

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09438

研究課題名(和文) 神経ステロイドのオートファジー活性化作用を介した緑内障性視神経症の抑制効果

研究課題名(英文) The neurosteroid allopregnanolone and its enantiomer protects retinal neurons by effects on autophagy and GABAA receptors in rat glaucoma models

研究代表者

石川 誠 (Ishikawa, Makoto)

秋田大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：10212854

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)：緑内障は本邦の主要な失明原因だが、その発症メカニズムについては未だ不明な点が多い。我々は、「オートファジーを賦活化する神経ステロイドとその誘導体を投与すると、緑内障性視神経傷害を抑制することができる」との仮説を立て、ラット緑内障モデルを用いて検証した。緑内障モデルでは、オートファジーが停滞して網膜神経節細胞が障害された。GABA-A受容体作動型神経ステロイドであるアロプレグナロン(AlloP)は、GABA-A受容体とオートファジーを活性化して神経保護効果を発揮した。ent-AlloPはGABA-A受容体を介さず、専らオートファジー誘導によって神経保護効果を発揮することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑内障は本邦の主要な失明原因だが、その発症メカニズムについては未だ不明な点が多い。我々は、「オートファジーを賦活化する神経ステロイドとその誘導体を投与すると、緑内障性視神経傷害を抑制することができる」との仮説を立て、ラット緑内障モデルを用いて検証した。その結果、GABA受容体作動型神経ステロイドであるアロプレグナロン(AlloP)の誘導体であるent-AlloPは、GABA-A受容体を介さず、専らオートファジー誘導によって神経保護効果を発揮することが明らかになった。この結果から、ent-AlloPはGABA受容体による副作用がなく、緑内障の神経保護治療薬として期待される。

研究成果の概要(英文)：In our previous study, we revealed that the neurosteroid, allopregnanolone (AlloP), protected retinal ganglion cells via GABA-A receptors. In the present study, we examined the involvement of autophagy in neuroprotection by AlloP, and revealed that AlloP protects retinal ganglion cells via activation of both GABAA receptors and autophagy. We also examine the effects of the enantiomer of AlloP (ent-AlloP). Ent-AlloP offered similar but better neuroprotection via simply autophagy acceleration but not GABA receptor activation. We conclude that ent-AlloP may serve as a prototype of potential therapeutic agents for treatment of glaucoma as an autophagy enhancer without affecting the inhibitory system mediated by GABARs.

研究分野：緑内障の神経保護治療

キーワード：緑内障 眼圧上昇 神経ステロイド アロプログネノロン GABA受容体 オートファジー 神経保護

1. 研究開始当初の背景

緑内障は、本邦における視覚障害の原因疾患の第1位である。眼圧上昇は緑内障進行の最も重要な危険因子であるが、眼圧上昇による網膜神経節細胞(RGC)の傷害機序については未だ不明な点が多い。

オートファジー(自食機能)は飢餓状態において誘導され、エネルギー産生・タンパク質新生のために細胞内のタンパク質を分解・回収するメカニズムである。その一方、オートファジーは十分な栄養下でも機能しており、傷ついた細胞内小器官や異常な凝集タンパク質を特異的に排除することにより、細胞における恒常性の維持に貢献する(選択的オートファジー)。近年、選択的オートファジーが、緑内障の発症メカニズムに関与する可能性が報告された(Deng et al., PLoS One 2013)。選択的オートファジーは、**図1**の3段階から成る(オートファジー・フラックス)。

