様式Ｆ－１９

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25　年　5　月　16　日現在

機関番号：１３３０１
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2011～2012
課題番号：23650163
研究課題名（和文）　視神経再生中に見られる山中因子の活性化機構と神経再生における役割について
研究課題名（英文）　A role of Yamanaka's factor during fish optic nerve regeneration after nerve injury
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

研究成果の概要（和文）：哺乳類と異なり魚の視神経は損傷を受けても再生する。なぜ再生できるのかを考えたとき、我々は視神経損傷により網膜神経節細胞（RGCs）が幼若化するのではないかと考え、神経幹細胞のマーカーや山中因子について検討したところ、山中因子の sox2, klf4, c-myc が損傷 2-3 日で、RGCs で活性化し、その後幹細胞マーカー、ネスチンも活性化することを見出した。このシグナルカスケードについて検討したところ、LIF（リューケミア　インヒビトリー　ファクター）が１～２日と最も早期に活性化することを見つけ、LIF 以降のカスケードについて現在検討中である。

研究成果の概要（英文）：　Unlike mammals, fish optic nerve can regenerate after nerve injury. We have a hypothesis of this regenerative capacity of fish optic nerve that mature retinal ganglion cells (RGCs) in fish are reprogrammed to neural stem-cell like cells by optic nerve injury. To certain this hypothesis, we investigated expression levels of sox2, klf4, c-myc and nestin in the zebrafish retina after optic nerve injury. The levels of sox2, klf4 and c-myc mRNA increased in the retina 3 days after axotomy. The level of a neural stem cell marker, nestin increased in the retina 4-5 days after axotomy. These molecules were all localized to the RGCs. Furthermore, we found that leukemia inhibitory factor (LIF) was positional as an upstream signal to the klf4 and sox2. In the presence of LIF in culture medium of retinal explant, a significant neurite outgrowth could be seen as compared to the no treatment, control. In contrast, the inhibition of LIF signals leaded to the suppression of neurite outgrowth from retina. Therefore, we conclude that the capability of fish optic nerve regeneration is due to reprograming mechanism of matured RGCs after optic nerve injury.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：神経発生、神経再生
科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般
キーワード：魚，視神経再生，sox2，klf4，c-myc，oct3/4，神経幹細胞

１．研究開始当初の背景

哺乳類と異なり、魚の視神経は損傷を受けても再生でき、視機能も完全に回復する。しかし、何故再生可能なのかは全く不明であった。そこで我々は、網膜神経節細胞（RGCs）

が視神経を切断されることにより、自発的に幼若化、幹細胞化するのではないかと考え、山中先生の見つけた iPS 細胞を作製するための四つの山中ファクターに注目した。まず、この四つの転写因子のゼブラフィッシュ視神経損傷後 RGCs での発現パターンを追跡することを思いついた。すると、sox2、klf4 が損傷後 3～5 日後に特異的に活性化することを発見した。それを契機に神経幹細胞マーカーであるネスチンを調べたところ、同じく 3～5 日後に RGCs で有意に上昇しており、神経幹細胞化が明らかとなり、本研究課題の提案を思いついた。

２．研究の目的

視神経の軸索が損傷を受けると、魚の中枢神経は再生できて、哺乳類は原則再生が難しい。何故魚の中枢神経が再生できるのかを考えた時､魚の網膜では蛋白合成の促進や RNA 合成が促進されることは、従来から知られていた。また、我々は様々な再生関連遺伝子が誘導されることも報告してきた。この様な現象を総合すると成熟細胞があたかも幼若神経細胞に交代したように見える。そこで、成熟神経細胞が損傷を受けると幹細胞化し、幼若化し、神経発生時の様に軸索が再生できるのではないかと考えたところ、山中因子の一つである sox2 やネスチンなど幹細胞マーカーが確かに活性化していた。そこでこの sox2 へのシグナルを詳細に調査し、そのトリガー分子を同定すれば、哺乳類等への応用を試みることで、全く新しい再生医療が生まれることを期待し本実験を企画した。

