

令和元年5月30日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16956

研究課題名(和文) マウス緑内障モデル動物の網膜神経節細胞死における転写因子Sp1の関与

研究課題名(英文) Role of transcription factor Sp1 in retinal ganglion cell death in mouse glaucoma model animals

研究代表者

津田 聡 (Tsuda, Satoru)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：60791093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Sp-1の下流にあるEcel1に着目し、視神経挫滅後のマウス網膜におけるEcel1発現を評価したところ、網膜神経節細胞において特異的にEcel1発現が誘導された。さらに、Ecel1遺伝子をアデノ随伴ウイルス-CRISPR/Cas9システムを用いてノックダウンし、網膜神経節細胞の生存を逆行性標識、qRT-PCR、および視覚誘発電位で評価したところ、Ecel1のノックダウンは視神経挫滅後の網膜神経節細胞の喪失を促進した。本成果は、Ecel1が網膜神経節細胞障害の軽減の新規治療標的のとなる可能性を示している。そして、Sp-1の細胞保護メカニズムの一部にはEcel1が関与していると推測される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において明らかにされた、転写因子であるSp-1の下流にあるEcel1による視神経挫滅後の網膜神経節細胞障害の軽減効果は、視神経が障害され、重篤な視機能障害を来す緑内障や外傷性視神経症に対して、Sp-1及びEcel1が新規治療標的となりえることを示している。緑内障は、本邦の失明原因の第1位の疾患であり、既存治療である眼圧下降治療が十分に奏功せず失明に至る症例が存在する。また外傷性視神経症は有効な治療法が存在しない。そのため本研究成果は、緑内障や外傷性視神経症による重篤な視機能障害や失明の防止に繋がる可能性のある有意義な研究成果と考えられる。

研究成果の概要(英文)：When Ecel1 expression was evaluated in the mouse retina after optic nerve crush, focusing on Ecel1 downstream of Sp-1, Ecel1 expression was specifically induced in retinal ganglion cells. In addition, knocking down the Ecel1 gene using the Adeno-Associated Virus-CRISPR / Cas9 system and evaluating retinal ganglion cell survival with retrograde labeling, qRT-PCR, and visual evoked potentials, knockdown of Ecel1 promoted the loss of retinal ganglion cells after optic nerve crush. This results indicate that Ecel1 may be a novel therapeutic target for alleviation of retinal ganglion cell injury. And it is speculated that Ecel1 is involved in a part of cytoprotective mechanism of Sp-1.

研究分野：緑内障

キーワード：網膜神経保護 緑内障 外傷性視神経症 Sp-1 Ecel1 視神経挫滅

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦は、未曾有の超高齢社会を迎え、2050年には高齢者人口は約40%に達することが予想される。緑内障は視野狭窄を来す疾患であり、本邦の中途失明原因第一位の疾患である。その有病率は40歳以上では約5%、70歳以上では10%を上回り、高齢化が進む本邦では高齢者が自立した生活を維持する上で、緑内障は重要な疾患である。緑内障は網膜神経節細胞(RGC)の細胞死が生じ、不可逆的視機能障害を来す。眼圧下降治療が唯一確立された治療であるが、眼圧が十分に低下した場合でも視機能障害が進行する症例が存在し、眼圧下降以外の治療法が望まれる。特に、正常眼圧緑内障が全緑内障患者の70%以上を占める本邦では、その期待は大きい。現在、眼圧下降以外の方法でRGCの細胞死を抑制する神経保護治療の開発が行われているが、現時点でエビデンスが確立された神経保護治療は存在しない。そこで申請者らは、未だ十分に解明されていないRGC障害の機序を明らかにし、その機序に基づいた効率的な治療開発を目的として、次世代シーケンサーによる転写開始点領域の検出に特化した本邦発の網羅的遺伝子発現解析手法であるCAGE (cap analysis of gene expression) 法を用いて、RGC障害(視神経挫滅)モデル動物の網膜における網羅的遺伝子発現変動解析を行った。その結果、図1のようにRGC障害後の遺伝子発現変動を調節する転写因子の候補の1つとしてSp1を見出した。

Sp1は亜鉛フィンガー構造を有し、プロモーター領域に共通して存在することの多いGCボックス配列に結合することで、様々な遺伝子の発現を調節することが知られている。また、アポトーシスの制御、酸化ストレス障害及び小胞体ストレス等に起因する神経細胞死の抑制に関与することが報告されている。一方、申請者らはこれまでの研究から、視神経挫滅によるRGCのアポトーシスに酸化ストレス、小胞体ストレス等が関与していることを報告している。以上より、緑内障モデルマウスにおいて活性化するSp1はRGCの細胞死抑制に関与することを想定している。

