

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19592045  
 研究課題名 (和文) siRNA 及びアンチセンスオリゴヌクレオチドの視神経変性疾患への適応  
 研究課題名 (英文) Possible application of siRNA and antisense therapies for optic nerve degeneration  
 研究代表者  
 上野 聡樹 (UENO SATOKI)  
 聖マリアンナ医科大学・医学部・教授  
 研究者番号：20109010

研究成果の概要:エンドセリン誘発網膜視神経障害でリン酸化 ERK は網膜で一過性に上昇し、視神経では遅れて上昇することが確認され、この上昇は保護的に働いていることが確認された。また siRNA の浸透度に関して、硝子体注射で網膜神経節細胞の中に入ることを確認した。CRE decoy オリゴヌクレオチドにより、TNF- $\alpha$  による内因性の BDNF 上昇は有意に抑制され、その上昇は内因性の保護機構であることが示唆された。siRNA およびオリゴヌクレオチドが視神経変性疾患モデルにある程度有用であることが示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：眼科学

## 1. 研究開始当初の背景

近年 RNA 干渉の技術はあらゆる研究分野において成果を発揮している。眼科領域においては加齢性黄斑変性症をターゲットにした研究がなされ、血管内皮成長因子 (VEGF) を small interfering RNA (siRNA) で抑制すると原因となる脈絡膜新生血管の発生を阻害したとの報告がされている (Tolentino et al., Retina, 2004)。また fibronectin, collagen IV, laminin に対する siRNA が糖尿病網膜症に有用である可能性が報告されている (Osh

itari et al., Exp. Eye Res, 2005)。しかしながら緑内障等の視神経変性疾患に対する siRNA の有効性は検討されていない。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。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 T

NF- $\alpha$  が何らかの役割を演じている可能性が示唆されている。我々はTNF- $\alpha$  をラットの硝子体注射し、先行する視神経軸索障害と、引き続きおこる遅発性の網膜神経節細胞死を確認し、その過程で視神経のNF- $\kappa$ B p65とマイクログリアの発現が上昇していることを報告した(Kitaoka et al. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006)。よってこのTNF- $\alpha$  硝子体注射モデルを視神経原発の軸索障害モデルとして用い、NMDA硝子体注射を細胞体障害モデルとして用いる。さらにエンドセリン硝子体注射はその中間に位置すると考え合わせて比較検討する。TNF- $\alpha$ 、エンドセリン硝子体注射での責任蛋白を明らかにし、なぜ一部のanti-apoptotic因子(Bcl-2等)が細胞体は保護するが軸索は保護しないのかを、NMDA網膜障害モデルとの相違を解明することで明らかにする。それにより軸索変性に有効な、抑制すべき因子は何かを明らかにし、siRNA、AS ODNのpenetrationを検討することで、緑内障等の視神経疾患に対する新しい神経保護治療法を確立できると考える。

## 2. 研究の目的

Cy3でラベルしたsiRNAをラットの硝子体もしくは球後に注射し、時間経過別に網膜及び視神経への浸透を共焦点顕微鏡で確認する。TNF- $\alpha$  誘発視神経障害、エンドセリン誘発網膜視神経障害、NMDA誘発網膜障害に関わる分子生物学的出来事の相違を視神経、網膜別に明らかにする。3つの異なるモデルから得られた分子生物学的出来事を参考にそれぞれ当該蛋白をターゲットにしたsiRNAまたはAS ODNを用いて、どの因子が細胞体変性には有効で軸索変性には無効であるか明らかにする。

## 3. 研究の方法

雄性ラットに麻酔下でNMDA、TNF- $\alpha$ 、エンドセリンの硝子体注射を2 $\mu$ 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Phosphate-buffered saline(PBS)の硝子体注射を他眼に行う。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、コンピュータソフトウェアで軸索直径別の軸索数を解析する。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、硝子体注射後上記の時間に網膜伸展標本作製し視神経節細胞数を評価する。Cy3でラベリングしたsiRNA及びローダミンでラベリングしたAS ODNは、硝子体注射後6、12、24時間、3日、1、2週間後に眼球を視神経ごと摘出し、垂直切片を作成、DAPI染色後それらの局在を検討する。視神経、網膜の垂直切片を用い、CaMK、MAPKのERK、p-ERK、マイ

クログリアのマーカーであるED-1、OX-42、Iba1、更に神経栄養因子(BDNF、NGF)とそれらの受容体(trk、p75)に対する抗体を使用し免疫組織化学染色を行う。ラットの視神経は眼球付着部から4mmまでを単離し、上記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。

## 4. 研究成果

TNF- $\alpha$  誘発視神経障害、エンドセリン誘発網膜視神経障害、NMDA誘発網膜障害に関わる分子生物学的出来事を視神経、網膜別に検討した。まずエンドセリン誘発網膜視神経障害においては、硝子体注射後28日での網膜垂直切片の結果をもとにエンドセリンの量を0.2nmolに決定し、硝子体注射後1、7、14、28日後の網膜及び視神経をサンプルにウェスタンブロットでextracellular signal-regulated kinase(ERK)の蛋白を検討した。ERKはいずれも変化を認めなかったが、リン酸化ERKは網膜で24時間後一過性に上昇し、視神経では遅れて28日後上昇することが確認された。今回用いたエンドセリンの量では網膜神経節細胞死がやや先行し、視神経軸索変性は遅れて生じることが考えられた。網膜の早期のリン酸化ERK上昇に比し、視神経のリン酸化ERK上昇はかなり遅れており、エンドセリン受容体を介さない可能性が考えられた。そこでエンドセリン受容体ET-AとET-Bのそれぞれ受容体の阻害剤を用いて視神経のリン酸化ERKの効果のみたところ、やはり受容体は介していないことが明らかとなった。リン酸化ERKは網膜でも視神経においても、アストロサイトのマーカーであるGFAPと共存していることが確認され、おそらく慢性的なグリアの活性が視神経でおこっていることが示唆された。さらにERKの阻害剤であるU0126を用いた研究によりp-ERKの上昇は網膜にも視神経にも保護的に働いていることが確認された。また現在すでに臨床で使用されているウノプロストンにp-ERKを上昇される効果があることが確認され、視神経軸索変性及び神経節細胞死に対して保護効果が確認された。よって緑内障点眼薬であるウノプロストンは視神経の保護の観点からも期待がもたれた(Vis Neurosci, 2008)。

