

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 7 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05725

研究課題名(和文) HSF-1 が関与する中枢神経再生へのカスケード反応

研究課題名(英文) HSF-1 is indispensable for injured optic nerve regeneration.

研究代表者

杉谷 加代 (Sugitani, Kayo)

金沢大学・保健学系・准教授

研究者番号：20162258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では再生・機能回復が可能なゼブラフィッシュ視神経をクラッシュし、その後24時間以内の急性期に発現が見られる分子の変化を中心に研究を行った。その結果、タンパク架橋酵素であるTransglutaminase2が損傷後30分をピークとした一過性の増加が見られ、この発現はHeat shock factor 1 (HSF1)の発現誘導に深く関与していた。さらにHSF1は山中因子として知られる3つの転写因子(Klf4, Oct4, Sox2)の発現にも寄与していることが分かった。これらの分子の発現は、損傷後の神経細胞のアポトーシスを回避すると共にリプログラミングにも深く関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

魚類の網膜-視神経-視蓋からなる視覚系は、中枢神経軸索再生のモデルとしてよく研究されており基礎的データの蓄積が大きい。本研究により神経軸索の再生あるいは創傷治癒のスイッチを握るかもしれない分子の活性化機構が明らかとなれば、中枢神経組織の損傷直後に発現誘導される急性相反応物質の生理学的意義の解明に繋がると考えられる。また、この実験系では山中ファクターの誘導が視神経クラッシュによって自然な治癒過程として網膜で起こるため、本研究が進展すれば、ヒトの脊髄損傷など中枢神経軸索損傷に対し治療効果のある分子が発見されるきっかけを掴める可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Unlike in mammals, fish central nervous system neurons can regrow axons and restore their function after nerve injury. In this study, we used a zebrafish optic nerve injury model to analyze molecules induced during the acute phase (<24 hours) of the regenerative process. The results revealed that the three Yamanaka factors, klf 4, oct 4, and sox 2, are activated in the damaged retina within a few hours. This activation required increased expression of HSF1 in the retina. Early expression of HSF1 was also important for avoiding apoptosis. Further, activation of HSF1 required immediate upregulation of Transglutaminase 2 in the damaged retina. Expression of these molecules may avoid neuronal damage after optic nerve injury, and expression of Yamanaka factors may contribute to induction of reprogramming to form new optic nerve.

研究分野：神経生理学, 神経科学

キーワード：zebrafish optic nerve regeneration retina transglutaminase 2 heat shock factor 1 Yamanaka factors reprogramming antiapoptosis

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の中枢神経は一旦損傷を受けると、神経細胞が細胞死に陥るため最終的には機能喪失に至る。対照的に、魚類では中枢神経の優れた再生・治癒能力が認められる。そのため中枢神経の一つである視神経を切断し損傷させても、中枢神経軸索の再伸長が見られ視神経は完全に再生し視覚機能は回復する。ゼブラフィッシュの視神経損傷モデルを用い、その視神経再生過程において、網膜で発現が増加する再生関連分子に着目した。特に、視神経損傷後 24 時間以内の急性期において発現が上昇する分子が視神経の再生に深く関与するのではないかと推定して、当初、最も早く発現増加が認められたのは Heat shock factor 1 (HSF1) であり、約 30 分以内に有意な発現増加が確認され、視神経損傷後 6 時間をピークとした一過性的変動が認められていた。

2. 研究の目的

自然治癒機構が作動するゼブラフィッシュ視神経再生モデルを用いることで、視神経損傷後の急性期における HSF1 の活性化と視神経再生との関連について解明を目指す。HSF1 の熱ショック以外のストレス下での作動機構、特に創傷治癒に対する生理学的作用を中心に研究を行い、山中ファクターへの発現への関与や視神経損傷後の網膜での神経細胞の生存への関与についても解析を行う。

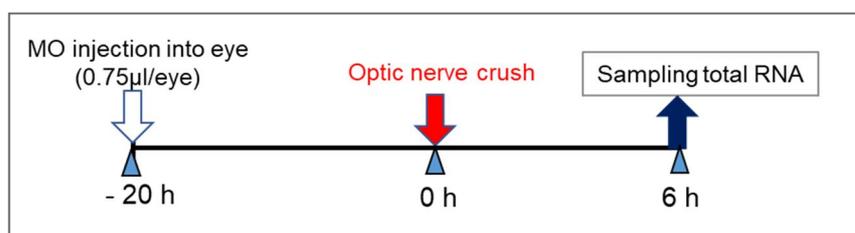
3. 研究の方法

1) ゼブラフィッシュ視神経損傷後のサンプル採取

実験的に視神経をピンセットでクラッシュして実験的に損傷させ、0.5 時間、1、3、6、12、24 時間後の網膜、視神経および視蓋より組織を摘出、total RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA の合成を行った。また、眼球 - 視神経 - 視蓋の視覚に関与する一連の組織を摘出後、4%パラホルムアルデヒドで固定し OCT 包埋後、凍結切片用の組織ブロックを作成した。無処置(0時間)をコントロール群とし、リアルタイム PCR によって mRNA レベルの経時的变化、*in situ* hybridization や免疫組織化学染色により HSF1 および急性期における山中ファクター、Transglutaminase 2 (TG2) の網膜組織内での局在や 24 時間以内の変動について調べた。

2) Heat shock factor 1 (HSF-1) モルフォリノ (MO) 投与実験

視神経損傷を行う 20 時間前に HSF-1 特異的モルフォリノを眼球内 0.75 μ l マイクロシリンジでインジェクションした。その 6 時間後、網膜を摘出し、total RNA を抽出してサンプルとした(下図参照)。HSF-1 および山中ファクターのうち iPS 細胞の誘導に必須とされる *klf4*, *oct4* および *sox2* の 3 つの転写因子の発現について、リアルタイム PCR で解析を行った(下図参照)。同様に、TG2 のモルフォリノを投与して発現抑制を行った条件下での視神経損傷後の HSF1 などの発現について探索した。



3) クロマチン免疫沈降 (Chromatin immunoprecipitation, ChIP) アッセイ

HSF-1 と山中ファクターとの相互関係を調べるために、ChIP アッセイを行った。視神経損傷前と損傷後 6 時間の網膜サンプルをホモジナイズし、ホルムアルデヒド等で処理後、抗 HSF1 または通常の IgG と結合した磁性プロテイン A / G ビーズを用い免疫沈降を行った。沈降 DNA を洗浄後、山中ファクターの各遺伝子である *klf4*, *oct4* および *sox2* について、リアルタイム PCR により定量し、視神経損傷前(0 h)との比較を行った。

4) 網膜でのアポトーシス細胞の検出

Heat shock factor 1 (HSF-1) 特異的モルフォリン (MO) 投与後に、網膜でのアポトーシス細胞の検出を TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 法を用いて行った。

4. 研究成果

1) 視神経損傷後の網膜での HSF1 の発現変化

視神経損傷前の網膜と損傷後の網膜から経時的に採取した total RNA を用いて、リアルタイム PCR によって視神経損傷後の網膜における HSF1 の mRNA 発現について調べた。その結

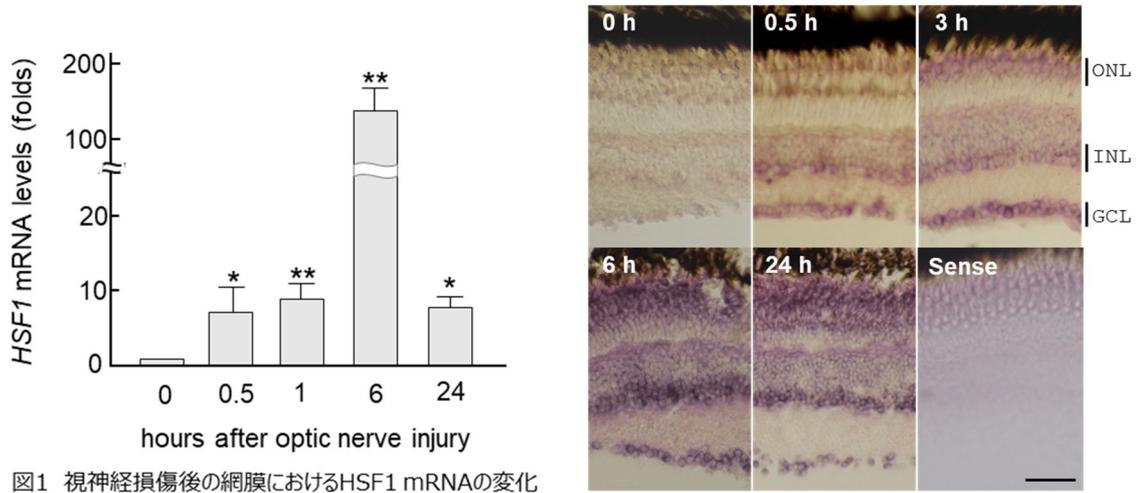


図1 視神経損傷後の網膜におけるHSF1 mRNAの変化

果、損傷 0.5 h 後より有意な発現増加が認められ、6 時間後をピークとした一過性の増加を示すことが確認された (図 1)。

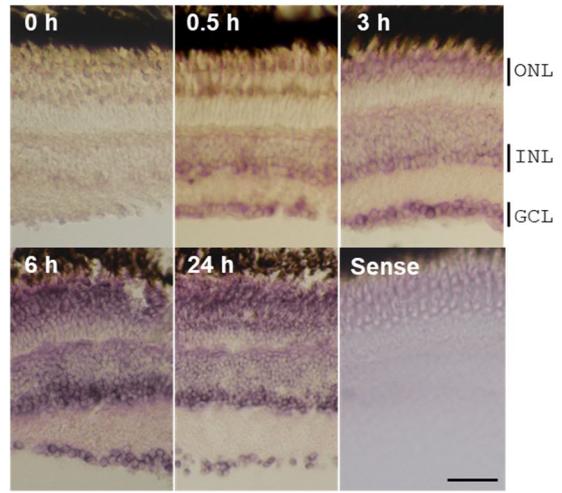


図2 視神経損傷後の網膜におけるHSF1 *in situ* hybridization
ONL; outer nuclear layers(外顆粒層)
INL; inner nuclear layers(内顆粒層)
GCL; ganglion cell layers(網膜神経節細胞層)

また、*in situ* hybridization により、HSF1 の mRNA の発現は、損傷後 0.5 時間では網膜神経節細胞層(GCL)および内顆粒層(INL)が強いが、その後、網膜の全核層に広がっていくことが

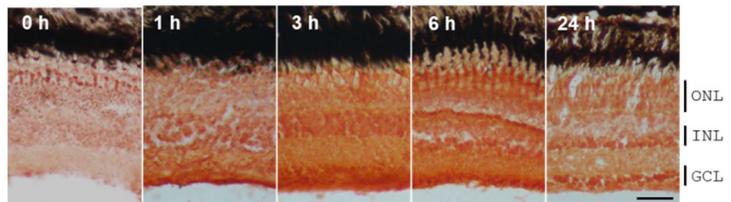


図3 視神経損傷後の網膜におけるHSF1の免疫組織化学染色

わかり、リアルタイム PCR の結果と同様に 6 時間後に最も強いシグナルが観察された(図 2)。この変化は、抗 HSF1 抗体を用いた免疫組織化学染色の結果と同様であった(図 3)。

2) 視神経損傷後 24 時間以内の網膜での山中ファクターの発現変化

同様に、神経損傷前のコントロール網膜と損傷後の網膜から経時的に採取した total RNA を用い、山中ファクターの mRNA 発現について調べた。その結果、3 つの遺伝子共に視神経損傷後 1 時間より有意な発現増加が認められた。それぞれの発現ピークは、*klf 4* が損傷後 1 時間、*oct 4* が損傷後 3 時間、*sox 2* が 6 時間であった (図 4)。

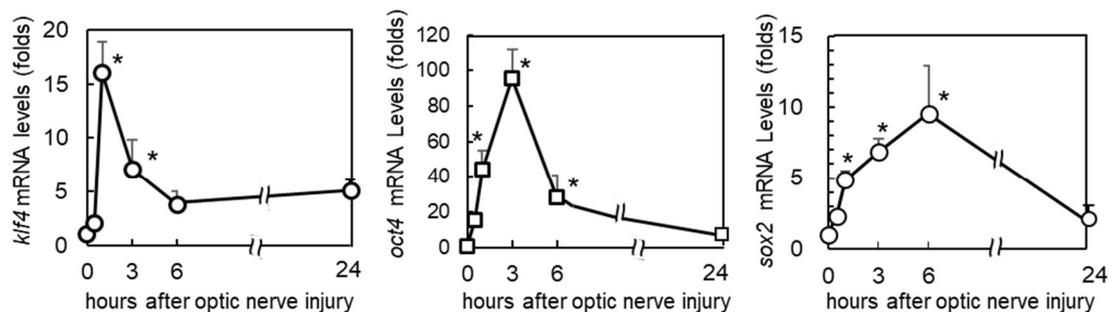


図4 視神経損傷後24時間以内の網膜における山中ファクターのmRNAの変化

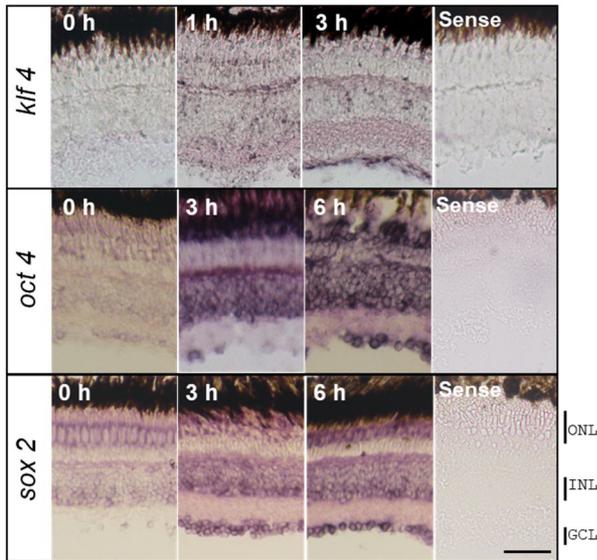


図5 視神経損傷後の網膜における山中ファクターのmRNAの変化

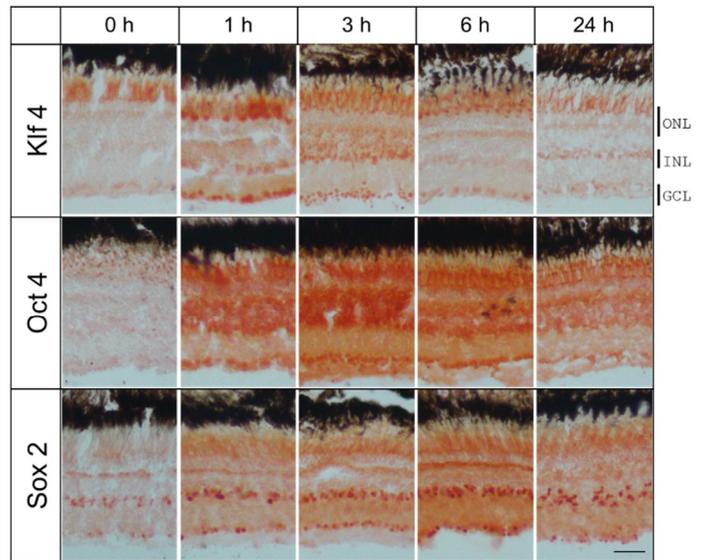


図6 視神経損傷後の網膜における山中ファクターの免疫組織化学染色
ONL; outer nuclear layers(外顆粒層),
INL; inner nuclear layers(内顆粒層),
GCL; ganglion cell layers(網膜神経節細胞層) . Bar=50µm