Table 4 List of predicted motif sequences associated with axonal injury

Motif no.	Consensus	Foreground	Background	P-value	Known motifs (P-value)
Up-regulated at top peaks					
AMD_001	YNNRAGGTGT	21	101	2.50E-06	NA
AMD_002	CCTNDGNNNGAG	24	167	7.79E-05	NA
AMD_003	WGAGNNTACCNS	20	91	2.65E-06	NA
AMD_005	GNNNGTGNTGATGNC	19	92	1.30E-05	NA
AMD_006	YDNWNATTCHTAGGYNA	16	102	1.61E-03	NA
AMD_007	CNNNMAGARRNNTTGNMNV	22	115	3.75E-06	NA
AMD_009	ACGNATAYWNNNA	16	92	5.85E-04	NA
GLAM2_001	SCBCCCBCCCYCCCCNCCCB	34	330	2.24E-05	SP1 (5.25E-08), Pax4 (6.97E-07), RREB1 (5.84E-06)



次世代シーケンサー

図1 CAGE法による網羅的遺伝子発現解析結果

2. 研究の目的

Endothelin-converting enzyme-like 1 (Ecel1) 遺伝子発現は、Sp1の活性化を介して、ATF3、c-Jun、STAT3などの軸索再生関連転写因子によって相乗的に調節されていることが知られており、Ecel1が軸索再生に関連していることを示唆している。また、成熟Ecel1欠損マウスの最近の研究では、Ecel1が視神経損傷後の軸索再生促進に重要な役割を果たしていることを示している。そこで、視神経損傷後のEcel1の発現パターンに焦点を当て、緑内障や外傷性視神経症のマウスモデルにおいて誘導される網膜神経節細胞死に対するEcel-1の保護効果について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

8~12週齢のオスのC57BL/6Jマウスを用いた。外科的処置は、ケタミンとキシラジンの混合物の腹腔内投与による深部麻酔下で行った。視神経挫滅後のマウス網膜におけるEcel1発現をqRT-PCR、ウエスタンブロッティング、および免疫組織化学により評価した。視神経へのピンプラスチン投与およびN-Methyl-D-Aspartate (NMDA)の硝子体内注射を用いてEcel1遺伝子発現を評価した。Ecel1はアデノ随伴ウイルス-CRISPR/Cas9システムを用いてノックダウンし、網膜神経節細胞の生存を逆行性標識、qRT-PCR、および視覚誘発電位で評価した。

4. 研究成果

視神経挫滅後の網膜神経節細胞の障害の経過を明らかにするために、視神経挫滅後の網膜の網膜神経節細胞マーカー(Brn3a、Brn3b、Brn3c、Thy-1.2、Nefh、およびRbpms)の遺伝子発現レベルを測定した。これらのマーカーはすべて、視神経挫滅後に経時的に減少した。NefhおよびRbpmsの転写レベルは、視神経挫滅の2日後に有意に減少し、Brn3a、Brn3b、Brn3c、およびThy-1.2の遺伝子発現は、視神経挫滅の4日後に有意に減少し(図2)、視神経挫滅4日目に網膜神経節細胞が減少したことが示唆された。

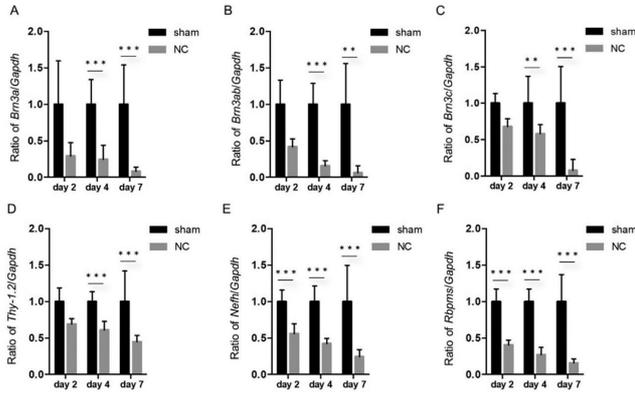


図2 視神経挫滅後の網膜神経節細胞マーカーの発現変化

またマウス網膜における *Ece1* の発現パターン (図3) を調べるために、視神経挫滅後2~7日目にqRT-PCRおよびウエスタンブロッティングを行った。視神経挫滅の2日後、*Ece1* の mRNA レベルは、有意に上昇し、視神経挫滅の4日後および7日後に、*Ece1* の mRNA レベルはさらに増加した。*Ece1* のタンパク質レベルは、転写レベルと同様に、視神経挫滅の4日後および7日後に増加した。さらに免疫組織化学染色の結果、*Ece1* は、視神経挫滅の4日後にRGCが位置するGCLにおいて明確に検出された、他の細胞層では検出されなかった。視神経挫滅の4日後のGCL中の*Ece1*陽性細胞は、有意に増加した。*Ece1*陽性細胞はRBPMS (RGCマーカー)と共局在化しており、*Ece1*が網膜神経節細胞で発現していることが明らかになった。

