

博士論文

RNA シーケンスによるマウス軸索障害早期の網膜
トランスクリプトーム解析

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

神経感覚器病態学講座 眼科学分野

安田 正幸

目次

1. 要約.....	1
2. 研究背景	4
3. 研究目的	8
4. 研究方法	9
5. 研究結果	13
6. 考察.....	16
7. 結論.....	24
8. 文献.....	26
9. 図	38
10. 表	40
11. 謝辞.....	49

1. 要約

【目的】

緑内障は本邦の失明原因の第一位を占める重要な疾患である。その定義は、視神経と視野に特徴的变化を有し、通常、眼圧を十分に下降させることにより視神経障害を改善もしくは抑制しうる眼の機能的構造的異常を特徴とする疾患とされている。しかし、本邦では眼圧が正常なタイプの緑内障（正常眼圧緑内障）が最も多く、さらに眼圧を下降させても視野障害が進行する症例が存在することが問題となっている。現在のところ、緑内障は眼圧下降が唯一の治療法であり、病態解明と新たな治療法の開発が必要である。緑内障では、眼圧非依存的な細胞死のメカニズムとして、視神経乳頭篩状板部での軸索障害による網膜神経節細胞（RGC）死が重要とされるが、詳細な病態は明らかにされていない。本研究では軸索障害に着目し、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を行いその分子メカニズムの一端を明らかにした。

【方法】

軸索障害の誘導にマウス視神経挫滅モデルを用いた。視神経挫滅群とコントロールとしてシャム手術群を用意した。過去に報告した RGC 死のタイムコースの検討から生存 RGC 数が有意に減少し始める以前の障害 2 日後を解析時期とし、網膜を摘

出後 RNA を抽出した。cDNA library を作製し、RNA シークエンスを行い、CLC Genomics Workbench (CLC Bio) で遺伝子発現量を算出した。|Fold change| > 1.5 かつ False discovery rate < 0.1 を閾値とし発現変動遺伝子を抽出した。さらに、同定した発現変動遺伝子群を用い Ingenuity Pathway Analysis (IPA) でパスウェイ解析をした。

【結果】

RNA シークエンスにより軸索障害 2 日後において 177 の発現変動遺伝子を同定した。発現減少した遺伝子には、*Pou4f1* や *Nefh* など RGC に特異的に発現する遺伝子が含まれていた。発現上昇した遺伝子群には、小胞体ストレスに関連する *Atf3* や *Chop* といった遺伝子が含まれていた。その他に抗酸化関連遺伝子である *Hmox1*、*Srxn1* や、補体である *Clqa* も有意に発現上昇していた。発現変動遺伝子を IPA で解析したところ、'Cell Death and Survival' が最も有意なパスウェイであった。IPA による上流制御因子の解析では ATF4 が最も有意である他に、CHOP, NFE2L2, TP53 が有意な上流転写因子であると判定された。

【結論】 RNA シークエンスによる網膜トランスクリプトーム解析の結果から、視神経軸索障害早期では ATF4 を上流とした小胞体ストレスが病態に深く関与していることが示唆された。さらに、NFE2L2 を上流とした抗酸化反応や補体系など様々なパスウェイが軸索障害による分子病態メカニズムを構成していることが示唆された。

小胞体ストレスはさまざまな障害によって誘導されることが知られているが、視神経挫滅モデルでは、軸索の機械的損傷によって生じる小胞体の機能障害や、軸索流の低下によって生じる酸化ストレスが起因となり、小胞体ストレスが生じた可能性が示唆される。緑内障の視神経乳頭篩状板部では、機械的な軸索絞扼によって本モデルと同様の変化が生じていると考えられ、本研究の成果は緑内障の病態の理解、および治療標的の探索に寄与すると考えられる。

2. 研究背景

緑内障は成人の中途失明原因の上位を占める主要な眼疾患の一つである¹⁾。緑内障は視神経に特徴的な変化を有し、進行性の視機能障害を来す疾患とされている²⁾。緑内障では視神経乳頭陥凹と呼ばれる特徴的な構造変化を認め、陥凹が拡大すると網膜神経線維に障害が生じ視機能低下につながると考えられている³⁾。しかし、数多くの研究が試みられているにもかかわらず、緑内障の病態メカニズムは十分に解明されていない。

緑内障では眼圧上昇が視神経障害に影響を及ぼす最も重要なリスク因子であると広く認知されている。現在のところ、眼圧下降が緑内障の唯一の治療法であり、様々な眼圧降下薬が開発され臨床応用されている⁴⁾。緑内障の臨床試験である CNTGS (Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study) の結果、緑内障患者において眼圧を30%以上下降させた治療群と未治療群を比較すると、治療群で有意に視野障害の進行が抑制されることが明らかとなった⁵⁾。しかし、同時に治療群においても進行速度は抑制されるものの視野障害が進行していることが明らかとなり、緑内障の病態に眼圧非依存因子が関与する可能性を示唆する結果となった。緑内障では眼圧のみならず、加齢、近視⁶⁾、乳頭周囲網脈絡膜萎縮⁷⁾、眼循環障害⁸⁾といった様々なリス

ク因子が関与しているとも報告されており、緑内障の病態を解明し新たな治療薬を開発するには眼圧非依存因子に着目した研究が必要である。

近年、画像診断機器の進歩により、視神経乳頭の篩状板の形態を評価することが可能となり、正常眼圧緑内障患者では篩状板の菲薄化が生じていることが報告された⁹⁾。さらに、これまでの研究から、視神経乳頭の篩状板が変形した部位ではその内部を通過する軸索が絞扼によって障害され逆行性に RGC 死が誘導されると考えられており、眼圧非依存因子の一つとして視神経軸索障害が注目されている¹⁰⁾。しかしながら、軸索障害により生じる RGC 死を抑制する神経保護因子を探索した研究がいくつかなされているが、これまでの研究は主に少数の分子を標的としたものであり十分な効果が得られているとは言い難い^{11,12)}。多因子が病態に関与する緑内障ではメカニズムを包括的に捉える研究が必要であると考えられる。

緑内障の病態解明には網膜組織を用いて RGC 死を引き起こすメカニズムを調べることが重要と考えられるが、人眼から網膜を生検摘出することは倫理的に限界があり¹³⁾、動物モデルを用いた研究が中心になる。緑内障の病態には視神経軸索障害が重要であるとされており、視神経を鑷子で挫滅し軸索障害によって RGC 死を誘導する視神経挫滅モデルがしばしば用いられている^{12,14-16)}。過去に我々は、マウス視神経挫滅モデルを用いた研究によって、カルパインが RGC 死に関与することを報告

した¹²⁾。さらに、視神経挫滅によって誘導される RGC 死のタイムコースを検討するために、FluoroGold によって RGC を逆行性染色し、その後視神経挫滅を行い、各タイムポイント (Day 0、3、7、10、14、28) で蛍光標識された生存 RGC 数を計測した。その結果、興味深いことに視神経挫滅による軸索障害の早期では生存 RGC 数が維持されており、有意な生存 RGC の減少は障害 3 日後以降に急速に生じることが明らかとなった。緑内障患者では視野異常が障害の程度の指標とされているが、視野異常が検出される時期には不可逆的な構造的変化が既に進行した状態にあり、障害早期における変化の検出、治療介入が重要であると考えられている¹⁷⁾。そこで我々は、有意に RGC 数が減少する直前の視神経挫滅 2 日後の網膜を解析することで、不可逆的な変化である RGC 死を引き起こす病態を知ることが可能であると仮説を立てて研究を行った。

これまで、包括的な病態解明にはマイクロアレイによる網羅的遺伝子解析が主に用いられており現在でも広く利用されている。軸索障害後の網膜や RGC の遺伝子発現をマイクロアレイによって解析した報告もされている¹⁸⁾。しかし、マイクロアレイは既知の遺伝子配列しか検出できないという制限がある。一方で、近年普及が進んでいる次世代シーケンサーを用いた RNA シーケンス法は全ての転写物を解析することが可能であり¹⁹⁾、未知の遺伝子や選択的スプライシングイベントも含

