

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22300109

研究課題名(和文) ChIP-on-chip法による再生初期遺伝子群の同定とラット視神経再生への応用

研究課題名(英文) Identification of regeneration-associated genes in zebrafish by a ChIP-on-chip assay and its application to mammals.

研究代表者

加藤 聖 (Kato, Satoru)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：10019614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円、(間接経費) 4,140,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経の再生可能なサカナの視神経切断モデルを使用し、再生初期に発現が上昇する遺伝子を同定し、細胞生存や神経突起伸長作用を確認し、これらを神経再生初期分子とした。この候補物質としてHSP70、レチノール結合蛋白ブルプリンを同定した。これらに引き続いてレチノイン酸シグナル分子の発現が上昇した。これら再生分子を成熟ラット網膜に導入することにより、ラット視神経がin vivoで再生できた。

研究成果の概要(英文)：Regeneration-associated genes (RAGs) were cloned from axotomized zebrafish retina. HSP70 (a stress protein) and purpurin (a retinol-binding protein) were rapidly induced in the fish retina after optic nerve injury. HSP70 was involved in cell survival of injured retinal ganglion cells (RGCs), whereas purpurin was involved in neurite sprouting from injured RGCs. These RAGs could easily induce regrowth of axotomized optic nerve in adult rat.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：神経再生分子 HSP70 エピジェネティクス HDACインヒビター 神経生存 軸索伸長 CHIPアッセイ 転写因子

1. 研究開始当初の背景

(1) 魚の視神経は、ヒトを含む哺乳類と異なり、損傷しても再生することが知られている。そこで我々は形態学的、生化学的、行動学的手法を用いて、まず正確な魚の視神経再生過程のタイムスケジュールをゼブラフィッシュで決定した。その結果、i)準備期(～5日以内)、ii)軸索伸長期(1～4週)、iii)シナプス再編成期(1～3ヵ月)、iv)機能回復期(～4ヵ月)に分類された。

(2) 損傷後5日以内の準備期(再生初期)に発現が上昇する遺伝子をクローニングした。次に、この再生初期分子が、如何なる働きをしているかを詳細に調べた。更に、これら分子が次の軸索伸長に向けてのカスケードを活性化させる仕組みについて、2, 3の分子を例として、その分子機構の解明を試みた。

(3) これら魚の再生関連遺伝子が視神経再生の起こらないラットではどのような振る舞いをするのかを検討した。

2. 研究の目的

(1) 魚視神経再生初期(準備期)に発現が上昇する分子をクローニングし、その発現時期(ピーク)、発現局在を明らかにする。

(2) 網膜片培養等を用いて、再生分子の軸索伸長への関与や更にモルフォリンや siRNA 等による mRNA 発現の抑制効果より、その果たすべき役割を検討する。また、阻害剤の使用により、loss of function の実験を行う。さらに、過剰発現系の実験も行い、gain of function 実験を行う。

(3) クロマチン免疫沈降法等の実施により、核内移行メカニズムや転写活性化のメカニズムなどを精査する。

(4) ラットの視神経損傷モデルを使い、これら魚再生分子相当分子がどのような推移を示すか比較検討し、成熟ラット視神経の再生に対して効果的か否かを調べる。

3. 研究の方法

(1) 再生分子の機能的役割の解明

上記の HSP70, IGF-1, LIF, プルプリン, ファクター XIII A 等の mRNA 量は RT-PCR 法で、局在は in situ ハイブリッド法で検索した。Loss of function の実験には、RNA に関してはモルフォリン, siRNA を使用し、その他特異抗体や低分子阻害剤を使用した。Gain of function の実験には、リコンビナント蛋白の添加や遺伝子導入により実施する。

(2) 分子相互作用

上記のインヒビターや siRNA 等により、各分子間相互作用に対する影響を生化学的に

調べる。

(3) 視神経再生の機能的解析 行動学的実験

ゼブラフィッシュを水槽に入れ、OMR (optomotor response) を指標に簡単な視神経再生を確認する。複数匹の場合には追尾行動、群れ行動を指標に高次の視覚機能回復を評価する。

(4) CHIP アッセイ

ゲノム遺伝子の 5' 上流ヌクレオチドに結合している DNA 結合蛋白を、抗体を使い沈降し、視神経損傷或いはその継時変化を定量する。

(5) 成熟ラット視神経損傷モデルにおける上記魚再生分子相当分子の推移を比較する。

4. 研究成果

(1) 再生初期分子

魚の再生準備期において発現が上昇する分子として HSP70, IGF-1, LIF, レチノール結合蛋白プルプリン, ファクター XIII A 等が同定された。そのうちプルプリンを除いては、網膜神経節細胞で特異的に発現上昇した。他方プルプリンは興味あることに視細胞で発現上昇し、蛋白は網膜神経節細胞を含む網膜全層に分泌されていた。これら初期分子の機能としては大きく2つに分類された。