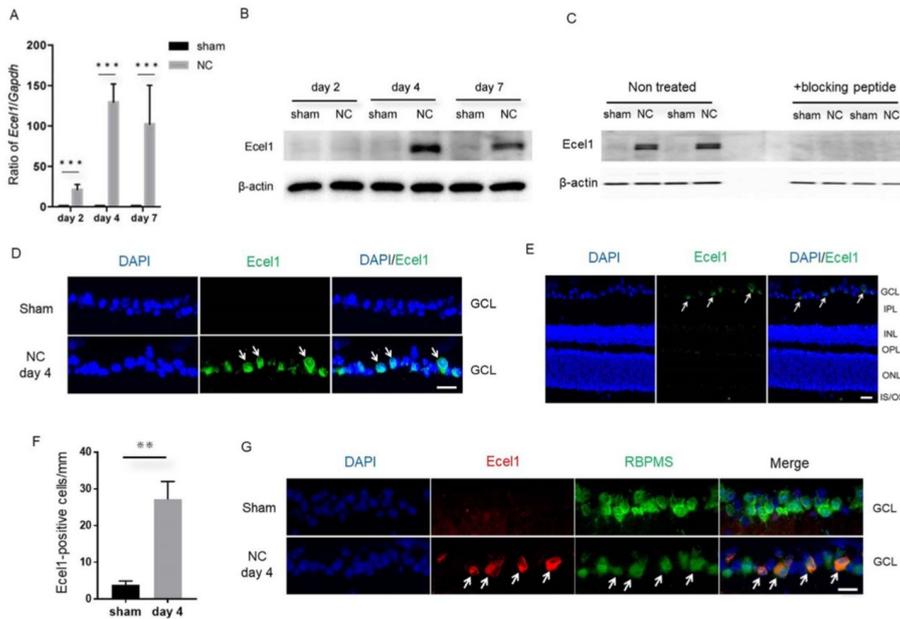


図3 視神経挫滅後の *Ece1* 発現

マウスにおける *Ece1* 誘導のメカニズムを明らかにするために、軸索輸送を阻害するためのビンブラスチン投与または興奮毒性を誘導するためのNMDA投与を受けた網膜においてqRT-PCRを行った。ビンブラスチン及びNMDAのいずれの投与によっても、網膜神経節細胞マーカーであるThy-1.2及びRbpmsは減少したが、ビンブラスチン投与のみが *Ece1* の mRNA 発現上昇を誘導し、NMDAは *Ece1* 発現を誘導しなかった (図4)。

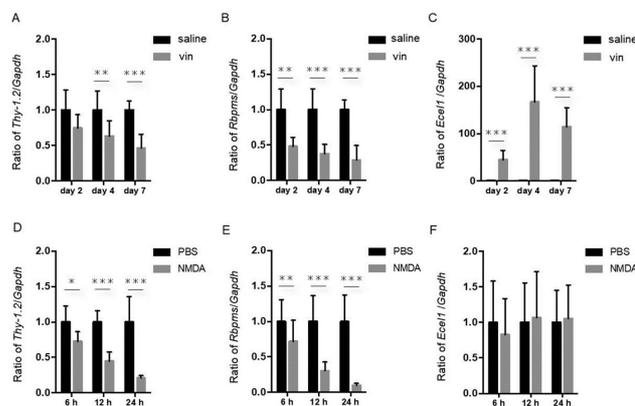


図4 ビンブラスチン投与及びNMDA投与後の網膜神経節細胞マーカーと *Ece1* の発現

RGC 保護における Ece1 誘導の役割を明らかにするために、ゲノム編集を行い、Ece1 ノックダウンを誘導するために AAV2-CRISPR / Cas9 システムを用いた。視神経挫滅 4 日後、Ece1 タンパク質レベルおよび Ece1 陽性細胞の数が、AAV2-CRISPR/Cas9-Ece1 の投与を受けた網膜において有意に減少することを見出した。次に、Ece1 が視神経損傷後の網膜神経節細胞の生存を促進するか明らかにするために、Ece1 のノックダウンを受けたまたは受けなかったマウスにおける生存網膜神経節細胞数を比較した。その結果、生存網膜神経節細胞を示す FG 陽性細胞が、視神経挫滅後では、AAV2-CRISPR / Cas9-Ece1 を投与された網膜において有意に減少することを見出した。網膜神経節細胞マーカー及び視覚誘発電位による評価においても、AAV2-CRISPR / Cas9-Ece1 を投与された網膜において網膜神経節細胞の有意な障害を示す結果であった (図 5)。

