

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25890007

研究課題名(和文) 視神経再生に必要なリプログラム遺伝子の新たな制御機構とそのマスター遺伝子の解明

研究課題名(英文) Investigation of the mechanisms of reprogramming genes and their regulatory master gene(s) during optic nerve regeneration

研究代表者

大貝 和裕 (OGAI, Kazuhiro)

金沢大学・健康増進科学センター・助教

研究者番号：40706983

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)：本研究では、ほ乳類では不可能な中枢神経再生が可能な魚類を用いて、LIF(白血病阻止因子)が中枢神経再生に効果的であることを明らかにした。

ゼブラフィッシュの視神経を切断すると、網膜神経節細胞(視神経の発端となる細胞)でLIF遺伝子が3日以内に上昇する。LIFは引き続きSTAT3シグナルを活性化し、神経再生に関わるGAP-43を上昇させていることがわかった。一方、LIFを低下させた場合、STAT3の活性化とGAP-43の上昇が抑えられ、視覚機能の回復が遅れることがわかった。上記の成果により、中枢神経再生にはLIFが有効に働いていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：This research has been aimed at investigating the beneficial effect of leukemia inhibitory factor (LIF) on zebrafish optic nerve regeneration.

The LIF mRNA was upregulated within 3 days after optic nerve transection followed by the activation of STAT3 at 5 days. The activation of STAT3 in turn upregulated GAP-43, which is required for nerve elongation. Meanwhile, the knockdown of LIF attenuated the STAT3 activation and GAP-43 upregulation, and delayed the functional recovery during optic nerve regeneration. These result would tell that the upregulation of LIF after optic nerve transection may have a beneficial effect on optic nerve regeneration in adult zebrafish, which in turn implies the therapeutic strategies of LIF application against central nervous system injuries.

研究分野：神経科学

キーワード：神経再生 ゼブラフィッシュ LIF STAT3 GAP-43

1. 研究開始当初の背景

ヒトをはじめとする哺乳類には、中枢神経を自力で再生させる能力はほとんどない。よって、中枢神経疾患にかかってしまうと、その後の完全回復は望めない。そのため近年では、iPS 細胞による補充療法を中心として中枢神経の再生医療が注目されている。一方、申請者が着目しているゼブラフィッシュをはじめとした魚類は、中枢神経を損傷したとしても自然に回復することが知られている (Ogai et al., 2012)。申請者らは優れた再生能力を持つゼブラフィッシュを用いて、中枢神経の一つである網膜・視神経の再生について研究を行っている。

「視神経の再生」とは、網膜の信号を脳に伝える「網膜神経節細胞 (RGC)」からの軸索が再生することを意味する。申請者らはゼブラフィッシュを用いて、この軸索再生を可能にする因子について研究を行った。その結果、iPS 細胞リプログラム遺伝子 (いわゆる山中ファクター) の一部である Sox2, Klf4, c-Myc 各遺伝子が視神経切断後 3 日目の RGC で増加していることをつきとめた。さらに、リプログラム遺伝子発現のあと RGC がリプログラムを受け、成熟ニューロンから「軸索の再生が可能な幼若化ニューロンの状態」へと変化する (成熟マーカー MAP2 の減少) ことを示唆する結果を得ていた。

では、Sox2 などの再生関連遺伝子は、なぜ同時期に視神経切断後に発現できるのか。興味深いことに、先に挙げた 3 因子、さらに再生関連因子である GAP-43 は、ある 1 つの因子によって総合的に制御されることが報告されている。それが、本研究で注目した白血球阻止因子 (leukemia inhibitory factor = LIF) である。

2. 研究の目的

先に述べたとおり、ゼブラフィッシュ視神経再生時に発現が増加する再生関連遺伝子のうちいくつかは、たった 1 種類の因子 LIF で制御されている可能性がある。

そこで本研究では、ゼブラフィッシュ視神経切断後の LIF の発現、LIF によって制御されるシグナル伝達系 STAT3 の活性化変化、STAT3 の下流に存在すると考えられる再生関連遺伝子の発現を、PCR 法や各種染色法、遺伝子ノックダウン法や行動解析などの方法を用いて「遺伝子から行動まで」包括的・多角的に明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究ではモデル動物として、ゼブラフィッシュ成魚 (体長 3~4 cm) を使用した。な

お、動物実験に関する計画はすべて所属する研究機関の承認を得た上で実施した (#86294)。

ゼブラフィッシュ視神経切断は麻酔下で実施され、技術に習熟した者が実施した。その後、麻酔薬の過剰投与による安楽死下で経時的に網膜を採取し、mRNA・タンパク質の抽出や組織学的研究に用いた。

遺伝子発現の変化は定量的 PCR 法と *in situ* hybridization (ISH) 法を用いて調べた。タンパク質量の変化はウエスタンブロッティング法と免疫組織化学染色 (IHC) を用いて調べた。また、視神経回復時の行動解析には、所属する研究室にある行動解析装置を用いて、視運動反射 (OMR) を定量化する方法を用いた。遺伝子ノックダウンは、視神経切断断端に LIF 特異的なモルフォリノ (mRNA に相補的に結合し、結果的に mRNA の分解や翻訳阻害による遺伝子ノックダウンの効果となる) を投与し、LIF タンパク質の量を低下させる方法を採用した。また、網膜組織片培養は Sugitani らの方法 (Sugitani et al., 2012) を踏襲した。

4. 研究成果

(1) ゼブラフィッシュ視神経損傷後の RGC における LIF の発現

ゼブラフィッシュ視神経切断後の網膜を経時的に採取し、LIF の mRNA および LIF タンパク質の経時変化と発現局在を求めた。その結果、LIF mRNA は視神経切断後 1 日目から発現が増加し、3 日目をピークとして、5 日目まで発現増加が見られた。また LIF mRNA の発現上昇の局在を ISH 法で求めたところ、RGC に局限していたことが明らかとなった (図 1)。

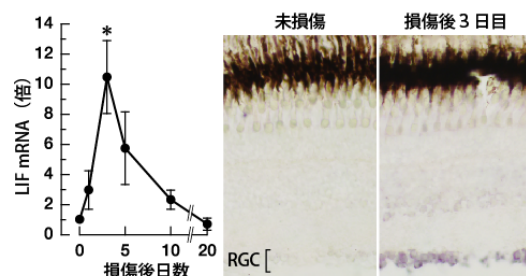


図1 ゼブラフィッシュ視神経切断後の LIF mRNA の発現変化と局在

同様に LIF タンパク質の発現変化と局在を求めたところ、LIF mRNA と同様に、視神経切断後 3 日をピークとして発現が増加し、かつその部位は RGC であることが IHC 法によって証明された。RGC のマーカー (TuJ1) との重なりも確認している (図 2)。

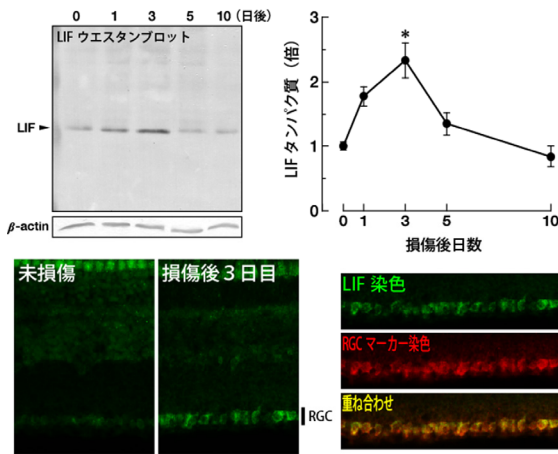


図2 ゼブラフィッシュ視神経切断後のLIFタンパク質の発現変化と局在

以上の結果より、ゼブラフィッシュ視神経切断後1~5日目(3日目がピーク)に、LIF mRNAとタンパク質がRGCにおいて発現上昇することが示された。

(2) ゼブラフィッシュ視神経損傷後のLIF下流シグナル(Jak/STAT3)の活性化

LIFは細胞膜にあるレセプター(LIFレセプター+gp130)を介して細胞内Jak/STAT3シグナルを活性化し、種々の遺伝子発現を調節している。ゼブラフィッシュ視神経切断後にLIFが発現上昇していることから、Jak/STAT3シグナルの活性化が考えられた。そこで、STAT3の活性化体であるリン酸化STAT3(pSTAT3)に対するウェスタンブロット・IHCを実施したところ、予想通り視神経切断後3~5日目にpSTAT3の増加が確認された(図3)。これによって、ゼブラフィッシュ視神経切断後に、RGCでLIFの発現とJak/STAT3シグナルの活性化が3~5日目にかけて起こることが明らかとなった。

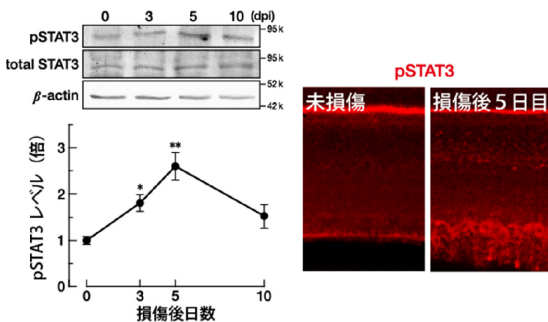


図3 ゼブラフィッシュ視神経切断後のSTAT3活性化と局在

(3) LIFノックダウンによる視神経再生への影響

LIFとJak/STAT3の活性化は、視神経再生にどのような機能を果たしているかを明ら

かにするため、LIFのノックダウン実験を実施した。LIFのモルフォリノ(mRNAに相補的に結合し、翻訳を阻害する物質)を切断した視神経断端からRGCに導入し、LIF発現を抑制した。その結果、LIFのノックダウンがSTAT3の活性化を抑えることがわかった。これは、LIF→Jak/STAT3というシグナルパスウェイをさらに強く証明する結果であった(図4)。

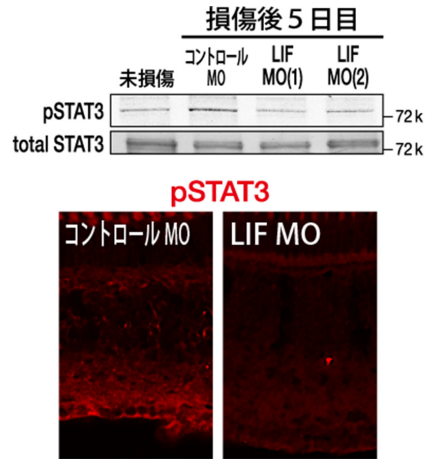


図4 LIFノックダウンによるSTAT3活性化の抑制(MO:モルフォリノ)

さらに、LIFのノックダウンによって、視神経再生に重要な因子であるGAP-43の発現量が低下することが明らかとなった(図5)。

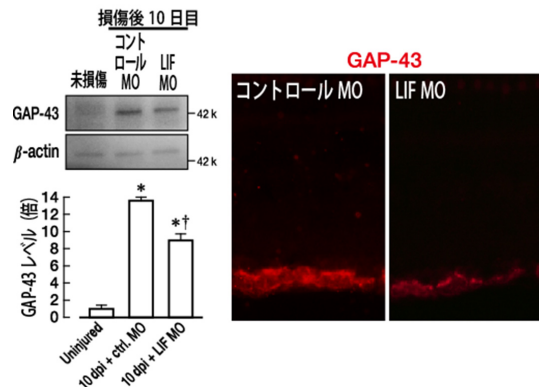


図5 LIFノックダウンによるGAP-43発現の抑制

また、視神経再生の機能評価をコントロール群とLIFノックダウン群で比較したところ、LIFノックダウン群では視神経再生がコントロールに比べて遅れることが明らかになった(図6)。

LIFは細胞生存に関わるという報告もあるため、LIFノックダウンによる細胞生存への影響を確認した。しかし、細胞生存や細胞死、細胞生存に関わる因子Bcl-2には変化が見られなかった。

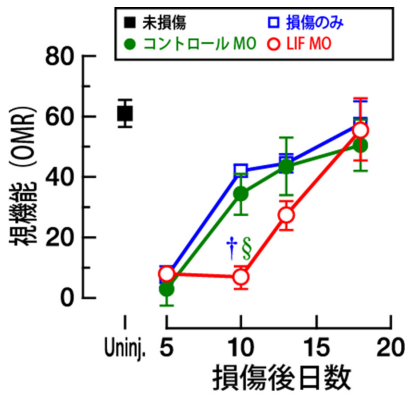


図6 LIF ノックダウンによる視機能回復の遅延

上記結果より、ゼブラフィッシュ視神経切断後1~5日目にかけてLIFが発現し、それが自身、あるいは近傍の細胞にレセプターを介して作用し、STAT3の活性化とGAP-43の発現を促していることが示唆された(図7)。本研究の成果は、ほ乳類視神経再生のために必要な因子の一つとして、LIFがその候補になり得ることを示唆するものと考えられる。一方、LIF下流の因子である再生関連遺伝子(Sox2など)についての影響は時間の都合で明らかにすることができなかった。今後の課題(予定)は、LIFと再生関連遺伝子の関わりについて、GAP-43以外の因子を明らかにすることである。

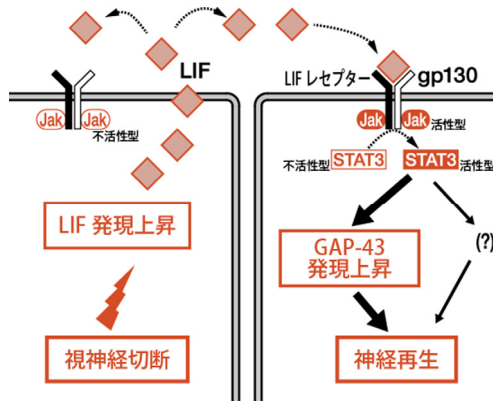


図7 本研究の成果模式図

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2件)

- ① Ogai K, Nakatani K, Hisano S, Sugitani K, Koriyama Y, Kato S. (2014) Function of Sox2 in ependymal cells of lesioned spinal cords in adult zebrafish. *Neuroscience Research*, 査読有, Vol. 88, pp. 84-87,

doi: 10.1016/j.neures.2014.07.010.

- ② Ogai K, Kuwana A, Hisano S, Nagashima M, Koriyama Y, Sugitani K, Mawatari K, Nakashima H, Kato S. (2014) Upregulation of leukemia inhibitory factor (LIF) during the early stage of optic nerve regeneration in zebrafish. *PLOS ONE*, 査読有, Vol. 9, No. 8, doi: 10.1371/journal.pone.0106010.

[学会発表] (計3件)

- ① Ogai K, Sugitani K, Koriyama Y, Kato S. Upregulation of leukemia inhibitory factor (LIF) during zebrafish optic nerve regeneration. 第91回日本生理学会大会, 2014年3月16日, 鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島県鹿児島市)
- ② Ogai K, Sugitani K, Koriyama Y, Nakashima H, Kato S. Intrinsic upregulation of leukemia inhibitory factor (LIF) and subsequent activation of Jak/Stat signaling in adult zebrafish retina during optic nerve regeneration. Neuroscience 2013, 2013年11月11日, サンディエゴ(アメリカ)
- ③ Ogai K, Sugitani K, Koriyama Y, Nakashima H, Kato S. Upregulation of leukemia inhibitory factor (LIF) in retinal ganglion cells during optic nerve regeneration in adult zebrafish. 第19回小型魚類研究会, 2013年9月20日, 仙台AER(アエル)ビル5階(宮城県仙台市)

[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

大貝 和裕 (OGAI, Kazuhiro)

金沢大学・健康増進科学センター・助教

研究者番号: 40706983