

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893015

研究課題名(和文) RNAiを用いた緑内障に関連する神経保護機能遺伝子の探索・同定

研究課題名(英文) Analysis of molecular responses in retinal ganglion cell death using RNAi

研究代表者

藤田 幸輔 (Fujita, Kosuke)

東北大学・医学系研究科・助手

研究者番号：80708115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：緑内障は視神経の特徴的な構造的・機能的異常をきたす疾患であり、中途失明の原因の第一位を占めている。そこで、神経損傷・保護に機能する遺伝子とその分子機構の探索・同定を行った。網羅的発現解析(Yasuda et al., 2014)から得られた遺伝子をターゲットとしてRNAiおよび過剰発現等のアデノ随伴ウイルスベクターを用いて緑内障モデルを用いた解析を行ったところ、網膜神経節細胞の細胞死パスウェイにおいて小胞体ストレスが関与していることが示唆された。本研究により、緑内障をはじめとした難治性網膜疾患がもたらす神経損傷の分子機構の解明と神経保護薬の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Glaucoma, a leading cause of blindness, is characterized by the progressive loss of retinal ganglion cells (RGCs); however, the molecular component modulated by cell death and the mechanisms of this modulation have not been fully understood. Recently, our laboratory performed a comprehensive gene expression analysis of the murine retina in the optic nerve crush injury (Yasuda et al., 2014). To identify molecules involved in the RGC cell death signaling characterize their modulation, we conducted RNAi and overexpression experiments using adeno-associated virus. Using mice devoid of Chop and AAV2/2 carrying Chop transgene, we found that RGC death was indeed mediated specifically through Chop signaling, suggesting that ER stress seems to play an important role in the pathogenesis of RGC death following axonal injury, which is in agreement with recent comprehensive gene expression studies.

研究分野：分子生物学

キーワード：Glaucoma Adeno-associated virus RNAi

1. 研究開始当初の背景

緑内障は視神経の特徴的な構造的・機能的異常をきたす疾患であり、我が国の失明原因の25%を占める。そのメカニズムはまだ未解明の部分も多く、眼圧下降がほぼ唯一の有効な治療法ではあるものの、眼圧を目標値まで低下させられない症例も多く、眼圧下降治療以外の新規の神経保護による治療の確立が必要である。

緑内障モデル動物を用いて神経障害に関する様々な研究がおこなわれており、いくつかの分子が同定されている。しかしながら、神経保護・損傷に働く遺伝子・経路がいくつかあって、それがどう関連しているのか、実際にそこでどの分子がいつどこで何にたいしてどのように働いているかについての全容の解明はまだまだ途上にある。これを解明するためには、まずは実際にそこで働いている遺伝子を明らかにすることが必要である。

そこでRNAiによるノックダウンを用いた逆遺伝学的アプローチにより機能分子を同定し、さらにその分子が関与する生体経路およびその働きをバイオイメージング等を用いて明らかにすることとした。

2. 研究の目的

本研究は、中途失明の原因の第一位を占める緑内障の病態の解明のため、各種障害を与えた疾患モデル動物を用いて、神経損傷・保護に機能する遺伝子およびその分子機構の探索・同定を目的とする。そのために、RNAi法を用いた探索を行う。すなわち、種々の遺伝子をRNAiによりノックダウンし、それによって現れる影響を疾患モデルにより機能面から評価することで新規機能性遺伝子を同定し、その詳細を分子生物学的手法と機能プローブを用いたイメージングなどの手法を駆使することで解析する。本研究により、緑内障をはじめとした難治性網膜疾患がもたらす神経損傷の分子機構の解明と神経保護薬の開発につながることを期待される。

3. 研究の方法

RNAi法は生体内に2本鎖のRNAを導入することによって簡便に遺伝子ノックダウンを引き起こすことのできる手法であり、遺伝学的手法による遺伝子探索が困難な研究対象においても、逆遺伝学的手法による遺伝子の網羅的な機能解析を可能にしている。そこでRNAiにより特定の遺伝子をノックダウンした緑内障モデルマウスの評価によって、機能遺伝子を同定する。モデルについては神経挫滅による網膜神経節細胞死を用いた。

(1) siRNAを用いたノックダウン

網羅的解析のためには安価で簡便な手法が求められることから、siRNAはin vitroの系で安価に設計、合成し、それを眼内に導入することとした。標的配列を鋳型としてin vitro transcriptionで長鎖dsRNAを合成し、

それを各種の細胞導入試薬とともに眼内に注入した。siRNAは必要に応じて蛍光標識を行った。なお、ノックダウン効率についてはqRT-PCRを用いて判定した。

(2) shRNA 発現アデノ随伴ウイルスベクターを用いたノックダウン

より確実に細胞内に導入するためにshRNA発現アデノ随伴ウイルスベクターを用いた遺伝子導入を行った。U6プロモーターの下流にショートヘアピン構造をとるように標的配列を設計したアデノ随伴ウイルスを作製し、眼内に投与し、4週間後に判定を行った。なお、ノックダウン効率についてはqRT-PCRを用いて判定した。

(3) アデノ随伴ウイルスによる過剰発現系を用いた標的遺伝子の機能解析

RNAiは生物種や細胞種によって、その効率が大きく異なる。そのため、十分なRNAi効果が得られないことも予想されたので、過剰発現系も用いることとした。標的遺伝子のcDNAを組み込んだアデノ随伴ウイルスを作製し、眼内に投与し、4週間後に実験を行った。

4. 研究成果

(1) siRNAを用いたノックダウン

効果的にRNAiを行うためには、細胞内に効率よくsiRNAを導入する必要がある。そこで、まずはその条件検討を行った。蛍光標識したsiRNAを各種のリポフェクション試薬やアテロコラーゲン等の細胞導入試薬とともに眼内に注射し、細胞への導入効率を検討した。リポフェクション試薬を用いた導入は局所的であったが、アテロコラーゲンは比較的均一な導入が見られたため、アテロコラーゲンを用いてsiRNAを細胞に導入することとした。siRNAをアテロコラーゲンと共にマウス眼内に注射し、qRT-PCRでその効果を判定した。しかしながら、40%程度のノックダウン効率しか見られず、持続期間も短く、十分なRNAi効果は見られなかった(図1)。

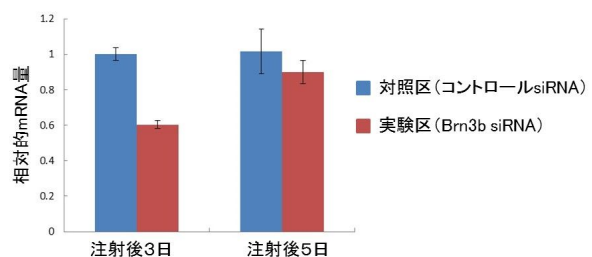


図1. siRNAを用いたノックダウン

マウス眼内にsiRNAを注射し、3日後および5日後にqRT-PCRを用いてmRNA量を定量した。

(2)shRNA 発現アデノ随伴ウイルスベクターを用いたノックダウン

次に shRNA 発現ベクターを用いた RNAi について検討を行った。shRNA をアデノ随伴ウイルスを用いて細胞内に発現させることで、網膜神経節細胞への効率良い導入と安定した発現が見込まれる。

まずは、実際に用いる shRNA 発現ベクターが機能するかどうかを in vitro の系で確認することとした。発現ベクターは U6 プロモーターの下流にショートヘアピン構造をとるように標的配列を配置したものを作製した。作製したベクターを培養細胞に導入し、フローサイトメトリーにて導入された細胞を分取して、その対象遺伝子に対する RNAi 効果を検討したところ、79%のノックダウン効果が得られた(図2)。

