

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 22日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791651

研究課題名（和文） 新規細胞外マトリックスタンパク質による神経再生の分子基盤解明と緑内障治療への応用

研究課題名（英文） The role of novel extracellular matrix protein on CNS regeneration and its application study for glaucoma treatment

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（和文）：本研究は中枢神経再生が可能である魚類より得た新規細胞外マトリックス因子プルプリンをアデノ随伴ウイルスベクターを使ってほ乳類に応用し、損傷後視神経を再生させることを目的とした。プルプリンは接着斑キナーゼを活性化させ、細胞接着作用と細胞生存作用を示した。そのメカニズムはマトリックスメタロプロテアーゼ9の活性阻害によりラミニンを安定させることにあった。プルプリンおよびそのメカニズムが将来的に緑内障治療に貢献できることを期待する。

研究成果の概要（英文）：In our strategies toward optic nerve regeneration of mammals using fish derived molecule, we used purpurin (a novel extracellular matrix protein) overexpression systems by adeno-associated virus vector in rat retina. In rat, supply of purpurin could protect retinal ganglion cells (RGCs) from injury-induced apoptosis through a mechanism of focal adhesion kinase (FAK)/Akt activation. Furthermore, purpurin had adhesive effect on rat RGCs from culture study with purpurin-coated dishes. We focused on the extracellular matrix-related molecules as a mechanism of purpurin adhesive and survival effects. Purpurin inhibited optic injury-induced matrix metalloprotease 9 activity and the degradation of laminin and activated FAK signaling. Purpurin could potentially offer new avenues for developing treatments for human retinal degenerative disorders such as glaucoma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：中枢神経再生

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：神経再生、視神経、網膜、接着因子、ラミニン、接着斑キナーゼ、Akt

1. 研究開始当初の背景

視神経は中枢神経であり成体ほ乳類において再生が起こらないためその疾病である

視神経症（緑内障、虚血性視神経症）は難治性である。我が国における高齢人口増加にとも

ない視神経疾患が増加の一途を辿っており、いち早い治療薬の開発が急がれる。この最終病態部位が網膜神経節細胞 (RGC) であるためその脱落を抑える、あるいは RGC の神経修復や軸索再生ができれば根治的治療につながる。

2. 研究の目的

効率よく中枢神経修復・再生させるには①細胞死からの回避作用、②細胞外マトリックス (ECM) 安定化作用、③栄養因子や接着因子を含む遺伝子発現、④軸索再伸長作用といった4つの主な条件が必須であり、神経損傷によるそれらの破綻が神経の脱落を誘引し再生を困難にさせる。つまりこの4条件を満たすホリスティック (包括的) 作用を持つ分子は中枢神経の温存的再生を誘導する可能性がある。以前我々は中枢神経損傷後の神経生存および再生が可能である魚類より新規 ECM タンパク質プルプリンのクローニングに成功し中枢神経再生のトリガー分子として機能することを報告した。本研究は AAV によるプルプリン過剰発現系を用いてラット網膜-視神経をモデルとした中枢神経修復・再生を試みるとともにそのホリスティックな作用機序を精査する。

3. 研究の方法

クローニングしたプルプリンはアデノ随伴ウイルスベクターを用いて発現系を作製した。タンパク質の発現変化はウェスタンブロット法で、mRNA の発現変化は RT-PCR 法で調べた。マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP-9) の活性化はザイモグラフィ法で調べた。RGC における FAK と軸索伸長の関係を調べるために FAK をリポフェクションで発現させた培養系を用いた。RGC の生存は TUJ1 染色により定量化した。視神経再生は軸索伸長

のマーカーである GAP43 抗体を用いて定量した。

4. 研究成果

魚類由来のプルプリンをクローニングし、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて発現系を作製した (図 1)。

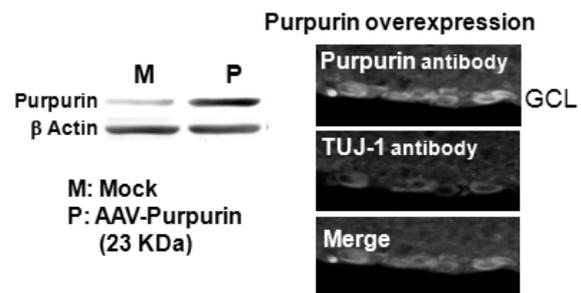


図 1. プルプリンの強制発現系作製

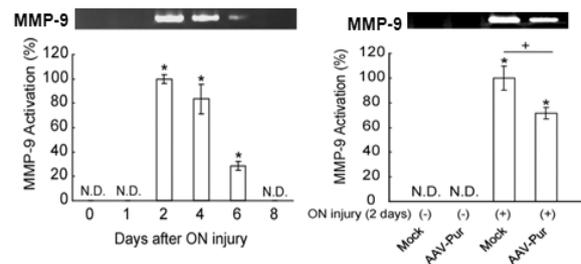


図 2. プルプリンの MMP-9 の阻害作用

プルプリンは RGC に対し、接着作用を示したがその作用はラミニン安定化作用に起因した。その原因をザイモグラフィ法で調べたところプルプリンは MMP-9 を阻害することで視神経損傷後に分解するラミニンを安定化することがわかった (図 2)。ラミニンは FAK とその下流の生存シグナル Akt を活性化することも分かった。網膜神経節細胞株 (RGC-5) を用いた研究から視神経損傷後の軸索伸長メカニズムとして FAK/Akt/GSK3beta/CRMP-2 シグナルがチュブリンを重合させることが証明できた。また、in vivo において視神経損傷後の RGC の細胞死はプルプリンにより有

