

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：32713
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23792016
 研究課題名（和文） SAM系新規線内障モデルにおける神経特異性上皮増殖因子制御と軸索伸
 展機構の解明
 研究課題名（英文） Regulation of Nell2 in the senescence-accelerated mouse and
 elucidation of axonal extension.
 研究代表者
 宗正 泰成（MUNEMASA YASUNARI）
 聖マリアンナ医科大学・医学部・助教
 研究者番号：30440340

研究成果の概要（和文）：老化マウス、特に SAMP8 及び SAMP10 は SAMR（正常老化マウス、コントロールマウス）に比し、生後 3 か月で網膜神経節細胞が有意に減少していることが判明した。内顆粒層及び外顆粒層に関してこれらのマウスにおいて有意差はなかった。この結果より老化促進マウスの SAMP8 及び P10 では網膜神経節細胞が早期に減少することが判明した。神経細胞の成長や投射に関与する分子の神経特異性上皮増殖因子（Nell2）を Immunoblot にて検討すると、SAMR に比し、SAMP8 及び SAMP10 で生後 1 か月から減少傾向にあった。また抗老化分子で知られる SIRT1 の変化も同様に検討すると SAMP8 及び SAMP10 で減少傾向にあった。この結果は老化マウスにおける網膜神経節細胞死には Nell2 の分解及び SIRT1 の減少が関与していることが判明した。

研究成果の概要（英文）：The senescence-accelerated mouse (SAM) has been established as a model of accelerated aging. SAM consists of the senescence-accelerated prone mouse (SAMP) and senescence-accelerated resistant mouse (SAMR), which exhibits normal aging process. We investigated the change of retinal ganglion cell (RGC) and Sirtuin 1 (Sirt1), which is a member of the sirtuin family of proteins and related with aging process, and Nell2, which is involved in neuronal growth process, in SAMR, SAMP8, and SAMP10. RGC in 3 month old SAMP8 and P10 was significantly decreased, compared with those in SAMR. No significant changes in the INL and the ONL were observed in SAMR, SAMP8, and SAMP10. IB showed that a significant decrease in Sirt1 and Nell2 were observed in the retinas of SAMP8 and SAMP10, compared to SAMR. An abundant Sirt1 was seen in the RGC and the IPL of SAMR retina, compared to those in SAMP8 and SAMP10.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：網膜、老化、神経

1. 研究開始当初の背景
 現在までに我々はラット高眼圧モデル及び
 視神経切断モデルにおいて抗酸化機構の主

要酵素である Thioredoxin が視神経変性さら
 には網膜神経節細胞死に関わっていること
 を見出した (Munemasa et al., Gene Therapy,

2009)。さらに最近では高眼圧モデルラットにおけるミトコンドリア外膜機能制御破綻による酸化ストレス誘導蛋白 AIF (apoptosis inducing factor) の変化が、視神経変性さらには網膜神経節細胞死に強く関わっていることを報告した (Munemasa et al., J Neurochem, 2010)。これらの結果は酸化ストレス及びミトコンドリア機能障害が緑内障性視神経症に関わっていることを強く示唆した。しかし視神経切断もしくは高眼圧モデルは外的にストレスを誘導したモデルであり、正常眼圧緑内障の神経変性とは異なる。そこで本研究では**外傷なくかつ眼圧を上げずに酸化ストレスやミトコンドリア機能障害により視神経変性が生じるより自然に近い神経変性モデル動物を使用するために SAM に着眼した**。本研究では**視神経保護・軸索伸展機構**も課題として取り上げた。正常眼圧緑内障に関しては高眼圧緑内障とは異なり、降圧加療のみではその視神経変性の進行を食い止めるには至らない場合が多々あり神経保護・再生が必要になる。過去の報告では外的な成長因子例えば Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) を投与すると、細胞死の予防は可能であるが、再生は促進されない (Klöcker N, J Neurosci, 2000)。細胞体の保護のみならず、軸索の伸展さらには正常な投射までを考えると、発生段階で軸索伸展を制御する因子を成人視神経の細胞体-軸索に応用できれば細胞体の賦活化のみならず軸索伸展、延いては再生へと発展可能となりうる。