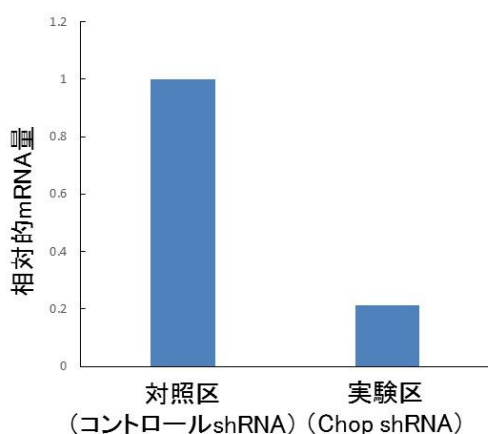


図2. shRNA を用いた in vitro でのノックダウン

shRNA 発現プラスミドを RGC5 培養細胞に導入し、標的遺伝子の mRNA 量を qRT-PCR を用いて定量した。

続いて、in vitro で効果の見られた配列を組み込んだアデノ随伴ウイルスベクターを作製し、in vivo での RNAi 効果を検討することとした。

shRNA 発現アデノ随伴ウイルスベクターを作製し、マウス眼内に投与した。4週間後、視神経挫滅処置を行い、qRT-PCR を用いて RNAi 効果を検査した。しかしながら、33%しか標的遺伝子のノックダウンがみられず、関連遺伝子にも大きな発現変動は観察されなかった。

(3) アデノ随伴ウイルスによる過剰発現系を用いた標的遺伝子の機能解析

RNAi による遺伝子ノックダウンに十分な効果が見られなかったため、過剰発現ベクターを用いて分子機能の解析を行うこととし

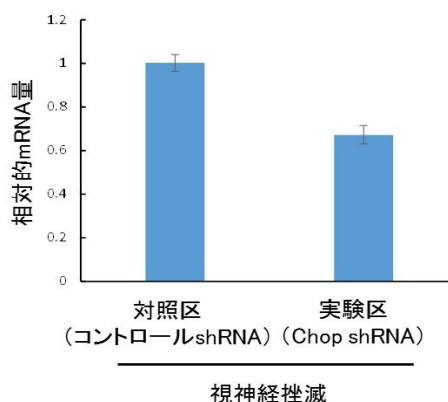


図3. shRNA を用いた in vivo でのノックダウン

shRNA 発現アデノ随伴ウイルスをマウス網膜に導入し、視神経挫滅後の mRNA 量を qRT-PCR を用いて定量した。

た。網羅的発現解析 (Yasuda et al., 2014) から、視神経挫滅後に小胞体ストレス経路に関わる遺伝子の変動することが明らかとなったので、それらの遺伝子が視神経挫滅後の網膜神経節細胞死に対してどのように関与するのか解析を行った。

小胞体ストレス応答経路に働く遺伝子である Chop のノックアウトマウスに対し、アデノ随伴ウイルスを用いて Chop 遺伝子を発現させ、視神経挫滅により細胞死を誘導させたところ、細胞数に有意な変化が見られた(図4)。このことは網膜神経節細胞の細胞死パスイェにおいて小胞体ストレスが関与していることを示唆している。

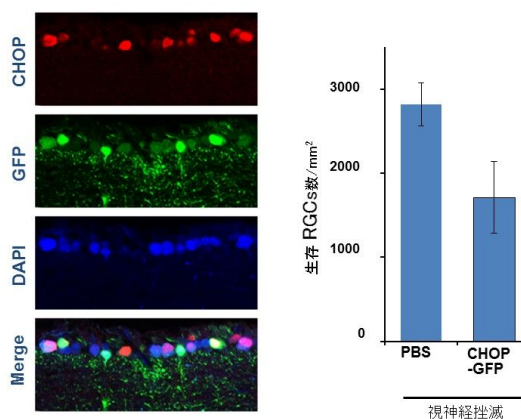


図4. Chop のレスキュー実験

Chop 欠損マウスに Chop を発現させ、視神経挫滅を行い、生存細胞数をカウントした。

本研究により、緑内障をはじめとした難治性網膜疾患がもたらす神経損傷の分子機構の解明と神経保護薬の開発につながる

が期待される。

<引用文献>

Yasuda M, Tanaka Y, Ryu M, Tsuda S, Nakazawa T. RNA sequence reveals mouse retinal transcriptome changes early after axonal injury. PLoS One. 2014; 9:e93258.

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤田 幸輔 (FUJITA, Kosuke)

東北大学・医学系研究科・助手

研究者番号：80708115