

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K18894

研究課題名（和文）p38-p62シグナル阻害を介した視神経軸索保護機構解明

研究課題名（英文）Elucidation of optic nerve protection via inhibition of p38-p62 signal

研究代表者

佐瀬 佳奈（Sase, Kana）

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：30821904

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）：視神経軸索保護作用を示すオートファジー誘導体であるAkebia Saponin D (ASD) は、MAPKも抑制する事が報告されている。ウェスタンブロットでTNFによりp-p38、p62共に発現が上昇しそれをASDが抑制するが、発現上昇のピークがp-p38は硝子体注射1週後に対しp62は1-2週後であることからp38がp62の上流に存在する可能性が考えられた。p38阻害剤であるSB203580は形態的に軸索保護作用を示しTNFにより上昇したp62の発現を低下させることから、p38の抑制を介したオートファジーの上昇が軸索保護作用に寄与していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑内障患者で薬剤、手術により十分な眼圧下降が得られても視野障害の進行を阻止できない患者には眼圧非依存性の根本的治療が必要である。緑内障の病態は視神経軸索障害であることは視神経乳頭のリムの菲薄化と一致する神経線維層欠損から明らかであり、視神経軸索保護効果を有する様々な治療が期待される。p38は多くの炎症系疾患に関与しているとされており、関節リウマチの治療薬としてp38阻害剤が臨床試験まで進んでいる。p38はすでに安全性が確立されたものの中で視神経軸索保護効果を示すものを明らかにできれば、投与経路等も検討した上で、将来的に緑内障治療の新たな選択肢を見出せる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Akebia Saponin D (ASD), an autophagy inducer, exert axonal protection in optic nerve. A previous report showed that ASD suppress MAPK signals. The result of western blot showed that the expression of p-p38 and p62 was significantly elevated by TNF injection and this elevation was significantly suppressed by ASD. The peak of p-p38 elevation was 1 week after TNF injection, whereas significant elevations of p62 were observed at both 1 and 2 weeks, implicating that p-p38 exists upstream of p62. Treatment with ASD can inhibit this pathway, thereby exerting axonal protection. SB20350, p38 inhibitor showed significant axonal protection in TNF-induced optic nerve degeneration model. The result of western blot showed the level of p62 was significantly increased by TNF injection. This TNF-increased p62 expression was significantly decreased by SB203580. These results suggest that inhibition of p38 exerts axonal protection with upregulated autophagy in TNF-induced optic nerve damage.

研究分野：緑内障視神経保護

キーワード：オートファジー p62 p-p38

1. 研究開始当初の背景

緑内障患者で薬剤、手術により十分な眼圧下降が得られても視野障害の進行を阻止できない患者には眼圧非依存性の根本的治療が必要である。緑内障の病態は視神経軸索障害であることは視神経乳頭のリムの菲薄化と一致する神経線維層欠損から明らかであり、視神経軸索保護効果を有する様々な治療が期待される。ある種の緑内障では TNF の関与が指摘されており、我々は以前 TNF 誘発視神経障害モデルでオートファジー活性上昇により軸索保護につながることを見出している(Sase et al., *Front Cell Neurosci*, 2015)。

Akebia Saponin D (ASD)は植物から抽出される生理活性物質で、背部痛やリウマチ性関節痛の治療に対して使用している国もありオートファジー誘導体として知られている。また、PC12 細胞において Amyloid- β による細胞毒性に対する保護や (Zhou et al., *Cell Biol Int*, 2009)、ラットにおいて ASD 投与により記憶障害が改善したとの報告がある (Yu et al., *Behav Brain Res*, 2012)。そこで視神経においても TNF 誘発視神経障害モデルに対する ASD の作用を検討すると、オートファジーフラックスのマーカーである p62 (上昇により停滞、下降によりフラックス上昇) は視神経において TNF で有意に上昇し、その上昇を ASD は有意に抑制した。このことは ASD がオートファジーフラックスを上昇させることを示している。さらに TNF 誘発視神経障害モデルで ASD の硝子体注射により有意な視神経軸索保護作用が認められた。また、ASD による記憶障害改善のメカニズムに MAPK シグナルの抑制が関与しているのではないかとされている (Yu et al., *Pharmacol Biochem Behav*, 2012)。そこで ASD による視神経軸索保護効果にも MAPK シグナルの抑制が関与している可能性が考えられそれについて検討しようと考えた。

2. 研究の目的

MAPK ファミリーのうち p38 に注目して TNF 誘発視神経障害モデルでの phosphorylated-p38 の発現について検討すると、ラットの視神経において TNF 硝子体注射で p-p38 の発現は有意に上昇することが最近確認できた。さらに ASD により p-p38 の発現上昇は有意に抑制される事がわかった。前述の通り ASD で視神経保護効果が認められており、視神経においても p-p38 の抑制により神経保護に寄与するのではないかと考えている。

既に視神経挫滅モデルにおいて p38 阻害剤が網膜神経節細胞死を抑制したとの報告があるが (Katome T et al., *Cell Death Differ*, 2013)、視神経での p38 の発現を検討した報告はない。また p38 阻害により視神経が組織学的に保護されたかどうかの検討も報告がない。オートファジーと p38 の関係はほとんど知られていないが、マウスのパーキンソン病モデルにおいて rapamycin の新しい誘導体である temsolorimus によって神経保護効果が認められ、さらに MAPKp38 の発現が有意に抑制されていることが報告されている (Siracusa R et al., *Mol Neurobiol*, 2018)。このことから視神経保護のメカニズムにも MAPK シグナルの抑制とオートファジーが関与しているのではないかと考えられる。さらに、p38 は多くの炎症系疾患に関与しているとされており、関節リウマチ等で p38 阻害剤が臨床試験まで進んでいる。p38 の抑制により視神経軸索保護作用が認められるのであれば、投与経路も検討する必要があるが緑内障治療の新たな選択肢としての可能性を見出していきたい。

3. 研究の方法

ラットを用いて、PBS 硝子体注射 (= control 群)、TNF 硝子体注射群、p-p38 阻害剤 (SB203580) 単独投与群、TNF と同時 SB203580 を投与した群を作成した。神経軸索保護効果の検討を行う為、各群硝子体注射から 2 週後に視神経を摘出し、プラスチック切片作成後 PPD 染色し Aphilion software で定量化した。各群において硝子体注射から 1 週間後に摘出した視神経をサンプルに immunoblot でオートファジー関連因子である p62 や LC3 の発現を評価した。各群において LC3 と neurofilament の免疫染色で軸索内の LC3 の immunopositive dots の評価を行った。また、control 群と TNF 群では視神経における p-p38 と p62 の局在を免疫染色で確認した。

4. 研究成果

p38 阻害剤はこれまでに報告されている網膜神経節細胞死を保護するだけでなく、視神経軸索にも保護効果があることがわかった。以前 TNF による p-p38 と p62 の発現上昇をオートファジー誘導体である ASD が抑制する事を報告しているが、今回 TNF 群の免疫染色で神経線維内において p-p38 と p62 の局在の一致を認めた。また、ウエスタンブロットでは p-p38 と p62 の発現上昇のピークに時間差があることから p-p38 は p62 の上流に存在するのではないかと考えられ、p38 阻害剤である SB203580 を用いて検証した。ウエスタンブロットで SB203580 は TNF

による p62 の発現上昇を有意に抑制した。更にオートファジーのマーカとして知られている LC3-II は control 群、TNF 群共に SB203580 投与により発現上昇を認めた。免疫染色でも control 群、TNF 群ともに神経線維内に認められる LC3 の dot が SB203580 投与により増強される結果を得ることが出来た。

これらの結果から視神経において p-p38 は p62 の上流に位置し、p38 阻害によりオートファジーを活性化し軸索保護作用につながる事が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4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 Sase Kana, Tsukahara Chihiro, Fujita Naoki, Arizono Ibuki, Otsubo Mizuki, Kitaoka Yasushi	4. 巻 43 (9)
2. 論文標題 Inhibition of p38 ameliorates axonal loss with modulation of autophagy in TNF-induced optic nerve damage	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 3067-3074
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10792-023-02706-1	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 Kitaoka Y, Sase K, Tsukahara C, Fujita N, Arizono I, Kogo J, Tokuda N, Takagi H	4. 巻 63
2. 論文標題 Axonal Protection by Netarsudil, a ROCK Inhibitor, Is Linked to an AMPK-Autophagy Pathway in TNF-Induced Optic Nerve Degeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Invest Ophthalmol Vis Sci.	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.63.1.4.	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 上杉康雄, 徳田直人, 山田雄介, 豊田泰大, 塚本彩香, 塚原千広, 佐瀬佳奈, 北岡康史, 高木均	4. 巻 39
2. 論文標題 病因別血管新生緑内障に対する線維柱帯切除術の長期成績	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 あたらしい眼科	6. 最初と最後の頁 354-357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Sase Kana, Tsukahara Chihiro, Fujita Naoki, Arizono Ibuki, Takagi Hitoshi, Kitaoka Yasushi	4. 巻 47
2. 論文標題 Akebia Saponin D prevents axonal loss against TNF-induced optic nerve damage with autophagy modulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Biology Reports	6. 最初と最後の頁 9733 ~ 9738
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11033-020-06008-y	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 Fujita Naoki, Sase Kana, Tsukahara Chihiro, Arizono Ibuki, Takagi Hitoshi, Kitaoka Yasushi	4. 巻 48 (1)
2. 論文標題 Penafibrate prevents retinal neuronal cell death in NMDA-induced excitotoxicity via inhibition of p-c-Jun expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Biology Reports	6. 最初と最後の頁 195 ~ 202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11033-020-06032-y	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 Kitaoka Yasushi, Sase Kana, Tsukahara Chihiro, Fujita Naoki, Arizono Ibuki, Takagi Hitoshi	4. 巻 57
2. 論文標題 Axonal Protection by Nicotinamide Riboside via SIRT1-Autophagy Pathway in TNF-Induced Optic Nerve Degeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 4952 ~ 4960
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12035-020-02063-5	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 -

[学会発表] 計9件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 佐瀬佳奈、塚原千広、藤田直樹、有菌生吹、北岡康史
2. 発表標題 TNF誘発視神経障害モデルにおけるp38阻害剤の保護作用
3. 学会等名 第33回日本緑内障学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤田直輝、塚原千広、佐瀬佳奈、北岡康史、高木 均
2. 発表標題 網膜神経節細胞障害モデルラットに対するペマフィブラート内服による神経保護効果
3. 学会等名 第13回神奈川眼科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北岡康史, 塚原千広, 佐瀬佳奈, 藤田直輝, 有蘭生吹, 高木 均
2. 発表標題 AMPKとTNF視神経障害モデル
3. 学会等名 第41回日本眼薬理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塚原千広, 佐瀬佳奈, 藤田直輝, 有蘭生吹, 高木 均, 北岡康史
2. 発表標題 TNF誘発視神経障害モデルにおけるNFAT c 阻害剤の軸索保護効果とIL-1
3. 学会等名 第41回日本眼薬理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 有蘭生吹, 藤田直輝, 塚原千広, 佐瀬佳奈, 高木 均, 北岡康史
2. 発表標題 高眼圧モデルにおけるnicotinamide riboside (NR) による軸索保護効果
3. 学会等名 第41回日本眼薬理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐瀬佳奈
2. 発表標題 網膜神経節細胞の蛋白発現異常と緑内障病態
3. 学会等名 第31回日本緑内障学会 シンポジウム3 緑内障の細胞機能異常と治療 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐瀬佳奈、塚原千広、藤田直輝、有菌生吹、高木 均、北岡康史
2. 発表標題 TNF誘発視神経障害モデルにおけるp38阻害剤の視神経軸索保護作用
3. 学会等名 第40回 日本眼薬理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐瀬 佳奈
2. 発表標題 MAPKp38シグナル抑制による視神経軸索保護作用とオートファジー
3. 学会等名 第123回日本眼科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐瀬 佳奈
2. 発表標題 TNF誘発視神経障害モデルに対するオートファジーとMAPK p - p 38の関与
3. 学会等名 第39回日本眼薬理学会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------