めた解析が可能である。RNA シーケンスを用いた研究は疾患病態の全体像や未知のパスウェイを同定し新たな治療法の創出に至る可能性を有している。

3. 研究目的

本研究では緑内障の病態として軸索障害早期に着目し、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を行い、その分子メカニズムの一端を明らかにすることを目的とした。

4. 研究方法

4.1. 動物

本研究では12週齢、雄のC57BL/6マウスを実験に用いた。すべての実験はARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Researchに従って計画を立案し、東北大学医学部の動物実験専門委員会の承認を得て行った。

4.2. マウスを用いた軸索障害の誘導

軸索障害は既報に従って、視神経挫滅により誘導した¹²⁾。塩酸ケタミンと塩酸キシラジンの混合麻酔をマウスの大腿部に筋肉注射し全身麻酔をした。マイクロ剪刀でマウスの上方結膜と上直筋を切開し、セッシで術野を展開し視神経を露出した。眼球後極の2 mm後方をセッシで10秒間把持し視神経を挫滅した。処置後にカバーガラスを角膜上に載せ、手術用双眼顕微鏡下に眼底を観察し、網膜血管に循環障害が無いことを確認し、抗菌薬軟膏を眼表面に塗布した。視神経を露出するが挫滅しないシャム手術群をコントロールに用いた。

4.3. RNA 抽出

手術2日後に網膜を摘出し、RNA stabilization reagent (RNase later sample and assay technology; Qiagen, Valencia, CA) に浸漬した。網膜をQiazol (Qiagen) に移し入れ、

ペッスルホモジェナイザーで破碎し、miRNeasy mini kit (Qiagen) を用いてRNAを抽出した。RNAの品質と濃度をNanoDrop 2000c (Thermo Scientific) で確認した。

4.4. RNA シークエンス

36網膜 (各群18網膜) から抽出したRNAを用いてRNAシークエンスのサンプルを調整した。RNAシークエンスではサンプル間のばらつきを最小限にするために、6網膜から抽出したRNAからそれぞれ当量のRNAを取り混合したものを1つのサンプルとして解析に用いた。すなわち36網膜から各群3サンプル、計6サンプルのシークエンス用RNAを調整した。これらのRNAの品質はAgilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) で確認した。RNAの品質を示すRNA integrity number (RIN) は7.8 - 8.2であり、一般的にRNAシークエンスのサンプルに要求される品質であるRIN > 7を満たしていた (表1)。 Illumina Tru-Seq RNA Sample Prep Kits (Illumina, San Diego, CA) を用いて100 bp paired-end readsのcDNAライブラリーを作製した。マルチプレックス解析を可能とするためにcDNAにインデックス配列を付加し、Illumina HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, CA) の1レーンを使用しRNAシークエンスを行った。データはFATQファイルに記録し、CLC Genomics Workbench (version 6.0.1) (CLC Bio, Aarhus, Denmark) に入力し解析した^{20,21)}。すべてのシークエンスリードはリファレンス配列NCBI37/mm9にマッピングした。RNAシークエンスでは、サンプルによって総

リード数が異なることや、遺伝子長が長いほど配列決定される確率が上昇し発現量が多く見積もられることが発現比較する上で問題点となりうる。したがって、本研究では総リード数を100万、遺伝子長を1000塩基として補正する正規化法に基づき、各遺伝子のRPKM (reads per kilobase of exon per million mapped reads) をCLC Genomics Workbenchで算出し、遺伝子発現定量解析に用いた²²⁾。

4.5. アイソフォーム毎の発現変動遺伝子解析

軸索障害によって変動するアイソフォーム毎の遺伝子発現を検討するために、セルイノベーションプログラムのデータ解析拠点が提供する解析プラットフォーム (<http://cell-innovation.nig.ac.jp/>) を用いて解析を行った。具体的には、シーケンスデータを記録した FASTQ を用い、Tophat²³⁾でマッピングをし、Cufflinks2 (v2.0.2)²⁴⁾ を用いて発現変動遺伝子を解析した。Cufflinks2 では FPKM (Fragments per kilobase of exon per million mapped reads) が遺伝子発現量として用いられる。

4.6. 定量的 RT-PCR

RNAシーケンスによって同定された発現変動遺伝子の結果を検証するために、新たに12網膜（各群6網膜）を用意し、定量的RT-PCRを行った。それぞれ200 ngのRNAからSuperScript III (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) を用いて逆転写反応を行いcDNAを合成した。TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems,

Foster City, CA) を用いてPCR反応液を調整し、7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて定量的RT-PCRを行った。*Gapdh*を内部標準遺伝子とし相対定量解析 ($\Delta \Delta Ct$ 法) により遺伝子発現量を比較した。使用したTaqmanプローブは表2に示した。

4.7. パスウェイ解析

RNAシーケンスによって得られた発現変動遺伝子をIngenuity Pathway Analysis (IPA, Ingenuity Systems, Redwood City, CA) にアップロードしソフトウェアを用いてパスウェイ解析を行った²⁵⁻²⁷⁾。IPAソフトウェアにより、軸索障害2日後において有意に変動する生物機能と上流制御因子を解析した。

4.8. 統計解析

RNAシーケンスによって得られたデータからCLC Genomics WorkbenchでRPKMを算出し定量解析に用いた²⁸⁾。RPKMが低値の場合、偽陽性の遺伝子を含む確率が増すため、各群の平均RPKMがいずれかの群で0.3未満である遺伝子は解析から除外した^{29,30)}。これにより得られた13160の遺伝子を発現変動解析に用いた。R software (version 3.0.1) を用いて統計解析を行った³¹⁾。*t*検定によって視神経挫滅群とシャム手術群の遺伝子発現量を比較し、R/Bioconductorのqvalueパッケージを用いて多重検定の補正をした^{32,33)}。偽陽性率 (False discovery rate: FDR) が0.1未満かつ遺伝子の倍率

変化 (Fold change: FC) の絶対値が1.5以上の遺伝子を発現変動遺伝子と定義した。本研究では網膜全体を解析対象にしているが視神経挫滅によって主に障害されるRGCは網膜全体の細胞の約0.5%程度と報告されている³⁴⁾。また、1.5倍程度の遺伝子発現変動でも軸索障害に影響を及ぼしているとの報告があり³⁵⁾、本研究では閾値を比較的低めに設定した。Cufflinks2を用いて転写された遺伝子のアイソフォーム毎の発現変動解析を行った。FDRが0.1未満かつFCの絶対値が1.5以上の遺伝子を発現変動遺伝子と定義した。なお、偽陽性である発現変動遺伝子を最小限にするために、各群の平均FPKMがいずれかの群で0.3未満である遺伝子は解析結果から除外した³⁶⁾。定量的RT-PCR はR softwareを用い、*t*検定によって発現量を比較し、*P*値が0.05未満の遺伝子を有意差ありと判定した。

5. 研究結果

5.1. RNA シークエンスによる軸索障害後の遺伝子発現プロファイル

視神経挫滅によって軸索障害を誘導した網膜のトランスクリプトームをRNAシークエンスで解析した。シークエンスはIllumina Hiseq 2000で行い、その結果、1レーンの総リード数は約4億、各サンプルの平均リード数は約6290万から7030万であった(表1)。総リード数の内、約73.8%がリファレンス配列にペアでマッピングされていた。各遺伝子のRPKMを算出し箱ひげ図を作成したところ各サンプルの発現分布は全

体的に均一であった（図1A）。発現変動遺伝子（ $|FC| > 1.5$ かつ $FDR < 0.1$ ）の分布をVolcano plotにより図1Bに示した。階層的クラスタリングにより、サンプル間の発現変動遺伝子の発現様式を解析した。図1Cが示すように視神経挫滅群とシャム手術群でクラスターが明瞭に分かれていることが確認できた。

