

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592683

研究課題名(和文) 視神経軸索障害における セクレターゼとオートファジーの分子制御機構の解明

研究課題名(英文) Modulation of gamma-secretase and autophagy in optic nerve axonal degeneration

研究代表者

北岡 康史 (KITAOKA, YASUSHI)

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10367352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：視神経軸索障害が細胞体死より先行するTNFモデルを用いて、セクレターゼの主な構成因子である、presenilin-1(PS-1)や、分解を受ける側の因子であるamyloid precursor protein (APP)の変化を調べた。視神経においてリン酸化PS-1は上昇しており、その局在はグリア細胞の核にあることが分かった。またAPPも視神経のグリアに存在し、TNFモデルでセクレターゼの抑制により視神経軸索保護に向かう。またオートファジー関連因子のp62は視神経変性で上昇しオートファジー活性で低下する。p62抑制もしくはオートファジー活性によって軸索保護に向かうことがわかった。

研究成果の概要(英文)：Axonal degeneration precedes retinal ganglion cell death in TNF-induced optic nerve degeneration model. We observed that phosphorylated-presenilin1 (p-PS1) was increased in the optic nerve after TNF injection and was found to colocalize with vimentin and glial fibrillary acidic protein, markers of astrocytes. Immunoprecipitation using 6E10 antibody revealed an increase in γ -secretase activation in the optic nerve after TNF injection, which was inhibited by treatment with the γ -secretase inhibitor. Moreover, γ -secretase inhibition significantly prevented the loss of axons in the optic nerve after TNF injection. Modulation of γ -secretase activity may be useful for the treatment of TNF-related optic neuropathy. p62 is involved in autophagy machinery. We observed that p62 was increased in the optic nerve degeneration. Activation of autophagy decreased p62 protein levels and led to axonal protection.

研究分野：医歯薬学

キーワード：セクレターゼ 緑内障 TNF オートファジー 視神経 軸索変性

1. 研究開始当初の背景

緑内障患者の視神経乳頭と網膜において、TNF- α と TNF-R1 の発現が上昇しているとの報告があり (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- α の関与が示唆されてきた (Sawada et al. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009)。我々は軸索変性が先行する TNF 誘発視神経障害モデル (Kitaoka et al. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006) を用いて、軸索保護の研究を行ってきた。外因性の BDNF の軸索保護効果に、軸索の隣に位置するオリゴデンドロサイトの p-CREB とその下流の内因性 BDNF が関与していることを報告した (Fujino et al. Acta Neuropathol, 2009)。また、nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) 合成酵素である nmnat1 が TNF 誘発視神経障害で減少すること、篩状板部のマイクログリアの活性を外因性 NAD が抑制し軸索保護効果を示すことを報告した (Kitaoka et al. J Neuropathol Exp Neurol, 2009)。高眼圧モデルでは軸索内正常ミトコンドリア輸送の減少を報告した (Munemasa et al. J Neurochem, 2010)。一方、緑内障における酸化ストレスの関与が細胞体死では示唆されてきたが、軸索死ではほとんど報告がなかった。我々は軸索障害において軸索内の酸化ストレスマーカーである thioredoxin1 (Trx1) が障害に先行し減少すること、エストロゲンが Trx1 を介して軸索保護効果を示すことを報告した (Kitaoka et al. Endocrinology, 2011)。これらの過程で、電子顕微鏡所見において高眼圧モデルにおける軸索内に autophagic vacuoles (AV) が多数存在することを確認し、さらにはオートファジーのマーカーである LC-3 が上昇していることを報告した。AV はアルツハイマー病や presenilin-1 (PS-1)/amyloid precursor protein (APP) transgenic mouse の神経突起で蓄積されていると報告されており、緑内障とアルツハイマー病の関連性も示唆されてきたことに一致する。アルツハイマー病では APP が β -セクレターゼ

で分解されアミロイド β が凝集、神経変性を起こす。緑内障でもアミロイド β が治療のターゲットになりうるということが報告されている (Guo et al. PNAS, 2007)。 β -セクレターゼ阻害剤の視神経軸索への影響は不明であり、オートファジーとの関係も不明である。さらに最近ではオートファジー活性上昇により視神経切断モデルでの網膜神経節細胞死が抑制されたとの報告がある (Rodriguez-Muela et al. Cell Death Differ, 2011)、軸索での報告はない上に慢性モデルで検討されていない。オートファジーに影響する分子生物学的出来事を明らかにし、緑内障を新しい中枢神経疾患の概念でとらえることにつなげたい。

2. 研究の目的

緑内障患者の神経線維層欠損は限局性で扇形をしており、軸索障害が網膜神経節細胞体死より先行している根拠となる。我々はこれまでに、視神経原発の軸索障害モデルを用いて軸索保護の研究を行ってきたが、その過程で軸索変性にオートファジーや β -セクレターゼ等の酵素が関与していることに気付いた。本研究では軸索保護の研究をさらに発展させ、アルツハイマー病と緑内障の類似点を組織学的分子生物学的に明らかにし、本邦の緑内障の大多数を占める正常眼圧緑内障に、軸索保護作用を持つ薬物療法を導入することにつながる研究成果を目指す。

3. 研究の方法

視神経障害モデル作製

TNF 誘発視神経障害モデルラットは、TNF-10ng を顕微鏡下にて 32G で硝子体に注射する。ラット高眼圧モデルは前房内に India Ink を注射し、その5日後に Ink により染められた角膜輪部にアルゴンレーザーを照射する。ラット及びマウスの眼圧は手持ち眼圧計 (トノラボ) にて週一回無麻酔下で測定する。

セクレターゼ関連因子とオートファジー関連因子の分子生物学的検討

immunoprecipitate にて、TNF により APP の特異

的部位での切断と、Notch-sparing GSI である BMS299897 でのその抑制を視神経で検討する。視神経をサンプルに蛋白抽出後、PS1、6E10、AICD、APP、Atg8(LC-3)、p62の抗体(リン酸化も含む)を用い Immunoblot を行う。更に、細胞質蛋白、膜/器官蛋白、核蛋白、細胞骨格蛋白に分け、RIP A buffer 付加後 immunoprecipitation を行う。

セクレターゼ関連因子とオートファジー関連因子の分布

視神経のパラフィン切片を水平方向垂直方向作製し、p-PS1、APP、TNF-R1、TNF-R2、vimentin、GFAP、Neurofilament で2重染色し、局在を明らかにする。

視神経軸索の形態的評価(光学顕微鏡)

各種薬剤投与後、もしくは、強制発現や siRNA 硝子体注射後、眼球より 1mm の位置の薄切横断切片を作製し PPD 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(Aphelion)で軸索直径別の軸索数を解析する。

視神経軸索の形態的評価(電子顕微鏡)

篩状板、眼球より 1mm の位置の超薄切横断切片を作製し酢酸ウラニル等処理後 TEM で撮影する。

4. 研究成果

TNF 誘発視神経障害において、視神経をサンプルに p-PS1 の発現を検討し、TNF 硝子体注射後 1 週間、2 週間で total PS1 に比して p-PS1 が有意に上昇していることが分かった。P-PS1 は視神経のアストログリアの核に存在し、TNF モデルではこれらのグリアの活性も観察された。P-PS1 は neurofilament とは共存せず、neurofilament は軸索障害のおこる 2 週間後にはその蛋白発現の低下が認められた。P-PS1 は セクレターゼの重要な構成因子であるが、セクレターゼによって分解される APP について検討した。視神経において、APP はアストログリアに多く存在し、一部 p-PS1 と共存していた。アストロサイトのマーカーの GFAP と TNF-R1 と TNF-R2 は一部共

存していることが判明した。次に 6E10 の抗体を用いて immunoprecipitation を行い、AICD で immunoblot を行ったところ、CTF の発現が TNF により減少し、この減少は セクレターゼ阻害剤によって抑制された。このことより、TNF により視神経の セクレターゼ活性が上昇していることが明らかとなった(IOVS, 2012)。セクレターゼ阻害剤である BMS により、TNF による軸索数の減少は有意に抑制された。次にオートファジーとの関係についてさらに検討した。オートファジー誘導体であるラパマイシンによって p-PS1 の上昇は抑制された。また、ラパマイシンによって、視神経の LC3- は上昇し、p62 が減少した。高眼圧モデルの視神経において、ラパマイシンは有意に軸索保護効果を発揮した(Cell Death Dis, 2013)。高眼圧モデルの視神経で p62 は上昇するが、TNF モデルの視神経でも p62 が上昇していることを報告した(Neurosci Lett, 2014)。このときラパマイシンで TNF による軸索数減少は抑制されたが、p62 siRNA によっても、部分的に抑制効果が認められた。オートファジーの調節が加齢、神経変性や緑内障性視神経症に重要であり、今後の治療開発にも寄与する可能性を示した(PREER, 2015)。