細胞生存に働く因子

HSP70 や IGF-1 はインヒビターの使用により生存因子 p - Akt や Bcl2 を抑えることが明らかとなり、PI3K/Akt を介し、細胞生存に関与することが証明された。(図1)

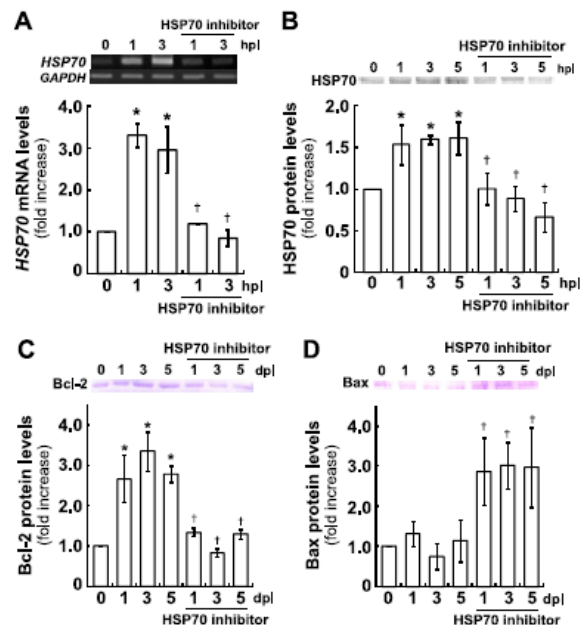


図1. サカナ網膜における視神経損傷後の HSP70 の誘導とインヒビターによる抑制と細胞死誘導

神経突起発芽因子

LIF, プルプリン, ファクター-XIII A は神経突起の発芽 neurite sprouting を促進することが網膜切片培養により明らかとなった。

(2) プルプリンの特異的作用

プルプリンの作用はレチノールの添加により増強され、かつレチノイン酸合成酵素阻害剤により、完全に抑えられた。そのことより、プルプリンはレチノール結合蛋白として働き、各網膜神経細胞へレチノイン酸を供給し、そのレセプターは核内に移行することが証明された。(図2)

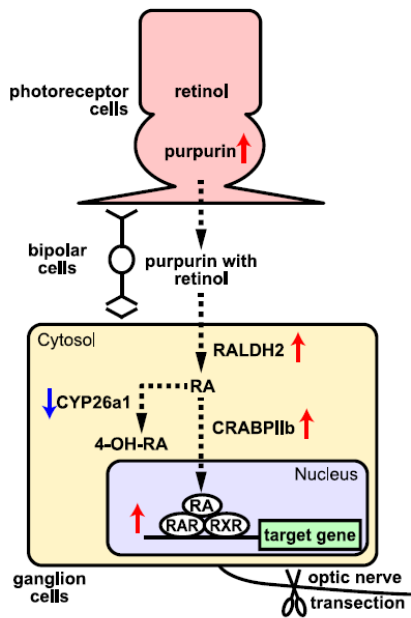


図2 . プルプリンによるレチノールの損傷神経節細胞への供給

(3) 転写因子の活性化機構

魚の網膜神経節細胞は視神経損傷後 3~7 日をピークに RNA 合成や蛋白合成が増加し、再生関連遺伝子の発現が増加することが知られている。そこで、この再生遺伝子活性化機構を探るため、ヒストンのアセチル化等エピジェネティックな変化をアセチル化ヒストン (AcH3, AcH4) 抗体を用い免疫染色を施したところ、損傷後 3 日目の網膜神経節細胞でヒストンのアセチル化が強く認められた。他方、再生できないラットでは損傷後 AcH₃, AcH₄ が急激に減少していた。今回の我々の実験から 2 つの転写活性化機構を見出した。

細胞生存のための Keap1/Nrf2 系の活性化

Keap1 のニトロシル化により、Nrf2 が核内移行することが、免疫染色及び Chip 法により確認できた。(図3)

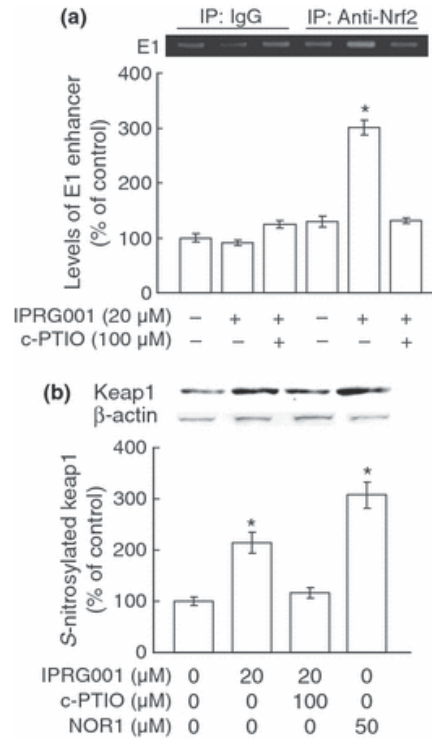


図3 .Keap1 のS-ニトロシル化による抗酸化蛋白の誘導

ヒストン脱アセチル化酵素の抑制

HDAC のニトロシル化により HDAC が抑制され、その結果、再生分子の一つレチノイン酸レセプター (RAR) の発現が活性化し、神経突起の伸長が促進された。(図4)