5.2. 軸索障害早期の発現変動遺伝子

RNAシーケンスデータの統計解析により177の発現変動遺伝子（上昇：132遺伝子，減少：45遺伝子）を同定した。発現上昇・減少した遺伝子の上位10位を表3に示した。最も発現変動が大きい遺伝子は軸索再生に関与することが報告されている*Sprr1a*であった¹⁸⁾。RGCマーカーと軸索再生に関与する遺伝子を表4に示した。本研究はRGC数が有意に減少する時期より早い視神経挫滅2日後で解析を行ったが、複数のRGCマーカー遺伝子（*Nefh*、*Pou4f1*、*Pou4f2*、*Rbpms*、*Rbpms2*、*Sncg*）が減少を示した。しかしRGCマーカーとして広く知られている*Thy1*遺伝子は有意には減少していなかった。文献情報と発現変動遺伝子を照合したところ、*Atf3*、*Atf4*、*Atf5*、*Chac1*、*Ddit3*、*Egr1*、*Trib3*といった小胞体ストレスに関連した遺伝子群³⁷⁾が有意に発現上昇していることが明らかとなった（表4）。さらに、抗酸化反応に関連する*Hmox1*、*Srxn1*や、補体に関連する*Clqa*、*Clqa*、*Clqa*が有意に発現上昇していた（表4）。

5.3. 軸索障害早期におけるアイソフォーム毎の発現変動遺伝子解析

DNA から転写された RNA は選択的スプライシングによって複数のアイソフォームが生成されることが知られている³⁸⁾。本研究では、Cufflinks2 を用い遺伝子のアイソフォームレベルの発現変動解析を行い、その結果、93 の有意な発現変動遺伝子を同定した。アイソフォームレベルの発現変動遺伝子のうち、FC が大きい順に上位 20 までの遺伝子を表 5 に示した。

5.4. 軸索障害早期では細胞死と細胞生存のパスウェイが共に活性化している

RNA シークエンスによって得られた 177 の発現遺伝子群を IPA にアップロードしパスウェイ解析を行った。その結果、‘Cell Death and Survival’（細胞死と細胞生存）に関与するパスウェイが最も有意に変動していると判定された（表 6）。Cell Death and Survival パスウェイには、細胞死に関与する *Atf3*、*Egr1*、*Jun*、*Tnfrsf12a* や、細胞生存に関与する *Hmox1*、*Sprr1a* といった遺伝子が含まれていた（表 7）。これらの遺伝子を含む 14 遺伝子（*Sprr1a*、*Mmp12*、*Sox11*、*Atf3*、*Tnfrsf12a*、*Hmox1*、*Plat*、*Egr1*、*Atf5*、*Ddit3*、*Jun*、*Pou4f2*、*Nefh*、*Pou4f1*）の発現変動を定量的 RT-PCR で検証し、RNA シークエンスと同様の結果を得た（表 8）。

5.5. 軸索障害早期では ATF4 を中心とし、TP53、NFE2L2、DDIT3 によって制御されるネットワークも病態に関与する

IPAによるパスウェイ解析を用い、どの遺伝子が軸索障害早期の病態を制御しているかを検討した。その結果、ATF4が最も有意な上流制御因子であると判定された(表9)。その他に、TP53、NFE2L2、DDIT3も軸索障害早期の病態に関与する転写因子であると判定された。これらの上流制御因子と、本研究で同定された標的遺伝子を組み合わせたネットワーク図を図2に示した。

6. 考察

本研究ではRNAシーケンスを用いて軸索障害早期における網膜トランスクリプトームを明らかにした。視神経挫滅後、RGC数が減少し始める前の早期において、新規の候補遺伝子を含む177の発現変動遺伝子を同定した。パスウェイ解析によって病態の意義付けをしたところ、Cell Death and Survivalが最も有意なパスウェイであると判定され、軸索障害早期では細胞死と細胞生存を促進する因子が同時に活性化していることが明らかとなった。さらに最も有意な上流制御因子としてATF4が同定され、発現変動遺伝子群には多くの小胞体ストレス関連遺伝子群が含まれていることから、ATF4を上流とした小胞体ストレス応答が軸索障害による細胞死に重要な役割を持つことが示唆された。それに加え、酸化ストレス防御機構の中心的役割を担うNFE2L2

を上流としたパスウェイも活性化していると判定され、軸索障害早期における細胞生存シグナルに抗酸化反応が関与していることが示唆された。

本研究では、緑内障における進行性の RGC 死の原因として軸索障害に着目しマウス視神経挫滅モデルを用いて解析を行った。従来、RGC 死を抑制する神経保護治療薬の研究には様々な動物モデルが用いられている。その例として、視神経挫滅^{12,16,39)}、視神経切断⁴⁰⁻⁴²⁾、グルタミン酸障害⁴³⁻⁴⁸⁾、tumor necrosis factor- α (TNF- α) による神経炎症^{49,50)}などが報告されている。視神経挫滅や視神経切断は他のモデルと異なり、視神経に機械的に直接障害を与えるモデルであり、緑内障の主要な病態である篩状板部の絞扼による機械的な軸索障害を反映している¹⁶⁾。N-methyl-d-aspartate やカイニン酸によるグルタミン酸障害も広く用いられているが、障害後 6 時間で RGC に TUNEL 陽性細胞が検出され障害の進行速度が早いため、RGC が有意に減少する前の早期での解析は困難である^{51,52)}。一方で、TNF- α の硝子体注射による神経炎症モデルでは RGC 死の検出までに数週間を要することに加え、細胞死が生じる RGC 数が比較的少ないとされる。マウス視神経挫滅モデルでは視神経挫滅 3 日後まで RGC が維持されその後 RGC 死が進行する¹²⁾。本研究では視神経挫滅モデルを用い、障害 2 日後を解析時期とすることで比較的短期間で軸索障害早期の変化を解析することが可能であった。

本研究は、我々の知る限り、軸索障害早期の網膜トランスクリプトームを RNA シーケンスで解析した初の報告である。ラット視神経切断やマウス視神経挫滅モデルのマイクロアレイによる解析は既に報告があり、細胞死や軸索再生に関与する遺伝子がいくつか突き止められている^{18,53)}。しかし、RNA シーケンスによる解析例は無く、その有用性は不明であったが、マイクロアレイ解析で報告された軸索障害に重要な役割を示す遺伝子（例：*Sprr1a*、*Ecell*、*Atf3*）を同様に検出することが可能であった。

マイクロアレイ解析で検出できる遺伝子は、デザインした特定のプローブの配列に制約される欠点がある。一方で、RNA シーケンスは全ての転写物を解析し定量化するため未知の転写物の同定や選択的スプライシングイベントの評価が可能である¹⁹⁾。本研究では、全エクソンレベルの発現変動遺伝子解析に加え、選択的スプライシングによって影響されるアイソフォームレベルの発現変動遺伝子解析も行った(表 5)。その結果、全エクソンレベルと同様に、*Sprr1a* が最も発現変動が大きいことや、*Chac1*、*Atf3*、*Trib3* などの小胞体ストレス関連遺伝子がアイソフォームレベルでも発現変動していることが明らかとなった。さらに、*Fbxo44*、*Smarc11*、*Ctnn1*、*Cep250* といった、これまでのマイクロアレイ解析でも報告はなく、全エクソンレベルの RNA シーケンスでも検出されなかった発現変動遺伝子を同定することが可能であった。遺伝

子のアイソフォームレベルの変化はアルツハイマー病やがん組織の発生など疾患の病態に関与することが報告されており^{54,55)}、上記の遺伝子は視神経軸索障害の病態に関与することが示唆される。本研究で用いた全転写物を解析する RNA シークエンスは、緑内障のような多因子で複雑な病態が想定される疾患の研究では強力なツールとなる可能性がある。本研究においても、緑内障病態に関与する軸索障害によって生じる遺伝子変化を網羅的に解析し、包括的な分子ネットワークを得ることができた。