2. 研究の目的

視神経変性・再生機構は動物種により相違がある。哺乳類は魚類と異なり、障害後軸索再生機能を保有せず網膜神経節細胞は死滅する。魚類の再生機構はその発生における軸索伸長制御因子が関与している。死滅した網膜

神経節細胞を再生し、正常な軸索伸長・投射を構築するにあたり、魚類とは異なる分子生物学的機構が存在すると考えられる。緑内障は不可逆的視神経変性疾患であり、進行例に対し神経保護のみでは視野は回復せず、再生かつ正常な軸索伸長・投射が期待される。本研究では正常眼圧緑内障自然発症動物モデルを想定したマウスの視神経変性における神経上皮増殖因子の制御機構を解析し、視神経軸索保護及び軸索伸展への応用を試みる。以上を踏まえ本研究では特に以下の点を明らかにする。

- 1) SAM における網膜神経節細胞変化
- 2) SAM の視神経変性機序解明
- 3) Ne112 の発現制御機構及び役割を分子生物学的に解明、Ne112 相互作用分子の同定
- 4) Ne112 遺伝子導入が及ぼす SAM 視神経・網膜への影響を組織学的・分子生物学的に解析、神経保護さらには軸索伸展に寄与するか否か検討

3. 研究の方法

様々な月齢における SAM の視神経軸索変性及び網膜神経節細胞の変化を組織学的に捉える。光学顕微鏡にて軸索変性及び細胞体死を定量し、電子顕微鏡にてミトコンドリアやマイクロチューブリンなどの細胞内構築変化を捉える。視神経及び網膜神経節細胞内の Ne112 及び Ne112 蛋白質間相互分子作用の変化は Mass spectrometry 及び GST pull down assay などにより解析する。Ne112 の強制発現系による役割同定は網膜神経節細胞の初代培養及び SAM にて行う。網膜視神経内局所強制発現は Ne112 cDNA が挿入されレンチウイルスベクターの硝子体注射にて行う。Ne112 の神経変性における役割を同定後、網膜特異的プロモーターに Ne112 DNA を組み込

み SAM へ遺伝子導入を試み、SAM の加齢における軸索変性及び細胞体死を検討することで Ne112 の神経変性における役割を同定する。

1) SAM の眼圧測定及び視神経変性評価

SAM の眼圧測定は生後 1 カ月より週一回手持ち眼圧計 (tonolab) を用い無麻酔下で行う。

SAMP は生後早期から抗酸化ストレス脆弱性により様々な障害が生じると考える。6, 9 及び 12 カ月齢における SAMP8, 10 及び SAMR1 (コントロールマウス) の視神経矢状断切片を作成し、網膜神経節細胞は神経トレーサーにて逆行性標識を行い網膜伸展標本にし、Aphelion ソフトウェアにて視神経軸索数及び細胞数を評価する。ミトコンドリアやマイクロチューブリン等の細胞内構築変化は電子顕微鏡にて評価する。

2) Ne112 標的分子との蛋白質間相互作用の分子生物学的評価

網膜神経節細胞は magnetic beads 法にて採取する。Ne112 と他分子の蛋白質間相互作用は immunoprecipitation 後、**Mass spectrometry** にて質量分析を行う。相互分子同定後、Ne112 の GST 融合蛋白質を大腸菌に発現させ相互分子との結合を **GST pull down assay** にて確認する。軸索再生促進分子との結合がみられれば、レンチウイルスに Ne112 DNA 及びレポーター遺伝子を挿入したベクターを作成する。

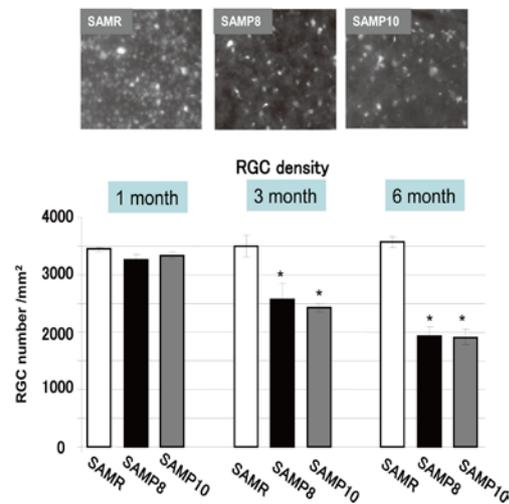
3) Ne112 細胞体保護及び軸索伸展効果の評価

網膜神経節細胞を magnetic beads 法で単離後、初代培養を行う。その後 EGFP が挿入された Ne112 plasmid DNA を網膜神経節細胞に強制発現させ、神経保護効果を組織学的に検討する。

4. 研究成果

SAMP8 及び SAMP10 は SAMR (正常老化マウス、

コントロールマウス) に比し、生後 3 か月で網膜神経節細胞が有意に減少していることが判明した。内顆粒層及び外顆粒層に関してこれらのマウスにおいて有意差はなかった。



この結果より老化促進マウスの SAMP8 及び P10 では網膜神経節細胞が早期に減少することが判明した (上図参照)。神経細胞の成長や投射に関与する分子の神経特異性上皮増殖因子 (Ne112) を Immunoblot にて検討すると、SAMR に比し、SAMP8 及び SAMP10 で生後 1 か月から有意に減少していることが判明した。また抗老化分子で知られる SIRT1 の変化も同様に検討すると SAMP8 及び SAMP10 で有意な減少を認めた。

この結果は SIRT1 及び Ne112 が網膜神経節細胞変性に何らかに関与していることが示唆された。次に Ne112 との相互分子を検索するため Ne112 で Immunoprecipitation 施行後、Mass spectrometry を行い定性分析したところ MACF1 (Microtubule-actin cross-linking factor 1) が検出された。Ne112 と MACF1 の局在を免疫染色で検討すると網膜神経節細胞内で共存していることがわかった。

さらに Ne112 を網膜神経節細胞に electroporation にて強制発現すると視神経切断モデルに対し、神経保護効果を示した。この結果は Ne112 が MACF1 と相互し、神経保護効果を有する分子ということが判明した。

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 3 件)

(1) Munemasa Y and Kitaoka Y. Molecular mechanisms of retinal ganglion cell degeneration in glaucoma and future prospects for cell body and axonal protection. Front Cell Neurosci, 査読有, 6, 2013, 1-13, DOI: 10.3389/fncel. 2012.00060

(2) Kojima K, Kitaoka Y, Munemasa Y, and Ueno S. Axonal Protection via Modulation of the Amyloidogenic Pathway in Tumor Necrosis Factor-Induced Optic Neuropathy. Invest Ophthalmol Vis Sci, 査読有, 53, 2012, 7675-7683, DOI:10.1167/iovs.12-10271

(3) Munemasa Y, Chang CS, Kwong JM, Kyung H, Kitaoka Y, Caprioli J, Piri N. The neuronal EGF-related gene Nell2 interacts with Macf1 and supports survival of retinal ganglion cells after optic nerve injury. PLoS One, 査読有, 7, 2012, e34810, DOI: 10.1371/journal.pone.0034810

[学会発表] (計 4 件)

(1) 宗正 泰成、SAM (The senescence-accelerated mouse) における SIRT1 の発現、第 23 回日本緑内障学会、2012/9/28、金沢

(2) Yasunari Munemasa, RGC degeneration in the senescence-accelerated mouse. The Association for Research and Vision in Ophthalmology. 2012/5/6, Fort Lauderdale, USA.

(3) 宗正 泰成、SAM (The senescence-accelerated mouse) における網膜神経節細胞変性、第 22 回日本緑内障学会、2011/9/23、秋田

(4) Yasunari Munemasa, The Senescence-Accelerated Mouse in Retinal Neurodegeneration. The Association for Research and Vision in Ophthalmology. May 4, 2011, Fort Lauderdale, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宗正 泰成 (MUNEMASA YASUNARI)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 30440340

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし