

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18384

研究課題名（和文）PARP1活性制御によるRPの制御機構解明

研究課題名（英文）Elucidation of the regulatory mechanism of RP by regulating PARP1 activity

研究代表者

芦森 温茂（Ashimori, Atsushige）

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60870459

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）：本研究は、PARP1活性制御による網膜色素変性症（RP）の制御機構の解明を目的とした。本研究により、RPに関与する可能性のあるPARP1標的因子がLC-MS/MSにより同定され、これらはより詳細に検証する必要がある。また、眼由来細胞の内、PARP1活性化剤または阻害剤によりPARP1の活性化制御が異なることが明らかとなり、RP進行におけるPARP1の制御機構を明らかにする一助になることが見いだされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RPの原因遺伝子及び機序、またはRP進行を遅らせる治療薬の研究などは広く行われてきた一方で、RPとPARP1活性制御を結びつける本研究は新規性が高い。PAR化タンパク質の同定では、RP制御に関与する直接的な因子を発見するには至らなかったものの、近年報告されている手法を用いることにより、ブレイクスルーとなる潜在性がある。また、本研究で予想外にえられたPARP1の活性制御機構は、RP制御の枠を超えPARP1の新たな制御機構および分子機序を明らかにできる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to elucidate the regulatory mechanisms of retinitis pigmentosa (RP) by regulating PARP1 activity.

This study identified PARP1 target factors by LC-MS/MS that may be involved in RP, and these need to be validated in more detail. We also found that PARP1 activation is differentially regulated by PARP1 activators or inhibitors within eye-derived cells, which may help elucidate the regulatory mechanism of PARP1 in RP progression.

研究分野：眼科学関連

キーワード：Aging PARP1 NAD+

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1) は、全身の細胞で恒常的に発現し、特に神経細胞や免疫系の細胞で強く発現する。PARP1 は Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) を基質とし、様々なタンパク質に ADP-ribose を修飾及び重合 (Poly ADP ribosylation) させる。PARP1 活性は、DNA 損傷などのストレス条件下で亢進し、DNA 修復や転写調節を担うとされる。

PARP1 の役割は、中枢神経系で特に研究されており、パーキンソン病における神経細胞変性の進行に PARP1 過剰活性の関与が報告されている。神経細胞変性が原因とされる網膜色素変性症 (RP: retinal pigmentosa) については、2019 年 Sahaboglu らによってマウス由来網膜細胞を用い、PARP1 活性を阻害することで、網膜神経細胞変性のレベルが変化することが報告されている。このことは、これまで注目されてこなかった PARP1 と RP を結びつける上で意義深いものの、詳細な分子機構や in vivo レベルでの PARP1 阻害の有用性などは検証されてこなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、PARP1 活性制御による網膜色素変性症の制御機構解明である。興味深いことに、基質 NAD⁺ は加齢に伴い減少し、PARP1 活性レベルも減少することが知られている。また、老化個体に NAD⁺ を供給することで、ショウジョウバエや線虫において寿命を延長させることが報告されており、NAD⁺ は抗老化因子として注目されている。そこで本研究では、PARP1 による RP 進行への影響評価に加え、老化・NAD⁺ という観点にも着目し、研究を遂行する。

一方で、加齢に伴う NAD⁺ 減少は、多くの生物で観察される普遍的現象にも関わらず、NAD⁺ が加齢減少する生物学的意義についてはほとんど議論されていない。PARP1 は、NAD⁺ を消費して過剰活性することで神経細胞変性を惹起させると考えられることから、加齢に伴う NAD⁺ の減少が神経細胞変性の保護を担っていることが考えられる。このことから、NAD⁺ は単に減少しているのではなく、老化個体では意図的に NAD⁺ を減少させている、つまり NAD⁺ 加齢減少の生物学的意義についても議論できることが期待できる。

3. 研究の方法

PARP1 がどのような機序で視細胞の変性に寄与するか明らかにすることで、RP 進行制御の分子機構の一端を解明することを目指した。さらに、RP 進行における PARP1 活性制御の有用性を検証し、PARP1 を標的とした新たな RP 治療薬の探索を目的とした。

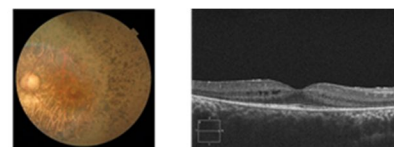
RP 進行における PARP1 の下流因子探索

PARP1 欠損及び PARP1 活性阻害により、RP 耐性が亢進することが報告されている。これらの分子機構をより詳細に理解するために、PARP1 による Poly ADP ribosylation の標的となる因子を LC-MS/MS などにより同定し、標的因子の Poly ADP ribosylation 残基の変異体を作成し、網膜神経細胞に導入することで、PARP1 下流因子を探索する。また PARP1 は、Poly ADP ribosylation による制御だけでなく、NAD⁺ 過剰消費による TCA サイクルの阻害を惹起することから、HPLC を用いた NAD⁺ 測定及び、ミトコンドリアの障害マーカーなどを用いることで、PARP1 による網膜神経細胞変性への影響を多角的に検証する。

PARP1 過剰活性による網膜神経細胞の変性惹起の検証

PARP1 活性は、基質である NAD⁺ 量により制御される。PARP1 過剰活性が網膜神経細胞の変性を亢進するか検証するために、NAD⁺ を過剰にした上で細胞変性マーカーの遺伝子発現を、リアルタイム PCR により評価する。さらに、NAD⁺ と PARP1 活性阻害を共添加、又は PARP1 欠損細胞に NAD⁺ を添加し、PARP1 の関与をより詳細に検証する。

In vivo における PARP1 活性阻害による RP 進行の評価



網膜色素変性症に対する有効な治療は未だ存在しない

視細胞保護治療の開発が必要

図1: 網膜色素変性症の眼底写真、OCT像

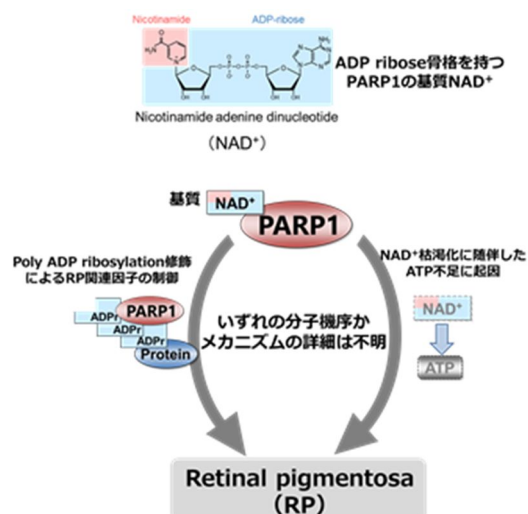


図2: PARP1によるRP制御機構

RP のモデル動物である Pde6b 変異マウスを用い、PARP1 活性阻害である PJ-34 又は Olaparib をマウスに眼内投与し、PARP1 活性阻害が RP の進行を低減させるかを検証する。

4. 研究成果

・ RP 進行における PARP1 の下流因子探索

RP 進行における PARP1 の関与及び分子機構を詳細に理解するために、PARP1 による Poly ADP ribosylation (PAR) の標的となる因子を LC-MS/MS などによる同定を行った。PAR 化は一般的な 1 残基 1 修飾ではなく多重修飾され分子量が大きく異なってくる。その関係でタンパク質同定はやや難航したものの、PARP1 の標的因子を 12 個同定することができた。一方で、同定された因子の中で RP や神経変性への関与が報告されている因子は同定されず、かつ、いずれも生体内で多量に発現していると考えられるタンパク質が検出された。したがって、現在までに RP 進行に関与する PARP1 経路を分子的に明らかにするには至っていない。一方で、2022 年 Fuらにより新規の PAR 化タンパク質検出手法が報告されており、これら技術を用いることで、今回同定に至らなかった分子については分子経路を明らかにできる可能性があると考えられる。

・ PARP1 過剰活性による網膜神経細胞の変性惹起の検証

PARP1 過剰活性が網膜神経細胞の変性を亢進するか検証するために、基質である NAD⁺を過剰にした上で細胞変性マーカーの遺伝子発現を、リアルタイム PCR により評価することを目指した。まず、NAD⁺を 661w に添加し、PARP1 活性の亢進を、PAR 抗体を用いた WB により評価した。予想外なことに、NAD⁺添加にも関わらず PARP1 活性は亢進が認められなかった。このことは、NAD⁺よりも細胞透過性の高い NAD⁺前駆体である NMN でも同様であった。661w 細胞に対し NMN を添加した研究は過去いくつか行われているものの PARP1 活性の評価されておらず、661w において PARP1 活性が亢進しなかった原因は不明である。興味深いことに、RPE1、Primary mouse RPE や NIH3T3 などの細胞に NMN を添加したところ、PARP1 活性が亢進する細胞としない細胞が存在することが観察された。このことは PARP1 活性と基質の関係性に着眼した場合、有意義な研究に発展する潜在性があるものの、RP 進行における PARP1 関与を検証する上では障害であり、PARP1 過剰活性による検証はやや難航している。また、基質ではなく PARP1 過剰発現による PARP1 活性亢進は、対照群 (空ベクター) でも PAR 活性が亢進してしまうため難しい (おそらく遺伝子導入に伴い DNA 損傷のシグナルが入ってしまうことが要因と考えられる)。

・ マウスを用いた RP 進行における PARP1 の役割

In vivo における PARP1 の役割を検証するために、まず、10 μ M の PJ-34 をマウス眼内に単回投与し、PARP1 阻害時の網膜における PAR レベルを免疫染色及びウエスタンブロットにより評価することを試みた。免疫染色では、PAR と考えられるシグナルが検出されず、ウエスタンブロットでは無処置のサンプルではシグナルが観察されたものの、PAR レベルが亢進すると考えられる高照度刺激群や、PARP1 の活性阻害剤 PJ-34 を投与したマウスにおいても PAR のシグナル強度に変化は観察されなかった。これらはマウス数を増やしたサンプルでも同様であり、このことから In vivo における PARP1 の活性評価が難しいものであると考えられる。

これらの結果から、RP の原因遺伝子及び機序、または RP 進行を遅らせる治療薬の研究などは広く行われてきた一方で、RP と PARP1 活性制御を結びつける本研究は新規性が高い。PAR 化タンパク質の同定では、RP 制御に関与する直接的な因子を発見するには至らなかったものの、近年報告されている手法を用いることにより、ブレイクスルーとなる潜在性がある。また、本研究で予想外にえられた PARP1 の活性制御機構は、RP 制御の枠を超え PARP1 の新たな制御機構および分子機序を明らかにできる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ashimori A, Nakahata Y, Sato T, Fukamizu Y, Matsui T, Shinohara K, Bessho Y	4. 巻 15
2. 論文標題 Attenuated SIRT1 activity leads to PER2 cytoplasmic localization and dampens the amplitude of Bmal1 promoter-driven circadian oscillation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Neurosci	6. 最初と最後の頁 647589-647589
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2021.647589	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 -

1. 著者名 Kobayashi Y, Tokuda K, Yamashiro C, Higashijima F, Yoshimoto T, Ota M, Ogata T, Ashimori A, Hatano M, Kobayashi M, Uchi SH, Wakuta M, Kimura K	4. 巻 11
2. 論文標題 Inhibition of epithelial-mesenchymal transition in retinal pigment epithelial cells by a retinoic acid receptor- agonist	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 11842-11842
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-90618-4	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 -

1. 著者名 Yamashiro C, Tokuda K, Kobayashi Y, Higashijima F, Yoshimoto T, Ota M, Ogata T, Ashimori A, Kobayashi M, Hatano M, Uchi SH, Wakuta M, Teranishi S, Kimura K	4. 巻 11
2. 論文標題 Benzalkonium chloride-induced myofibroblastic transdifferentiation of Tenon's capsule fibroblasts is inhibited by coculture with corneal epithelial cells or by interleukin-10	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 16096-16096
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-94852-8	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------