

令和元年6月12日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11336

研究課題名(和文) P7C3のサ-チュイン遺伝子賦活化を介した神経保護作用と視神経疾患への応用

研究課題名(英文) Neuroprotective effects of P7C3 through activation of sirtuin gene and its application for optic nerve diseases.

研究代表者

奥 英弘 (Oku, Hidehiro)

大阪医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90177163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：P7C3の網膜神経節細胞(RGCs)に対する保護作用を、ラット視神経挫滅モデル(ONC)で検討した。左視神経を挫滅し、P7C3を3日間腹腔内投与した。P7C3はday7と14で、RGCs密度を有意に温存した。ONCは視神経のNAD量、NamtおよびSirt-1遺伝子を減少させ、P7C3はこれらを有意に回復した。ONCはリン酸化mTORの発現を亢進し、P7C3はその上昇を抑制した。視神経挫滅部では、TNF-陽性、CD68陽性細胞が集積し、炎症関連遺伝子発現が増加したが、P7C3はこれら炎症反応を抑制した。P7C3の作用にはNAD代謝やmTOR経路の抑制を介した抗炎症作用の関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

P7C3は神経再生を目的としたin vivo包括的スクリーングで抽出された薬剤で、神経保護作用が期待されている。その作用機序としてNAD合成を促進することが報告されている。NADはワーラー変性遅延遺伝子の機能も担っている。本研究でも傷害視神経でNAD量の減少が抑制された。さらにNADはmTOR系を阻害する可能性が示唆されている。mTOR kinaseはグリアの活性化に深く関与し、neuroinflammationを惹起する。P7C3は傷害視神経でリン酸化mTORの発現を抑制し、neuroinflammationを抑制した。P7C3は広く神経変性疾患に応用できる可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Neuroprotective effects of P7C3 on retinal ganglion cells (RGCs) were determined using optic nerve crush (ONC) model of rats. The left optic nerve was crushed, and 5.0 mg/kg/d of P7C3 or its vehicle was injected intraperitoneally for 3 consecutive days beginning 1 day before the ONC. P7C3 significantly preserved the density of RGCs on days 7 and 14 after the ONC. ONC decreased the NAD levels as well as mRNA levels of Nampt and Sirt-1 genes in the optic nerves, while P7C3 significantly restored the levels. In addition, ONC increased the level of phosphorylated mTOR and P7C3 significantly lowered the level. There was an accumulation of CD68+ cells that were immunoreactive to TNF- at the crush site. Inflammatory genes including the CD68, TNF-, MCP-1, and iNOS were upregulated after the ONC and these inflammatory events were suppressed by P7C3. Thus, effects of P7C3 may involve NAD metabolisms and anti-inflammatory properties through suppression of mTOR pathways.

研究分野：眼科学

キーワード：P7C3 mTOR NAD sirtuin 視神経挫滅モデル 網膜神経節細胞 CD68 TNF-

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

1. 研究開始当初の背景

炎症や外傷など、原因の如何にかかわらず、視神経が傷害されると普遍的に軸索変性が生じる。ワーラー変性は神経細胞体からの軸索輸送障害に起因する、受動的な変化であると考えられてきた。しかし変性が緩徐で、機能障害が生じにくい軸索変性遅延 (wlds) マウスが発見され、軸索変性過程に対し治療的介入の可能性が示された。wlds 遺伝子は NAD 合成サルベージ経路を賦活化して機能し、NAD により軸索変性が制御可能であることが示された。P7C3 は神経保護に対する包括的 in vivo スクリーニングにより抽出された薬剤で、NAD 合成の律速段階にあたる Nampt を活性化すると考えられている。したがって、P7C3 は NAD 合成を促進して、視神経軸索変性と網膜神経細胞死に対し、神経保護的に作用する可能性が期待できると考えられた。

2. 研究の目的

P7C3 の神経保護作用と、その作用機序として以下の点を、ラット視神経挫滅モデルで検討した。

- (1). P7C3 が NAD 合成系を促進して神経保護作用を発揮している可能性を明らかにする。
- (2). NAD が mTOR 系を抑制する可能性が示唆されている。また mTOR 系が賦活化されると、グリア細胞を介した neuroinflammation が促進されると考えられている。この観点から、P7C3 が NAD 合成系を介し、neuroinflammation を抑制し、神経保護的に作用する可能性を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1). ラット視神経挫滅モデルを用い、P7C3 を腹腔内投与することで、視神経組織内 NAD 含有量が実際に増加する可能性を検討した。ラット視神経を球後 2mm で挫滅し、day 7 で視神経を摘出し、視神経組織をホモジナイズし NAD/NADH kit を用いて、組織内 NAD 含有量を定量した。P7C3 は視神経挫滅処置の前日、当日および翌日の 3 日間連続で投与した。
- (2). P7C3 の作用は、Nampt の活性化を介した NAD 合成促進にあると考えられている。ラット視神経挫滅モデルを用い、P7C3 投与による Nampt とその下流にある Nmnat-1、Sirt-1 遺伝子の変化を real-time PCR で測定した。
- (3). 神経保護作用は、day 7 で網膜伸展標本を作製し、網膜神経節細胞を Tuj-1 染色して細胞密度を測定し、placebo 投与群と比較検討した。さらにアポトーシスに關与する Bax 遺伝子と Bcl2 遺伝子を real-time PCR で測定し、Bax/Bcl2 比を求めた。
- (4). 神経保護作用の機序として、NAD が mTOR 系を抑制する可能性を検討するため、視神経挫滅後 day 7 で視神経を摘出し、リン酸化 mTOR の発現を immunoblot で定量した。また視神経挫滅部を中心とした炎症反応を、免疫組織学的に検討した。さらに CD68、iNOS、TNF の遺伝子発現の変化を real-time PCR で定量した。

4. 研究成果

- (1). 未処置ラットの視神経中 NAD 量は、 1.36 ± 0.05 nmol/mg/protein であった。P7C3 投与群では、 1.59 ± 0.10 nmol/mg/protein と NAD 量は有意に増加していた ($n=4$, $P=0.02$, t-test)。一方、挫滅後 day 7 の傷害視神経では、NAD 量は 1.27 ± 0.21 nmol/mg/protein に減少していたが、P7C3 投与群では、 1.43 ± 0.10 nmol/mg/protein に温存されていた。したがって、P7C3 は視神経組織内の NAD 含有量を増加あるいは温存する効果が、実際に認められた。
- (2). Nampt 遺伝子の視神経組織内 mRNA レベルは、視神経挫滅により対照の 0.6 倍に減少したが、P7C3 投与群では 0.83 倍の減少に留まっていた。また Sirt-1 遺伝子は対照の 0.6 倍に減少したが、P7C3 投与群では 0.84 倍の減少に留まった。これらの抑制効果は統計学的に有意であった。(1)の結果と考え合わせ、P7C3 は視神経傷害時の NAD 含有量を温存し、NAD 依存性遺伝子である Sirt-1 の機能低下を抑制する可能性が示唆された。
- (3). 網膜神経節細胞の密度は未処置網膜では $2009/\text{mm}^2$ であったが、視神経挫滅後 day 7 で $980/\text{mm}^2$ に減少した。P7C3 投与群では $1266/\text{mm}^2$ に温存され、有意な神経保護作用が認められた。また挫滅後の Bax/Bcl2 比は、視神経では対照の 24.1 倍、網膜では 1.29 倍に増加し、apoptosis の関与が考えられたが、P7C3 投与群ではそれぞれ 6.06 倍、0.72 倍に抑制された。したがって P7C3 は有意な神経保護作用を有していることが生化学的にも示された。
- (4). 視神経挫滅により、視神経組織内でリン酸化 mTOR の発現が亢進し、P7C3 はその上昇を抑制した。また視神経挫滅部では、TNF- 陽性、CD68 陽性細胞が集積し、炎症関連遺伝子発現が増加していたが、P7C3 はこれら炎症反応を抑制した。したがって P7C3 の作用には NAD 代謝や mTOR 経路の抑制を介した抗炎症作用の関与が示唆された。

総括: P7C3 の作用機序として NAD 合成を促進することが報告され、本研究でも傷害視神経で NAD 量の減少が抑制された。NAD はワーラー変性遅延マウスの視神経軸索変性抑制作用を担っている。さらに NAD は mTOR 系を阻害する可能性が示唆されている。mTOR kinase はグリアの活性化に深く関与し、neuroinflammation を惹起する。P7C3 は傷害視神経でリン酸化 mTOR の発現を抑制し、neuroinflammation を抑制した。この機序は、P7C3 の新たな薬理作用と考えられ、他の神経変性疾患に広く応用できる可能性があると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Nishikawa Y, Oku H, Morishita S, Horie T, Kida T, Mimura M, Fukumoto M, Kojima S, Ikeda T. Negative impact of AQP-4 channel inhibition on survival of retinal ganglion cells and glutamate metabolism after crushing optic nerve. *Exp Eye Res*. 2016;146:118-27. (査読あり)
2. Oku H, Morishita S, Horie T, Nishikawa Y, Kida T, Mimura M, Kojima S, Ikeda T. Protective effect of P7C3 on retinal ganglion cells from optic nerve injury. *Jpn J Ophthalmol*. 2017;61(2):195-203. (査読あり)
3. Kida T, Oku H, Horie T, Fukumoto M, Okuda Y, Morishita S, Ikeda T. Implication of VEGF and aquaporin 4 mediating Müller cell swelling to diabetic retinal edema. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2017;255(6):1149-1157. (査読あり)
4. Oku H, Morishita S, Horie T, Kida T, Mimura M, Kojima S, Ikeda T. P7C3 Suppresses Neuroinflammation and Protects Retinal Ganglion Cells of Rats from Optic Nerve Crush. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017;58(11):4877-4888. (査読あり)
5. Stankowska DL, Mueller BH 2nd, Oku H, Ikeda T, Dibas A. Neuroprotective effects of inhibitors of Acid-Sensing ion channels (ASICs) in optic nerve crush model in rodents. *Curr Eye Res*. 2018;43(1):84-95. (査読あり)
6. Kida T, Flammer J, Oku H, Konieczka K, Morishita S, Horie T, Ikeda T. Vasoactivity of retinal veins: A potential involvement of endothelin-1 (ET-1) in the pathogenesis of retinal vein occlusion (RVO). *Exp Eye Res*. 2018;176:207-209. (査読あり)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Oku H, Kida T, Horie T, Ikeda T. P7C3 suppresses neuroinflammation and protects retinal ganglion cells of rats from optic nerve crush. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (国際学会、米国). 2018年5月
2. 奥 英弘 喜田照代、堀江妙子、池田恒彦. mTOR 阻害剤の小胞体ストレス、オートファジーを介した神経保護作用の検討. 第123日本眼科学会. (一般講演) 2018年4月
3. 奥 英弘. 視神経脊髄炎におけるアキュアポリン-4の役割. 第123日本眼科学会. (シンポジウム) 2018年4月
4. 奥 英弘, 森下清太, 堀江妙子, 西川優子, 喜田照代, 池田恒彦. P7C3の神経保護作用におけるmTORの関与. 第122日本眼科学会. (一般講演) 2017年4月
5. 奥 英弘, 堀江妙子, 西川優子, 喜田照代, 池田恒彦. P7C3による神経保護作用の検討. 第121日本眼科学会. (一般講演) 2016年4月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

大阪医科大学眼科学教室ホームページ

<http://www.osaka-med.ac.jp/deps/opt/gyouseki.html>

Research gate

https://www.researchgate.net/profile/Hidehiro_Oku

6 . 研究組織

研究分担者名：小嶋祥太

□ - マ字氏名：(Kojima, Shota)

所属研究機関名：大阪医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁)：10388259

研究分担者名：小林崇俊

□ - マ字氏名：(Kobayashi, Takatoshi)

所属研究機関名：大阪医科大学
部局名：医学部
職名：講師
研究者番号（8桁）：10567093

研究分担者名：池田恒彦
□ - マ字氏名：(Ikeda, Tsunehiko)
所属研究機関名：大阪医科大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：70222891

研究分担者名：高井真司
□ - マ字氏名：(Takai, Shinji)
所属研究機関名：大阪医科大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：80288703

研究分担者名：喜田照代
□ - マ字氏名：(Kida, Teruyo)
所属研究機関名：大阪医科大学
部局名：医学部
職名：講師
研究者番号（8桁）：90610105

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。