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 6 件)

Kitaoka Y, Kojima K, Munemasa Y, (他 2 名). Axonal protection by brimonidine with modulation of p62 expression in TNF-induced optic nerve degeneration. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2015 Apr 12. In press. 査読有
Kitaoka Y, Munemasa Y. Autophagy in axonal degeneration in glaucomatous optic neuropathy. Prog Retin Eye Res. 2015 Mar 26. pii: S1350-9462(15)00017-8. 査読有

Kojima K, Kitaoka Y, Munemasa Y, (他 3 名). Axonal protection by modulation of p62 expression in TNF-induced optic nerve degeneration. *Neurosci Lett*. 2014;581:37-41. 査読有

Kitaoka Y, Munemasa Y, (他 4 名). Axonal protection by Nmnat3 overexpression with involvement of autophagy in optic nerve degeneration. *Cell Death Dis* 2013; 4: e860. 査読有

Kitaoka Y, Munemasa Y. Molecular mechanisms of retinal ganglion cell degeneration in glaucoma and future prospects for cell body and axonal protection. *Front Cell Neurosci*. 2012;6:60. 査読有

Kojima K, Kitaoka Y, Munemasa Y, (他 1 名). Axonal protection via modulation of the amyloidogenic pathway in tumor necrosis factor-induced optic neuropathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53:7675-83. 査読有

[学会発表] (計 8 件)

北岡康史. 神経科学からみえてきた種々視神経障害の分子生物学, 第 34 回日本眼薬理学会, 2014 年 9 月 13 日, 長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市)

Kitaoka Y, (他 3 名). Induction of autophagy protects axons against TNF-induced optic nerve degeneration with possible involvement of p62 inhibition. 2014 ARVO Annual Meeting May 8, 2014, Orlando, U.S.A.

北岡康史. シンポジウム 3 「徹底検証! Glaucomatous Optic Axonopathy」 軸索保護とそのメカニズム, 第 24 回日本緑内障学会, 2013 年 9 月 22 日, 京王プラザ(東京都・新宿区)

Kojima K, Kitaoka Y, (他 2 名). Induction of autophagy prevents increase of p-PS1 in

TNF-induced optic nerve axonal degeneration. 2013 ARVO Annual Meeting, May 6, 2013, Seattle, U.S.A.

Kitaoka Y, (他 3 名). Nmnat3 inhibits up-regulation of p62 in high IOP-induced optic nerve degeneration. 2013 ARVO Annual Meeting, May 6, 2013, Seattle, U.S.A.

Kitaoka Y. Molecular mechanism of optic nerve degeneration in glaucoma and possible axonal protection. The 28th Annual Meeting of Korean Glaucoma Society, Nov 28, 2012, Seoul, South Korea.

北岡康史. シンポジウム 1 「神経保護」 緑内障を想定した視神経障害のメカニズムと軸索保護, 2012 年 9 月 28 日, 第 23 回日本緑内障学会, ANA クラウンプラザホテル金沢(石川県・金沢市)

北岡康史. Symposium 「緑内障に関する最近のトピックス」 緑内障性視神経症モデルと軸索保護, 2012 年 9 月 16 日, 第 32 回日本眼薬理学会, ビアザ淡海(滋賀県・大津市)

[図書] (計 1 件)

Kitaoka Y. Axonal Degeneration. Neuroprotection and Neuroregeneration for retinal diseases. Springer. 2014. chapter 9. 123-131.

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・准教授
研究者番号: 10367352

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

宗正 泰成 (MUNEMASA YASUNARI)
聖マリアンナ医科大学・医学部・講師
研究者番号: 30440340