

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21642

研究課題名（和文）視細胞の再生に挑戦する

研究課題名（英文）Intervention of retinal diseases using energy metabolism reprogramming

研究代表者

阿部 俊明（ABE, Toshiaki）

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90191858

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：代謝を調節して細胞再生に臨むために代謝に関わる核蛋白HMG1の解析を行った。HMG1欠損細胞作製とKOマウスのその他の遺伝子改変マウスとの交配の解析を進めた。代謝に関わる新しいHMG1の機能がわかり、局在だけでなく発現量でその細胞の代謝が変化し、加齢による発現変化も判明した。これらは細胞代謝の変化だけでなく網膜機能にも関わる大事な変化であることも判明した。期間内に本来の目的は達成できなかったが、非常に重要な網膜機能と代謝の関係が分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

失明疾患は網膜疾患が多いが、なかでも視細胞障害は治療が難しい。今回は視細胞の再生をめざすために、代謝に関わる分子の発現を調節することを試みた。核蛋白HMG1に注目したが、この検討過程で網膜代謝に関わる非常に重要な結果を得ることができた。期間内に目的は達成できなかったが、これまでの結果は、今回の目的を達成するのに重要な結果を示してくれたと考えられるので、今後のさらなる研究を推し進めたい。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the nucleoprotein HMG1 involved in metabolism in order to engage in regeneration using cell function regulation. We proceeded with the analysis by producing HMG1-deficient cells and mating KO mice with other genetically modified mice. A new function of HMG1 involved in metabolism was clarified, and the metabolism of the cells changed not only by localization but also by the expression level, and the expression change due to aging was also considered. It was also found that these are important changes related to retinal function as well as changes in cell metabolism. Although the original purpose could not be achieved within the period, a very important relationship between retinal function and metabolism was found.

研究分野：眼科

キーワード：HMG1 網膜色素上皮

1. 研究開始当初の背景

日本の失明原因の上位は糖尿病網膜症や加齢黄斑変性など網膜疾患であるが病態背景は複雑である。加齢、活性酸素、遺伝子など多因子が長期間に関与して発症するため治療法開発を難しくする。高齢になると増加傾向にある網膜疾患は難治性で、特に視細胞が最終的に障害されることが治療法開発を困難にさせる。高齢になり問題になる網膜機能では、最近特に代謝が注目されている。網膜内にはさまざまな細胞が含まれるが、それぞれの細胞は同じ代謝を行うわけではないので網膜内の細胞はすべて均一に障害を受けるわけではない。これらの機序が明らかになれば難治性網膜疾患の治療法は新しい展開が開ける可能性がある。

2. 研究の目的

グルコース代謝にかかわる核蛋白 high-mobility group protein N1 (HMGN1) が、本来持つ解糖系と関連する核酸合成や脂肪代謝から生合成能を発揮し複製に利用できるようにするため、HMGN1 の局在を変更し、必要時に代謝適応を変化させ、細胞増殖機能を発揮させたり、環境に必要な代謝を誘導したりして、視細胞の再生させる引き金になる可能性を探る。

3. 研究の方法

細胞解析 (令和 2-3 年、阿部・大学・永井 (研究協力者)・大学院生)

(1) HMGN1 局在と制御因子の同定

HMGN1 の局在について明暗や日内変動についても再確認する。その後、すでいくつか知られている核内輸送受容体インポーチン beta ファミリー等の既知の遺伝子発現の検討を行う。また、HMGN1 は核局在化シグナル NLS を持つので、視細胞で特殊に HMGN1 の NLS に変化がある可能性は低いと考えられるが、視細胞の RT-PCR から塩基配列を確認する。これは Laser capture microdissection で視細胞層を採取するか細胞株を利用して獲得した RNA を利用する。核に移行しない新しい機序が疑われた場合は細胞質にとどまる要因 (分子) をまず視細胞株の培養解析で決定する。このための蛋白質相互作用の研究法は膨大であるが、最も単純な免沈やプルダウンアッセイなどから開始し、時に組み合わせも利用する。上記した RNA も micro RNA assay から RPE との比較スクリーニングで、新しい候補分子のスクリーニングに利用する。細胞株がうまく利用できないときは、視細胞が網膜内に大量に存在することを利用して大型動物から網膜を採取して解析に利用する。神経網膜は視細胞が圧倒的に多く、しかも他の神経細胞は一部の細胞に見られるのみなので十分挑戦可能であると考ええる。増殖に変化する前後の細胞内中間代謝産物の変化を確認する。RPE はさまざまな病的シグナルに反応して増殖するが、この時の増殖に核酸や脂質合成など解糖系関連代謝が機能すると考えられるので、培養増殖中の RPE と我々が過去に報告した色素を持ちほぼ六角形細胞で占められる分化培養した RPE で解糖系の中間代謝産物を比較・検討する (図 2)。これにはメタボローム解析を行うが、100 種類以上あるエネルギー中間代謝産物はこれまでの成果から特にグルコース 6 リン酸、乳酸、グルタミン、アルファケトグルタル酸 (αKG)、ATP である程度判断できると考える。これらは下記する HMGN1 を核に移行させた視細胞の変化と比較する。また、CRISPR-Cas 9 システムで作製済の HMGN1 欠損 ARPE (HMGN1KO) も利用して分化培養を試み、HMGN1 がいない RPE の解糖系中間代謝産物の変化を検討して比較に利用する。

(2) 培養細胞と動物モデルで解析 (令和 3 年、阿部・大学・鈴木・大学院生)

上記の核移行抑制因子が判明した場合は、まずその因子抑制を視細胞株で検討する。視細胞株が適切でない場合は、動物から摘出した網膜細胞の一時培養で視細胞の HMGN1 移行と増殖の可能性を探る。これは (a) CRISPR-Cas9 で作製する目的因子の削除、(b) siRNA のリポフェクションやウイルスベクターを利用した一過性の抑制、(c) Tet-on ベクターを利用した必要時のみの抑制で検討する (使用経験あり、IOVS, 2008; 49: 3631)。解析は核への移行の割合を免染と、細胞内各分画を利用してウェスタンブロットで評価し、グルコース代謝、特に中間代謝産物の変化、種々の負荷を含めて MTS 活性測定で細胞増加の割合を確認する。

(a) マウスでは網膜上、硝子体への siRNA 投与を試み、(b) 核移行抑制因子を抑制するトランスジェニックマウス (Tg) を作製して検討する。これらのモデルを免疫染色や RNA 解析して HMGN1 の核移行が確認されたら、組織解析と ERG による網膜機能検討を行う。視細胞の機能が確認できたら rd と rds の変性速度の違う網膜変性マウスモデルとの組み合わせ、さらに薬剤による視細胞変性やレーザーで視細胞を破壊するモデルとともに視細胞増殖の可能性と網膜機能を検討する。標的因子は現時点ではまだ想定しにくい、状況により我々の薬剤徐放デバイスから標的因子を制御する分子徐放も念頭に置く。これらの遺伝子改変細胞やマウスの一部は作製済で薬剤徐放システムは我々独自のものでありすぐに検討できる。

4. 研究成果

細胞に発現が確認されたが、すべて均一に同様な発現レベルで確認されるわけではなかった (図 1)。網膜色素上皮は核内に存在が確認されたが、通常飼育では視細胞杆体細胞は HMGN1 が核エンベロップの LaminB1 とほぼ同じ位置に存在した。杆体細胞のクロマチンインバージョンを考えると HMGN1 の核蛋白質との接触は他の細胞と HMGN1 の役割が異なる可能性が考えられた。In situ hybridization でも HMGN1 遺伝子発現は細胞により異なることが判明した。インポーチンの発現 (importin α1, α3, α6) は遺伝子型で網膜内に有意な発現差は見られなかった (図 2)。しかし、HMGN1 は代謝に関わる機能を考慮すると杆体細胞はエネルギー代謝

図 1: 網膜内 HMGN1 発現

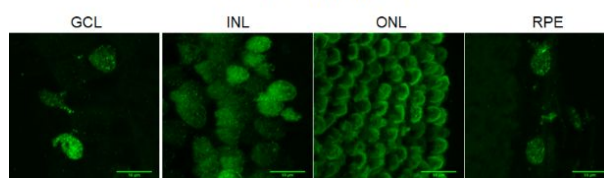


図2：インポーチン発現

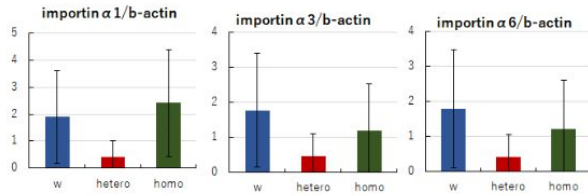
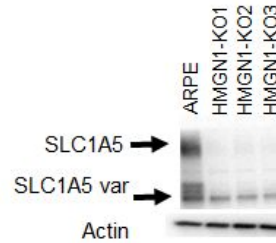


図3：グルタミントランスポーター



が他の網膜内細胞と異なる可能性が考えられた。そしてこれが視細胞のエネルギー代謝を特殊なものにして、再生できないことなどに影響すると推測した。そこで、視細胞のHMGN1局在や発現を変更させ、必要時にHMGN1本来の機能を復活させ視細胞増殖、すなわち再生の引き金になる可能性を探ることを計画した。初年度の検討ではまずHMGN1がエネルギー代謝に重要な役割を担うことを明らかにした。主としてCRISPR-Cas9法でHMGN1を欠損させた細胞で解析したが、この細胞はまずグルタミントランスポーターの発現を変化させ、癌細胞などで報告されている増殖に関わるトランスポーターの発現を抑制することが判明した(図3)。しかし、グルタミンの利用がなくなるわけではなく、細胞増殖などの代謝に関わる割合が減り、神経細胞の伝達物質や細胞内pHの制御に働くトランスポーターとの共役が強くなる可能性が考えられた。このためにエネルギー代謝に重要なTCA回路は脂質代謝のベータ酸化を利用する可能性が推測された。そして、Hmgn1欠損マウスの眼の解析では形態的な変化はほとんど見られないが、網膜機能の低下が確認され、HMGN1は代謝を介して細胞機能に重要な役割を担うことが推測された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究分担者	大学 玲子 (Daigaku Reiko) (10770604)	東北大学・医学系研究科・学術研究員 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関