

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462739

研究課題名(和文)二次的網膜神経節細胞変性における新規分子基盤の確立

研究課題名(英文)Establish of new molecular mechanism in retinal ganglion cell degeneration.

研究代表者

宗正 泰成 (Munemasa, Yasunari)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：30440340

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではTLR4の網膜内新規リガンドを同定し、そのRGCの変性機序を解明した。TLR4の新規リガンドとしてHistoneH2B(H2B)が検出された。H2Bをwild miceの硝子体に投与するとRGCの変性が生じるが、TLR4 KO miceに投与してもRGC変性は生じない。Real time PCRにてH2B投与後の炎症性サイトカインの変化を検討した。wild miceでは有意に上昇するがTLR4 KO miceでは上昇しなかった。この結果はH2BがTLR4を介して炎症性サイトカインの上昇によりRGCの細胞死を惹起していることが証明された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to investigate the neurotoxicity of HistoneH2B(H2B) through TLR4 in the mice retina. IIVI of 300 μmol H2B on wild mice showed significant RGC loss compared with the control. IIVI of H2B on TLR4-/- mice did not show RGC loss compared to wild mice. Dramatic upregulation of inflammatory cytokines mRNA was observed in the retina after IIVI of H2B, suppression of these changes was observed in TLR4-/- mice (IL-1 ; wild 118.0 TLR4-/- 22.4 fold/control, TNF ; wild 37.7 TLR4-/- 3.4, TGF- ; wild 3.1 TLR4-/- 1.1). Furthermore, significant phosphorylation of JNK and P38 was observed in wild mice, in contrast, no obvious phosphorylation of these proteins was observed in TLR4-/- mice.

研究分野：眼科

キーワード：網膜 緑内障 視神経 細胞死

1. 研究開始当初の背景

緑内障は不可逆的な視神経症及び網膜神経節細胞死を来す神経変性疾患である。既に視野障害が強く進行した患者に対し点眼・手術による降圧を試みるも、視野障害は悪化の一方を辿ることが多く、真に病状進行抑制可能な治療は存在するとは言い難い。さらに末期緑内障では、軸索変性に伴う扇型の網膜神経節細胞死による視野変化のみでは説明できない視野を呈することもある。これらは軸索変性に引き続く網膜神経節細胞死のみならず、何らかの二次的な網膜神経節細胞障害が考えられる。末期緑内障では生存している網膜神経節細胞はごく僅かであり、これらの細胞を死滅に至らせない strategy は失明予防に繋がると考えられる。

最近の報告では開放隅角緑内障特に正常眼圧緑内障と Toll like receptor4(TLR4)の多型との関連性が指摘されており、TLR4による細胞内シグナルが緑内障性視神経症に関わっていることが示唆された(Takano et al., 2012, Am J Ophthalmol; Suh et al., 2011, Mol Vis)。TLR4は細胞膜上に存在する型膜蛋白で、様々なシグナルを Toll-Interleukin 1 receptor(TIR)細胞内ドメインを介して細胞内に伝達する。これまで報告されているTLR4のリガンドは lipopolysaccharide, heat shock proteins 70 (HSP70), fibrinogen, heparan sulfate fragments, や hyaluronic acid fragments が挙げられる。しかしながら直接的に軸索障害及び網膜神経節細胞死に繋がる分子は見つかっていない (Ahmad-Nejad et al., 2002, Eur J Immunol; Fang et al., 2011, J Biol Chem)。それ故に**臨床エビデンスを緑内障基礎研究にフィードバックし、TLR4に関わる分子機構を解明することは網膜神経節細胞死の核心的知見を得ることになり得る。**

2. 研究の目的

我々の網膜神経節細胞死に HistoneH2B が

TLR4を介して何らかの death signal を活性化させている可能性が考えられた。TLR4に結合している HistoneH2B が**真に TLR4 の ligand として機能していること**を in vitro 系の GST-pull down assay を施行し証明する。

視神経挫滅や高眼圧マウスにおいて HistoneH2B が実際に網膜細胞外や硝子体内で上昇しているか証明する。HistoneH2B が実際に TLR4 を介して網膜神経節細胞死を誘導するかを in vivo 及び in vitro で証明する。

3. 研究の方法

(1) TLR4 の発現細胞の同定

TLR4 正常機能を示す C3H/HeN マウスに視神経挫滅ストレスもしくは polystyrene beads 及び viscoelastic solution を混入した solution により高眼圧を加え、その後 TLR4 の網膜視神経内での発現を免疫組織染色で様々な細胞マーカーを用いて確認する。

(2) TLR4 の ligand 再現性確認

視神経挫滅もしくは高眼圧負荷後、TLR4 の発現が強く出る時間で網膜膜蛋白抽出後、TLR4 抗体を用い Immunoprecipitation を行う。電気泳動施行後 Silver stain 施行し、目的分子部位 (TLR4) の Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)により相互分子を確認する。先に述べたが、予備実験では HistoneH2B type1-B が検出された (Score229)。再現性を確認するため、同様の process を複数回施行する。

