

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16949

研究課題名(和文) 網膜変性時におけるヒストンメチル化修飾の役割

研究課題名(英文) The roles of histone modifications in retinal degeneration

研究代表者

岩川 外史郎 (Iwagawa, Toshiro)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号：30638648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：網膜の変性は遺伝子変異によらない、いわゆるエピジェネティックな遺伝子発現制御機構の破綻によっても引き起こされると考えられているがその寄与はよく分かっていない。本研究ではヒストン修飾の一つであるH3K27me3のメチル化を促すEzh2の網膜特異的ノックアウトマウス(Ezh2-cKO)を解析した。メチルニトロソ尿素によって視細胞の変性を引き起こしたところEzh2-cKOではコントロールと比較して変性の進行が抑制されている傾向があり特にオスマウスで顕著であった。細胞死の一つであるネクロトーシス関連遺伝子の発現がEzh2-cKOで低かったことから、H3K27me3とネクロトーシスの関連が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒストン修飾を含むエピジェネティックな発現制御機構と様々な疾患との関連は明らかにされつつあるが、網膜変性に対する寄与はよく分かっておらず、役割が比較的よく分かっているH3K27me3の網膜変性における知見も非常に少ない。本研究によりH3K27me3が視細胞の変性の進行に寄与していることが示唆され、さらに変性を促進する薬剤であるMNUに対する反応性の性別差から、細胞死の中でもネクロトーシスに關与する可能性が考えられる。今後視細胞変性に対して促進性あるいは抑制性に働く因子との関係からそのメカニズムが明らかとなり、変性を抑える手立ての一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Retinal dystrophy is thought to be caused not only by a gene mutation but by a dysregulated gene expression through an epigenetic mechanism, including a histone modification. To clarify the contribution of H3K27me3, a repressive histone modification, to retinal dystrophy, MNU, which causes photoreceptor degeneration, was administered to a control and a conditional knockout of Ezh2 (Ezh2-cKO), a methyltransferase for H3K27me3, mouse and retinas were analyzed by immunohistochemistry and RT-qPCR. Compared with the control, the Ezh2-cKO retina showed milder photoreceptor degeneration, especially in male mice, and the expression of a gene related to necroptosis, a programmed form of necrosis, was lower in the Ezh2-cKO retina. The results suggest the contribution of H3K27me3 to necroptosis of photoreceptor cells during retinal degeneration.

研究分野：眼科学

キーワード：ヒストン修飾 網膜変性 Ezh2 H3K27me3

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

網膜は外界からの光を視覚中枢へと伝達する役割を担った組織であり、網膜を構成する細胞の変性は視覚能力の低下を引き起こす。遺伝性の網膜変性症の原因遺伝子は複数知られているものの発症メカニズムがよく分かっていないものは多く、また DNA の配列変化によらない遺伝子発現制御機構、いわゆるエピジェネティックな発現制御機構の破綻が発症や信仰に關与すると考えられているが、網膜変性に対する寄与に關しては不明な点が多い。エピジェネティックな発現制御機構のひとつとしてヒストン修飾が知られており、これまでに様々な部位における多様な修飾が遺伝子発現制御へ寄与することが明らかにされつつある。例えば、ヒストン H3 の 27 番目のリジン (H3K27) に対するトリメチル化 (H3K27me3) は主に遺伝子発現の抑制に寄与することが知られている。研究代表者はこれまで H3K27me3 の網膜発生における役割の解析を進め、メチル基転移酵素である Ezh2 や脱メチル化酵素である Jmjd3 の網膜発生に対する寄与を見出してきた。しかしながら、成体網膜における H3K27me3 の役割に關してはよく分かっていない。特に、Ezh2 や Jmjd3 は発生期と比較すると成体では発現レベルが低いため注目されてこなかったと考えられる。研究代表者は予備的な実験で成体網膜の視細胞変性時に Ezh2 の発現が上昇することや細胞全体の H3K27me3 レベルが変動していることを見出した。そこで Ezh2 の視細胞変性時における役割の解明を目指すことにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は網膜視細胞変性時における H3K27me3 のメチル化酵素である Ezh2 の役割を解明し H3K27me3 の網膜変性に対する寄与を明らかにすることである。

3. 研究の方法

網膜発生初期から Ezh2 の機能を阻害すると網膜前駆細胞の増殖の低下や早期分化を促し、小眼球症を呈するため、成体網膜で特異的に Ezh2 の機能を阻害する必要があった。そこで、Msi1-CreER(T2)と Ezh2 flox マウスをかけ合わせ Msi1-CreER (T2); Ezh2 flox マウスを作製し、6 週齢のマウスにタモキシフェンを経口投与することで Msi1 を発現している視細胞や Müller 細胞で Cre による組み換えを引き起こし Ezh2 コンディショナルノックアウト (Ezh2-cK0) マウスを作製した。対照となるコントロールとして Msi1-CreER(T2)を有さない Ezh2 flox マウスを用いた。さらに 1 週間後、視細胞変性を引き起こす薬剤である N-メチル-Nニトロソ尿素 (MNU, 30mg/kg) を腹腔内投与し、さらに 5 日後あるいは 7 日後に免疫染色法あるいは RT-qPCR 法による解析を行った。

4. 研究成果

MNU による変性に対する性差

本来の目的には含まれていなかったが、コントロールにおいて、MNU 投与後 5 日では明確ではなかったものの、7 日では明らかにメスと比較するとオスでは MNU による視細胞の変性がより進行していることが認められ、MNU に対する反応性に性差があることが示された。過去の知見で、MNU と同様に視細胞の変性を引き起こすアルキル化剤であるメタンスルホン酸メチル (MMS) も、オスの方がより激しい変性を示すことが認められている。この報告では、MMS によって、ネクロトーシスによる細胞死がオスでより多く引き起こされることで性差が生じている。MNU でも、ネクロトーシス関連遺伝子である Ripk3 の発現がメスと比較するとオスで高い傾向があることが RT-qPCR で見られたため、MMS と同様のメカニズムによって性差が生じる可能性が考えられる。

Ezh2-cK0 における視細胞変性の抑制

コントロールと Ezh2-cK0 間で MNU による視細胞の変性に違いが認められるか、性別に比較検討した。視細胞の変性状態の指標として、視細胞で構成される外顆粒層 (ONL) の厚みを測定した。個体間で視細胞の変性状況にばらつきがあるものの、オスでは Ezh2-cK0 はコントロールより ONL の厚みが 2 倍程度あり、Ezh2-cK0 で視細胞変性が抑制されていることが示された。一方、メスでは Ezh2-cK0 でコントロールより ONL が厚い傾向は見られたものの顕著な差ではなく統計的な有意差は認められなかった。オスの Ezh2-cK0 とメスのコントロールの ONL の厚みは同程度であり、ネクロトーシス関連遺伝子である Ripk3 の発現はオスの Ezh2-cK0 でコントロールより低かったことから、コントロールのオスで多くおきていると考えられるネクロトーシスによる細胞死がオスの Ezh2-cK0 では抑制されていることで視細胞変性の抑制が生じている可能性が示唆された。また、視細胞変性時に活性化されるマイクログリアから放出される炎症性のサイトカインである Ccl2 や Cxcl10 の発現が、特にオスの Ezh2-cK0 で低く、マイクログリアの活性化が抑制されている可能性が示唆された。一方、メスではこれらの遺伝子の発現はコントロール、Ezh2-cK0 でオスのコントロールより低く、視細胞変性の進行との相関が見られた。

視細胞変性に対する Cd9 の関与

当初の研究計画には含まれていなかったが、テトラスパニンファミリーの一つである Cd9 の視細胞変性に対する寄与を調べ、視細胞変性時に Cd9 は視細胞で発現が著しく上昇し、Edn2 に発

現誘導に寄与することで視細胞の変性に対して保護的に働く可能性が示唆された。網膜発生期に Ezh2 をロックアウトしたマウス網膜では、Cd9 の発現上昇が認められたため、前述した Ezh2-ck0 における視細胞変性の抑制は Cd9 の発現上昇によってもたらされた可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Toshiro Iwagawa, Yuko Aihara, Daisy Umutoni, Yukihiro Baba, Akira Murakami, Kenji Miyado, Sumiko Watanabe	4. 巻 61
2. 論文標題 Cd9 Protects Photoreceptors From Injury and Potentiates Edn2 Expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Invest Ophthalmol Vis Sci.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1167/iovs.61.3.7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----