軸索障害では逆行性に軸索変性が生じ、RGC が減少することが知られている¹²⁾。軸索障害の動物モデルの検討でいくつかの RGC マーカーとなる遺伝子が減少することが報告されている^{56,57)}。本研究では視神経挫滅 2 日後に *Pou4f1* や *Pou4f2* といった RGC 特異的な遺伝子が減少していた (表 4)。POU4F1 は RGC 数を反映する有用なマーカーであることが知られている⁵⁶⁾。一方で RGC マーカー遺伝子として広く知られている *Thy1*⁵⁸⁾ は視神経挫滅 2 日後という障害早期では有意な減少を示さなかった。POU4F1 は逆行性染色で標識した RGC の計測よりも早期に発現が減少するとされており⁵⁶⁾、軸索挫滅早期の障害の検出には *Pou4f1* の定量が有用であることが示唆された。その他に、軸索障害が生じている網膜では軸索再生に関与する遺伝子の発現も変動することが知られている⁵⁹⁾。本研究においても *Sprr1a* や *Gap43* といった、軸索再

生を促進する遺伝子が有意に発現上昇していた (表 4)。これらは従来のマイクロアレイの解析で得られた結果と一致していた¹⁸⁾。

小胞体ストレスは様々な神経変性疾患の病態にも重要な役割を持つことが報告されている⁶⁰⁾。小胞体ストレス下では主要な 3 つのパスウェイである RNA-dependent protein kinase (PKR)-like ER kinase (PERK)、inositol-requiring kinase 1 (IRE1)、そして ATF6 が活性化され、小胞体ストレスが遷延すると細胞死が誘導されることが知られている⁶¹⁾。視神経挫滅 2 日後の解析では *Atf3*、*Atf4*、*Atf5*、*Chac1*、*Ddit3*、*Egr1*、*Trib3* といった小胞体ストレス関連遺伝子の発現上昇を認めた。(表 5)。さらに IPA を用いたパスウェイ解析で ATF4 が最も有意な上流制御因子であると判定された (表 9)。小胞体ストレス下では PERK の下流の eukaryotic inactivation factor 2 α によって ATF4 が活性化されることが報告されている⁶²⁾。これらの結果から、軸索障害早期の病態には小胞体ストレスによって活性化された ATF4 が重要な役割を持つことが示唆された。

小胞体ストレスは、虚血、酸化ストレス、加齢など、様々な障害が原因となり異常タンパクが集積することで活性化される⁶²⁾。本研究では、視神経挫滅後に眼底観察をし、網膜に循環障害が無いことを確認していることに加え、RNA シークエンスの結果でも低酸素関連遺伝子の有意な変動は認めていない。したがって、本研究における小胞体ストレス活性化の主原因は虚血による低酸素ではないと考えられる。視神経挫

滅モデルでは、軸索の機械的損傷によって小胞体の機能障害が生じることや、軸索流低下によるミトコンドリア障害で酸化ストレスが生じるとされており^{63,64}、これらが小胞体ストレス反応の活性化の引き金になったと考えられる。

本研究では、パスウェイ解析で ATF4 に加え、C/EBP homologous protein (CHOP) という名でも知られる DDIT3 も有意な上流制御因子であると判定された(表 9)。CHOP は小胞体ストレス下で ATF4 によって活性化され、細胞死を誘導することが知られている⁶⁵。*Chop* 欠損マウスを用いた過去の報告では、野生型と比較して視神経挫滅による RGC 死が抑制されることが報告されている⁶⁶。本研究の結果も含め、軸索障害の早期では ATF4-CHOP パスウェイが軸索障害による細胞死に重要な役割をもつことが示唆された。しかし、本研究ではそれ以外にも、小胞体ストレス反応の一つである IRE1-JNK パスウェイによって活性化される *Jun* も有意に発現上昇していた^{35,67} (表 8)。さらに、*Trib3* や *Chac1* といった、網膜ではその機能が詳細に検討されていない遺伝子も発現上昇していることがわかった(表 4)。TRIB3 は 293 細胞 や Hela 細胞を用いた研究で小胞体ストレスによって誘導される細胞死に関与することが報告されている⁶¹。CHAC1 はグルタチオンを減少させることで酸化ストレスを誘導することや⁶⁸、小胞体ストレス下で ATF4-ATF3-CHOP パスウェイにより活性化され細胞死に関与することがヒト大動脈内皮細胞を用いた研究で報告されている⁶⁹。

以上より、軸索障害によって ATF4-CHOP パスウェイだけでなくさまざまなパスウェイが同時に活性化され細胞死に関与していることが明らかとなった。ラットの網膜剥離モデルを用いた研究で、細胞死に関与する 2 つのパスウェイを同時に阻害することで視細胞保護効果が増強することが報告されており、緑内障病態である軸索障害においても複数のパスウェイで構成される分子病態ネットワークを考慮した治療が有用である可能性が示唆された⁷⁰⁾。

小胞体ストレスに加え、酸化ストレスも多くの神経変性疾患に関与することが報告されている^{71,72)}。本研究では抗酸化反応に関連する遺伝子である *Hmox1* と *Srxn1* が視神経挫滅 2 日後に有意に上昇していた (表 4)。IPA によるパスウェイ解析では Nrf2 (NF-E2 related factor 2) として知られる NFE2L2 が有意な上流制御因子であると判定された (表 9)。Nrf2 は酸化ストレスによって活性化される強力な転写因子であり、*Hmox1* と *Srxn1* といった細胞保護に関連した遺伝子の発現を上昇させることが知られている^{73,74)}。マウスの視神経挫滅モデルを用いた検討では、障害 1 日後に Nrf2 が RGC の核内に移行することが報告されている¹¹⁾。さらに Nrf2 欠損マウスを用いた検討において、視神経挫滅による RGC 死が野生型マウスと比較し有意に増加することが報告されている¹¹⁾。このことから軸索障害後、RGC 数が維持されている早期においては Nrf2 によって誘導される *Hmox1* や *Srxn1* が RGC 保護に関与していることが示唆さ

れた。小胞体ストレスの抑制に加え、抗酸化反応を増強させることで軸索障害による RGC 死をさらに抑制できる可能性が示唆された。

中枢神経障害に免疫反応が関与することが報告されている⁵⁹⁾。本研究においても、*Clqa*、*Clqb*、*Clqc* といった補体系に関与する遺伝子が有意に発現上昇していた（表 4）。*Clqa* はパスウェイ解析で最も有意に活性化している Cell Death and Survival パスウェイの遺伝子群に含まれていた（表 7）。補体系はアルツハイマーなどの神経変性疾患の病態に関与することが報告されている⁷⁵⁾。また、視神経挫滅 2 日後の網膜をマイクロアレイで解析した過去の報告においても、本研究と同様に補体系が活性化することが報告されている⁷⁶⁾。軸索障害によって生じる RGC 死に免疫反応も関与していることが示唆された。

本研究では、RGC が有意に減少し始める前の視神経挫滅 2 日後の網膜を用いて網羅的に遺伝子発現を解析したが、タイムコースによる変化の詳細な検討は行っていない。過去の研究では、視神経挫滅 2 日後をピークに *Chop* や *Jun* の発現が上昇し、5 日後も上昇が続くことが報告されている。*Chop* 欠損マウスでは、野生型と比較し視神経挫滅による RGC 死が抑制されることから、軸索障害早期では小胞体ストレスが重要な役割を持つと考えられる。しかし、視神経挫滅後 3 日から 4 日以降の網膜では、ミトコンドリアにおける活性化酸素種の増加やマイクログリアの活性化が生じ

RGC 死に関与することが報告されている^{11,77)}。我々の研究グループが行った定量的 RT-PCR によるタイムコースの検討においても、酸化ストレスや炎症に関与するいくつかの遺伝子に同様の傾向が認められている（データ未掲載）。したがって、軸索障害中から後期では酸化ストレスや炎症反応が RGC 死に関与し、これらの病態に対する治療も併せて行うことが有効である可能性がある。緑内障は慢性疾患であり上述した病態が混在していると考えられ、今後はタイムコースを考慮した詳細な検討が必要と考えられる。

7. 結論

次世代シーケンサーを用いて軸索障害早期の網膜トランスクリプトームを解析した。RNA シークエンスを用いた報告は本研究が初である。RNA シークエンスによる発現変動遺伝子解析とパスウェイ解析の結果から RGC が維持されている軸索障害早期の網膜では細胞死と細胞生存に関与するパスウェイが同時に活性化していることが明らかとなった。さらに、軸索障害による RGC 死には小胞体ストレスによって活性化される ATF4-CHOP が主要なパスウェイであることが示唆された。次世代シーケンサーによる RNA シークエンスとパスウェイ解析を用いることで、視神経軸索障害における分子病態メカニズムの全体像を把握することが可能であった。今後、本研

究で得られた候補遺伝子を詳細に解析することで、新規の神経保護薬の開発につながる
ことが期待できる。

8. 文献

1. Ou Y, Goldberg I, Migdal C et al. A critical appraisal and comparison of the quality and recommendations of glaucoma clinical practice guidelines. *Ophthalmology* 2011;118:1017-1023.
2. Kwon YH, Fingert JH, Kuehn MH et al. Primary open-angle glaucoma. *New England Journal of Medicine* 2009;360:1113-1124.
3. Weinreb RN, Khaw PT. Primary open-angle glaucoma. *Lancet* 2004;363:1711-1720.
4. Heijl A, Leske MC, Bengtsson B et al. Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression: results from the Early Manifest Glaucoma Trial. *Arch Ophthalmol* 2002;120:1268-1279.
5. Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study Group. (1998) The effectiveness of intraocular pressure reduction in the treatment of normal-tension glaucoma. *Am J Ophthalmol*;126:498-505.
6. Hollands H, Johnson D, Hollands S et al. Do findings on routine examination identify patients at risk for primary open-angle glaucoma? The rational clinical examination systematic review. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2013;309:2035-2042.

7. De Moraes CGV, Juthani VJ, Liebmann JM et al. Risk factors for visual field progression in treated glaucoma. *Archives of ophthalmology* 2011;129:562-568.
8. Chiba N, Omodaka K, Yokoyama Y et al. Association between optic nerve blood flow and objective examinations in glaucoma patients with generalized enlargement disc type. *Clin Ophthalmol* 2011;5:1549-1556.
9. Park HY, Jeon SH, Park CK. Enhanced depth imaging detects lamina cribrosa thickness differences in normal tension glaucoma and primary open-angle glaucoma. *Ophthalmology* 2012;119:10-20.
10. Calkins DJ. Critical pathogenic events underlying progression of neurodegeneration in glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 2012;31:702-719.
11. Himori N, Yamamoto K, Maruyama K et al. Critical role of Nrf2 in oxidative stress-induced retinal ganglion cell death. *J Neurochem* 2013.
12. Ryu M, Yasuda M, Shi D et al. Critical role of calpain in axonal damage-induced retinal ganglion cell death. *J Neurosci Res* 2012;90:802-815.
13. Fujimoto JG. Optical coherence tomography for ultrahigh resolution in vivo imaging. *Nat Biotechnol* 2003;21:1361-1367.

14. Allcutt D, Berry M, Sievers J. A qualitative comparison of the reactions of retinal ganglion cell axons to optic nerve crush in neonatal and adult mice. *Brain Res* 1984;318:231-240.
15. Li Y, Schlamp CL, Nickells RW. Experimental induction of retinal ganglion cell death in adult mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:1004-1008.
16. Libby RT, Li Y, Savinova OV et al. Susceptibility to neurodegeneration in a glaucoma is modified by Bax gene dosage. *PLoS Genet* 2005;1:17-26.
17. Weinreb RN, Friedman DS, Fechtner RD et al. Risk assessment in the management of patients with ocular hypertension. *Am J Ophthalmol* 2004;138:458-467.
18. Fischer D, Petkova V, Thanos S et al. Switching mature retinal ganglion cells to a robust growth state in vivo: gene expression and synergy with RhoA inactivation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2004;24:8726-8740.
19. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews Genetics* 2009;10:57-63.

20. Tong M, Chan KW, Bao JY et al. Rab25 is a tumor suppressor gene with antiangiogenic and anti-invasive activities in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2012;72:6024-6035.
21. Greenwald JW, Greenwald CJ, Philmus BJ et al. RNA-seq analysis reveals that an ECF sigma factor, AcsS, regulates achromobactin biosynthesis in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a. *PLoS One* 2012;7:e34804.
22. Mortazavi A, Williams BA, McCue K et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* 2008;5:621-628.
23. Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 2009;25:1105-1111.
24. Trapnell C, Hendrickson DG, Sauvageau M et al. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nat Biotechnol* 2013;31:46-53.
25. Ramayo-Caldas Y, Mach N, Esteve-Codina A et al. Liver transcriptome profile in pigs with extreme phenotypes of intramuscular fatty acid composition. *BMC Genomics* 2012;13:547.

26. Prat-Vidal C, Gálvez-Montón C, Nonell L et al. Identification of Temporal and Region-Specific Myocardial Gene Expression Patterns in Response to Infarction in Swine. *PLoS ONE* 2013;8:e54785.
27. Saili KS, Tilton SC, Waters KM et al. Global gene expression analysis reveals pathway differences between teratogenic and non-teratogenic exposure concentrations of bisphenol A and 17 β -estradiol in embryonic zebrafish. *Reproductive Toxicology* 2013;38:89-101.
28. Gusberti M, Gessler C, Brogini GA. RNA-Seq Analysis Reveals Candidate Genes for Ontogenic Resistance in Malus-Venturia Pathosystem. *PLoS One* 2013;8:e78457.
29. Ramskold D, Wang ET, Burge CB et al. An abundance of ubiquitously expressed genes revealed by tissue transcriptome sequence data. *PLoS Comput Biol* 2009;5:e1000598.
30. Rowley JW, Weyrich AS. Coordinate expression of transcripts and proteins in platelets. *Blood* 2013;121:5255-5256.
31. Team RC. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available: <http://www.R-project.org>. 2013.

32. Dabney A, Storey JD. qvalue: Q-value estimation for false discovery rate control. R package version 1.36.0.
33. Folkersen L, Kyriakou T, Goel A et al. Relationship between CAD risk genotype in the chromosome 9p21 locus and gene expression. Identification of eight new ANRIL splice variants. *PLoS One* 2009;4:e7677.
34. Kamei S, Chen-Kuo-Chang M, Cazevielle C et al. Expression of the Opa1 mitochondrial protein in retinal ganglion cells: its downregulation causes aggregation of the mitochondrial network. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:4288-4294.
35. Fernandes KA, Harder JM, Kim J et al. JUN regulates early transcriptional responses to axonal injury in retinal ganglion cells. *Exp Eye Res* 2013;112:106-117.
36. Prakasa KR, Becker L, Faraday N et al. Platelet RNA-Seq Identifies Genes Expressed Differentially After Clopidogrel Treatment. *Blood* 2013;122:4817-4817.
37. Liang SH, Zhang W, McGrath BC et al. PERK (eIF2alpha kinase) is required to activate the stress-activated MAPKs and induce the expression of immediate-early genes upon disruption of ER calcium homeostasis. *Biochem J* 2006;393:201-209.
38. Norton PA. Alternative pre-mRNA splicing: factors involved in splice site selection. *J Cell Sci* 1994;107 (Pt 1):1-7.

39. Levkovitch-Verbin H, Harris-Cerruti C, Groner Y et al. RGC death in mice after optic nerve crush injury: oxidative stress and neuroprotection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:4169-4174.
40. Chidlow G, Casson R, Sobrado-Calvo P et al. Measurement of retinal injury in the rat after optic nerve transection: an RT-PCR study. *Molecular vision* 2005;11:387-396.
41. Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Rasminsky M et al. Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats. *J Neurobiol* 1993;24:23-36.
42. Berkelaar M, Clarke DB, Wang YC et al. Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci* 1994;14:4368-4374.
43. Nakazawa T, Takahashi H, Nishijima K et al. Pitavastatin prevents NMDA-induced retinal ganglion cell death by suppressing leukocyte recruitment. *J Neurochem* 2007;100:1018-1031.
44. Lam TT, Abler AS, Kwong JM et al. N-methyl-D-aspartate (NMDA)--induced apoptosis in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:2391-2397.
45. Siliprandi R, Canella R, Carmignoto G et al. N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in the adult rat retina. *Vis Neurosci* 1992;8:567-573.

46. Seki T, Nakatani M, Taki C et al. Neuroprotective effect of PACAP against kainic acid-induced neurotoxicity in rat retina. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1070:531-534.
47. Ehrlich D, Teuchert G, Morgan IG. Specific ganglion cell death induced by intravitreal kainic acid in the chicken retina. *Brain Res* 1987;415:342-346.
48. Honjo M, Tanihara H, Kido N et al. Expression of ciliary neurotrophic factor activated by retinal Muller cells in eyes with NMDA- and kainic acid-induced neuronal death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:552-560.
49. Nakazawa T, Nakazawa C, Matsubara A et al. Tumor necrosis factor-alpha mediates oligodendrocyte death and delayed retinal ganglion cell loss in a mouse model of glaucoma. *J Neurosci* 2006;26:12633-12641.
50. Kitaoka Y, Kitaoka Y, Kwong JM et al. TNF-alpha-induced optic nerve degeneration and nuclear factor-kappaB p65. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:1448-1457.
51. Liu Y, Tang L, Chen B. Effects of antioxidant gene therapy on retinal neurons and oxidative stress in a model of retinal ischemia/reperfusion. *Free Radical Biology and Medicine* 2012;52:909-915.
52. Nakazawa T, Shimura M, Ryu M et al. ERK1 plays a critical protective role against N-methyl-D-aspartate-induced retinal injury. *J Neurosci Res* 2008;86:136-144.

53. Watkins TA, Wang B, Huntwork-Rodriguez S et al. DLK initiates a transcriptional program that couples apoptotic and regenerative responses to axonal injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013;110:4039-4044.
54. Twine NA, Janitz K, Wilkins MR et al. Whole transcriptome sequencing reveals gene expression and splicing differences in brain regions affected by Alzheimer's disease. *PLoS One* 2011;6:e16266.
55. Pal S, Gupta R, Davuluri RV. Alternative transcription and alternative splicing in cancer. *Pharmacol Ther* 2012;136:283-294.
56. Nadal-Nicolas FM, Jimenez-Lopez M, Sobrado-Calvo P et al. Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:3860-3868.
57. Chidlow G, Casson R, Sobrado-Calvo P et al. Measurement of retinal injury in the rat after optic nerve transection: an RT-PCR study. *Mol Vis* 2005;11:387-396.
58. Soto I, Oglesby E, Buckingham BP et al. Retinal ganglion cells downregulate gene expression and lose their Axons within the optic nerve head in a mouse glaucoma model. *Journal of Neuroscience* 2008;28:548-561.

59. Leon S, Yin Y, Nguyen J et al. Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve. *J Neurosci* 2000;20:4615-4626.
60. Roussel BD, Kruppa AJ, Miranda E et al. Endoplasmic reticulum dysfunction in neurological disease. *Lancet Neurol* 2013;12:105-118.
61. Logue SE, Cleary P, Saveljeva S et al. New directions in ER stress-induced cell death. *Apoptosis* 2013;18:537-546.
62. Kim I, Xu W, Reed JC. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7:1013-1030.
63. Roselli F, Caroni P. Life-or-death decisions upon axonal damage. *Neuron* 2012;73:405-407.
64. Li S, Yang L, Selzer ME et al. Neuronal endoplasmic reticulum stress in axon injury and neurodegeneration. *Ann Neurol* 2013;74:768-777.
65. Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* 2004;11:381-389.
66. Hu Y, Park KK, Yang L et al. Differential effects of unfolded protein response pathways on axon injury-induced death of retinal ganglion cells. *Neuron* 2012;73:445-452.

67. Urano F, Wang X, Bertolotti A et al. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 2000;287:664-666.
68. Kumar A, Tikoo S, Maity S et al. Mammalian proapoptotic factor ChaC1 and its homologues function as gamma-glutamyl cyclotransferases acting specifically on glutathione. *EMBO Rep* 2012;13:1095-1101.
69. Mungrue IN, Pagnon J, Kohannim O et al. CHAC1/MGC4504 is a novel proapoptotic component of the unfolded protein response, downstream of the ATF4-ATF3-CHOP cascade. *J Immunol* 2009;182:466-476.
70. Trichonas G, Murakami Y, Thanos A et al. Receptor interacting protein kinases mediate retinal detachment-induced photoreceptor necrosis and compensate for inhibition of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:21695-21700.
71. Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:205-214.
72. Harada C, Namekata K, Guo X et al. ASK1 deficiency attenuates neural cell death in GLAST-deficient mice, a model of normal tension glaucoma. *Cell death and differentiation* 2010;17:1751-1759.

73. Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007;47:89-116.
74. Singh A, Ling G, Suhasini AN et al. Nrf2-dependent sulfiredoxin-1 expression protects against cigarette smoke-induced oxidative stress in lungs. *Free Radic Biol Med* 2009;46:376-386.
75. Crehan H, Holton P, Wray S et al. Complement receptor 1 (CR1) and Alzheimer's disease. *Immunobiology* 2012;217:244-250.
76. Templeton JP, Freeman NE, Nickerson JM et al. Innate immune network in the retina activated by optic nerve crush. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54:2599-2606.
77. Lin S, Liang Y, Zhang J et al. Microglial TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-beta (TRIF) deficiency promotes retinal ganglion cell survival and axon regeneration via nuclear factor-kappaB. *J Neuroinflammation* 2012;9:39.

9. 図

図 1、2 は基礎論文(Yasuda M *et al. PLoS One* 2014;9:e93258.) より改変して掲載。

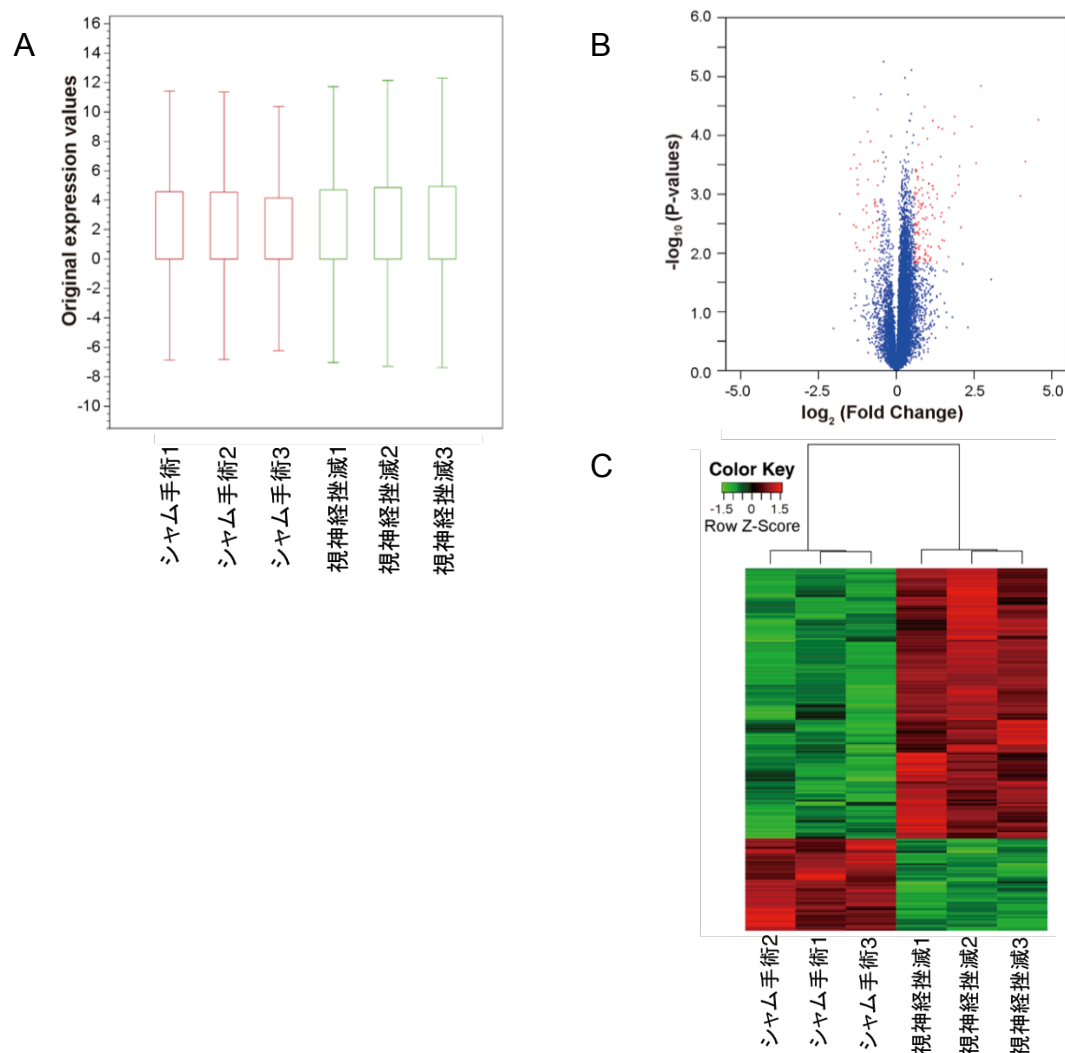


図1. RNAシーケンスによる軸索障害後の遺伝子発現プロファイル

(A) 各サンプルの遺伝子発現量 (RPKM) の分布。(B) 軸索障害後の遺伝子発現の倍率変化とP値の関係を示すVolcanoプロット。赤点は発現変動遺伝子を示す。(C) 軸索障害後の発現変動遺伝子による階層的クラスタリングとヒートマップ。赤は発現上昇を示し、緑は発現減少を示している。

10. 表

表 5 以外の表は基礎論文 (Yasuda M *et al. PLoS One* 2014;9:e93258.) より改変して掲載。

表 1. RNA integrity number とシークエンスデータの要約

Sample	RIN	Total number of reads	Reads mapped in pairs	Reads mapped in pairs (%)	Reads mapped broken pairs (%)	Reads not mapped (%)
シヤム手術 1	7.9	62,912,122	45,979,638	73.1	11.2	15.7
シヤム手術 2	8.2	65,022,532	47,911,894	73.7	11.1	15.2
シヤム手術 3	8.1	70,252,900	48,951,858	69.7	12.4	17.9
視神経挫滅 1	7.8	67,981,274	50,614,630	74.5	10.4	15.1
視神経挫滅 2	8.0	64,768,264	49,773,370	76.9	9.4	13.7
視神経挫滅 3	8.1	69,257,018	51,881,580	74.9	10.3	14.8

表 2. 定量的 RT-PCR に用いた Taqman プローブの情報

Gene symbol	Gene Accession
<i>Sprr1a</i>	Mm01962902_s1
<i>Mmp12</i>	Mm00500554_m1
<i>Sox11</i>	Mm01281943_s1
<i>Atf3</i>	Mm00476032_m1
<i>Tnfrsf12a</i>	Mm01302476_g1
<i>Hmox1</i>	Mm00516007_m1
<i>Plat</i>	Mm00476931_m19
<i>Egr1</i>	Mm00656724_m1
<i>Atf5</i>	Mm04179654_m1
<i>Ddit3</i>	Mm01135937_g1
<i>Jun</i>	Mm00495062_s1
<i>Pou4f2</i>	Mm00454754_s1
<i>Nefh</i>	Mm01191456_m1
<i>Pou4f1</i>	Mm02343791_m1
<i>Gapdh</i>	Mm99999915_g1

表 3. 軸索障害後早期に発現上昇または減少した上位 10 遺伝子

Symbol	Description	Gene accession	Fold change	P 値	FDR
発現上昇					
<i>Sprr1a</i>	Small proline-rich protein 1A	NM_009264	23.81	5.46E-05	0.026
<i>Mmp12</i>	Matrix metalloproteinase 12	NM_008605	17.82	2.80E-04	0.045
<i>Ecel1</i>	Endothelin converting enzyme-like 1	NM_021306	15.96	1.08E-03	0.054
<i>Chac1</i>	ChaC, cation transport regulator-like 1 (E. coli)	NM_026929	6.61	1.44E-05	0.022
<i>Sox11</i>	SRY-box containing gene 11	NM_009234	5.92	2.98E-04	0.045
<i>Atf3</i>	Activating transcription factor 3	NM_007498	5.34	7.10E-05	0.028
<i>Lgals3</i>	Lectin, galactose binding, soluble 3	NM_001145953	4.23	3.66E-03	0.071
<i>Phgdh</i>	3-phosphoglycerate dehydrogenase	NM_016966	4.09	3.36E-04	0.045
<i>Cdkn1a</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	NM_007669	4.03	6.92E-04	0.051
<i>Tnfrsf12a</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a	NM_013749	3.98	4.84E-04	0.048
発現減少					
<i>Gm6747</i>	Predicted gene 6747	XM_003945591	-3.53	2.17E-03	0.061
<i>Irx2</i>	Iroquois related homeobox 2 (Drosophila)	NM_010574	-2.77	3.69E-04	0.045
<i>Gm7244</i>	Predicted gene 7244	NG_019018	-2.57	3.35E-03	0.069
<i>Rasgrp2</i>	RAS, guanyl releasing protein 2	NM_011242	-2.57	2.13E-04	0.043
<i>Tppp3</i>	Tubulin polymerization-promoting protein family member 3	NM_026481	-2.55	2.27E-05	0.022
<i>Kcnd2</i>	Potassium voltage-gated channel, Shal-related family, member 2	NM_019697	-2.47	6.78E-03	0.081
<i>Opn3</i>	Opsin 3	NM_010098	-2.44	3.63E-03	0.071
<i>Ctxn3</i>	Cortixin 3	NM_001134697	-2.42	3.62E-04	0.045
<i>Pou4f2</i>	POU domain, class 4, transcription factor 2	NM_138944	-2.40	7.99E-03	0.085
<i>Pvalb</i>	Parvalbumin	NM_013645	-2.37	5.66E-04	0.048

表 4. RGC、軸索再生、小胞体ストレス、抗酸化、補体に関する遺伝子の発現変動

Symbol	Description	Gene accession	Fold change	P 値	FDR
RGC					
<i>Nefh</i>	Neurofilament, heavy polypeptide	NM_010904	-2.24	3.11E-04	0.045
<i>Pou4f1</i>	POU domain, class 4, transcription factor 1	NM_011143	-1.54	5.41E-03	0.077
<i>Pou4f2</i>	POU domain, class 4, transcription factor 2	NM_138944	-2.40	7.99E-03	0.085
<i>Pou4f3</i>	POU domain, class 4, transcription factor 3	NM_138945	1.04	NS	NS
<i>Rbpms</i>	RNA binding protein gene with multiple splicing	NM_019733	-1.62	1.43E-03	0.056
<i>Sncg</i>	Synuclein, gamma	NM_011430	-1.77	1.27E-04	0.032
<i>Thy1</i>	Thymus cell antigen 1, theta	NM_009382	-1.07	NS	NS
軸索再生					
<i>Gap43</i>	Growth associated protein 43	NM_008083	1.53	4.44E-03	0.073
<i>Sprr1a</i>	Small proline-rich protein 1A	NM_009264	23.81	5.46E-05	0.026
小胞体ストレス					
<i>Atf3</i>	Activating transcription factor 3	NM_007498	5.34	7.10E-05	0.028
<i>Atf4</i>	Activating transcription factor 4	NM_009716	1.61	5.65E-04	0.048
<i>Atf5</i>	Activating transcription factor 5	NM_030693	2.24	2.27E-03	0.062
<i>Chac1</i>	ChaC, cation transport regulator-like 1 (E. coli)	NM_026929	6.61	1.44E-05	0.022
<i>Ddit3</i>	DNA-damage inducible transcript 3	NM_007837	2.15	1.51E-03	0.056
<i>Egr1</i>	Early growth response 1	NM_007913	2.25	7.25E-04	0.051
<i>Trib3</i>	Tribbles homolog 3 (Drosophila)	NM_175093	2.89	2.98E-03	0.067
抗酸化					
<i>Hmox1</i>	heme oxygenase (decycling) 1	NM_010442	3.67	4.82E-05	0.026
<i>Srxn1</i>	sulfiredoxin 1 homolog (S. cerevisiae)	NM_029688	2.22	3.14E-04	0.045
補体					
<i>C1qa</i>	complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide	NM_007572	1.64	7.98E-03	0.085
<i>C1qb</i>	complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide	NM_009777	1.92	1.66E-03	0.058
<i>C1qc</i>	complement component 1, q subcomponent, C chain	NM_007574	1.62	4.31E-03	0.073