(3) HistoneH2B の発現 in vivo 及び in vitro

in vivo では視神経挫滅もしくは高眼圧負荷後の HistoneH2B の発現は硝子体内では微量と考えられるため ELISA を行う。また網膜内細胞を magnetic beads 法で単離除去し、神経細胞・グリア細胞を除去した細胞外基質のみの蛋白抽出液を作製し、HistoneH2B 抗体で Immunoblot を施行し control 群と比較する。in vitro では先に述べた網膜神経節細胞単離

後、培養し starvation によりストレス負荷し、培養液中の HistoneH2B の濃度を ELISA にて測定し control 群と比較する。

(4) TLR4 と HistoneH2B の蛋白質間相互作用の分子生物学的評価

TLR4のplasmid DNAを作成：pEGFP-N3 vector を制限酵素のEco RI 及びBam HI で切断し、TLR4をPCRで増幅後、cDNAを精製しpEGFP-N3 vectorに挿入し、EGFP-TLR4 plasmid DNAを作成する。大腸菌にTLR4 plasmid DNAを用いてTLR4を強制発現させその後TLR4を精製する。そしてGSTを融合したHistoneH2Bを用いてPull downを行いImmunoblotでその相互作用を確認する。

(5) HistoneH2B の細胞障害評価 in vivo

網膜神経節細胞を単離培養後、TLR4 を上記 plasmid DNA を用いて強制発現+もしくは-の群に分け、様々な濃度の HistoneH2B を投与する。細胞障害性は WST assay にて評価する。

(6) HistoneH2B の細胞障害性 in vivo

網膜神経節細胞は中脳上丘に逆行性神経トレーサーでラベルする。C3H/HeJ マウスもしくは C3H/HeN マウスに HistoneH2B の硝子体注射を行い、ラベルされた網膜神経節細胞数の評価を行う。また軸索変性も視神経矢状断を作成後評価する。組織学的評価はAphelionソフトウェアにて客観的に評価する。またTUNEL染色にてアポトーシスの評価も行う。

(7) TLR4 下流分子の評価

HistoneH2B を C3H/HeJ マウスもしくは C3H/HeN マウスに硝子体投与後、TLR4 の下流と考えられる Myd88, MAPKs のリン酸化、NF kappa B p65 の変化を Immunoblot で確認し、HistoneH2B が TLR4 を介して細胞死を惹起していることを確認する。また HistoneH2B との結合ドメインを in vitro で検索し、その sequence を knock down し下流分子の発現を確認する。

4 . 研究成果

TLR4 発現細胞

Histone H2B 投与後免疫染色を施行した。TLR4 の発現は Iba-1 陽性マイクログリア細胞であった。

TLR4 ligand 再確認

視神経挫滅もしくは高眼圧負荷後、網膜膜蛋白抽出後、TLR4 抗体を用い Immunoprecipitation を行い、電気泳動施行後 Silver stain 施行し、目的分子部位(TLR4) の Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)により HistoneH2B が確認された。

HistoneH2B の発現

高眼圧マウスでの硝子体内 HistoneH2B はコントロール群に比し有意に上昇していた。その上昇は眼圧の程度と相関していた。

TLR4 と HistoneH2B の蛋白質間相互作用の分子生物学的評価

HistoneH2B を wild mice 硝子体に投与後 TLR4 で immunoprecipitation をし HistoneH2B 抗体もしくは TLR4 抗体で immuno blot を施行した。HistoneH2B 抗体で immuno blot すると band が明確に認め、HistoneH2B が ligand として機能していることが確認された。

HistoneH2B の細胞障害評価

In vivo では wild mice では HistoneH2B を硝子体投与すると約 20%細胞死が生じるが TLR4 KO mice では細胞死が生じない。

In vitro では HistoneH2b 投与のみでは「神経細胞株の PC12 は細胞死が生じないが TLR4 を強制発現すると約 40%細胞死が生じる。また TLR4 の下流分子の Myd 8 8 TRIF を Knock down すると TLR4 を強制発現しても細胞死が生じない。この結果は HistoneH2b が TLR4 に依存して細胞死が生じている裏付けとなった。

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 3 件)

Sase K, Kitaoka Y, Munemasa Y, Kojima K, Takagi H. Axonal protection by short-term hyperglycemia with involvement of autophagy in TNF-induced optic nerve degeneration. *Front Cell Neurosci.* 2015;9:425. doi: 10.3389/fncel. 2015.00425. 査読有

Munemasa Y, Kitaoka Y. Autophagy in axonal degeneration in glaucomatous optic neuropathy. *Prog Retin Eye Res.* 2015;47:1-18. 査読有

Kojima K, Kitaoka Y, Munemasa Y, Hirano A, Sase K, Takagi H. Axonal protection by modulation of p62 expression in TNF-induced optic nerve degeneration. *Neurosci Lett.* 2014;581:37-41. 査読有

[学会発表](計 1 件)

Munemasa Y, Kitaoka Y, Kojima K, Hirano A, Takagi H. Role of Toll like reseptor-4 ligand after neuronal cell degeneration in the mice retina. 2014 annual meeting of The Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2014.5.8. Orlando (USA)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

宗正 泰成 (MUNEMASA, Yasunari)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 30440340