

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23618006

研究課題名(和文)ゼブラフィッシュ視神経再構築におけるFactorXIII Aの関与とその作用機序

研究課題名(英文)Involvement of FactorXIII-A in fish optic nerve regeneration

研究代表者

杉谷 加代(SUGITANI, Kayo)

金沢大学・保健学系・助教

研究者番号：20162258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：アダルト哺乳類の中枢神経は一旦損傷を受けると不可逆的ダメージとなり、細胞はアポトーシスに陥り、やがて機能喪失に至る。ところが魚類中枢神経は、損傷後の軸索再生・修復が可能であり、機能も完全に回復する。ここでは、魚類視神経を実験的に損傷し、タンパク架橋酵素であるトランスグルタミナーゼファミリーの一つ、Factor XIII-A(FXIII-A)遺伝子の発現とその軸索再生への関与について検討した結果、FXIII-Aが視神経損傷後いち早く視神経および網膜で活性化され、創傷治癒・視神経軸索再生に深く関与することがわかった。

研究成果の概要(英文)：Unlike mammals, fish retinal ganglion cells have the capacity to repair their axons even after optic nerve transection. In the process of fish optic nerve regeneration, a large number of genes have been described as regeneration-associated molecules. Using molecular cloning techniques, we identified some cDNA clones belonging to the transglutaminase (TG) family as upregulation genes, and one of those was Factor XIII A subunit (FXIII-A). FXIII-A is quickly activated after optic nerve lesion and deeply involved in wound healing and optic nerve regeneration.

研究分野：神経化学

キーワード：Factor XIII-A retina optic nerve regeneration neurite sprouting neurite outgrowth

### 1. 研究開始当初の背景

アダルト哺乳類の中樞神経は一旦損傷を受けると不可逆的ダメージとなり、細胞はアポトーシスに陥り、やがて機能喪失に至る。ところが、ゼブラフィッシュを含む魚類は、中枢神経損傷後の軸索再生・修復が可能であり、その機能も完全に回復する。魚類には哺乳類には見られない優れた治癒力、再生力が認められる。これまで、こうした魚類中枢神経における修復機構を遺伝子および分子レベルで探求することにより、中枢神経軸索再生のメカニズムを探求してきた。特に、中枢神経損傷後に魚類では顕著に発現増加が認められるのに対し、哺乳類では減少し枯渇する分子として、タンパク架橋酵素である Transglutaminase (TG) が同定された。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、魚類中枢神経軸索再生過程において、このファミリー分子の一つで、凝固因子の一つとしても知られる Factor XIIIa (FXIII-A) 遺伝子の発現に焦点を当てて検索する。FXIII-A は血液凝固の反応過程においてフィブリン分子を架橋する酵素として重要であるが、近年、cellular FXIII として組織の細胞中に発現し、様々な生理活性を有することが新しい知見として得られつつある。本研究では、ゼブラフィッシュおよび金魚の視神経損傷モデルを用いることにより、その発現のピーク、局在について網膜・視神経をサンプルとして検索し、その生理学的作用について探求する。さらに同様に発現する他の再生関連分子との相互作用などについても検討する。

### 3. 研究の方法

(1) *In situ* TG activity assay: 視神経損傷後の TG ファミリーの各タイプの活性化について調べるため、それぞれのタイプに特異的な FITC 標識合成ペプチド基質を用いて損傷視神経での組織中の TG 活性を測定した。サンプルとしてはゼブラフィッシュよりも視神経が大きい金魚を材料として実施した。また、損傷後どの時期に発現上昇が見られるかについて経時的に調べた。

(2) 視神経損傷後に発現増加する FXIII-A 遺伝子のクローニング: 視神経損傷後 1 日後に発現が増加する金魚の cDNA ライブラリーを構築し、その中で FXIII-A 遺伝子の全長についてその塩基配列を解析した。

(3) 網膜・視神経での FXIII-A の発現の増減および局在については、タンパクレベルでは免疫染色およびウエスタンブロッティング、mRNA レベルでは *In situ* hybridization (ISH) および半定量的 RT-PCR を用いて、視神経損傷後から治癒に至る間の経時的な解析を行った。また、FXIII-A 発現細胞の解析を行った。

(4) RGC-5 培養細胞および網膜組織片培養を用いて、FXIII-A の軸索伸長への関与や役割を検討した。RGC-5 細胞への FXIII-A 遺伝子の過剰発現や FXIII を強発現している視神経抽出液の添加実験あるいは抗 FXIII-A 抗体などの添加により、loss of function 及び gain of function の実験を行った。

(5) マウス視神経損傷モデルを使い、FXIII-A タンパクの眼球内へのインジェクションを行い、成熟マウス視神経の再生に対して効果的か否かを調べた。

### 4. 研究成果

(1) 視神経損傷後 FXIII-A の発現時期および発現部位について調べたところ、視神経および網膜の双方で発現上昇が見られた。しかしその発現時期については違いが見られたため、組織別にその結果を下記に記載した。

#### ① 視神経での FXIII-A の発現について

*In situ* TG activity assay にて調べたところ、FXIII の活性が損傷後 3 時間には既に顕著に増加していた。これは他の TG1, TG2 に比較しても、損傷後迅速に、しかも強く活性化されていることがわかった(図 1)。

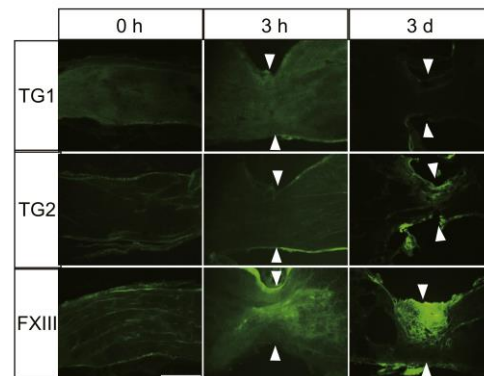


図 1 金魚視神経損傷後の *In situ* TG activity assay  
▽は損傷 (crush) 部位を示す

また、この発現は再生した視神経が視蓋に到達する約 30~40 日後まで継続することが判明した(図 2)。

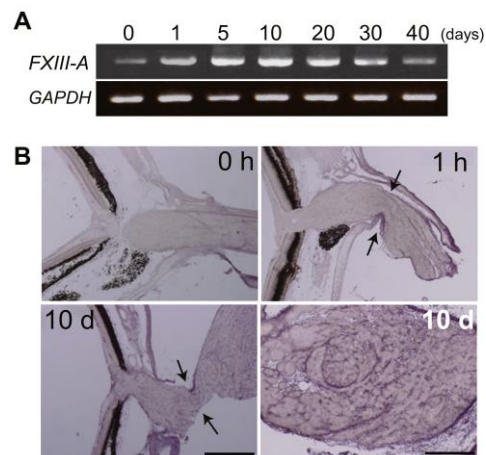


図 2 (A) 視神経の FXIII-A mRNA の RT-PCR  
(B) 視神経 FXIII-A の ISH. crush 1 時間後には損傷部位で発現上昇が見られる

損傷視神経での FXIII-A 発現細胞を解析するため免疫染色を行ったところ、これらは DAPI 陽性であり、グリア細胞のマーカープロテイン GFAP あるいは Iba1 を発現しており、グリア細胞であることが分かった (図 3)。



図 3 視神経の Anti-FXIII-A による免疫染色  
FXIII-A 陽性細胞はグリア細胞

②網膜での FXIII-A の発現について  
視神経損傷後、網膜では 3~10 日をピークに FXIII-A の発現が一過性に上昇した。網膜における FXIII-A 発現細胞は、網膜神経節細胞であることが免疫二重染色より判明した (図 4)。

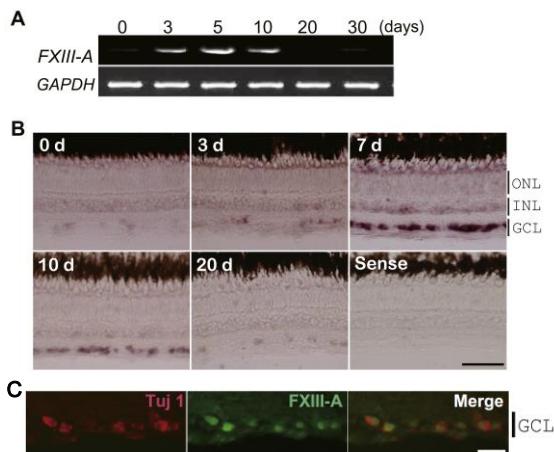


図 4 (A) 網膜の FXIII-A mRNA の RT-PCR  
(B) 網膜 FXIII-A の ISH. GCL(網膜神経節細胞層)で発現上昇が見られる  
(C) 網膜神経節細胞のマーカー Tuj1 と FXIII-A が完全にマージする

(2) 網膜での FXIII-A 発現の生理的作用についての解析

①FXIII-A の RGC-5 cell への強制発現

下図に示したように、FXIII-A を強制発現させると RGC-5 cell より神経突起の保有率が増

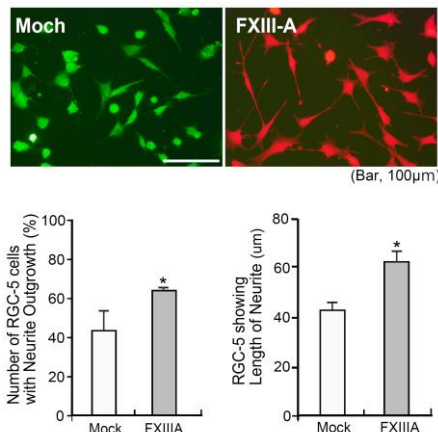


図 5 RGC-5 cell への FXIII-A 強制発現

加し、またその突起の長さについても有意に長くなるという結果が得られた(図 5)。

②網膜組織への強制発現実験

2つの条件下で採取した金魚網膜を用いて網膜組織片細胞への FXIII-A 強制発現実験を行った。一つは、視神経損傷後 3 日経過した網膜を取り出して、強制発現実験に使用したもの(Primed retina)、もう一つは、視神経には何も損傷を与えず、採取してすぐの網膜(Unprimed retina or Naïve retina)を用いたものである。すると、RGC-5 cell で観察されたような神経突起の形成を促進させる効果が Unprimed retina でのみ観察され、損傷後 3 日以上経過した網膜ではその効果は見られなかった (図 6)。これは、視神経損傷後 3 日経過すると、すでに網膜内では FXIII-A の発現増加が始まっており、強制発現による効果がマスクされてしまうと考えられた。また、FXIII-A 強制発現による神経突起保有率の促進効果は、Anti-FXIII-A IgG (1μg/ml)の培養液への添加により完全に消去される結果となった。

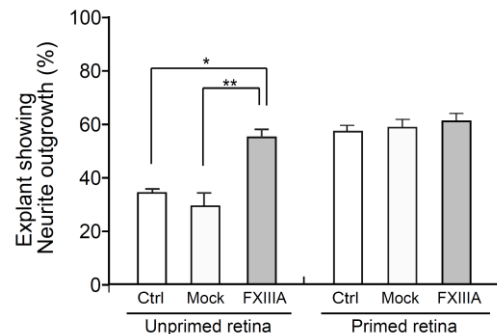


図 6 2つの条件下で採取した網膜組織片への FXIII-A 強制発現後の培養結果 (3日間培養)

これらの結果より、FXIII-A の網膜での発現は、ダメージを受けた網膜神経節細胞から、視神経再生のために新しい神経突起の形成、Neurite sprouting を促すという重要な生理学的作用があると考えられた。

(3) 視神経での FXIII-A 発現の生理的作用についての解析

網膜での一過性の FXIII-A に比べ、損傷を受けた視神経では 30 日以上にも及ぶ長い期間の発現が RT-PCR や ISH で観察された。そこで、その発現の生理学的作用を解析するため損傷を受けた 3 日後の視神経 (3d-N) そのものをホモジナイズして抽出液を作製し、網膜組織片に添加して培養実験を行った。損傷を受けていない視神経抽出液 (0d-N)を対照として用いた。この場合の網膜も、Unprimed retina と Primed Retina (視神経損傷 3 日後)の 2 種類を用いた。

その結果、視神経抽出液 3d-N のみが、Primed Retina に対してのみ、神経突起形成促進効果のあることが分かった。Unprimed retina に対しては、0d-N, 3d-N ともに視神経の抽出液の添加効果は見られなかった (図 7)。



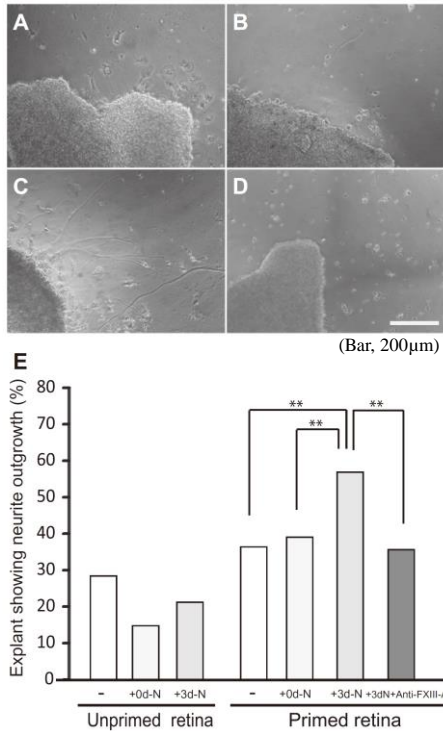


図7 2つの条件下で採取した網膜組織片への視神経抽出液添加の培養効果 (3日間培養)  
 A) 3d-N + Unprimed retina, B) Primed retina (-)  
 C) 3d-N+Primed retina, D) 3d-N+Primed retina + Ab

また、培養液に Anti-FXIII-A IgG (1 $\mu$ g/ml)を添加すると、神経突起形成の促進効果が完全にブロックされた (図7D, E)。

以上の結果より、視神経での視神経損傷後長期間に亘る FXIII-A 発現は、再生準備段階にある網膜神経節細胞に対して、神経突起形成及び軸索伸長を促す作用があると考えられた。

#### (4) 成熟マウスの視神経損傷モデルへのリコンビナント FXIII-A タンパク添加実験

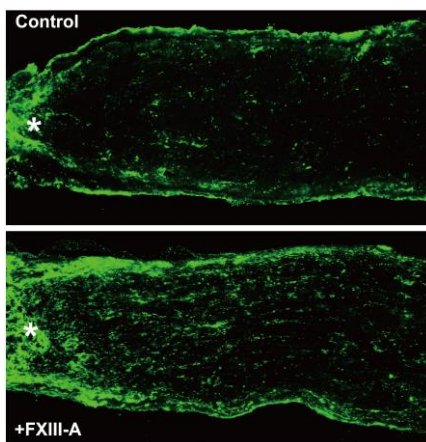


図8 マウス眼球内へのリコンビナント FXIII-A インジェクションによる損傷視神経の伸長効果 (GAP43 免疫染色) \*視神経クラッシュ部位

マウス視神経損傷モデルに、リコンビナント FXIII-A タンパク (30ng/ml)を眼球内に 5 $\mu$ l

インジェクションし、経過を観察した。その結果、図8に示すように視神経損傷 10日後の視神経について再生した神経突起を Anti-GAP43 抗体を用いて免疫染色したところ、コントロール群に比較して FXIII-A リコンビナントタンパク投与群は、視神経の再生が促進するという結果が得られた。

#### 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 16 件)

- ① Sugitani K, Ogai K, Koriyama Y, Kato S (2014) Reciprocal Changes in Factor XIII and Retinal Transglutaminase Expressions in the Fish Retina During Optic Nerve Regeneration. *Adv Exp Med Biol.* 801:759-764. 査読無 DOI: 10.1007/978-1-4614-3209-8\_95.
- ② Ogai K, Nakatani K, Hisano S, Sugitani K, Koriyama Y, Kato S. (2014) Function of Sox2 in ependymal cells of lesioned spinal cords in adult zebrafish. *Neurosci Res.*88.84-87. 査読有 DOI: 10.1016/j.neures.2014.07.010.
- ③ Ogai K, Kuwana A, Hisano S, Nagashima M, Koriyama Y, Sugitani K, Mawatari K, Nakashima H, Kato S. (2014) Upregulation of Leukemia Inhibitory Factor (LIF) during the Early Stage of Optic Nerve Regeneration in Zebrafish. *PLoS One.* 27;9(8):e106010. 査読有 DOI:10.1371/journal.pone.0106010.
- ④ Koriyama Y, Sugitani K, Ogai K, Kato S. (2014) Heat shock protein 70 induction by valproic acid delays photoreceptor cell death by N-methyl-Nnitrosourea in mice. *J Neurochem.*130:707-719. 査読有 DOI: 10.1111/jnc.12750.5
- ⑤ Koriyama Y, Kamiya M, Arai K, Sugitani K, Ogai K, Kato S. (2014) Nipradilol promotes axon regeneration through S-nitrosylation of PTEN in retinal ganglion cells. *Adv Exp Med Biol.* 801:751-757. 査読無 DOI: 10.1007/978-1-4614-3209-8\_94.
- ⑥ Ogai K, Nishitani M, Kuwana A, Mawatari K, Koriyama Y, Sugitani K, Nakashima H, Kato S. (2014) Regeneration-associated genes on optic nerve regeneration in fish retina. *Adv Exp Med Biol.* 801: 441-446. DOI: 10.1007/978-1-4614-3209-8\_56. 査読有
- ⑦ Koriyama Y, Sugitani K, Ogai K, Kato S. (2014) Neuritogenic activity of trichostatin A in adult rat retinal ganglion cells through acetylation of histone H3 lysine 9 and RAR $\beta$  induction. *J Pharmacol Sci.* 124: 112-116. 査読有 DOI: org/10.1254/jphs.13171SC
- ⑧ Kato S, Matsukawa T, Koriyama Y, Sugitani K, Ogai K. (2013) A molecular mechanism of optic nerve regeneration in fish: The retinoid signaling pathway. *Prog Retin Eye Res.* 37:13-30. 査読有 DOI: 10.1016/j.preteyeres.2013.07.004.

- ⑨ Koriyama Y, Takagi Y, Chiba K, Yamazaki M, Sugitani K, Arai K, Suzuki H, Kato S. (2013) Requirement of retinoic acid receptor  $\beta$  for genipin derivative-induced optic nerve regeneration in adult rat retina. PLoS One. 8. e71252. 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0071252.
- ⑩ Koriyama Y, Nakayama Y, Matsugo S, Sugitani K, Ogai K, Takadera T, Kato S. (2013) Anti-inflammatory effects of lipoic acid through inhibition of GSK-3 $\beta$  in lipopolysaccharide-induced BV-2 microglial cells. Neurosci Res. 77. 87-96. 査読有  
DOI: 10.1016/j.neures.2013.07.001.
- ⑪ Sugitani K, Ogai K, Hitomi K, Nakamura-Yonehara K, Shintani T, Noda M, Koriyama Y, Tanii H, Matsukawa T, Kato S. (2012) A distinct effect of transient and sustained upregulation of cellular factor XIII in the goldfish retina and optic nerve on optic nerve regeneration. Neurochem Int. 61:423-432. 査読有  
DOI: 10.1016/j.neuint.2012.06.004
- ⑫ de Lima S, Koriyama Y, Kurimoto T, Oliveira JT, Yin Y, Li Y, Gilbert HY, Fagiolini M, Martinez AM, Benowitz L. (2012) Full-length axon regeneration in the adult mouse optic nerve and partial recovery of simple visual behaviors. Proc Natl Acad Sci. 109: 9149-9154. 査読有 DOI: 10.1073/pnas.1119449109
- ⑬ Ogai K, Hisano S, Mawatari K, Sugitani K, Koriyama Y, Nakashima H, Kato S. (2012) Upregulation of anti-apoptotic factors in upper motor neurons after spinal cord injury in adult zebrafish. Neurochem Int. 61:1202-1211. 査読有 DOI: 10.1016/j.neuint.2012.08.015
- ⑭ Sugitani K, Ogai K, Nakashima H, Kato S. (2012) Factor XIII $\alpha$  Induction in the Retina and Optic Nerve After Optic Nerve Lesion in Goldfish. Adv. Exp. Med. Biol. 723:443-448. 査読無 DOI: 10.1016/j.neuint.2012.08.015
- ⑮ Koriyama Y, Sugitani K, Matsukawa T, Kato S. (2012) An application for Mammalian optic nerve repair by fish regeneration-associated genes. Adv. Exp. Med. Biol. 723:161-166. 査読無 DOI: 10.1007/978-1-4614-0631-0\_22
- ⑯ Koriyama Y, Takagi Y, Chiba K, Yamazaki M, Arai K, Matsukawa T, Suzuki H, Sugitani K, Kagechika H, Kato S. (2011) Neurotogenic activity of a genipin derivative in retinal ganglion cells is mediated by retinoic acid receptor  $\beta$  expression through nitric oxide/S-nitrosylation signaling. J Neurochem. 119:1232-1242. 査読有  
DOI: 10.1111/j.1471-4159.2011.07533.x

[学会発表] (計 15 件)

- ① Sugitani K. A novel function of Factor XIII-A in nerve regeneration. 第 86 回日本生化学会大会 (招待講演) パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) 2013/9/11.

- ② Ogai K, Sugitani K, Koriyama Y, Nakashima H, Kato S. Upregulation of leukemia inhibitory factor (LIF) and Sox2 after optic nerve injury in adult zebrafish. Neuro2013/第 56 回日本神経化学会大会 国立京都国際会館 (京都市) 2013/6/21.
- ③ Sugitani K. A novel function of Factor XIII-A on nerve regeneration. International Workshop on FXIII (招待講演), German Trombosis and Hemostasis Society 57th Annual Meeting, ICM-International Congress Center (ドイツ) 2013/2/20.
- ④ Sugitani K, Ogai K, Kato S. A distinct effect of two types of transglutaminase on fish optic nerve regeneration. The 11th Biennial Meeting of the APSN / The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市) 2012/9/30
- ⑤ Sugitani K, Ogai K, Kato S. Reciprocal changes of factor XIII and retinal transglutaminase expressions in the fish retina during optic nerve regeneration. XVI International Symposium on Retinal Degeneration 2012, The Monarch Hotel GmbH (ドイツ) 2012/7/16-20.
- ⑥ Sugitani K, Ogai K, Hitomi K, Kato S. Role of the transglutaminase family on optic nerve regeneration in fish. 第 54 回日本神経化学会大会, 瑠璃光 (石川県加賀市) 2011/9/27.
- ⑦ Ogai K, Sugitani K, Nakashima H, Kato S. Upregulation of a regeneration-related molecule on regrowing optic axons in goldfish. 日本分子生物学会第 11 回春季シンポジウム. 石川県立音楽堂 (石川県金沢市) 2011/5/26.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]  
ホームページ等  
<http://neuro.w3.kanazawa-u.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉谷 加代 (SUGITANI, Kayo)  
金沢大学・保健学系・助教  
研究者番号：20162258

### (2) 研究分担者

郡山 恵樹 (KORIYAMA, Yoshiki)  
鈴鹿医療科学大学・薬学部・准教授  
研究者番号：70397199

### (3) 連携研究者

加藤 聖 (KATO, Satoru)  
金沢大学・医学系・教授  
研究者番号：10019614