

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 11 月 1 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462753

研究課題名(和文) 視神経再生過程におけるクロマチンダイナミクス解析と緑内障治療への応用

研究課題名(英文) Study for chromatin dynamics during optic nerve regeneration

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：成熟期哺乳類では、中枢神経が一度損傷を受けると再生が極めて困難である。一方、新生期における中枢神経再生は比較的容易である。これはエピジェネティックな再生関連分子の発現制御機構に依存すると考えられているが、その詳細なメカニズムは不明であった。我々は中枢神経再生モデルとして、網膜-視神経系を用い、ヒストンのアセチル化によるエピジェネティックな再生分子の発現制御機構に着目し、新生期網膜神経節細胞(RGC)に発現が豊富なレチノイン酸受容体(RAR)を成熟期に再発現させることで神経再生を促すことに成功した。

研究成果の概要(英文)：Like other CNS neurons, mature retinal ganglion cells (RGCs) cannot regenerate their axons after nerve injury due to loss of regenerative capacity. One of the reasons why they lose their capacity seems to be a dramatic shift in gene expression of RGCs under epigenetic modulation. In here, we found that levels of histone H3 lysine 9 acetylation decreased after birth in RGCs. This decrease showed good correlation with restriction of retinoic acid receptor (RAR) expression in RGCs after birth. Furthermore, we demonstrated that a histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, induced axonal regeneration of adult rat RGCs through RAR induction.

研究分野：神経化学

キーワード：神経再生 エピジェネティクス レチノイン酸受容体 ヒストンアセチル化 視神経 網膜神経節細胞
神経回路 中枢神経

1. 研究開始当初の背景

視神経は眼球内の網膜神経節細胞 (RGCs) から伸びる神経線維束が眼球外へ出て視覚中枢までつづく構造をしており、中枢神経の修復・再生研究に広く用いられる。成熟哺乳類の中枢神経は、損傷後の再生が極めて困難であることが知られている。しかし、新生期では損傷後の神経再生は比較的容易である。これは、発生期には転写調節がオンの状態にあり軸索再生関連分子の発現が起こりやすいためとされているが、その制御機構は成長とともに制限を受けて、遺伝子発現が減衰した結果、再生が困難となると考えられる。しかし、その詳細な発現制御機構は解明されていない。一方近年、ヒストンの化学的修飾によるエピジェネティックな転写制御に関する報告が相次いでいる。ヒストン H3 や H4 の特定部位のアセチル化はクロマチン構造を緩め (ユークロマチン)、遺伝子発現機構がオンとなる。RGCs においては、クロマチンリモデリングとともに転写を促進させるヒストンアセチルトランスフェラーゼ p300 が生後の発達につれて発現抑制されることが報告されている。また、p300 の強制発現は RGCs において、成長関連タンパク質である GAP43 などを含む再生関連分子の発現を誘導させた結果、視神経を再生させる。これらのことは発生期 RGC においては、再生関連分子の転写活性化が比較的容易であるが、成長とともにその転写制限を強化する機構の存在をほのめかす。

2. 研究の目的

ヒストンの化学的修飾やそれによるクロマチンリモデリングは再生関連分子の遺伝子発現オン/オフ機構とその後の神経再生の可否決定機構の根幹を司る可能性がある。これまでの研究から RGCs においても成長により再生関連分子の遺伝子発現が制限され再生能力が衰退することが分かっている。その

遺伝子発現オン/オフ機構にはヒストンの化学修飾とクロマチンのリモデリングをともなうエピジェネティックな遺伝子発現制御機構との関連が考えられる。しかし、成長過程および視神経損傷後の RGCs におけるクロマチンダイナミクス解析やそれによる遺伝子発現制御と神経再生を関連付けた報告は国内外ともに皆無であった。本研究では、神経再生過程におけるエピジェネティックな転写制御による神経再生分子発現機構とレチノイン酸受容体 (RAR) の重要性について研究を行った。

3. 研究の方法

新生期から成熟期までのヒストンのアセチル化のレベルを免疫染色とウェスタンブロットでアッセイした。また、その時の軸索再生能について組織片培養法を用いて検討した。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、(1R) イソプロピルオキシゲニピン (IPRG001)などを眼球内投与し、ヒストンのアセチル化を免疫染色および、ウェスタンブロットでアッセイした。遺伝子発現の程度はマイクロアレイと RT-PCR で確認した。視神経再生の程度は損傷後の視神経において GAP43 抗体を用いて染色・定量した。

4. 研究成果

(1R) イソプロピルオキシゲニピン (IPRG001) は天然物化合物ゲニピンの誘導體であり、一酸化窒素放出作用を示すことを報告している。また、予試験的に IPRG001 の軸索伸長誘導に関する遺伝子発現をマイクロアレイで網羅的に解析した結果、レチノイン酸受容体 (RAR) の発現が特に顕著だったため RAR を再生関連分子候補として、その発現制御について着目した。網膜神経節細胞株 (RGC-5) において IPRG001 処理により軸索伸長は促進された。その効果は NO スカベンジャーで消失することから NO 依存적であ

