

平成 22 年 4 月 27 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20791285  
 研究課題名 (和文) TNF- $\alpha$  誘発視神経障害における軸索輸送物質とマイクログリアの分子生物学的関係  
 研究課題名 (英文) Molecular relationship between axonal transported substance and microglia in TNF- $\alpha$ -induced optic neuropathy  
 研究代表者  
 北岡 康史 (KITAOKA YASUSHI)  
 聖マリアンナ医科大学・医学部・講師  
 研究者番号：10367352

研究成果の概要 (和文)：軸索内物質として Nmnat1 とその下流物質である NAD が、TNF- $\alpha$  誘発視神経障害に先行し視神経内で減少すること、しかしそれらは網膜では変化がないことが判明した。外因性の NAD により、TNF- $\alpha$  による軸索数減少は有意に抑制され、microtubules の構造も保たれた。NAD により TNF- $\alpha$  によるマイクログリアの活性は有意に抑制された。一方、軸索の周りのオリゴデンドロサイトの p-CREB と BDNF が軸索保護機構に関わっていることが判明した。このように軸索保護機序を軸索側の因子と周りのグリア側の因子から解明した (J Neuropathol Exp Neurol, 2009; Acta Neuropathol, 2009)。

研究成果の概要 (英文)：The levels of Nmnat1 mRNA and protein and of NAD were significantly decreased in the optic nerve but not in the retina in TNF-induced optic neuropathy. Exogenous NAD significantly prevented TNF-induced axonal loss and led to the preserved organization of microtubules. The TNF-induced microglial activation was significantly inhibited by NAD treatment. On the other hands, p-CREB and BDNF in oligodendrocytes may serve as a protective moderator for optic nerve axons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：TNF- $\alpha$ , 視神経, Nmnat1, 緑内障, マイクログリア, Neurofilament, Trx1, エストロゲン

## 1. 研究開始当初の背景

緑内障は眼圧上昇等により網膜神経節細胞の軸索である視神経が障害を起し、神経節細胞の細胞体も死に向かう。本邦では眼圧が高くな

い正常眼圧緑内障の頻度が高く、眼圧下降以外に神経節細胞死をいかに阻止できるかが期待されている。一方、近年緑内障患者の視神経乳頭と網膜において、TNF- $\alpha$  と TNF-R1 の発

現が上昇していると報告されており (Yan et al. Arch Ophthalmol, 2000, Tezel et al. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001)、緑内障の病態生理において TNF- $\alpha$  が何らかの役割を演じていることが示唆されてきた。緑内障モデルである DBA/2J マウスの網膜神経節細胞の細胞体死には pro-apoptotic 因子である BAX が関係しているが、その視神経軸索変性には関係しないことが報告されており (Libby et al., PLoS Genet, 2005)、細胞体死と軸索変性の機序は異なると考えられる。我々はこれまでに、視神経原発の軸索障害モデルとして、TNF- $\alpha$  誘発視神経障害モデルを報告したが (Kitaoka et al., Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006)、どのような機序で軸索変性が神経節細胞死より先行するのか明らかになっていない。細胞体死と軸索変性の異なる機序解明がすすめば軸索保護に有効な経路を発見することにつながり、正常眼圧緑内障の効果的治療の確立に寄与すると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では TNF- $\alpha$  誘発視神経障害モデルを用い、軸索変性に関与する因子を、microtubules を含む軸索側の因子と、マイクログリアやオリゴデンドロサイトなど周りのグリア側の因子とそれぞれ明らかにし、軸索保護の観点から革新的な神経保護治療法を確立する。

## 3. 研究の方法

(1) TNF- $\alpha$  の硝子体注射 雄性ラットに麻酔下で TNF- $\alpha$  (10ng) の硝子体注射を  $2\mu\text{l}$  施行し、1日後、1週間後、2週間後、1ヶ月後、2ヶ月後に眼球を視神経ごと摘出する。コントロールとして PBS の硝子体注射を他眼に行う。

(2) 視神経の形態的評価 眼球より 2mm の位置で視神経を切断し、その場所より薄切横断切片を作製し染色後デジタルカメラで写真を撮り、コンピューターソフトウェアで軸索直径別の軸索数を解析する。

(3) 神経節細胞の形態的評価 TNF- $\alpha$  硝子体注射の 1 週間前に Fluorogold のラベリングを中脳上丘から施行し、硝子体注射後 2 ヶ月後に網膜伸展標本を作製し視神経節細胞数を評価する。

(4) 視神経の分子生物学的評価 ラットの視神経は眼球附着部から 4mm までを単離し、軸索障害に関係する Nmnat1、神経栄養因子 (BDNF) と転写調節因子 (CREB) の抗体に対するウェスタンブロットを行う。また視神経、網膜から Total RNA を抽出し、上記に対するプライマーを用い Real-time PCR で mRNA 量を定量する。

(5) 網膜神経節細胞の分子生物学的評価 網膜は total retina に加えマグネティックビーズ法で神経節細胞のみを抽出し分子生物学的出来事を検出する。

(6) 視神経及び網膜の免疫組織学的評価 視神経、網膜の垂直切片を用い、マイクログリアの

マーカーである ED-1、OX-42、Iba1、オリゴデンドロサイトのマーカーである myelin basic protein、軸索のマーカー neurofilament、軸索障害に関係する Nmnat1、更に神経栄養因子 (BDNF、NGF) とその上流の転写調節因子 (CREB) に対する抗体を使用し免疫組織化学染色を行う。

(7) 当該蛋白下流物質の視神経での量 蛋白の中でも Nmnat1 の下流の代謝産物 (NAD) の量を HPLC で視神経、網膜別に測定する。

(8) 当該蛋白の役割 in vivo TNF- $\alpha$  誘発視神経障害モデルを使用し、当該蛋白に対する siRNA、AS ODN、decoy、あるいはプラスミドは electroporation を用いて導入局所の強制発現を利用し、コンピューターソフトウェアを用いて軸索数を評価する。siRNA、AS ODN は Cy3 や Rhodamine で、ベクターやプラスミドは GFP で取り込みを確認する。それらの当該蛋白の経路によっては、activator や inhibitor として働く compound の軸索保護の有効性も明らかにする。

## 4. 研究成果

まず軸索の周りのグリア側の因子として、TNF- $\alpha$  硝子体注射により、視神経において内因性のリン酸化 cyclic AMP-response element binding protein (CREB) と Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) が一過性に上昇することを確認した。このとき網膜の BDNF の発現に有意な変化は認められなかった。CRE decoy オリゴヌクレオチドは p-CREB が CRE 領域に結合するのを阻害する。このオリゴヌクレオチドにより、TNF- $\alpha$  による視神経における内因性の BDNF 上昇は有意に抑制された。オリゴヌクレオチド単独では視神経軸索に変化は認めなかったが、TNF- $\alpha$  と組み合わせることで、TNF- $\alpha$  による軸索数減少は有意に増強された。また、CRE decoy オリゴヌクレオチドにより内因性 BDNF の上昇は有意に抑制され、BDNF は下流に存在することが明らかとなった。このことより一過性内因性 p-CREB および BDNF の上昇は、内因性の保護機構であることが示唆された。外因性の BDNF は強い軸索保護効果を示したが、その際 p-CREB と内因性の BDNF を上昇させた。さらに p-CREB も BDNF もその局在は、視神経軸索ではなく、むしろオリゴデンドロサイトであった。つまり外因性の BDNF の軸索保護効果には、オリゴデンドロサイトに存在する p-CREB と内因性の BDNF が関与し、隣接する軸索に働きかけていると考えられた (Acta Neuropathol, 2009)。このように視神経軸索保護を考えるとき周りのグリア細胞を介する保護経路があることが示唆された。次に軸索側の因子として、TNF- $\alpha$  硝子体注射後、視神経においては Nmnat1 mRNA が 1 日後と 1 週間後に減少し、Nmnat1 蛋白も 1 週間後には減少していた。この Nmnat1 は視神経においてはニューロ

フィラメントと共存していた。網膜においては神経節細胞と共存しており、この細胞の生存や死に関与している可能性が考えられた。しかしながら網膜をサンプルにした mRNA や蛋白の結果は、いずれも TNF- $\alpha$  硝子体注射後 Nmnat1 は有意な変化を認めなかった。さらに Nmnat1 の下流の因子である nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) 量を視神経と網膜において HPLC で測定した。Nmnat1 の結果に一致して、視神経でのみ減少を認め、網膜では減少を認めなかった。視神経での NAD 減少は 1 週間で認められ、Nmnat1 の発現の減少と NAD 量の減少は組織学的な視神経障害に先行しており、それらの減少は軸索障害に関与していると考えられた。また、外因性の NAD により TNF による軸索減少が有意に抑制された。NAD の軸索保護効果は電子顕微鏡レベルでも確認し microtubules の構造も保たれていた。さらに TNF- $\alpha$  によるマイクログリアの活性は、外因性 NAD により有意に抑制されたため、NAD の軸索保護効果にはマイクログリアの活性抑制が関与していることが示唆された (J Neuropathol Exp Neurol, 2009)。さらに他の軸索側の因子として、thioredoxin1(Trx1) に注目した。TNF- $\alpha$  により軸索の Trx1 は減少し、エストロゲンにより Trx1 は増加、さらに軸索減少もほぼ抑制された。エストロゲンの軸索保護効果は Trx1 の抑制により打ち消された。このように Nmnat1 のみならず Trx1 も軸索保護に関与していると考えられた。

