

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09427

研究課題名(和文) 視神経軸索障害におけるオートファジーを含む代謝処理機能不全の機構解明

研究課題名(英文) The mechanism of metabolic and autophagic dysfunction in optic nerve degeneration

研究代表者

北岡 康史 (Kitaoka, Yasushi)

聖マリアンナ医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：10367352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーや代謝機能は加齢により低下する。TNF誘発視神経障害モデルを用いていくつかのオートファジーを活性化する薬物について検討した。まずサーチュインを活性化するSIRT1活性化剤が視神経でオートファジーを亢進し、軸索保護効果を示すことを見出した。次にnicotinamide riboside(NR)を投与すると視神経のnicotinamide riboside kinase1が上昇することを見出した。NRはSIRT1発現を上昇させ、オートファジーを亢進させ、軸索保護効果を示した。最後にリン酸化p38が軸索障害で上昇することを見出し、オートファジー活性化により上昇が抑制され保護につながった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オートファジーや代謝機能は加齢により低下するが、運動や食事制限はオートファジー活性につながる。しかし高齢者にそれらは困難であり、薬物でのオートファジー活性化や軸索保護を提供できることにつながる研究成果を得たと考えている。

研究成果の概要(英文)：Autophagic and metabolic function may decrease in aging. We previously reported the impairment of autophagic flux in optic nerve in glaucomatous optic neuropathy model. Thus, in the present term, we tested if some autophagy activators alter axon loss in tumor necrosis factor (TNF)-induced optic nerve degeneration. First, we found that a SIRT1 activator enhanced autophagic flux and exerted axonal protection. Second, exogenous nicotinamide riboside (NR) upregulated endogenous nicotinamide riboside kinase 1 (NRK1) and SIRT1 expression in optic nerve. NR also enhanced autophagic flux and exerted axonal protection. We also found NRK1 exists in RGCs and optic nerve fibers. Third, we found upregulation of phosphorylated p38 in optic nerve axons in TNF-induced optic nerve degeneration. Upregulated p-p38 may inhibit autophagy. Akebia saponin D, an autophagy activator, prevented the increment of p-p38, enhanced autophagy flux, and exerted axonal protection.

研究分野：神経科学

キーワード：オートファジー 緑内障 nicotinamide SIRT1 p38

1. 研究開始当初の背景

緑内障では網膜神経節細胞死と視神経軸索障害が生じるが、これらを抑制できる根本的治療が存在しない。網膜神経節細胞数は年齢とともに減少していくが、緑内障性視神経症ではその減少のスピードが速く、スピードを緩やかにする目的で眼圧下降療法が現在行われている。視神経乳頭のリムの菲薄化とそこに一致する神経線維層欠損の存在は、細胞体死よりも軸索に原因があることを示しているが、軸索障害には細胞体からの様々な物質の輸送、また外側膝状体からの輸送も関与している。視神経軸索は網膜神経節細胞から外側膝状体までと長く、多くの energy を要する。軸索内のミトコンドリアは energy 供給に大きく貢献しているが、周りのグリア細胞(オリゴデンドロサイト、アストロサイト)も供給に貢献している。グリアからの供給 energy として lactate が知られており、LDH により pyruvate に変換される際に NAD⁺を要する。NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) は酵素である NMNAT により NMN(nicotinamide mononucleotide)から変換される。一方、NMNAT1,2,3 それぞれ脊髄後根神経で軸索保護の報告がある。以前我々は NMNAT1 と NMNAT3 が視神経軸索内に存在し、TNF 誘発視神経障害モデルと高眼圧モデルでそれぞれ減少することを報告している(Kitaoka et al., 2009, J Neuropathol Exp Neurol; Kitaoka et al., 2013, Cell Death Dis)。この中で外因性 NAD 硝子体注射での視神経軸索保護、外因性 NMNAT3 強制発現 (plasmid 遺伝子導入)での視神経軸索保護を見出した。さらに高眼圧において視神経の autophagic flux (オートファジーの動的流れ)は障害されており、NMNAT3 強制発現は autophagic flux を上昇させ軸索保護を発揮することを報告した。オートファジーは細胞内の不要蛋白をクリアランスするシステムであり、多くの中枢神経変性疾患で flux は低下していることが分かっている。我々は高眼圧のみならず、老化促進マウスの視神経でも flux が低下していることを見出した(Kitaoka and Munemasa, 2015, Prog Retin Eye Res)。つまり加齢や眼圧上昇により網膜神経節細胞の代謝機能の低下、およびオートファジー機能の低下があり、緑内障性視神経症の発生に寄与していることが推測される。

2. 研究の目的

眼外有髄軸索はオリゴデンドロサイトからの豊富な BDNF に保護されているが、眼内無髄軸索の変性は眼圧の影響はもちろんであるが、我が国の正常眼圧緑内障の頻度の多さを鑑みると、軸索変性に代謝機能不全とオートファジー機能不全が存在すると考えられる。そこには視神経乳頭のグリアも密接に関与していると推測される。その分子機序を明らかにすることで、緑内障性視神経症の根本的治療の発見につなげたい。緑内障の網膜神経節細胞死を加齢によるオートファジー機能の低下、または、代謝機能低下(NAD 減少)と位置付け、それらの傾斜をそれぞれ緩やかにする、もしくは上昇させ、網膜神経節細胞の軸索変性を抑制する経路の発見を目指す。

3. 研究の方法

ラット TNF 誘発視神経障害モデルにおいて、NFATc1 の発現を 3 日、1 週間、2 週間で検討した。タクロリムスによりそれらに変化があるか検討した。TNF 自体が蛋白レベルで変化するか検討した。タクロリムスにより TNF が影響を受けるか検討した。タクロリムスにより軸索数に影響を与えるか検討した。次に SIRT1 活性剤の SRT2104 を硝子体注射し、軸索数の定量と視神経の SIRT1 蛋白レベル、および LC3-II や p62 蛋白レベルを評価した。次に nicotinamide riboside (NR) を硝子体注射し、nicotinamide riboside kinase 1 (NRK1)の発現を網膜及び視神経で検討した。その際 SIRT1 の蛋白レベルと LC3-II、p62 の蛋白レベルも評価した。NR 後の軸索定量も行った。さらに SIRT1 阻害剤によって p62 レベルが変化するかも検討した。次にオートファジー活性剤の Akebia saponin D の軸索保護効果も検討した。今回 TNF によりリン酸化 p38 が視神経で変化するが、またリン酸化 p38 の視神経での局在も検討した。

4. 研究成果

まずグリア側の因子として NFATc1 がアストロサイトに位置して、TNF 硝子体注射により 1 週間で有意な上昇を示すことを見出した。TNF は遅れて 2 週間で視神経のサンプルで上昇した。タクロリムスにより NFATc1 の上昇は抑制され、TNF の上昇も抑制された。タクロリムスにより TNF の軸索障害は有意に保護された。次に TNF による軸索障害モデルで、SIRT1 活性剤の効果を見ると、SRT2104 により用量依存性の軸索保護効果を観察した。TNF による視神経での p62 上昇は SRT2104 により有意に抑制された。またベースラインの p62 は SRT2104 により有意に減少した。SRT2104 により LC3-II は TNF 群、コントロール共に有意に上昇した。TNF により視神経の SIRT1 レベルは変化を示さなかったが、TNF 群に比して TNF+SRT2104 群では SIRT1 レベルが有意に上昇した。また、コントロール群に比して、SRT2104 単独群でも SIRT1 レベルは有意に上昇した。SIRT1 の上昇がオートファジー亢進につながり軸索保護を示したことが判明した。次に NR の軸索保護作用を見出した。NR は NRK1 により NMN に変換され、下流の NAD に変換される。今回 NRK1 が初めて網膜神経節細胞と神経線維層、及び視神経軸索に存在することを見出した。つまり NRK1 は軸索側の因子であると言える。また、当初 NRK1 の発現レベルは NR により変化しないと予想して

いたが、NR 硝子体内投与により視神経の NRK1 レベルが有意に上昇することを観察した。この時 NR により SIRT1 上昇、さらに p62 減少と LC3-II 上昇からオートファジー亢進につながっていることがわかった。SIRT1 がオートファジーの上流にあるのか調べた。SIRT1 の阻害剤 EX-527 を前投与すると、NR+TNF での p62 レベルより有意に上昇し、SIRT1 阻害によりオートファジーフラックスは障害されたことになる。つまり、NR は SIRT1 を上昇させ、それがオートファジーフラックス上昇につながり、軸索保護効果を示したことになる。最後にリン酸化 p38 が TNF による視神経軸索障害で有意に上昇していることを観察した。先行研究ではリン酸化 p38 が網膜神経節細胞に存在することが知られている。今回は視神経軸索にリン酸化 p38 が存在することを観察した。Akebia saponin D により TNF によるリン酸化 p38 の上昇は有意に抑制された。また、TNF による p62 の上昇も有意に抑制され、硝子体注射後 2 週間でも LC3-II は上昇したのに対し、リン酸化 p38 の上昇は 1 週間で有意で、2 週間では有意でなかったことを踏まえると、リン酸化 p38 がオートファジー機構の上流に位置していると推測された。このようにオートファジーを亢進させ軸索保護を発揮するいくつかの期待できる薬物を見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tsukahara C, Sase K, Fujita N, Takagi H, Kitaoka Y.	4. 巻 44
2. 論文標題 Axonal Protection by Tacrolimus with Inhibition of NFATc1 in TNF-Induced Optic Nerve Degeneration.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurochem Res.	6. 最初と最後の頁 1726-1735
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11064-019-02804-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kitaoka Y, Sase K, Tsukahara C, Fujita N, Tokuda N, Kogo J, Takagi H.	4. 巻 64
2. 論文標題 Axonal protection by a small molecule SIRT1 activator, SRT2104, with alteration of autophagy in TNF-induced optic nerve degeneration.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Jpn J Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 298-303
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10384-020-00731-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kitaoka Y, Sase K, Tsukahara C, Fujita N, Arizono I, Takagi H.	4. 巻 57
2. 論文標題 Axonal Protection by Nicotinamide Riboside via SIRT1-Autophagy Pathway in TNF-Induced Optic Nerve Degeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Neurobiol	6. 最初と最後の頁 4952-4960
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12035-020-02063-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sase K, Tsukahara C, Fujita N, Arizono I, Takagi H, Kitaoka Y.	4. 巻 47
2. 論文標題 Akebia Saponin D prevents axonal loss against TNF-induced optic nerve damage with autophagy modulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Biol Rep	6. 最初と最後の頁 9733-9738
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11033-020-06008-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fujita N, Sase K, Tsukahara C, Arizono I, Takagi H, Kitaoka Y.	4. 巻 48
2. 論文標題 Penafibrate prevents retinal neuronal cell death in NMDA-induced excitotoxicity via inhibition of p-c-Jun expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Biol Rep	6. 最初と最後の頁 195-202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11033-020-06032-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Klionsky DJ, Kitaoka Y, et al.	4. 巻 17
2. 論文標題 Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1-382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2020.1797280.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Yasushi Kitaoka, Kana Sase, Chihiro Tsukahara, Naoki Fujita, Hitoshi Takagi
2. 発表標題 Axonal protection by nicotinamide riboside with inhibition of p62 in TNF-induced optic nerve degeneration
3. 学会等名 ARVO meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北岡康史、佐瀬佳奈、塚原千広、藤田直輝、高木均
2. 発表標題 TNF誘発視神経障害モデルにおけるp62発現抑制を介したnicotinamide ribosideの軸索保護効果
3. 学会等名 第39回日本眼薬理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北岡康史
2. 発表標題 ROCK阻害剤の血管拡張作用と神経保護
3. 学会等名 第30回日本緑内障学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北岡康史
2. 発表標題 オートファジーと網膜神経節細胞死
3. 学会等名 第31回日本緑内障学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北岡康史
2. 発表標題 オートファジーと視神経軸索
3. 学会等名 第40回日本眼薬理学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------