・細目：神経化学、神経薬理学

キーワード：神経再生、一酸化窒素合成酵素、一酸化窒素、cGMP、レチノイン酸、レチノイン酸合成酵素、網膜

1. 研究開始当初の背景

中枢神経は損傷、脱落をうけるとアポトーシスが誘導され再生しないという概念から緑内障をはじめとする中枢神経疾患の治療は難しいとされてきた。近年、ほ乳類における中枢神経再生の試みとして末梢神経移植や幹細胞の神経様分化誘導の応用が盛んに行われているが、いずれも機能的な再生には至っていない。一方、魚類は神経損傷させても、神経軸索再生阻害因子をコードする遺伝子がないため再生が可能であり、神経再生モデルとして用いられる。しかしどのようなメカニズムで神経再生が起こるかについては不明であった。下等脊椎動物の中枢神

経系が再生可能である理由やそのメカニズムを知ることはほ乳類中枢神経再生への応用に大きな貢献をもたらすだろうと考える。魚類視神経損傷後に網膜神経節細胞において一酸化窒素合成酵素(NOS)の発現が高まることをすでに報告しており(Devadas et al., Neurosci. Res. 2001)、今回は特に神経再生における NOS の作用メカニズムについて解析を行なった。これらのメカニズムの解析が将来的な難治性中枢神経疾患の治療に何らかの貢献ができれば幸いである。

2. 研究の目的

魚類網膜 視神経系を用いた神経再生モデルにおいて、神経損傷後の網膜神経節細胞 (RGC) では NOS の発現が網膜の RGC 層で発現増加することが分かっていたので中枢神経再生における NOS との関わりを知るために詳細なシグナル経路を精査することを目的とした。また、予試験的に魚類神経再生にレチニン酸が関連することが分かっていたのでレチニン酸と NOS の関係も調べ、視神経再生との関連性を精査した。特にレチニン酸合成酵素 (RALDH2)、分解酵素 (CYP26a1)、レチニン酸結合タンパク質 (CRABPI, CRABPIIb) とレチニン酸のレセプター (RARalpha) の発現パターンや局在についても調べた。視神経損傷後に RGC において増加するレチニン酸が nNOS 発現後、NO-cGMP-PKG 経路を介した軸索再伸長を起すかどうかについて *in vitro* および *in vivo* において調べた。

3. 研究の方法

金魚視神経損傷後の RALDH2、CYP26a1、CRABPI、CRABPIIb、RARalpha 発現パターンや局在については *in situ* ハイブリダイゼーション法と RT-PCR 法を用いた。また視神経損傷後の神経型 NOS (nNOS) の発現パターンと局在も *in situ* ハイブリダイゼーション法と RT-PCR 法、ウェスタンブロット、免疫染色法を用いて調べた。また実際の一酸化窒素 (NO) 産生量と活性についてはグリース法と NADPH ジアホラーゼ染色法を用いて精査した。軸索伸長と nNOS-NO の関係は金魚網膜組織片培養を用いた薬理的な解析を用いて軸索伸長効果と関連するシグナルを調べた。最終的には *in vivo* における視神経再生をトレーサ - 法により解析した。

4. 研究成果

我々の以前の研究よりレチニールは著しく視神経損傷後網膜組織片培養において軸索の再伸長を促進する結果を得ている (Matsukawa et al., J. Neurosci. 2004)。これらのことから視神経損傷後の RGC におけるレチニン酸のレベルを RALDH2 および CYP26a1 のレベルで精査した。その結果視神経損傷後 7 日より RALDH2 の発現上昇、CYP26a1 の発現抑制が見られ、RGC 内でレチニン酸合成量が高まっていることが示唆された (図.1)。また、同時に細胞内のレチニール結合タンパク質 CRABPIIb の発現とレチニン酸レセプターの RARalpha の発現も高まっていることからレチニン酸による何らかのタンパク質発現が軸索伸長促進に関わっている可能性が示唆された (Nagashima et al., Neurochem. Int. 2009)。

一方、魚類視神経損傷後に網膜神経節細胞

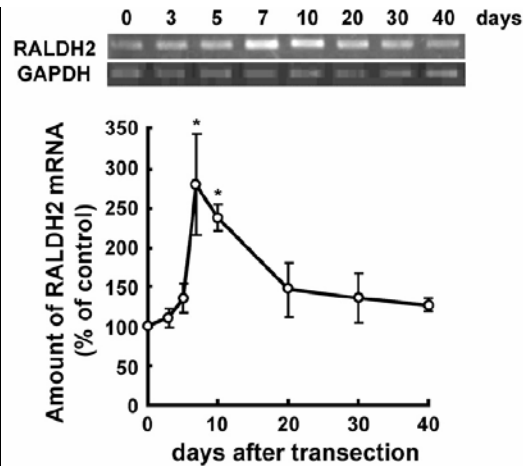


図 1. 視神経損傷後の RALDH2 の発現

において一酸化窒素合成酵素 (NOS) の発現が高まることをすでに報告しており (Devadas et al., Neurosci. Res. 2001)、その NOS のアイソタイプの決定や機能解析を行なった。その結果視神経損傷後、RGC において nNOS の mRNA、タンパク質、活性と NO の産生量ともに上昇することがわかった。



図 2. 視神経損傷後の nNOS の発現

そこで視神経再生と NO-NOS の関係を網膜組織片培養で調べた。その結果 NOS 阻害剤である L-NAME によって軸索伸長が抑制されることや SNAP、NOR2 といった NO 発生剤では軸索伸長が促進される結果となった。またより特異性の高い nNOS 阻害剤や nNOS 選択的な siRNAi によっても軸索伸長が抑制された結果から nNOS は損傷後の視神経再生に強く関わっていることが分かった。また、NO は可溶性グアニル酸シクラーゼを直接活性化し細胞内で cGMP を産生することが知られているので NO-cGMP と神経再生の関係についても精査した。sGC 阻害剤である ODQ によって軸索伸長は有意に阻害され膜透過性の cGMP アナログ dbcGMP により ODQ による阻害が抑えられた。また cGMP 依存的なプロテインキナーゼ (PKG) の阻害剤によっても軸索伸長が抑制されることから NO-cGMP-PKG 経路が視神経再生に関わっていると結論づけ現在論文投稿中である。実際に金魚視神経損傷後に眼球内に cGMP を投与し

た群では順行性、逆行性トレーサーにより in vivo での神経再生が確認された(図. 3)。

またレチノイン酸処理により網膜の nNOS レベルや NO 産生量が増えることから細胞内でレチノイン酸レベルが上昇することが nNOS 発現増加、ひいては cGMP、PKG の活性化を引き起こし視神経の再生を促進していると考え(図. 4)。

今後、NOS のアイソタイプのレベル変化やレチノイン酸により発現増加するシグナルを精査、解析することで神経再生メカニズムを再生できないほ乳類に応用したい。

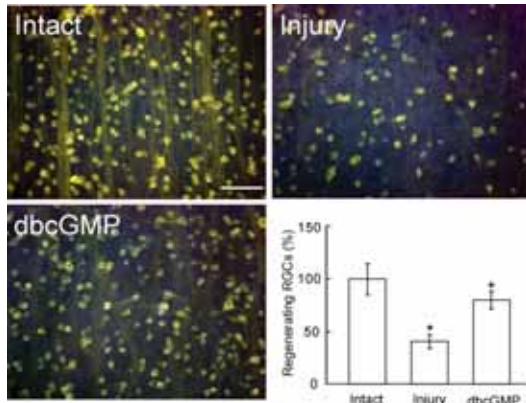


図 3. in vivo での dbcGMP による視神経再生

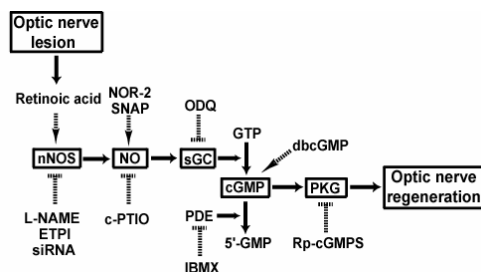


図 4. NO-cGMP-PKG 経路による神経再生

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

Nagashima M, Sakurai H, Mawatari K, Koriyama Y, Matsukawa T, Kato S., Involvement of retinoic acid signaling in goldfish optic nerve regeneration. Neurochem Int. 54, 229-236 (2009), 査読有

Koriyama Y, Tanii H, Ohno M, Kimura T, Kato S., A novel neuroprotective role of a small peptide from flesh fly, 5-S-GAD in the rat retina in vivo. Brain Res. 1240, 196-203(2008), 査読有

Kaneda M, Nagashima M, Nunome T, Muramatsu T, Yamada Y, Kubo M, Muramoto K, Matsukawa T, Koriyama Y, Sugitani K, Vachkov I, Mawatari K, Kato S., Changes of phospho-growth associated protein 43 (phospho-GAP43) in zebrafish retina after optic nerve injury:a long term observation.Neurosci Res. 61 281-288(2008), 査読有

Higuchi Y, Tanii H, Koriyama Y, Mizukami Y, Yoshimoto T.Arachidonic acid promotes glutamate-induced cell death associated with necrosis by 12-lipoxygenase activation in glioma cells. Life Sciences, 80 1856-1864(2007) 、査読有

Koriyama Y, Homma K, Mawatari K, Higuchi Y, Matsukawa T, Kosaka J, Kato S.Early downregulation of IGF-I decides the fate of rat retinal ganglion cells after optic nerve injury. Neurochem Int, 50 741-748(2007), 査読有

Koriyama Y, Homma K, Sugitani K, Higuchi Y, Matsukawa T, Murayama D, Kato S. Upregulation of IGF-I in the goldfish retinal ganglion cells during the early stage of optic nerve regeneration. Neurochem Int, 50 749-756(2007), 査読有

(学会発表)(計 7 件)

郡山恵樹, 齊藤淳一, 松川 通, 加藤 聖, 中枢神経損傷後におけるレチノール結合タンパク質プルプリンの神経保護、軸索伸長効果について、第 129 回日本薬学会年会、2009.3.28、京都

Y.Koriyama, J. Saito, T. Matsukawa, S.Kato., A retinol binding protein, purpurin protects injury-induced apoptosis and regenerate axons in rat CNS neurons. Society for Neuroscience 38th Annual Meeting, Saturday 2008.11.15, ワシントン DC

齊藤淳一、郡山恵樹、野中真澄、松川通、加藤聖、視神経再生分子プルプリンによるRALDH2の発現促進作用について、第55回中部日本生理学会、2008.10.17、愛知

(3)連携研究者
なし

郡山恵樹、松川通、齊藤淳一、野中真澄、加藤聖、プルプリンはラット損傷中枢神経のアポトーシスを保護する、第51回日本神経化学大会、2008.9.13、富山

Y. Koriyama, T. Matsukawa, H. Tanii, S. Kato, Cell survival and axonal regeneration by purpurin in retinal ganglion cells during optic nerve injury, Society for Neuroscience 37th Annual Meeting, 2007.11.6, カリフォルニア

加藤 聖、永島幹子、郡山恵樹、杉谷加代、松川 通、魚類の視神経再生の評価法について、第54回中部日本生理学会、2007.10.19、三重

郡山恵樹、桜井裕之、松川通、馬渡一浩、加藤聖、プルプリンによる損傷後網膜神経節細胞の生存および軸索再生、第50回日本神経化学大会、2007.9.10、横浜

(図書)(計 1 件)

Kato S. Koriyama Y. Matsukawa T. Sugitani K. Optic nerve regeneration in goldfish. In: Model Organisms in Spinal Cord Regeneration.(Becker CG, Becker T, eds), Wiley-VCH, Germany, pp355-372(2007).

6 . 研究組織

(1)研究代表者

郡山 恵樹 (KORIYAMA YOSHIKI)
金沢大学・医学系・助教
研究者番号：70397199

(2)研究分担者

なし