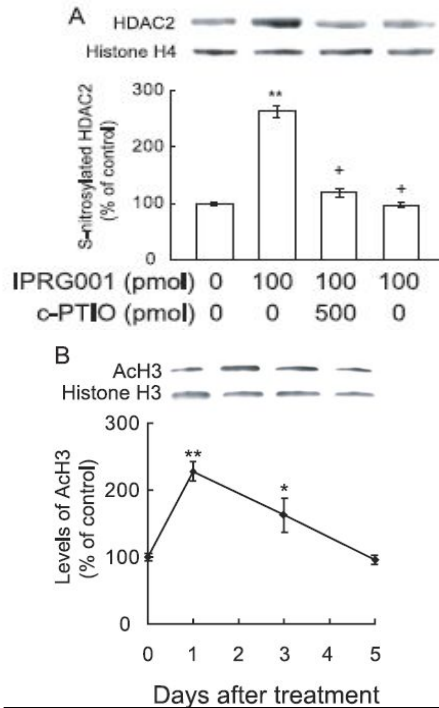


図4 .HDAC のS-ニトロシル化によるアセチル化ヒストンの誘導

(4) 行動学的研究

上記再生分子の抑制, モルフォリン, siRNA, 阻害剤等により、魚の視運動反射 (OMR) の遅滞が確認された。

(5) 成熟ラット視神経の再生

魚で得られた知識より、細胞死の抑制と神経突起伸長因子の組み合わせにより、ラット中枢までの長い視神経の再生が確認され、簡単な視機能も再生した。

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 10 件)

Kato S, Matsukawa T, Koriyama Y, Sugitani K, Ogai K. A molecular mechanism of optic nerve regeneration in fish: the retinoid signaling pathway. *Prog Retin Eye Res.* 37: 13-30, 2013, 査読有,
doi: 10.1016/j.preteyeres.2013.07.004

Koriyama Y, Takagi Y, Chiba K, Yamazaki M, Sugitani K, Arai K, Suzuki H, Kato S. Requirement of Retinoic Acid Receptor for Genipin Derivative-Induced Optic Nerve Regeneration in Adult Rat Retina. *PLoS One*, 8, e71252, 2013, 査読有,
doi: 10.1371/journal.pone.0071252

Koriyama Y, Takagi Y, Chiba K, Yamazaki M, Arai K, Matsukawa T, Suzuki H, Sugitani K, Kagechika H, Kato S. Neuritogenic activity of a genipin derivative in retinal ganglion cells is mediated by retinoic acid receptor beta expression through nitric oxide/S-nitrosylation signaling. *J. Neurochem.* 119, 1232-1242, 2011, 査読有,
doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07533.x

Nagashima M, Fujikawa C, Mawatari K, Mori Y, Kato S. HSP70, the earliest-induced gene in the zebrafish retina during optic nerve regeneration: Its role in cell survival. *Neurochem Int.* 58, 888-895, 2011, 査読有,
doi: 10.1016/j.neuint.2011.02.017

Koriyama Y, Chiba K, Yamazaki M, Suzuki H, Muramoto K, Kato S. Long-acting genipin derivative protects retinal ganglion cells from oxidative stress models in vitro and in vivo through the

Nrf2/antioxidant response element signaling pathway. *J. Neurochem.* 115, 79-91, 2010, 査読有,
doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06903.x.

[学会発表](計 14 件)

大貝和裕, 杉谷加代, 郡山恵樹, 加藤聖, ゼブラフィッシュ視神経再生における白血病阻止因子(LIF)の発現増加について, 第 91 回日本生理学会大会, 2014 年 3 月 16 日, 鹿児島大学 群元キャンパス

Sugitani K, A novel function of Factor XIII-A in nerve regeneration. GTH 2013 (German Trombosis And Hemostasis Society 57th Annual Meeting 2013), February 20-23, 2013, ICM (International Congress Center Munich)ドイツ ミュンヘン

Koriyama Y, Chiba K, Yamazaki M, Sugitani K, Kato S, S-nitrosylation of histone deacetylase 2 promotes optic nerve regeneration by retinoic acid receptor beta expression. RD2012, July 16-21, 2012, Monarch Hotel, Bad Gögging, Germany

Koriyama Y, Matsukawa T, Nagashima M, Kato S, 視神経損傷後の新規細胞外マトリックス分子プルプリンによるラット網膜神経節細胞の生存と軸索伸長, 第 54 回日本神経化学学会大会, 平成 23 年 9 月 28 日, 石川県加賀市山代温泉「瑠璃光」

[その他]

ホームページ等

<http://neuro.w3.kanazawa-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 聖 (KATO, Satoru)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号: 10019614

(2) 連携研究者

谷井 秀治 (TANII, Hideji)
金沢大学・医学系・准教授
研究者番号: 90110618