#### 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 3 件)

- ① Kitaoka Y, et al. (他 9 名). Axonal and cell body protection by nicotinamide adenine dinucleotide in tumor necrosis factor-induced optic neuropathy. J Neuropathol Exp Neurol. 68:915-927, 2009. 査読 有
- ② Fujino H, Kitaoka Y, et al. (他 6 名). Axonal protection by brain-derived neurotrophic factor associated with CREB phosphorylation in tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced optic nerve degeneration. Acta Neuropathol. 117:75-84, 2009 査読 有
- ③ Munemasa Y, Kitaoka Y, et al. (他 6 名). Effects of unoprostone on

phosphorylated extracellular signal-regulated kinase expression in endothelin-1-induced retinal and optic nerve damage. Vis Neurosci.25:197-208, 2008. 査読 有

[学会発表] (計 9 件)

- ① 北岡康史, (他 8 名)、TNF- $\alpha$  誘発視神経軸索障害及び RGC-5 細胞死におけるエストロゲンの保護効果に Trx1 が関係する、第 20 回日本緑内障学会、2009 年 11 月 14 日、沖縄
- ② 宗正泰成、北岡康史, (他 2 名)、緑内障性視神経症におけるミトコンドリア外膜の透過性制御と神経保護の可能性、第 20 回日本緑内障学会、2009 年 11 月 14 日、沖縄
- ③ 栗林純子、北岡康史、他 3 名、NMDA 硝子体投与後早期における軸索変性機序の解明、第 20 回日本緑内障学会、2009 年 11 月 14 日、沖縄
- ④ 北岡康史, (他 3 名)、視神経軸索障害モデルの網膜神経節細胞死の比較検討、第 29 回日本眼薬理学会、2009 年 9 月 12 日、品川
- ⑤ Munemasa Y, Kitaoka Y, (他 2 名). Modulation of mitochondrial function in the optic nerve of rat glaucoma model. 2009 ARVO annual meeting, May 6, 2009, Florida
- ⑥ Kitaoka Y, (他 3 名). Involvement of Trx1 in protective effect of 17 $\beta$ -estradiol against TNF- $\alpha$ -induced axonal and cell body degeneration. 2009 ARVO annual meeting, May 4, 2009, Florida
- ⑦ 北岡康史、シンポジウム 3「緑内障治療の未来」視神経変性の分子機構と軸索保護、第 19 回日本緑内障学会、2008 年 9 月 13 日、大阪
- ⑧ Kitaoka Y, Kitaoka Y, (他 4 名). Distribution of ROCK2 in TNF- $\alpha$ -induced optic nerve degeneration. 2008 ARVO annual meeting, April 30, 2008, Florida
- ⑨ Kitaoka Y, (他 9 名) . Decreased Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD) levels and the effect of exogenous NAD on microglia activation in TNF- $\alpha$ -induced optic nerve degeneration. 2008 ARVO annual meeting, April 30, 2008, Florida
- ⑩ Fujino H, Kitaoka Y, (他 4 名) . Phosphorylation of CREB and up-regulation of BDNF in TNF- $\alpha$ -induced optic nerve degeneration. 2008 ARVO annual meeting, April 30, 2008, Florida
- ⑪ Hayashi Y, Kitaoka Y, (他 3 名) .

Involvement of ER $\alpha$  in protective effect of 17 $\beta$ -estradiol against TNF- $\alpha$ -induced optic nerve degeneration. 2008 ARVO annual meeting, April 30,2008, Florida

- ⑫ Takeda H, Kitaoka Y, (他 4 名) . Early elevation of OX2 antigen and OX2 receptor in TNF- $\alpha$ -induced optic nerve degeneration. 2008 ARVO annual meeting, April 29,2008, Florida

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北岡 康史 (KITAOKA YASUSHI)  
聖マリアンナ医科大学・医学部・講師  
研究者番号 : 10367352

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし