

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10002

研究課題名(和文) 視神経傷害におけるタウオパチーの関与と、mTOR活性の制御を介した治療効果の検討

研究課題名(英文) Involvement of tauopathies in optic nerve injuries and therapeutic possibilities through the regulation of mTOR pathway.

研究代表者

奥 英弘 (Oku, Hidehiro)

大阪医科薬科大学・医学部・教授

研究者番号：90177163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：視神経傷害でタウオパチーが網膜神経節細胞死に関与している可能性を検討した。ラット視神経挫滅モデルを用いた。siRNAでtau遺伝子をknockdownし、RGCに対して神経保護的に作用しているか検討した。リン酸化tau、P62、LC3Bの発現変化はimmunoblotと免疫組織化学的に検討した。網膜ではP62がcontrolの3.1倍に増加しており、LC3B2/LC3B1比の減少が認められた。リン酸化tauは2.1倍に増加しており、tauをknockdownした群では、1.3倍の増加にとどまった。tauの蓄積が病的に有意な作用を持っており、視神経傷害にタウオパチーの関与が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

tauは中枢神経系の軸索機能維持に必須のタンパクであるが、軸索が傷害されるとリン酸化され重合し、不溶性タンパクとなり神経細胞体に蓄積される特徴を持つ。tauの蓄積から生じる神経変性はタウオパチーと総称されるが、一般には中枢神経系の慢性変性疾患との関連が示唆されている。視神経は網膜神経節細胞の軸索の集合体であるが、緑内障視神経症による網膜神経節細胞死に、tauの蓄積が関与していることが示されていた。本研究の結果、急性の視神経傷害にもタウオパチーが関与していることを示している。様々な視神経疾患を、タウオパチーの関連から研究する必要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We determined whether tauopathy is associated with impaired autophagy and involved in the death of retinal ganglion cells (RGCs) of rats from an optic nerve crush (ONC). The tau gene siRNA was injected intravitreally to knockdown of tau gene. The effects on neuroprotection were determined by the density of RGCs. The changes in the expressions of phosphorylated tau, P62, and LC3B were determined by immunoblot and immunohistochemistry (IHC). Autophagy was impaired in the retina, as P62 increased by 3.1-fold from that of the control with a reduction of LC3B2/LC3B1. There was a 2.1-fold increase of phosphorylated tau in the retina and siTau depressed the increase by 1.3-fold. Expressions of tau and P62 were well co-localized. Pretreatment by siTau showed significant protection of RGCs. Silencing the tau gene is neuroprotective, and tauopathy may be involved in the death of RGCs after ONC. Impaired autophagy may be involved in the ONC-induced tauopathy.

研究分野：眼科学

キーワード：タウオパチー 視神経傷害 オートファジー 網膜神経節細胞 P62

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

tau は中枢神経系の軸索機能維持に必須のタンパクであるが、様々な原因で軸索が傷害されるとリン酸化され重合し、不溶性タンパクとなり神経細胞体に蓄積される特徴を持つ。その結果、軸索輸送は障害され神経細胞死に至る。tau の蓄積から生じる神経変性は tauopathy と総称されるが、一般には Alzheimer 病に代表される、中枢神経系の慢性変性疾患との関連が示唆されている。視神経は網膜神経節細胞 (retinal ganglion cell: RGC) の軸索の集合体であるが、実験的緑内障で tau を knockout すると、RGC が保護されることが示されている。この所見は、緑内障視神経症による網膜神経節細胞死に、tau の蓄積が関与していることを示している。一方で、様々な視神経疾患は普遍的に軸索傷害を伴い、RGC の細胞死をもたらすが、tau の蓄積が RGC の細胞死に病的意義を持っているかを検討する必要がある。

2. 研究の目的

神経変性疾患を対象に、脳病理を用いて tauopathy の研究が積極的に行われている。しかし tauopathy の概念で視神経疾患をとらえた報告は依然少なく、今後の研究課題として残されている。また神経変性疾患モデルの脳病理は、発症に時間がかかり、また再現性に問題がある。

視神経挫滅モデル(optic nerve crush: ONC)は、球後視神経を挫滅して軸索を傷害する実験系で、逆行性軸索変性は RGC におよび apoptosis を生じる。RGC の細胞密度は ONC 後 day7 には約 50%にまで減少する。ONC の実験系を用いて RGC に tau の蓄積が生じているか、また tau の蓄積が病的な意義を持っているか、さらに tau の蓄積がどのような機序で生じるかなどを明らかにすることを目的に研究を行った。

不要なタンパクや構造異常を伴う細胞内小器官などは、autophagy により分解される。軸索障害により RGC に tau の蓄積をともなう機序として、autophagy の障害が生じている可能性を考え研究を行った。その研究過程で、糖尿病により生じる視細胞での autophagy 障害が、糖尿病網膜症発症に関与している可能性が考慮されたので、この実験系についても検討した。

3. 研究の方法

ラット視神経を球後 2mm の部位で挫滅する ONC モデルを作成した。ONC 後 day7 で網膜を摘出し、flatmount を作成し、RGC を Tuj-1 で染色し、細胞死と tau タンパクの蓄積の関連を免疫組織学的に検討した。リン酸化 tau の発現変化は immunoblot で検討した。さらに tau の蓄積が病理学的に有意な作用をおよぼしているかについて、siRNA を用いて tau 遺伝子を knockdown し、tau の減少が RGC に対して神経保護的に作用しているかについて検討した。ONC により tau の蓄積が増加する機序として、autophagy の障害を介している可能性を考えた。これについては、ONC 後の autophagy の機能を、その関連するタンパクである P62 と LC3 の発現変化で検討した。また RGC における tau の発現と、P62、LC3 の発現を免疫組織学的に検討した。

治療面では mTOR 系を介した介入の可能性を検討した。rapamycin に代表される mTOR 阻害剤は、translation を制御して異常たんぱくの生成を抑制し、さらに autophagy を促進して、その分解を促進する可能性が示唆されている。視神経挫滅モデルを用いて、rapamycin 投与群と非投与群で、autophagy の状態、RGC 密度などに差が生じ、mTOR 系の阻害が治療効果を発揮する可能性についても検討した。

4. 研究成果

ONC により、autophagy は障害されているのが観察された。day7 の網膜では、P62 が sham control の 3.1 倍に増加しており、LC3B2/LC3B1 比の減少が認められた。リン酸化 tau (ser 396) は 2.1 倍に増加しており、siRNA で tau 遺伝子を knockdown した群では、1.3 倍の増加にとどまった。免疫組織学的には P62 と tau の発現が一致していた(図 1)。

したがって不良な tau は autophagy により分解処理される可能性が高く示唆された。さらに tau 遺伝子の knockdown により、RGC 密度の減少が有意に抑制され、tau の蓄積が病的に有意な作用を持っていることが明らかになった (図 2)。

mTOR 阻害剤である rapamycin (2.0 mg/kg) を 3 日間腹腔内投与すると、day7 網膜におけるリン酸化 S6K の発現は有意に抑制され mTOR 系は阻害されること、同時に P62 の発現は減少し、autophagy は促進されることが確認できた。RGC 密度でも有意な神経保護作用が確認され、ONC では autophagy が障害され、autophagy の促進が神経保護的に作用することが示唆された。

マウス視細胞株である 661W を用い、高糖濃度培地で autophagy 阻害剤である 3 methyl adenine (3MA) を投与した場合、mitophagy が障害され、不純なミトコンドリアが蓄積し、活性酸素腫が蓄積される結果がえられた。この視細胞由来の活性酸素が、糖尿病網膜症の発症にも関与している可能性が示唆された。

本研究の結果は、急性の視神経傷害にも tauopathy が関与していることを示唆している。様々な視神経疾患で、tauopathy が関与している可能性も考えられ、今後の検討課題である。

一方で Alzheimer 病では、同年齢の健常者に比べ網膜神経節細胞の減少がみられ、視覚障害が生じていることが知られている。その機序にも網膜神経節細胞へ蓄積された tau の関与が考え

られている。neuroimaging を用い、脳への tau タンパクの蓄積をみようとする研究が試みられているが、網膜へも研究を広げる意義があると考えられる。

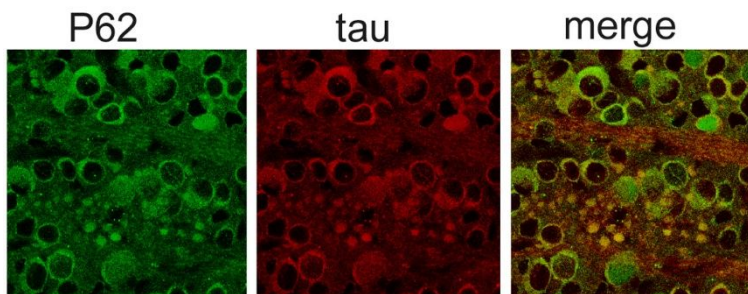


図1 . 網膜神経節細胞における P62 と tau. 両者の発現は良く一致している。

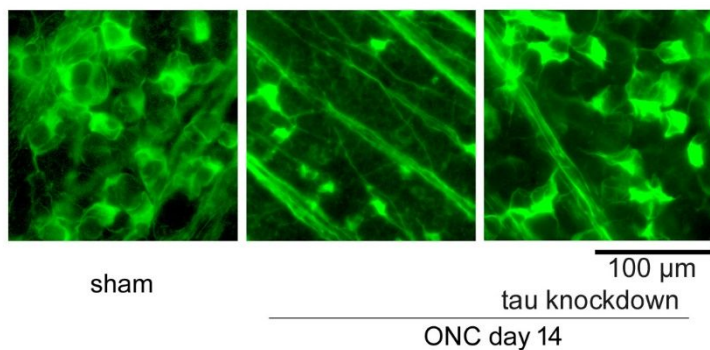


図2 . tau knockdown による神経保護作用。ONC day14 の網膜神経節細胞。tau knockdown により網膜神経節細胞が保護されている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Osuka S, Kida T, Oku H, Horie T, Morishita S, Fukumoto M, Sato T, Ikeda T.	4. 巻 21
2. 論文標題 Effects of an Aquaporin 4 Inhibitor, TGN-020, on Murine Diabetic Retina.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 2324-2327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21072324.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mizuno H, Fukumoto M, Sato T, Horie T, Kida T, Oku H, Nakamura K, Jin D, Takai S, Ikeda T.	4. 巻 21
2. 論文標題 Involvement of the Retinal Pigment Epithelium in the Development of Retinal Lattice Degeneration.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 7347-7357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21197347	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Taki K, Horie T, Kida T, Mimura M, Ikeda T, Oku H.	4. 巻 21
2. 論文標題 Impairment of Autophagy Causes Superoxide Formation and Caspase Activation in 661 W Cells, a Cell Line for Cone Photoreceptors, under Hyperglycemic Conditions.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 4240-4251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21124240	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Oku H, Kida T, Horie T, Taki K, Mimura M, Kojima S, Ikeda T.	4. 巻 60
2. 論文標題 Tau Is Involved in Death of Retinal Ganglion Cells of Rats From Optic Nerve Crush	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Invest Ophthalmol Vis Sci.	6. 最初と最後の頁 2380-2387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.19-26683.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kida T, Oku H, Horie T, Osuka S, Fukumoto M, Ikeda T.	4. 巻 257
2. 論文標題 Protein kinase C-mediated insulin receptor phosphorylation in diabetic rat retina.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 1427-1434.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00417-019-04324-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 廣川 貴久, 奥 英弘, 堀江 妙子, 喜田 照代, 池田 恒彦
2. 発表標題 Tau蛋白リン酸化抑制による神経保護作用の検討
3. 学会等名 第124回日本眼科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣川 貴久, 奥 英弘, 堀江 妙子, 喜田 照代, 池田 恒彦
2. 発表標題 tauリン酸化抑制による神経保護作用の検討
3. 学会等名 日本眼科学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	小嶌 祥太 (Kojima Shota) (10388259)	大阪医科薬科大学・医学部・教授 (34401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	池田 恒彦 (Ikeda Tsunehiko) (70222891)	大阪医科薬科大学・医学部・名誉教授 (34401)	
研究分担者	喜田 照代 (Kida Teruyo) (90610105)	大阪医科薬科大学・医学部・教授 (34401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関