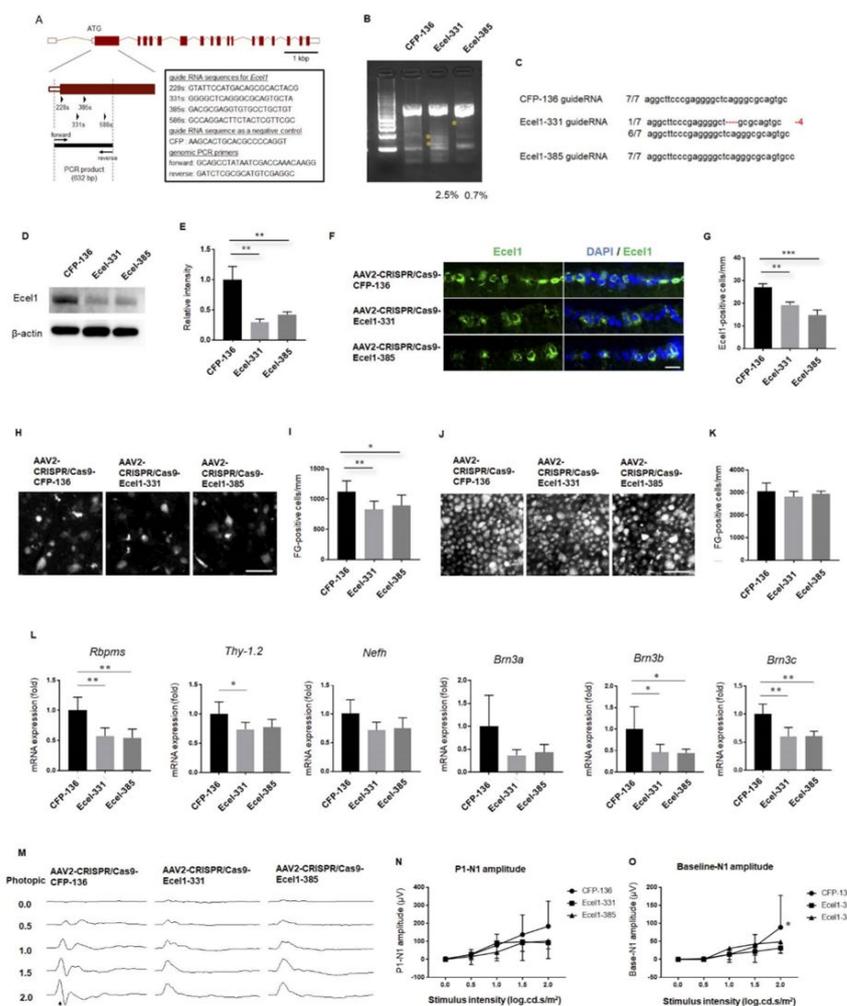


図 5 CRISPR / Cas9 システムによる Ece1 ノックダウンによる視神経挫滅後の網膜神経節細胞障害の変化

本研究成果は、網膜神経節細胞における Ece1 の発現誘導がマウスの視神経の軸索損傷に対する網膜神経保護反応の一部であることを示唆している。これらの知見は、Ece1 が外傷性視神経症や緑内障において生じるような、網膜神経節細胞障害の軽減のための新規治療標的となる可能性を示している。そして Sp-1 自体も細胞保護効果が報告されているため、Sp-1 の細胞保護メカニズムの一部には Ece1 が関与していることが推測される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Sato K, Shiga Y, Nakagawa Y, Fujita K, Nishiguchi KM, Tawarayama H, Murayama N, Maekawa S, Yabana T, Omodaka K, Katayama S, Feng Q, Tsuda S, Nakazawa T. Ece1 Knockdown With an AAV2-Mediated CRISPR/Cas9 System Promotes Optic Nerve Damage-Induced RGC Death in the Mouse Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2018;59:3943-3951.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。