意に抑制された。またプルプリン過剰発現系では視神経損傷後に再生線維のマーカーである GAP43 の免疫染色を行ったところ、MOCK コントロールに比べて著しい神経再生が起こっていた(図 3)。

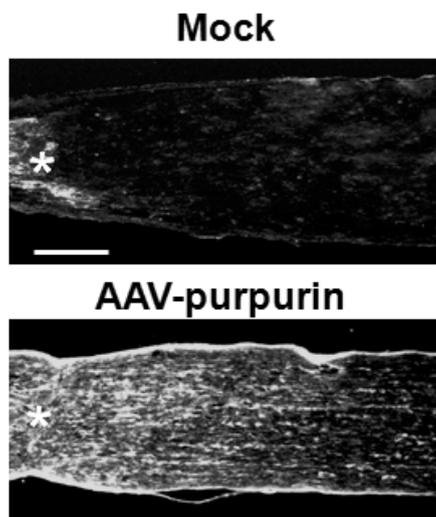


図 3. プルプリンによる視神経再生効果

このように中枢神経再生が可能である魚類からクローニングしたプルプリンをラットの補充することでほ乳類の中枢神経再生が促され、そのシグナルも解析できた。本メカニズムが緑内障をはじめとする視神経症への治療に貢献できることを期待する。

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 8 件)

1. Lima S, Koriyama Y, Kurimoto T, Oliveira JT, Yin Y, Li Y, Gilbert HY, Fagiolini M., Martinez AM, Benowitz L, Restoring visual circuits and function after optic nerve injury in adult mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (掲載確定 2011-19449R) 査読有り

2. Dickendesher TL, Baldwin KT, Mironova

YA, Koriyama Y, Raiker SJ, Askew KL, Wood A, Geoffroy CG, Zheng B, Liepmann CD, Katagiri Y, Benowitz LI, Geller HM, Giger RJ. NgR1 and NgR3 are receptors for chondroitin sulfate proteoglycans. Nature Neurosci. 15:703-712 (2012). 査読有り

3. Koriyama Y, Takagi Y, Chiba K, Yamazaki M, Arai K, Matsukawa T, Suzuki H, Sugitani K, Kagechika H, Kato S. Neuritogenic activity of a genipin derivative in retinal ganglion cells is mediated by retinoic acid receptor β expression through nitric oxide/S-nitrosylation signaling. J. Neurochem. 119, 1232-1242 (2011). 査読有り

4. Koriyama Y, Chiba K, Yamazaki M, Suzuki H, Muramoto K, Kato S. Long-acting genipin derivative protects retinal ganglion cells from oxidative stress models in vitro and in vivo through the Nrf2/antioxidant response element signaling pathway. J. Neurochem. 115, 79-91 (2010). 査読有り

[学会発表] (計 20 件)

1. TL. Dickendesher, KT. Baldwin, YA. Mironova, Y. Koriyama, SJ. Raiker, Y. Duan, Y. Katagiri, CG. Geoffroy, KL. Askew, B. Bates, MM. Zaleska, A. Wood, B. Zheng, LI. Benowitz, HM. Geller, RJ. Roman. NgR1 and NgR3 are inhibitory receptors for chondroitin sulfate proteoglycans. Society for Neuroscience 41th Annual Meeting, 2011.11.13. ワシントンコンベンションセンター (アメリカ)

2. 郡山 恵樹、松川 通、永島 幹子、加藤

聖 視神経損傷後の新規細胞外マトリックス分子プルプリンによるラット網膜神経節細胞の生存と軸索伸長第 54 回日本神経化学会, 2011 年 9 月 28 日, 瑠璃光(石川県)

3. Y. Koriyama, K. Sugitani, T. Matsukawa, S. Kato. A novel extracellular matrix stabilizing molecule, purpurin protects injury-induced apoptosis and regenerate axons in rat retinal ganglion cells The XIVth international symposium on retinal degenerations, 2010.7.14. トレンブラントホテル (カナダ)

4. 郡山 恵樹、杉谷 加代、松川 通、加藤 聖 魚類神経再生モデルを用いたほ乳類中枢神経修復・再生へのアプローチ 第 25 回神経組織の成長・再生・移植研究会, 2010 年 5 月 22 日, 大阪医科大学 (大阪府)

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

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし