

令和元年6月11日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10908

研究課題名(和文) 視神経軸索障害における部位別能動的分子プログラム制御機構の解明

研究課題名(英文) Active molecular mechanism regulation in optic nerve axon damage

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：TNF誘発視神経障害モデルを用いて軸索変性の新しい機序を探求してきた。まず視神経障害においてIL-1 betaの上昇が確認できた。外因性thioredoxinによりこの上昇は抑制され、さらに軸索保護作用を示した。次にROCK阻害剤がオートファジーに関係するかを調べた。Ripasudilは視神経においてオートファジーを活性化し、軸索保護作用を示した。またautophagosomeの軸索内での上昇も電子顕微鏡所見で確認できた。最後にNFATc1に注目した。NFATc1の上昇がTNFモデルで観察された。またタクロリムスが軸索保護作用を示し、このNFATc1の上昇を有意に抑制したことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑内障とTNFの密接な関係は国内外で報告されている。まずinterleukin-1 が視神経変性に関与していることを示した。また眼圧下降作用により緑内障点眼として現在使用されているripasudilの新しい作用としてオートファジーを活性化することを見出した。また難治性アレルギー結膜炎で臨床で使用されているタクロリムス点眼が、緑内障などの視神経変性疾患に適応拡大できる可能性を示した。さらにNFATc1という新しい標的分子が治療の開発に役立つ可能性も示した。

研究成果の概要(英文)：The study has been performed to investigate what molecules are involved in tumor necrosis factor (TNF)-mediated axonal degeneration. We found an upregulation of interleukin-1 beta in optic nerve after TNF injection and taht exogenous thioredoxin prevented this upregulation. Thioredoxin exerted substantial axonal protection. Next, we tested whether ROCK inhibitor alters autophagic status in optic nerve. Ripasudil, a ROCK inhibitor, upregulated autophagic status and exerted axonal protection. We also found an increase in autophagosomes inside axons. Lastly, we examined nuclear factor of activated T cells (NFATc), a downstream effector of CaN signaling. A significant increase in NFATc1 protein level was observed in optic nerve 7 days after TNF injection. This increase was negated by simultaneous administration of tacrolimus. The increased immunoreactivity was colocalized with glial fibrillary acidic protein. Treatment of tacrolimus significantly ameliorated the TNF-mediated axonal loss.

研究分野：神経保護

キーワード：視神経 緑内障 神経保護 タクロリムス NFATc astrocyte interleukin-1 ROCK

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

我々のこれまでに遂行してきた軸索保護研究を視神経のグリア側の因子からみると、BDNFの軸索保護において、オリゴデンドロサイトのリン酸化 CREB とその下流の内因性 BDNF の関与を見出した(Fujino et al., 2009, Acta Neuropathol)。さらに最近では視神経のアストロサイトのセクレターゼ活性を抑制することで軸索保護を発揮することを報告した(Kojima et al., 2012, IOVS)。視神経の軸索側の因子からみると、軸索内 thioredoxin1(Trx1)の低下が軸索障害に先行し、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., 2011, Endocrinology)。そもそも軸索は損傷を受けると細胞体から遠位側ではワーラー変性を生じる。このワーラー変性は細胞体から栄養素が欠如するための受動的現象であると考えられていたが、ワーラー変性が著しく起きづらい slow Wallerian degeneration (Wlds) mutant mouse の登場でワーラー変性は能動的分子プログラムによって起こることが示されてきた。Wlds mouse の研究が進む中で、nicotinamide adenine dinucleotide (NAD+)代謝経路の酵素である Nmnat1,2,3 が軸索保護に重要であるとの報告が近年されてきた(Sasaki et al., 2009, J Neurosci; Gilley et al., 2010, PLoS Biol; Yahata et al., 2009, J Neurosci)。我々もこの間、軸索内 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., 2009, J Neuropathol Exp Neurol)。この TNF 誘発モデルは遅発性逆行性網膜神経節細胞死を起こすが(Kitaoka et al., 2006, IOVS) NAD が細胞体保護も示し、軸索保護は結果的には神経節細胞保護につながる事が判明した。緑内障において、網膜内神経線維は逆行性軸索障害を生じてくることは、緑内障患者での限局性扇形の神経線維層欠損の存在により明らかである。つまり視神経乳頭から篩状板までの軸索保護により、網膜内神経線維欠損及び網膜神経節細胞死は防ぐことが可能であると考えられる。一方、Sterile alpha/Armadillo/Toll-interleukin receptor homology domain 1 (Sarm1)は脊髄後根神経節や坐骨神経の軸索障害に関与しており、その抑制により Wlds に匹敵する程度の軸索保護効果が最近示された(Osterloh et al., 2012, Science)。眼球内カインニン酸投与による視神経ワーラー変性においても Sarm1 が網膜で上昇、その関与が示唆されている(Massoli et al., 2013, IOVS)。このように軸索変性過程において能動的分子プログラムが存在していることは明らかであり、抑制により保護に向かう分子機構の発見は、抗 VEGF 抗体の臨床実用化を考えるとより現実的である。

## 2. 研究の目的

緑内障では視神経軸索障害が生じるが、根本的治療が存在しない。緑内障性視神経症は大原則である篩状板原発から網膜神経節細胞への逆行性軸索障害と、実は順行性軸索障害が混在する病態であることが推測される。本研究では軸索保護の研究をさらに発展させ、軸索変性過程の組織学的分子生物学的機序を明らかにし、緑内障性視神経症への根本治療法導入につながる研究成果を目指す。

## 3. 研究の方法

通常ラットでの TNF 誘発視神経障害モデル作製と、オートファジー活性状態としてのインスリン欠乏ラットで TNF 誘発視神経障害モデル作製した。オートファジーの状態の把握としては p62 と LC3-II のウェスタンブロットで定量した。LC3 の視神経と網膜での局在も免疫染色で判断した。視神経軸索内の autophagosome を電子顕微鏡及び免疫染色 (Immunogold) を用いて確認した。視神経軸索の周りのグリアでの autophagosome も電子顕微鏡で定量した。インスリン欠乏ラット以外でのオートファジーに影響を与える薬剤として ROCK 阻害剤も検討した。またグリアの因子としては Interleukin-1 にも注目した。IL-1 に影響を与える因子として外因性の Thioredoxin の検討も行った。Thioredoxin は抗酸化作用が知られている。さらにオートファゴソーム形成の最初のステップで重要な役割のある Beclin-1 についても immunoblot 及び免疫染色で検討した。抑制により保護に向かう分子機構として nuclear factor of activated T cells (NFATc1)にも注目し、immunoblot 及び免疫染色で検討した。その際、カルシニューリンの阻害剤であるタクロリムスの効果も検討した。

## 4. 研究成果

インスリン欠乏ラットの視神経において視神経での LC3-II 発現は著明に上昇した。また電子顕微鏡所見では軸索内オートファゴソームも有意に上昇した。TNF 誘発視神経障害モデルでは視神経の p62 は有意に上昇し、インスリン欠乏状態でのこの p62 上昇は有意に抑制された。ノーマルラットで TNF 硝子体注射群では有意に軸索減少が認められ、この減少はインスリン欠乏状態でも有意に抑制された。LC3 の免疫染色では視神経軸索線維の中に一致して positive dots が確認され、それらは網膜では最内層の神経線維層でも確認された。つまり TNF による軸索変性はインスリン欠乏により保護され、その保護機構にオートファジー活性が関与することが分かった(Sase et al., 2015)。以前我々は内因性 Thioredoxin が軸索内に存在し、その減少が軸索変性に関与していることを報告しているが、今回外因性 Thioredoxin の保護効果を検討した。Human Recombinant Thioredoxin (45、150、450 µg) をラットに TNF と同時に硝子体注射し、150 µg 及び 450 µg において有意な軸索保護効果を示すことを確認した。また TNF 誘発視神経障害において IL-1 が視神経で上昇していることを見出した。そして外因性 Thioredoxin によ

りこの上昇が完全に抑制された。IL-1 はこのとき GFAP と共存しており、アストロサイトから分泌していると考えられた。これらのことより Thioredoxin の軸索保護効果には IL-1 の活性抑制が関与していると考えられた(Kitaoka et al., 2016)。次にオートファジーに影響を及ぼす薬剤として ROCK 阻害剤である ripasudil を TNF とラット硝子体と同時に投与した。Ripasudil には TNF 誘発視神経障害において軸索保護作用があることが判明した。Ripasudil 単独投与で視神経の LC3-II は上昇し、p62 は現象することが分かった。また ripasudil により電子顕微鏡所見では軸索内のオートファゴソームが上昇するが、グリアでのオートファゴソームは上昇しなかった。また視神経軸索内の LC3 immuno-positive dots は ripasudil により上昇していた。さらに、軸索内のオートファゴソームに関しては、真にこれらがオートファゴソームかどうかの判断として LC3 の immunogold を行った。Immunogold positive particle はやはりオートファゴソームと一致しており、これらのことより ROCK 阻害剤である ripasudil の軸索保護効果にオートファジーの活性化が関与していることが明らかとなった(Kitaoka et al., 2017)。一方でインスリン欠乏状態でのオートファジー活性についてのさらなる機序解明として Beclin-1 にも注目した。インスリン欠乏状態でのオートファジー活性化において Beclin-1 の上昇が視神経の Immunoblot で確認された。興味深いことに、Beclin-1 は多くはアストロサイトと共存しているが、インスリン欠乏でオートファジー活性状態においては視神経内の neurofilament とも共存していた。さらに Beclin-1 の siRNA を用いての軸索保護作用を検討した。インスリン欠乏状態での軸索保護作用は Beclin-1 siRNA で部分的に抑制されたことより、この保護作用の一部に Beclin-1 が関与したと推測される。硝子体注射の siRNA はおそらくグリアの Beclin-1 には作用せず、軸索輸送される Beclin-1 の発現を抑制したと考えられるため、軸索内の Beclin-1 がインスリン欠乏状態でのオートファジー活性に関与していることが示唆された(Sase et al., 2018)。最後に NFATc1 の変化についての成果として、まず上流のカルシニューリンについて検討した。本研究での TNF 誘発視神経障害モデルの視神経及び網膜においては、カルシニューリン蛋白発現の変化は認められなかった。しかしながらその下流因子である NFATc1 の発現は TNF 硝子体注射後 1 週間で有意に視神経において上昇した。免疫染色検査では NFATc1 は GFAP と共存しており、NFATc1 はアストロサイトから放出されていることが考えられた。カルシニューリン阻害剤であるタクロリムスは難治性アレルギー結膜炎の治療として臨床応用されている。タクロリムスを TNF と同時投与すると用量依存性に軸索保護効果を示した。タクロリムスにより、TNF による NFATc1 上昇は有意に抑制された。つまりタクロリムスの軸索保護効果に NFATc1 阻害作用が関与することが示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Tsukahara C, Sase K, Fujita N, Takagi H, [Kitaoka Y](#). Axonal Protection by Tacrolimus with Inhibition of NFATc1 in TNF-Induced Optic Nerve Degeneration. *Neurochem Res*. 2019, in press. 査読有
2. Sase K, [Kitaoka Y](#), Tsukahara C, Takagi H. Involvement of Beclin-1 in axonal protection by short-term hyperglycemia against TNF-induced optic nerve damage. *Mol Med Rep*. 2018, 18: 5455-5460. DOI: 10.3892/mmr.2018.9568. 査読有
3. [Kitaoka Y](#), Sase K, Tsukahara C, Kojima K, Shiono A, Kogo J, Tokuda N, Takagi H. Axonal Protection by Ripasudil, a Rho Kinase Inhibitor, via Modulating Autophagy in TNF-Induced Optic Nerve Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017, 58: 5056-5064. DOI: 10.1167/iovs.17-22000. 査読有
4. Klionsky DJ, [Kitaoka Y](#)(1044 番目), 他 2465 名. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3<sup>rd</sup> edition). *Autophagy*. 2016, 12: 1-222. DOI: 10.1080/15548627.2015.1100356. 査読有
5. [Kitaoka Y](#), Tanito M, Kojima K, Sase K, Kaidzu S, Munemasa Y, Takagi H, Ohira A, Yodoi J. Axonal protection by thioredoxin-1 with inhibition of interleukin-1 in TNF-induced optic nerve degeneration. *Exp Eye Res*. 2016, 152: 71-76. DOI: 10.1016/j.exer.2016.09.007. 査読有
6. Sase K, [Kitaoka Y](#), Munemasa Y, Kojima K, Takagi H. Axonal protection by short-term hyperglycemia with involvement of autophagy in TNF-induced optic nerve degeneration. *Front Cell Neurosci*. 2015, 9: 425. DOI: 10.3389/fncel.2015.00425. eCollection 2015. 査読有

### 〔学会発表〕(計 9 件)

1. [Kitaoka Y](#). Asia-Japan Symposium New Insights of Glaucoma; Retinal ganglion cell biology. 第 29 回日本緑内障学会. 2018.
2. Sase K, [Kitaoka Y](#), Tsukahara C, Takagi H. Akebia Saponin D prevents axonal loss against TNF-induced optic nerve damage with autophagy modulation. Annual Meeting, ARVO. 2018.
3. [Kitaoka Y](#), Sase K, Tsukahara C, Fujita N, Takagi H. Axonal protection by a small molecule SIRT1 activator, SRT2104, with alteration of autophagy in optic nerve

- degeneration. Annual Meeting, ARVO. 2018.
4. 北岡康史. オートファジーから見た緑内障性視神経症. 第28回日本緑内障学会. 2017.
  5. 佐瀬佳奈、北岡康史、宗正泰成、田中千広、高木均. 短期高血糖による視神経軸索保護とオートファジー関連因子 Beclin-1. 第121回日本眼科学会総会. 2017.
  6. 北岡康史. 軸索障害研究の実践. 第27回日本緑内障学会. 2016.
  7. Kitaoka Y, Sase K, Munemasa Y, Takagi H. Ripasudil, a ROCK inhibitor, modulates p62 expression in TNF-induced optic nerve degeneration. Annual Meeting, ARVO. 2016.
  8. Sase K, Kitaoka Y, Munemasa Y, Takagi H. Atg4A in axonal protection by short-term hyperglycemia in TNF-induced optic nerve degeneration. Annual Meeting, ARVO. 2016.
  9. Kitaoka Y. Autophagy in the high IOP- and TNF-induced axonal degeneration. 6<sup>th</sup> World Glaucoma Congress. 2015.

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。