ることが分かった。また、近年の報告からヒストン脱アセチル化酵素 2(HDAC2)は NO により S-ニトロシル化を受けると不活性化され、ヒストンアセチル化を誘導した結果、転写が促進されることが知られている。一方、レチノイン酸シグナルは生物の発生・再生機構に非常に大切であることが知られている。我々はこれらの点を線で結ぶべく、神経再生機構の解明を行った。その結果、S-ニトロシル化依存的なエピジェネティック制御によるレチノイドシグナル亢進といった新たな中枢神経再生機構を見出した。

RAR は新生期 1 日目 (P1) の RGCs に強く発現が認められるが成長とともに減衰し、成熟期にはほとんど発現されていない。網膜組織片を用いた神経再生アッセイにおいて、その再生能力は新生期から減衰し、成熟期には P1 の約 10%以下まで低下した。そのカーブパターンは生後の RAR の発現パターンと一致した。また、新生期網膜で RAR を siRNA によりノックダウンしたところ神経再生が抑制された。つまり、新生期における視神経再生は RAR の発現が豊富であることで起こり、そのレベルは成長とともに減衰するため再生能力が低下していくことが考えられた。また、IPRG001 は RAR の発現誘導作用を持つため、成熟期で RAR を再発現させることができれば神経再生能力が得られると仮定した。実際に、成熟期網膜組織片を用いた実験により IPRG001 は神経再生を誘導した。また、その効果は NO スカベンジャーや S ニトロシル化阻害剤であるジチオスレイトール、さらに、RAR の阻害により抑制されたことから NO/S-ニトロシル化に起因する RAR の発現機構の存在が予想された。その結果、ピオチンスイッチアッセイにより IPRG001 は HDAC2 を S-ニトロシル化することが分かった。また、RGCs においてヒストン H3 のアセチル化が起こっていることを免疫染色で確認した。その形態は IPRG001 未処理群と比べ、明

らかに RGCs の細胞核が大きくなっていることが分かった。これは IPRG001 処理により HDAC2 が S-ニトロシル化されて不活性化されることでヒストンのアセチル化が優勢となり、アセチル化されたヒストンがユークロマチン状態であることを示し、遺伝子転写がオンになっていることが示唆された。その標的再生関連分子のひとつが RAR であり、成熟期における RAR の再発現が神経軸索伸長を促して神経再生を起こす可能性を示した。実際に損傷後のラット視神経を IPRG001 が著しく再生させ、それは RAR のノックダウンによって抑制されるデータが得られた。これは、新生期の細胞内環境を成熟期の神経再生へ応用した成功例となった。実際にヒストン脱アセチル化阻害剤であるバルプロ酸やトリコスタチン A によってもヒストンのアセチル化が促された。これらの結果から、エピジェネティクス制御によって再生が容易な新生期の転写制御状態に近づけることで成熟哺乳類中枢神経も再生を促すことができたとともにその標的分子のひとつが RAR であることが分かった。

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 5 件)

(1) Koriyama Y, Ogai K, Sugitani K, Hisano S, Kato S. Geranylgeranylacetone Suppresses N-Methyl-N-nitrosourea-Induced Photoreceptor Cell Loss in Mice. Adv Exp Med Biol. 2016, 854:237-243.

(2) 郡山 恵樹 中枢神経再生過程におけるレチノイン酸受容体の必要性、ビタミン、査読有、90 巻、2016、126-127

(3) 郡山 恵樹、杉谷 加代、大貝 和裕、加藤 聖 中枢神経再生過程におけるレチノイドシグナルの重要性、ビタミン、査読有、89 巻、2015、348-349

(4) Koriyama Y, Kamiya M, Arai K, Sugitani K, Ogai K, Kato S. Nipradilol promotes axon regeneration through S-nitrosylation of PTEN in retinal ganglion cells. Adv Exp Med Biol. 2014, 801:751-757.

(5) Koriyama Y, Sugitani K, Ogai K, Kato S. Neuritogenic activity of trichostatin A in adult rat retinal ganglion cells through acetylation of histone H3 lysine 9 and RAR induction. J Pharmacol Sci. 2014, 124(1):112-116.

〔学会発表〕(計 5 件)

(1) 郡山 恵樹 S-ニトロシル化のエピジェネティック制御による中枢神経再生機構、日本酸化ストレス学会 東海支部第 4 回学術集会、平成 28 年 2 月 三重県

(2) 郡山 恵樹 機能再建を目指した中枢神経再生戦略 第 135 回日本薬学会、平成 27 年 3 月 兵庫県

(3) Koriyama Y, Sugitani K, Ogai K, Kato S. HSP70 delays photoreceptor cell death by MNU in mice. XVth International symposium on retinal degeneration 平成 26 年 7 月 米国 (Asilomar)

(4) 郡山 恵樹 成熟ほ乳類における RARbeta 再発現機構による視神経再生 第 24 回 日本レチノイド研究会 平成 25 年 8 月 東京

(5) 郡山 恵樹 損傷後視神経の視覚中枢回

路再建と視機能回復 第 56 回日本神経化学会 平成 25 年 6 月 京都

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

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