

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592553

研究課題名(和文) 緑内障進行におけるDNA損傷応答の役割

研究課題名(英文) DNA damage response in development of glaucoma

研究代表者

桂 真理 (KATSURA, Mari)

東京大学・アイソトープ総合センター・特任助教

研究者番号：30436571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：DNA損傷応答とは、DNAの修復、細胞周期の制御、細胞死の誘導などの生体現象である。本研究では主に低酸素負荷により網膜神経節細胞死が起きる際、DNA損傷応答に関わるATM、NF- κ B、53BP1、ヒストンH4K20モノメチル化などの分子が細胞死を抑制していることを初代培養ラット網膜神経節細胞で確認した。さらに、ATM、53BP1に関しては、マウスおよびラットの生体内でも確認した。低酸素負荷時に網膜神経節細胞死を抑制するプロスタグランジンF2誘導体ラタノプロストはH4K20モノメチル化を促進することが分かった。今後、この特性を考慮した緑内障性視神経症治療薬の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：DNA damage response (DDR) includes DNA repair, cell cycle checkpoint and apoptosis. In this study, we showed that under hypoxia, some DDR molecules were involved in retinal ganglion cell (RGC) death. 53BP1, ATM, NF- κ B and mono-methylation of histone H4K20 coordinate primary cultured rat RGC survival in cultured RGC. 53BP1 nuclear foci were decreased in rat optic nerve crush model. Prostaglandin F2 α analog latanoprost prevents RGC death under hypoxia with mono-methylation of histone H4K20 and 53BP1 nuclear foci. The findings will be useful in development of new therapy for glaucomatous optic neuropathy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：DNA損傷応答 緑内障 -H2AX 53BP1 ヒストンH4K20メチル化 ラタノプロスト 視神経保護 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

DNA 損傷応答は放射線等による障害の際生物に起こる DNA 修復、細胞周期チェックポイント、細胞死などの反応であり、通常状態でも自然放射線等によって生体内に日常的に起きていていると考えられている。緑内障は網膜神経節細胞 (retinal ganglion cell, RGC) が主体となる視神経の変性疾患であり、成人の失明原因としては最も多い疾患の一つであるが、眼圧下降の他にエビデンスのある有効な治療方法は確立されていない。特に、日本人に多い正常眼圧緑内障では、眼圧降下治療に反応せず視野障害が進行する症例が少なからず存在する。

本研究で DNA 損傷応答に注目したのは以下のような理由からである。まず、アルツハイマー病などの神経変性疾患における細胞死には DNA 損傷が関係していることが指摘されている。また、原爆被爆者における正常眼圧緑内障 (normal tension glaucoma, NTG) が増加しているという報告もある。さらに、緑内障患者の遺伝子変異を調査すると、細胞周期 G1/S チェックポイントに関わる遺伝子が複数存在する。緑内障の発症進展に DNA 損傷応答でみられる G1/S チェックポイントの役割が重要であることが示唆される。このような背景から、研究者らは緑内障の発症進展と DNA 損傷応答との関係を研究することにした。

2. 研究の目的

緑内障による失明を防ぐ有効な治療法を確立するためには、緑内障性視神経障害 (glaucomatous optic nerve neuropathy, GON) の発症、進行における分子メカニズムの解明が必要である。特に、RGC 死に深く関わりを持つ分子が確認できれば、治療のターゲットとして利用できる。幸い、DNA 損傷応答に関する研究は、がんの研究者によってひろくおこなわれており、すでに多くの分子標的に対する製薬が進んでいる。これらを利用して、これまで治療することのできなかつた

進行性の視野障害を抑えることも期待できる。DNA 損傷応答に注目して RGC 死の分子メカニズムを解明する目的で今回の研究を行うことにした。

3. 研究の方法

(1) 初代培養ラット RGC における細胞死と DNA 損傷応答との関係

まず、これまでに、東京大学医学部眼科学教室で手技の確立されている初代培養ラット RGC と種々の擬似的緑内障負荷を用いて、種々の DNA 損傷応答のマーカ分子を免疫染色を用いて確認した。擬似的緑内障負荷として、低酸素負荷 (5%O₂、CoCl₂ 添加による擬似的低酸素)、高圧負荷、酸化ストレス、グルタミン酸負荷を行った。マーカーとして DNA 損傷マーカーである H2AX、8-オキシグアニン、DNA 損傷および DNA 修復マーカーである 53BP1、KU70、などを利用した。また、細胞死のマーカーであるアネキシン V 陽性細胞の割合を利用した。この方法で、最も顕著な影響を観察できたのは、低酸素負荷による 53BP1 のフォーカス減少であった。

(2) 53BP1 フォーカス形成の上流因子の解析

次に、53BP1 の上流分子として知られる毛細血管拡張性小脳失調症 ataxia telangiectasia mutated の原因遺伝子である ATM の阻害剤を用い、53BP1 のフォーカス形成、細胞死の頻度等の解析を行った。また、53BP1 のフォーカスに必須と考えられているヒストン H4K20 のメチル化につき、ウェスタンブロットで解析した。また、低酸素負荷時に細胞死抑制効果があると知られるプロスタグランジン F2 アナログであるラタノプロスト (キサラン®) を添加し、ヒストン H4K20 のメチル化、53BP1 のフォーカス形成、細胞死等を解析した。

(3) 動物実験による確認

さらに、培養細胞で観察された現象を動物実験でも確認した。低酸素負荷に対応する動

物モデルとしてラット視神経挫滅モデルを作成した。この眼球凍結切片に対して免疫染色を行い、RGC における 53BP1 のフォーカス形成を観察した。また、ATM ノックアウトマウスと CFP-Thy-1 マウスを交配し、RGC が蛍光を発するマウスを作成し、網膜フラットマウントにおける RGC 数をカウントした。ATM-CFP - Thy-1 マウスは6か月程度でほぼ全例が死亡するため、さらに長期の観察には CFP-Thy-1 マウスを交配しない ATM ノックアウトマウスを使用することにした。

4. 研究成果

(1) 初代培養ラット RGC における細胞死と DNA 損傷応答との関係

初代培養ラット RGC に対して擬似的緑内障負荷として、低酸素負荷 (5% O₂, CoCl₂ 添加による擬似的低酸素)、高圧負荷、酸化ストレス、グルタミン酸負荷を行った。使用したマーカーは H2AX、53BP1、KU70、8-オキソグアニンなどである。この方法で、最も顕著な影響を観察できたのは、低酸素負荷による 53BP1 のフォーカス減少 (図 1) とグルタミン酸負荷時の H2AX の増加であった。

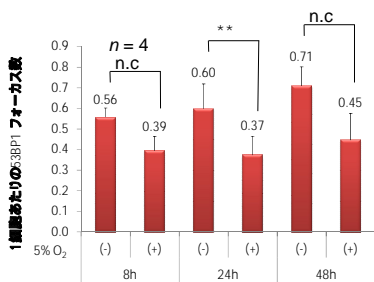


図1 初代培養ラットRGCにおける低酸素負荷時の53BP1フォーカスの減少

(2) 低酸素負荷による 53BP1 のフォーカス形成低下と細胞死増加

初代培養ラット RGC において低酸素負荷による 53BP1 のフォーカス減少は低酸素負荷後 24 時間で (1 細胞あたり 0.37 ± 0.09 個) と常酸素 (0.60 ± 0.12 個) と比較して有意に減少していた。これとは逆に、細胞死は常酸素

で $45.8 \pm 14.5\%$ に対して低酸素で $67.1 \pm 8.8\%$ と有意に増加していた (図 2)。同様の所見は、マウス網膜株化細胞 RGC-5 においても観察された。

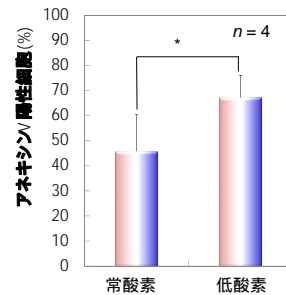


図2 初代培養ラットRGCにおける低酸素負荷時の細胞死の増加(低酸素負荷48時間後)

低酸素負荷と類似した状況をインビボで再現するために、ラット視神経挫滅モデルを作成した。視神経挫滅 48 時間後に眼球摘出し、凍結標本を作製した。免疫染色法にて 53BP1 のフォーカス形成を観察したところ、シャム手術眼と比較して有意なフォーカス数の減少が確認された (図 3)。

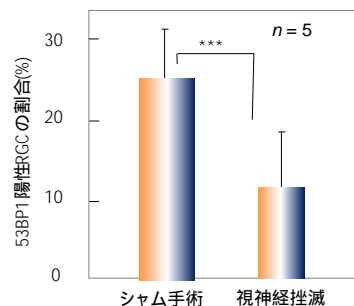


図3 ラット視神経挫滅モデルにおける53BP1フォーカス陽性細胞の減少(低酸素負荷48時間後)

(2) ATM による RGC 保護機能の解析

次に、53BP1 の上流因子である ATM の影響について調べた。ATM の特異的阻害剤 KU55933 を添加したところ、常酸素では 53BP1 のフォーカスは減少し、細胞死は増加した。しかし、低酸素負荷条件では KU55933 の存在とは関係なく、53BP1 のフォーカスは減少し、細胞死は増加した。すなわち、低酸素負荷は ATM の影響とは関係なく 53BP1 のフォーカス形成と細胞死に影響を与えることが明らかとなった (図 4)。

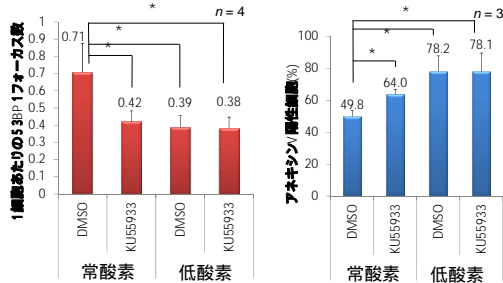


図4 初代培養ラットRGCにおけるATM阻害剤の53BP1フォーカス(低酸素負荷24時間後)およびの細胞死への影響(低酸素負荷48時間後)

ATM の RGC 細胞死抑制効果をインビボで確認するために、ATM ノックアウトマウスの解析を行った。RGC の表面抗原である Thy-1 に蛍光物質である CFP が発現する CFP-Thy-1 マウスを ATM ノックアウトマウスと交配して RGC 減少の有無を調べた。生後 3 か月の ATM ノックアウトマウスでは、野生型と比較して RGC 数に差はなかった (図 5)。

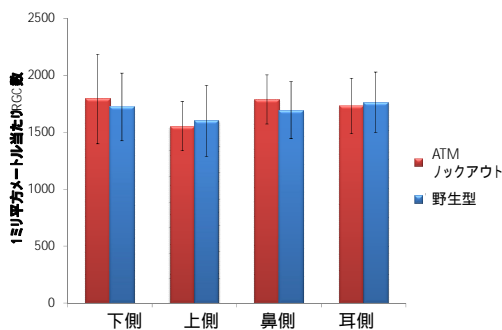


図5 ATMノックアウトマウスにおけるRGC数(生後3か月)

もともと、正常眼圧緑内障は加齢とともに発症が増加する傾向があるために、さらに高齢のマウスの解析を行おうとしたが、ATM-CFP - Thy-1 マウスは生後半年までに死亡するため、現在 CFP - Thy-1 マウスと交配しない ATM ノックアウトマウスを用いた解析を進めている。

(3) ヒストン H4K20 のモノメチル化と RGC 生存との関係

53BP1 のフォーカス形成に重要とされるヒストン H4K20 のメチル化について調べた。ヒストン H4K20 のメチル化に特異的な抗体 (モノメチル、ジメチル、トリメチル) をウェスタンブロットで確認したところ、ジメチル化とトリメチル化は低酸素による影響が確認されなかったが、低酸素負荷後 6 時間から 12 時間でモノメチル化が 53BP1 のフォーカス形成と正の相関をして増加減少し、逆に細胞死はモノメチル化と逆相関した。これらの結果より ATM、53BP1 のフォーカス形成、ヒストン H4K20 モノメチル化はいずれも RGC の生存に正の相関を示すことが分かった。さらに、低酸素負荷による細胞死を抑制する効果があるラタノプロストを最終濃度 100nM で細胞培養液中に添加すると、抑制されていたヒストン H4K20 のモノメチル化は戻る傾向が示された。同時に、53BP1 のフォーカス低下と細胞死の増加も改善した。(図 6)

これらの結果より、今後 53BP1、ATM、ヒストン H4K20 モノメチルなどを中心に緑内障性視神経症に重要な因子を絞り込んでいくことが可能と思われる。また、今回神経保護効果のメカニズムを一部解明できたラタノプロストについても、今後さらに検討されるべきである。

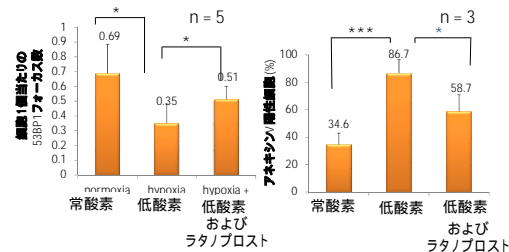


図6 初代培養ラットRGCにおける低酸素反応に対するラタノプロストの効果

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 1件)
- 1. DNA Damage Response Mechanisms in Neurodegenerative Diseases
Mari Katsura* Radiation Biology Research Communications. 47(4), 394-407(2013)(査読有)

〔学会発表〕(計12件)

Mari Katsura, Reiko Yamagishi, Makoto Aihara, Roles for methylation of H4K20 and 53BP1 in hypoxia-induced retinal ganglion cell death, ARVO 2014, 2014年05月04日~2014年05月08日, Orange Country Convention Center (オランダ・アメリカ)

Mari Katsura, Reiko Yamagishi, Makoto Aihara, Roles for 53BP1, a DNA damage response protein, in retinal ganglion cell survival, World Ophthalmology Congress 2014, 2014年04月02日~2014年04月06日, 東京国際フォーラム(東京)

桂 真理, 山岸麗子, 和田洋一郎, 相原 一, 網膜神経節細胞死におけるヒストン H4K20モノメチル化の役割, 第118回日本眼科学会学術総会, 2014年04月02日~2014年04月06日, 東京国際フォーラム(東京)

桂 真理, 天笠翔太, 山岸麗子, 相原 一, 児玉龍彦, 和田洋一郎, 秋光信佳, 宮川 清, 網膜神経節細胞におけるヒストン H4K20メチル化と53BP1の役割, 第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月03日~2013年12月06日, 神戸ポートアイランド(兵庫)

天笠翔太, 桂 真理, 秋光信佳, 相原 一, 宮川清, 和田洋一郎, 低酸素誘導神経細胞死における53BP1の役割, 第56回放射線影響学会, 2013年10月18日~2013年10月20日, 青森 ホテルクラウンパレス(青森)

Mari Katsura, Reiko Yamagishi, Makoto Aihara, Mechanisms of Neuroprotection by Latanoprost for Retinal Ganglion Cells under Hypoxia, ARVO 2013, 2013年05月05日~2013年05月09日, Washington State Convention Center (シアトル・アメリカ)

桂 真理, 山岸麗子, 相原 一, 網膜神経節細胞における低酸素負荷時のNFκBのリン酸化とラタノプロストの役割, 第117回日本眼科学会学術総会, 2013年04月04日~2013年04月07日, 東京国際フォーラム(東京)

Mari Katsura, Makoto Aihara, Reiko Yamagishi, et al. The Roles for DNA Damage Response in Retinal Ganglion Cell Death, ARVO 2012, 2012年05月05日~2012年05月11日, プロワードカントリーコンベンションセンター(フォートローダーデール・アメリカ)

桂 真理, 山岸麗子, 嶋澤雅光, 原 英彰,

相原 一, 低酸素誘導網膜神経細胞死におけるDNA損傷応答の役割, 第116回日本眼科学会学術総会, 2012年04月05日~2012年04月08日, 東京国際フォーラム(東京)

桂 真理, 53BP1 Nuclear Foci are Reduced by Hypoxia in Neural Cells, 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月16日, パシフィコ横浜(神奈川)

桂 真理, 種々のストレス負荷によるRGC細胞死におけるDNA損傷応答の関与, 第22回日本緑内障学会, 2011年9月23日, 秋田ビューホテル(秋田)

桂 真理, 山岸麗子, 相原 一, DNA Damage Response in Retinal Ganglion Cells, World Congress of Glaucoma 2011, 2011年6月29日, パレ・デ・コングレ(フランス)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ric.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桂 真理 (KATSURA, Mari)

東京大学アイソトープ総合センター・特任助教

研究者番号: 30436571

(2) 研究分担者

相原 一 (AIHARA, Makoto)

東京大学医学部附属病院・准教授(平成24年6月30日退職)

現在 北海道大学 客員研究員

研究者番号: 80222462

村田博史 (MURATA, Hiroshi)

東京大学医学部附属病院・助教

研究者番号: 80635748