また、この変化は *in situ* hybridization (図5) および免疫組織化学染色(図6)によっても確認することができた。

3) 視神経損傷後の網膜での Transglutaminase 2 (TG2) の発現変化

リアルタイムPCRにより網膜から抽出した total RNA をサンプルとして、TG2 の経時的変化を調べた(図7)。その結果、視神経損傷後 0.5 h をピークとした非常に早い発現パターンが認められた。これは、HSF1 の発現が有意に上昇し始める時期と一致していた。

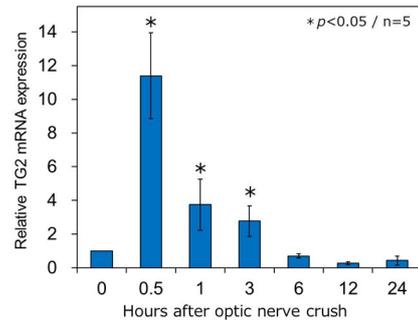


図7 視神経損傷後の網膜におけるTG2の発現変動

4) HSF1 特異的モルフォリノを用いた発現抑制実験

HSF1 と山中ファクターの相互関係を調べるために、視神経損傷後の HSF1 の発現抑制の条件下での山中ファクターの発現変動について調べた(図8)。コントロールとして、スタンダードモルフォリノ(Std MO)を同様に眼球内にインジェクションを行った。その結果、図7aで示すように、HSF1 MO の投与により視神経損傷後の HSF1 の発現が著しく抑制されている条件下では、klf4(図8b)、oct4(図8c) および sox2(図8d) の mRNA 発現は、いずれも顕著に抑制されることが判明した。

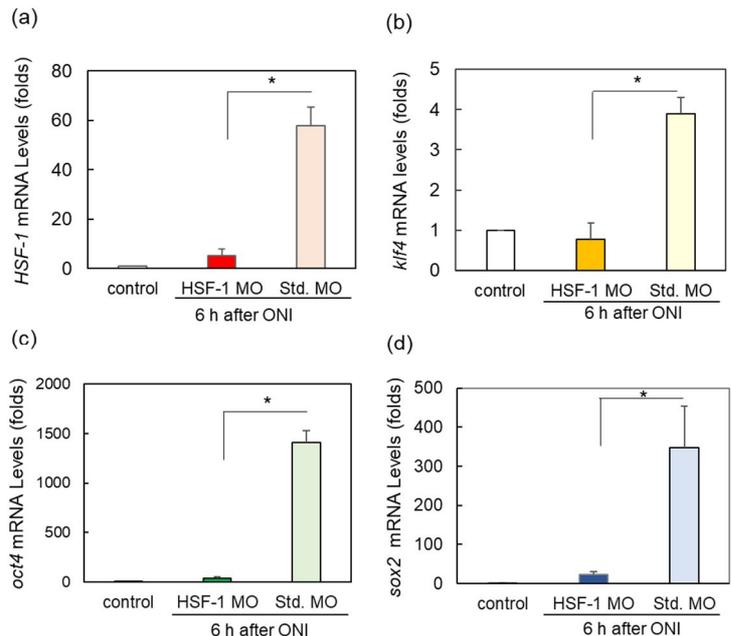


図8 HSF1 特異的モルフォリノ(MO)処理後の視神経損傷6時間後の山中ファクターの発現変化

5) 抗 HSF1 抗体を用いた視神経損傷後の網膜をサンプルとした ChIP アッセイ

視神経損傷前後の網膜 (0h および 6h) をサンプルとして、抗 HSF-1 抗体を用いて ChIP アッセイを行った。その結果、抗 HSF-1 抗体は IgG コントロール血清と比較して、*klf4* で約 20 倍、*oct4* で約 10 倍、*sox2* で約 15 倍の特異的 DNA を沈殿させた (図 9 a)。図 9 b は、ChIP アッセイでのサンプルを用いたゲル電気泳動の一例である。Input は陽性コントロール、IgG は陰性コントロールとして行った。以上の結果より、視神経損傷後に発現する HSF-1 は、山中ファクターの各転写因子のゲノムに結合することで、発現を調節している可能性が示唆された。

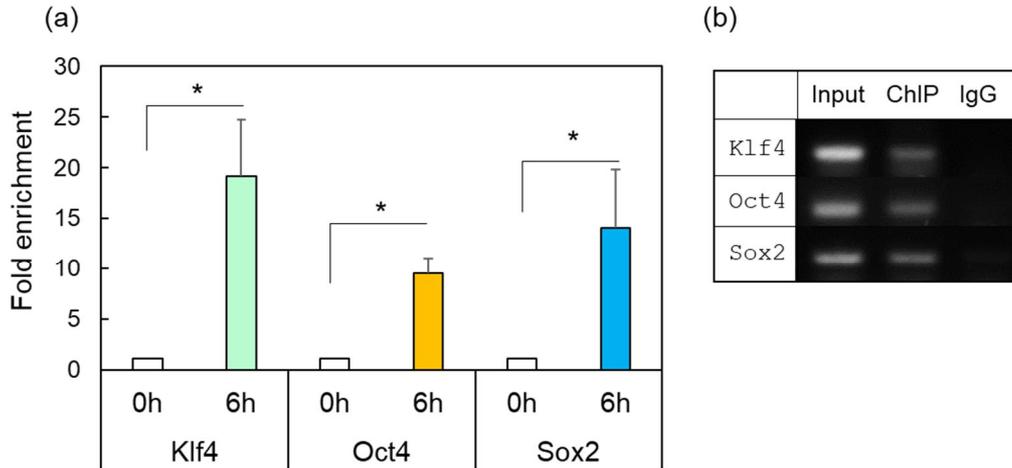


図9 視神経損傷6時間後の網膜サンプルの抗HSF1抗体を用いたChIPアッセイ

6) 視神経損傷後の HSF 発現と TG2 発現の相互関係について

TG2 特異的モルフォリノを使った眼球内インジェクション実験を行い、視神経損傷1時間後の2つの分子の発現について調べた。その結果、図10で示すようにTG2発現が顕著に抑制されている条件下では、HSF1の発現も顕著に抑制されているということが判明した。逆に、HSF1のモルフォリノによりHSF1の発現が抑制されている条件下でのTG2の発現抑制は観察されなかった。従って、HSF1の発現上昇には、これより早く発現が観察されるTG2の発現が必須であることが強く示唆された。

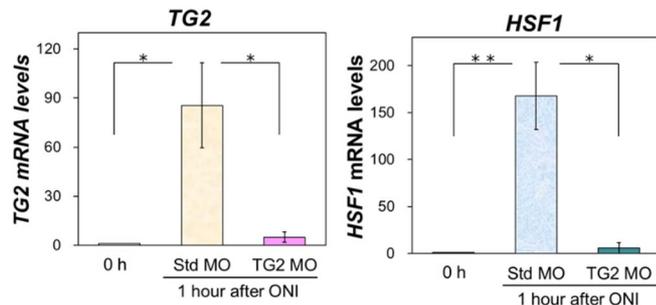


図10 TG2特異的MO眼球内投与による視神経損傷後のTG2およびHSF1のmRNA発現. MO:morpholino, Std:standard, ONI:optic nerve injury

7) 視神経損傷後の HSF1 の発現抑制がもたらす網膜のアポトーシスについて

HSF1 特異的 MO を眼球内にインジェクション後、20 時間後にクラッシュを行い、その 24 時間後にサンプルとして眼球を摘出し、アポトーシス細胞を TUNEL 法で検出した。網膜の層構造は、HSF-MO 投与群では著しく崩れ (図 10 a), また、網膜の全核層において TUNEL 陽性細胞が有意に増加するという結果であった (図 10 b)。この結果より、HSF1 の発現は、視神経損傷後の網膜の神経細胞の生存に深く関与していることが示唆された。

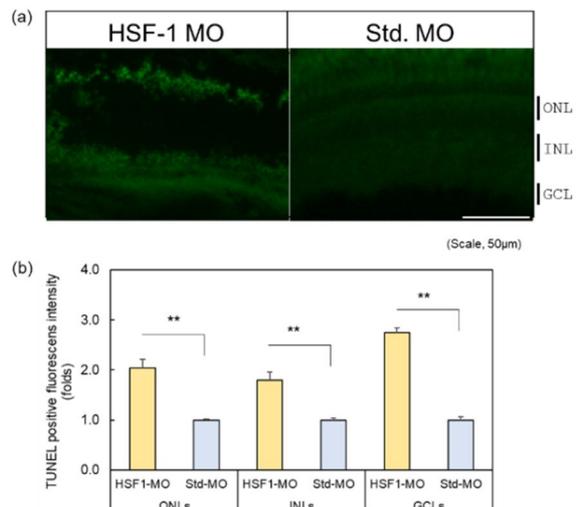


図11 HSF1ノックダウン条件下での視神経損傷後の網膜でのアポトーシス細胞の増加

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sugitani Kayo, Mokuya Takumi, Homma Shuichi, Maeda Minami, Konno Ayano, Ogai Kazuhiro	4. 巻 24
2. 論文標題 Specific Activation of Yamanaka Factors via HSF1 Signaling in the Early Stage of Zebrafish Optic Nerve Regeneration	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3253 ~ 3253
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms24043253	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 空屋 拓海, 杉谷 加代
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ視神経再生に関与する山中因子について
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部 第41回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 空屋 拓海, 杉谷 加代
2. 発表標題 ゼブラフィッシュの視神経損傷直後に発現する Transglutaminase 2の作用について
3. 学会等名 2023年 トランスグルタミナーゼ研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杉谷 加代
2. 発表標題 魚類視神経損傷モデルを用いた中枢神経系修復機構における複数のトランスグルタミナーゼの関与について
3. 学会等名 日本生化学会第96回大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杉谷 加代
2. 発表標題 Role of expression of Transglutaminase 2 (TG2) in the zebrafish retina just after optic nerve injury
3. 学会等名 第101回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kayo Sugitani, Takumi Mokuya, Yuya Omori, Serika Hosoi, Kazuhiro Ogai
2. 発表標題 Expression of Myeloid-derived growth factor in the zebrafish retina after optic nerve injury
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 空屋 拓海, 杉谷 加代
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ視神経損傷後のHSF-1によるcellular Factor XIII-Aの活性化
3. 学会等名 2022 年 トランスグルタミナーゼ研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kayo Sugitani, Takumi Mokuya, Shuichi Homma, Kazuhiro Ogai, Yoshiki Koriyama
2. 発表標題 Heat Shock Factor 1 is involved in the expression of Yamanaka factors in zebrafish retina after optic nerve injury
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kayo Sugitani, Ayano Konno, Minami Maeda, Kazuhiro Ogai, Yoshiki Koriyama
2. 発表標題 Heat Shock Factor 1 is required for the activation of cellular Factor XIII-A as well as Heat Shock Proteins in early stage of zebrafish optic nerve regeneration
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

金沢大学医薬保健研究域病態検査学講座 https://lab-science.w3.kanazawa-u.ac.jp/member.html#s01

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------