NMDA誘発網膜障害においては、おもにカルシウム流入によるアポトーシスが報告されていることから、関連するカルモジュリンキナーゼ(CaMK)の変化を調べた。リン酸化CaMK2はNMDA注射後一過性に上昇するが、その下流にCREBが存在することが明らかとなった(Brain Res, 2007)。またsiRNAの浸透度に関して硝子体注射で検討し、網膜

神経節細胞の中に入ることを確認した (Brain Res, 2007)。更にこれまでに siRNA を球後注射して、視神経への浸透度を評価してきた。アテロコラーゲン等を用いている試みたが、やはり球後注射された cy3-labeled siRNA を視神経内で検出することが困難であった。そこで硝子体注射で視神経に存在する因子に影響を与えることができるかどうかを検討した。

TNF- $\alpha$  誘発視神経障害においてデコイオリゴヌクレオチドを用いてその効果を検討した。まず 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。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ため、硝子体注射されたオリゴヌクレオチドが視神経のオリゴデンドロサイトに働きかけ、隣接する軸索に影響を与えていることが考えられた (Acta Neuropathol, 2009)。このように視神経および網膜でリン酸化 ERK 及びリン酸化 CREB は保護的に働いていることがわかり、BDNF は網膜神経節細胞よりは視神経のオリゴデンドロサイトに豊富であることが判明した。視神経保護を考えるとき周りグリア細胞を介する保護経路があることも示唆された。

#### 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 Fujino H, Kitaoka Y, (他 5 名), Ueno S. Axonal protection by brain-derived neurotrophic factor associated with CREB phosphorylation in tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced optic nerve degeneration. Acta Neuropathol 117, 2009, 75-84. 査読有

- ② Munemasa Y, Kitaoka Y, Hayashi Y, (他 4 名) Ueno S. Effects of unoprostone on phosphorylated extracellular signal-regulated kinase expression in endothelin-1-induced retinal and optic nerve damage. Vis Neurosci 2008, 197-208. 査読有

- ③ Takeda H, Kitaoka Y, (他 6 名), Ueno S. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II regulates the phosphorylation of CREB in NMDA-induced retinal neurotoxicity. Brain Res 1184, 2007, 306-315. 査読有

[学会発表] (計 12 件)

- ① 北岡康史、上野聰樹(他 6 名)、TNF- $\alpha$  誘発視神経障害における BDNF の CREB リン酸化を介する軸索保護 第 28 回日本眼薬理学会、2008.9.20、岡山
- ② 北岡康史、視神経変性の分子機構と軸索保護、第 19 回日本緑内障学会シンポジウム 3、2008.9.13、大阪
- ③ Kitaoka Y, Kitaoka Y, (他 3 名), Ueno S. Distribution of ROCK2 in TNF- $\alpha$ -induced optic nerve degeneration. 2008 ARVO annual meeting, April 30, 2008, Florida
- ④ Kitaoka Y, Hayashi Y, (他 7 名), Ueno S. 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
- ⑤ Fujino H, Kitaoka Y, (他 3 名), Ueno S. Phosphorylation of CREB and up-regulation of BDNF in TNF- $\alpha$ -induced optic nerve degeneration. 2008 ARVO annual meeting, April 30, 2008, Florida
- ⑥ Hayashi Y, Kitaoka Y, (他 2 名), Ueno S. 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
- ⑦ Takeda H, Kitaoka Y, (他 3 名), Ueno S. Early elevation of OX2 antigen and OX2 receptor in TNF- $\alpha$ -induced optic nerve degeneration. 2008 ARVO annual meeting, April 29, 2008, Florida

- ⑧ 北岡康史、(他 4 名)、上野聰樹、エンドセリンによる網膜及び視神経障害におけるウノプロストンのp-ERKを介する神経保護効果、第 24 回神奈川県緑内障談話会、2008.3.8、横浜
- ⑨ 北岡康史、視神経保護、第 27 回日本眼薬理学会シンポジウム 2、2007.9.17、岐阜
- ⑩ Fujino H, Kitaoka Y, (他 4 名), Ueno S. Changes of neurotrophin receptor expression in TNF- $\alpha$ -induced optic nerve degeneration. 2007 ARVO annual meeting, May 8, 2007, Florida
- ⑪ Takeda H, Kitaoka Y, (他 6 名), Ueno S. Early phosphorylation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in NMDA-induced retinal damage. 2007 ARVO annual meeting, May 6, 2007, Florida
- ⑫ Hayashi Y, Kitaoka Y, (他 8 名), Ueno S. Neuroprotective effect of 17  $\beta$ -estradiol against TNF- $\alpha$ -induced axonal degeneration and p-ERK expression. 2007 ARVO annual meeting, May 6, 2007, Florida

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上野 聰樹 (UENO SATOKI)  
聖マリアンナ医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20109010

### (2) 研究分担者

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

### (3) 連携研究者

なし