３．研究の方法

(1)　山中因子（sox2、klf4、c-myc）等の mRNA・蛋白の定量的解析と細胞局在の形態学的研究のため、上記因子のプライマーや抗体を用意し、視神経損傷後の網膜標本上でのシグナルを､RT-PCR 法､ウエスタンブロット法、インサイチュハイブリ法、免疫組織化学法を用いて精査する。

(2)　上記実験の詳細なタイムコースを調べ、各ファクターが活性化される順番を調べ、カスケードの可能性を探る。

(3)　各シグナルの siRNA やモルフォリノを用いた RNA 抑制実験を行い、視神経再生に及ぼす影響を、分子の発現や網膜組織片培養での神経突起の伸長を比較し、精査する。
更に、各シグナルの低分子インヒビターなども適宜使用し、シグナルカスケードに当てはまるか確認する。

(4)　更に、sox2, klf4 を活性化させる先行分子として文献的に言われている LIF の視神経損傷時での活性化、それに続くカスケードについて追及する。

(5)　LIF 以降のリン酸化経路の同定。特に Jak/Stat3 系のシグナルについて、その抑制インヒビターを用い、下流シグナルの発現について調べる。

(6)　網膜組織片培養を用い､LIF の添加効果や、そのインヒビターによる組織片培養における神経突起の伸び具合を精査する。

４．研究成果

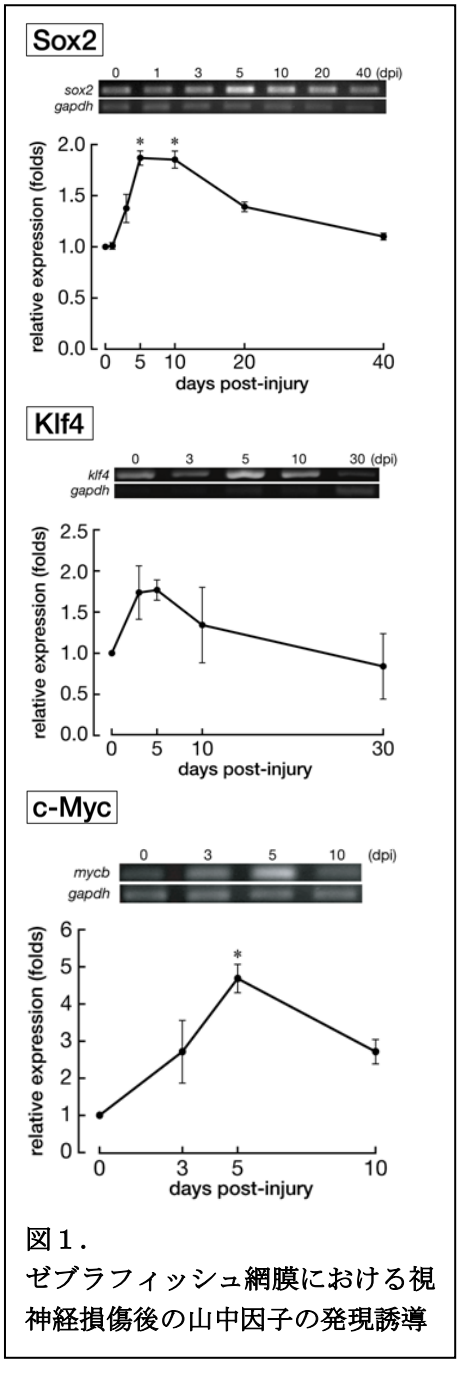


図１．
ゼブラフィッシュ網膜における視神経損傷後の山中因子の発現誘導

本研究の最大の成果は、中枢神経再生が可能な魚網膜において、視神経損傷後速やかに klf4, sox2 の分子が網膜神経節細胞で活性が上昇していることが確認できたことである（図 1. 参照）。また、LIF が klf4 の上流分子としていち早く活性化されることも見い出した（図２．参照）。更に、その下流分子 JAK, Stat3 系のインヒビターをあらかじめ網膜に添加した標本では神経突起の伸長が著しく阻害されることも見い出した。このことで、何故魚の視神経が再生出来るのかについて、成熟神経細胞がリプログラミングを起こし、あたかも神経幹細胞の如く軸索を伸長することが推測できた。この事実は魚を含めて初めての報告であり、神経生物学上大変興味深い事実である。また、4 つの因子を外来性に導入して作る iPS 細胞と異なり、視神経を損傷するだけで３つの因子が内在性に上昇する我々の魚の系は、簡便な iPS 細胞のモデルとして、iPS 細胞の研究にも役立つと期待される。また、細胞のリプログラミングという概念は、全く新しい概念であり、今後の再生医療の進歩にもつながるインパクトの高い研究成果である。

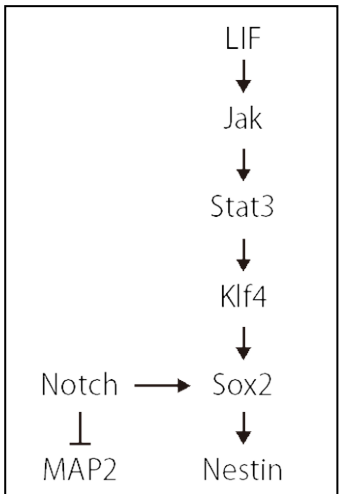


図２．
LIF から klf4, sox2 へのシグナルカスケード

更に、我々のモデル系で c-myc の抑制機構等が解明できれば、現在問題になっている iPS 細胞の発癌抑制にも十分貢献できると確信している。

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 6 件）

① Ogai K, Nishitani M, Kuwana A, Mawatari K, Koriyama Y, Sugitani K, Nakashima H, Kato S. Regeneration-associated genes on optic nerve regeneration in fish retina. Adv. Exp. Med. Biol. 査読無 in press