表 5. 軸索障害後早期におけるアイソフォーム毎の発現変動遺伝子上位 20 位のリスト

Symbol	Description	Gene accession	Fold change	FDR
<i>Sprr1a</i>	Small proline-rich protein 1A	NM_009264	22.70	3.42E-04
<i>Gal</i>	galanin	NM_010253	9.45	3.58E-02
<i>Adcyap1</i>	adenylate cyclase activating polypeptide 1	NM_009625	9.04	9.72E-03
<i>Chac1</i>	ChaC, cation transport regulator-like 1 (E. coli)	NM_026929	6.77	4.76E-06
<i>Sox11</i>	SRY-box containing gene 11	NM_009234	6.26	5.62E-05
<i>Stmn4</i>	stathmin-like 4	NM_019675	5.59	1.39E-02
<i>Fbxo44</i>	F-box protein 44	NM_173401	5.17	9.96E-02
<i>Atf3</i>	activating transcription factor 3	NM_007498	5.15	0.00E+00
<i>Smarcal1</i>	SWI/SNF related matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a-like 1	NM_018817	4.82	7.40E-02
<i>Ctnn1</i>	catenin (cadherin associated protein), alpha-like 1	NM_018761	4.33	7.98E-02
<i>Gm13889</i>	predicted gene 13889	NM_001145034	3.97	0
<i>Cdkn1a</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	NM_007669	3.91	1.22E-03
<i>Phgdh</i>	3-phosphoglycerate dehydrogenase	NM_016966	3.85	9.72E-07
<i>Hmox1</i>	heme oxygenase (decycling) 1	NM_010442	3.83	6.96E-03
<i>Tmem62</i>	transmembrane protein 62	NM_175285	3.81	9.78E-02
<i>Tnfrsf12a</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a	NM_013749	3.33	1.34E-03
<i>Cep250</i>	centrosomal protein 250	NM_177217	3.27	1.75E-02
<i>Trib3</i>	tribbles homolog 3 (Drosophila)	NM_175093	2.74	6.61E-02
<i>Stmn4</i>	stathmin-like 4	NM_019675	2.73	4.13E-05
<i>Mthfd2</i>	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NAD+ dependent), methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	NM_008638	2.49	2.22E-02

表 6. 軸索障害によって有意に変化する上位 5 つまでのパスウェイ

Category	P 値	標的分子数
Cell Death and Survival	7.45E-07-1.83E-02	45
Cellular Function and Maintenance	2.81E-06-1.83E-02	41
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	4E-06-1.83E-02	40
Molecular Transport	5.13E-05-1.17E-02	42
Small Molecule Biochemistry	5.13E-05-1.83E-02	36

表 7. Cell Death and Survival に含まれる遺伝子群のリスト

Category	P 値	Molecules	
Cell Death and Survival	7.45E-07-1.83E-02	AARS	KRT18
		ADAMTS1	LGALS3
		ADCYAP1	MMP12
		AGER	MMP9
		ATF3	NEFH
		ATF4	NRGN
		ATF5	OPN3
		C1QA	PGLYRP1
		CDKN1A	PLAT
		CHI3L1	POU4F1
		CLIC4	POU4F2
		Cr1l	PRMT2
		CX3CR1	SERPINB9
		DDIT3	SERPINF1
		DUSP1	SOX11
		EGR1	Spr1a
		FCER1G	SST
		HAX1	TAC1
		HMOX1	TNFRSF12A
		IGFBP3	TRAIP
		ITGAM	TYROBP
		JUN	ZYX
		KCND2	

表 8. 定量的 RT-PCR による RNA シークエンスデータの検証

Symbol	Description	Gene Accession	RNA シークエンス		RT-PCR	
			FC	P 値	FC	P 値
<i>Sprr1a</i>	Small proline-rich protein 1A	NM_009264	23.81	5.46E-05	232.12	2.79E-03
<i>Mmp12</i>	Matrix metalloproteinase 12	NM_008605	17.82	2.80E-04	84.75	2.27E-04
<i>Sox11</i>	SRY-box containing gene 11	NM_009234	5.92	2.98E-04	10.14	3.74E-04
<i>Atf3</i>	Activating transcription factor 3	NM_007498	5.34	7.10E-05	5.51	1.13E-02
<i>Tnfrsf12a</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 12a	NM_001161746	3.98	4.84E-04	7.57	1.27E-03
<i>Hmox1</i>	Heme oxygenase (decycling) 1	NM_010442	3.67	4.82E-05	4.50	1.53E-02
<i>Plat</i>	Plasminogen activator, tissue	NM_008872	2.26	5.63E-05	2.22	8.82E-03
<i>Egr1</i>	Early growth response 1	NM_007913	2.25	7.25E-04	4.21	2.15E-02
<i>Atf5</i>	Activating transcription factor 5	NM_030693	2.24	2.27E-03	2.82	5.50E-05
<i>Ddit3</i>	DNA-damage inducible transcript 3	NM_007837	2.15	1.51E-03	2.37	8.60E-06
<i>Jun</i>	Jun oncogene	NM_010591	2.00	1.14E-04	2.22	1.78E-03
<i>Pou4f2</i>	POU domain, class 4, transcription factor 2	NM_138944	-2.40	7.99E-03	-2.55	2.34E-06
<i>Nefn</i>	Neurofilament, heavy polypeptide	NM_010904	-2.24	3.11E-04	-2.36	3.58E-07
<i>Pou4f1</i>	POU domain, class 4, transcription factor 1	NM_011143	-1.54	5.41E-03	-2.25	1.55E-03

表 9. 軸索障害による変化を上流で制御する転写因子

Name	Predicted activation	Activation Z-score	P-value of overlap	標的分子
ATF4	Activated	3.12	8.90E-18	AARS, ASNS, ATF3, CDKN1A, DDIT3, GARS, LGALS3, MTHFD2, PSAT1, SARS, SERPINF1, SHMT2, SLC7A3, SLC7A5, TNFRSF12A, TRIB3
TP53	Activated	2.44	2.83E-05	ATF3, ATG10, C1QC, CDKN1A, CLIC4, DUSP1, HMGN2, HMOX1, IFI30, IGFBP3, KRT18, LGALS3, MMP9, SERPINB9, SESN2, TMEM43, TRIB3
NFE2L2	Activated	2.13	4.79E-03	ADCYAP1, ARHGEF3, CELA1, FXYD1, HAX1, HMOX1, PSAT1, SRXN1
DDIT3	Activated	2.00	3.20E-06	ATF3, ITGAM, SARS, TRIB3

フィッシャーの正確検定により検定。 $P < 0.05$ かつ $|Z\text{-score}| \geq 2$ を有意差ありと判定した。

11. 謝辞

本研究を遂行し学位論文を作成するにあたり、多くのご支援とご指導を賜りました、東北大学医学系研究科眼科学分野中澤徹教授、同分野田中佑治助教、西口康二助教、劉孟林助教に厚く御礼申し上げます。また、本論文作成にあたり、審査委員として多くの助言をいただきました、阿部俊明教授、永富良一教授、宮田敏男教授、永井展裕助教には深く感謝申し上げます。次世代シーケンサーによる解析におきましては、御支援を賜りました理化学研究所オミックス基盤研究領域林崎良英先生、眞鍋理一郎先生、田上道平先生、近藤直人先生、山本由美子氏、CLCバイオジャパン宮本真理氏、解析プラットフォームを提供してくださった国立遺伝学研究所に厚く御礼申し上げます。また実験面でサポートしていただいた東北大学医学系研究科眼科学分野佐藤順子氏に深く感謝申し上げます。