② Kamioka Y, Fujikawa C, Ogai K, Sugitani K, Watanabe S, Kato S, Wakasugi K. Functional characterization of fish neuroglobin: Zebrafish neuroglobin is highly expressed in amacrine cells after optic nerve injury and can translocate into ZF4 cells. Biochim. Biophys. Acta 査読有, in press doi: 10.1016/j.bbapap.2013.02.021

③ Ogai K, Hisano S, Mawatari K, Sugitani K, Koriyama Y, Nakashima H, Kato S. Upregulation of anti-apoptotic factors in upper motor neurons after spinal cord injury in adult zebrafish. Neurochem. Int. 61:1202-1211. (2012) 査読有 doi: 10.1016/j.neuint.2012.08.015

④ Sugitani K, Ogai K, Hitomi K, Nakamura-Yonehara K, Shintani T, Noda M, Koriyama Y, Tanii H, Matsukawa T, Kato S. A distinct effect of transient and sustained upregulation of cellular factor XIII in the goldfish retina and optic nerve on optic nerve regeneration Neurochem. Int. 61:423-432. (2012) 査読有 doi: 10.1016/j.neuint.2012.06.004

〔学会発表〕（計 7 件）

① 杉谷加代、大貝和裕、若杉桂輔、加藤 聖, ゼブラフィッシュ視神経損傷後に発現する再生関連因子としての Neuroglobin について, 第 90 回日本生理学会大会, 2013.3.29, タワーホール船堀（東京）

② 西谷真希、馬渡一浩、永島幹子、大貝和裕、加藤 聖, ゼブラフィッシュ視神経再生中における山中因子の挙動について, 第 54 回日本神経化学会大会, 2011.9.27, 山代温泉瑠璃光（石川）

③ 加藤 聖、松川 通、郡山恵樹、永島幹子、大貝和裕、杉谷加代, サカナの中枢神経再生：その分子メカニズムから哺乳類への応用まで, 2011.9.27, 山代温泉瑠璃光（石川）

④ Nishitani M, Mawatari K, Nagashima M, Matsukawa T, Koriyama Y, Kato S. Regeneration-associated genes in the zebrafish retina during optic nerve regeneration, 2011.7.7, Edinburgh International Conference Centre (Scotland)

〔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)研究分担者

（　　）

研究者番号：

(3)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