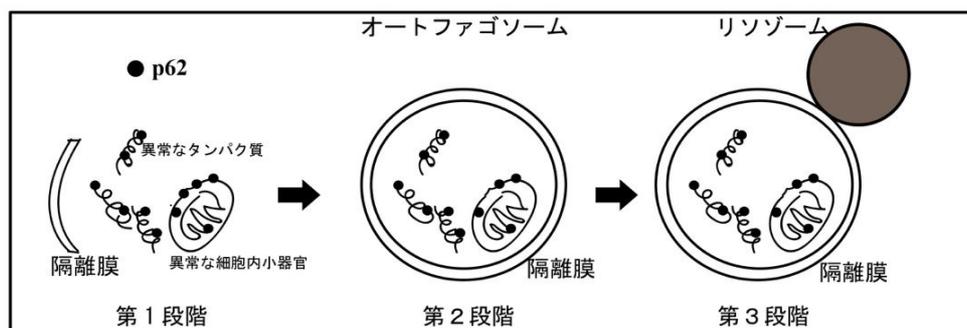


図1 . オートファジー・フラックスと p62 タンパク質

- 1) p62 タンパク質が、傷ついた細胞内小器官や異常な凝集タンパク質に集積する。
- 2) 細胞質内に出現した隔離膜が p62 と上記の異常構造物を取り囲み、オートファゴソームを形成する。オートファゴソームには、LC3B-II が特異的に発現する。
- 3) オートファゴソームは、加水分解酵素を含むリソゾームと融合してオートライソソームを形成する。オートライソソームは p62 と異常構造体を分解する。オートファジーが停滞すると、p62 が細胞内に蓄積する。

緑内障動物実験モデルを用いた検討では(Munemasa et al., Prog Retin Eye Res 2015), 眼圧が上昇すると、RGCにおいてオートファゴソームの出現頻度が増加し、選択的オートファジーの誘導が明らかになったが、p62の蓄積も同時に検出された。従って、「眼圧が上昇すると、RGCにおいてオートファジーが誘導されるものの、逐次的にオートファジーは停滞し、細胞内の異常構造物を除去できなくなる。その結果、緑内障性視神経症が誘導される」可能性があると考えられる。オートファジー関連薬による緑内障の神経保護効果については、オートファジー抑制薬 3-methyladenine が有効との報告がある一方、オートファジー賦活薬 rapamycin も有効との報告があり、未だ確定されていない。

神経ステロイドは、神経系においてコレステロールから合成されるステロイド・ホルモンの総称である。以前我々は *ex vivo* 緑内障モデルにおいて、GABA_A 受容体結合型の神経ステロイドであるアロプレグナノロン(AlloP)は、GABA_A 受容体を介してRGCを加圧傷害から防御することを報告した(Ishikawa et al. IOVS 2014)。当時 AlloP の神経保護作用は、主に神経伝達物質受容体を介するものと考えられていた。

一方、AlloP の持つオートファジー活性化作用も、中枢神経系において以前から報告されてきた。Niemann-Pick 病(Type C) マウスモデルにおいて、AlloP はオートファジーを活性化させて神経保護効果を発揮する可能性が報告されている(Liao et al. Brain Res 2009)。したがって、緑内障モデルにおいても、AlloP はオートファジー活性化によるRGC保護効果を持つ可能性が無視できなくなった。

AlloP は、2019年に米国FDAにて産後うつ病の治療薬として認可されたものの、傾眠や失神などGABA受容体を介すると考えられる副作用が認められた。もしGABA受容体を介さないで神経保護効果を発揮する薬物があれば、より一層の安全性が担保されることになる。そこで我々は、アロプレグナノロン(AlloP)の鏡像異性体である *ent*-アロプレグナノロン(*ent*-AlloP)に注目した。*ent*-AlloP は分子量と化学構造式はAlloPと同一であるが、光に対する性質(旋光性)が異なる物質である(**図2**)。 *ent*-AlloP はGABA_A 受容体とは結合しないものの(Covey et al., J Pharmacol Exp Ther 2000)、神経保護効果を有することが報告されている(VanLandingham et al., Neuropharmacology 2006)。これまで *ent*-AlloP の神経保護効果の詳細な機序は解明されていなか

ったが、予備実験の結果に基づいて、我々は *ent*-AlloP が、GABA_A 受容体を介さず、専らオートファジー活性化によって神経を保護する可能性を考えた。鏡像異性体を用いることによって、GABA_A を介さない、オートファジー活性化のみによる神経保護効果を抽出できる可能性があり、本研究計画は、緑内障の神経保護治療の臨床開発にむけ有益なエビデンスをもたらすと考えられた。

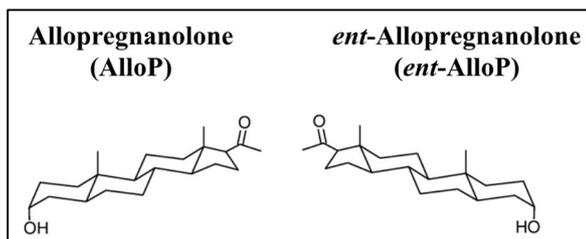


図2．神経ステロイドであるアロプレグナノロン AlloP と *ent*-アロプレグナノロン (*ent*-AlloP の鏡像異性体、*ent*-AlloP) の化学構造式。

2．研究の目的

我々は神経ステロイドがオートファジーを活性化することに着目して、「神経ステロイド及びその誘導体はオートファジーを活性化し、緑内障性視神経傷害を抑制できる」との作業仮説を立て、*ex vivo* 緑内障モデルと *in vivo* 緑内障モデルを用いて、仮説を検証した。新しい作用機序を持つ緑内障性視神経症の神経保護治療薬の臨床開発に向けて、エビデンスの構築を目指した。

3．研究の方法

1)「眼圧が上昇するとオートファジー機能が停滞し、細胞内に貯留した異常物質を積極的に除去できなくなった結果、網膜神経節細胞における緑内障性変化が誘導される」ことを検証するため、正常ラット分離眼杯標本による *ex vivo* 緑内障モデルと、ラット前房内マイクロ・ビーズ注入法による *in vivo* 緑内障動物実験モデルをもちいて、以下の項目を検討した。

光学顕微鏡・電子顕微鏡による形態学的観察と定量化

眼圧上昇による RGC とその軸索の傷害程度を、光顕・電顕による形態観察、抗 NeuN 抗体による RGC 生存試験、アポトーシス検出 TUNEL 染色法によって、経時的に評価した。さらに、眼圧上昇によってオートファゴソームやオートライソソームが増加するか否かを、電子顕微鏡超薄切片法によって定量化した。

免疫電気泳動法・免疫組織染色によるオートファジー・フラックスの解析

オートファジー・マーカーである LC3 及び p62 に対する抗体を用いた Western blotting 法と免疫組織染色を行い、眼圧上昇によってオートファジー・フラックスに変化が起きるか否かを調べた。PCR 法によって、LC3 と p62 の遺伝子の発現変化についても検討した。

2)「オートファジー賦活薬と抑制薬による神経保護効果」を検証するため、上記 *ex vivo* および *in vivo* 緑内障動物実験モデルにおいて、以下の項目を検討した。

オートファジー賦活薬と抑制薬の薬理作用の形態学的検証

オートファジー賦活薬として Rapamycin と Torin 2 を、オートファジー抑制薬として Bafilomycin, SAR405, 3-methyladenine を用いた。各薬剤の神経保護効果を、光顕・電顕による形態観察、RGC 生存試験、TUNEL 染色法によって確認した。

オートファジー・フラックスに対する生化学的、形態学的検証

各薬剤を投与した場合のオートファジー・フラックスの活性化について、LC3 及び p62 抗体を用いた Western blotting 法と免疫組織染色、PCR 法によって検討した。

3)「AlloP とその鏡像異性体 *ent*-AlloP はオートファジーを活性化して、緑内障性視神経傷害に対して神経保護効果を発揮する」ことを検証するため、上記 *ex vivo* 緑内障実験モデルと *in vivo* 緑内障動物実験モデルに AlloP と *ent*-AlloP を投与し、次の項目を検討した。

神経ステロイドとその鏡像異性体の神経保護効果の検証

ex vivo および *in vivo* 緑内障動物実験モデルにおける AlloP と *ent*-AlloP の神経保護効果を、光顕・電顕による形態観察、RGC 生存試験、TUNEL 染色法によって確認した。

神経ステロイドとその鏡像異性体によるオートファジー活性化の検証

AlloP と *ent*-AlloP を投与した場合のオートファジー・フラックスの活性化について、LC3 及び p62 抗体を用いた Western blotting 法と免疫組織染色、電子顕微鏡・超薄切片法によるオートファゴソームとオートライソソームの定量解析によって検討した。PCR 法によって、LC3 と p62 遺伝子の発現の変化も検討した。

AlloP の GABA_A 受容体を介する神経保護効果

AlloP および *ent*-AlloP の GABA_A 受容体を介する神経保護効果を検討するため、GABA_A 受容体拮抗薬であるピクロトキシンを用いて生化学的、形態学的に検討した。

4. 研究成果

今回の研究によって、以下の解析結果を得た。

1) 緑内障モデルでは眼圧が上昇するとオートファジーが停滞し、網膜神経節細胞が傷害された。

2) オートファジー賦活薬は神経保護効果をもたらしたが、オートファジー抑制薬は神経傷害をもたらした(図3)。

上記1)と2)の結果は、以下の2論文として掲載された。

- Additive neuroprotective effects of 24(S)-hydroxycholesterol and allopregnanolone in an ex vivo rat glaucoma model.

Ishikawa M, Yoshitomi T, Covey DF, Zorumski CF, Izumi Y.

Sci Rep. 2018 Aug 27;8(1):12851.

IF 3.998 査読あり 筆頭著者 海外共同研究

- The neurosteroid allopregnanolone protects retinal neurons by effects on autophagy and GABRs/GABA_A receptors in rat glaucoma models.

Ishikawa M, Takaseki S, Yoshitomi T, Covey DF, Zorumski CF, Izumi Y.

Autophagy. 2021 Mar;17(3):743-760.

IF 9.770 査読あり 筆頭著者 海外共同研究

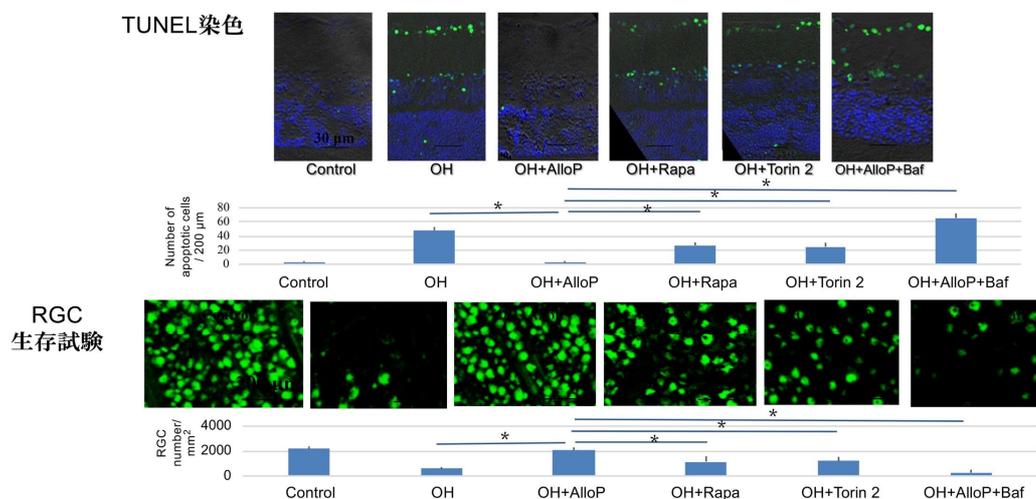


図3 . 上段 (TUNEL 染色): 対照群 (Control) と比較して、マイクロビーズの前房内注入によって高眼圧を誘導した *in vivo* 緑内障モデル (OH) において、神経節細胞層に TUNEL 陽性細胞が増加した。AlloP とオートファジー賦活薬 Rapamycin (Rapa) および Torin 2 を投与すると、TUNEL 陽性細胞は有意に減少した。AlloP とオートファジー抑制薬である Bafilomycin (Baf) を同時投与すると、AlloP の神経保護効果は失われた。下段 (RGC 生存試験): 対照群 (Control) と比較して、マイクロビーズの前房内注入によって高眼圧を誘導した *in vivo* 緑内障モデル (OH) において、神経節細胞 (RGC) は減少した。AlloP とオートファジー賦活薬 Rapamycin (Rapa) および Torin 2 を投与すると、RGC は有意に増加した。AlloP とオートファジー抑制薬である Bafilomycin (Baf) を同時投与すると、AlloP の神経保護効果は失われた。

3) AlloP と *ent*-AlloP は、Western blotting 法においてオートファジー活性化の指標である LC3B-II の発現を上昇させ、オートファジー抑制の指標である p62 の発現を抑制した(図4)。AlloP と *ent*-AlloP はオートファジーを促進すると考えられた。AlloP は GABA_A 受容体活性化とオートファジー活性化によって神経保護効果を発揮した。*ent*-AlloP は GABA_A 受容体を介さず、専らオートファジー誘導によって神経保護効果を発揮した。AlloP と比較して、*ent*-AlloP は GABA_A 受容体に関わる副作用がなく、より安全性の高い神経保護治療薬と考えられる。

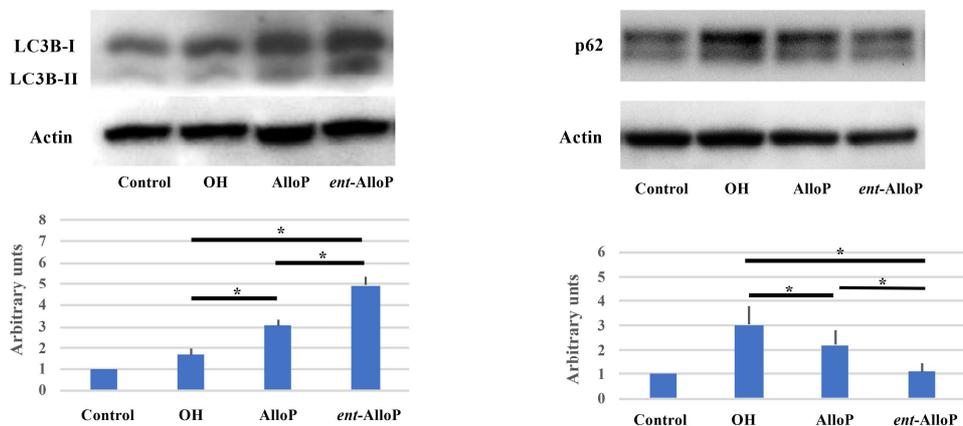


図4 . 上段 (TUNEL 染色): 対照群 (Control) と比較して , マイクロビーズの前房内注入によって高眼圧を誘導した *in vivo* 緑内障モデル (OH) において , 神経節細胞層に TUNEL 陽性細胞が増加した。AlloP とオートファジー賦活薬 Rapamycin (Rapa) および Torin 2 を投与すると , TUNEL 陽性細胞は有意に減少した。AlloP とオートファジー抑制薬である Bafilomycin (Baf) を同時投与すると , AlloP の神経保護効果は失われた。

上記 3) の結果は , 米国特許申請 (US Provisional Application 62/801,187) を行った。
 名称 : “The Enantiomer of Allopregnanolone for the Prevention and Treatment of Retinal Degeneration via Autophagy.”
 出願日 : 2019年2月5日
 出願者 : Makoto Ishikawa, Douglas F. Covey, Charles F. Zorumski, Yukitoshi Izumi

< 引用文献 >

Deng S, Wang M, Yan Z, Tian Z, Chen H, Yang X, Zhuo Y. Autophagy in retinal ganglion cells in a rhesus monkey chronic hypertensive glaucoma model. PLoS One. 2013 Oct 15;8(10):e77100.
 Munemasa Y, Kitaoka Y. Autophagy in axonal degeneration in glaucomatous optic neuropathy. Prog Retin Eye Res. 2015 Jul;47:1-18.
 Ishikawa M, Yoshitomi T, Zorumski CF, Izumi Y. Neurosteroids are endogenous neuroprotectants in an *ex vivo* glaucoma model. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2014 Nov 18;55(12):8531-41.
 Liao G, Cheung S, Galeano J, Ji AX, Qin Q, Bi X. Allopregnanolone treatment delays cholesterol accumulation and reduces autophagic/lysosomal dysfunction and inflammation in *Npc1*^{-/-} mouse brain. Brain Res. 2009 May 13;1270:140-51.
 VanLandingham JW, Cutler SM, Virmani S, Hoffman SW, Covey DF, Krishnan K, Hammes SR, Jamnongjit M, Stein DG. The enantiomer of progesterone acts as a molecular neuroprotectant after traumatic brain injury. Neuropharmacology. 2006 Nov;51(6):1078-85.
 Covey DF, Nathan D, Kalkbrenner M, Nilsson KR, Hu Y, Zorumski CF, Evers AS. Enantioselectivity of pregnanolone-induced gamma-aminobutyric acid(A) receptor modulation and anesthesia. J Pharmacol Exp Ther. 2000 Jun;293(3):1009-16.

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 5件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Sawada Y, Araie M, Shibata H, Murata K, Ishikawa M, Yoshitomi T, Iwase T.	4. 巻 Apr 9
2. 論文標題 Clinical Assessment of Scleral Canal Area in Glaucoma Using Spectral Domain Optical Coherence Tomography.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Am J Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 1-26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Ishikawa M, Takaseki S, Yoshitomi T, Covey DF, Zorumski CF, Izumi Y.	4. 巻 Feb 27
2. 論文標題 The neurosteroid allopregnanolone protects retinal neurons by effects on autophagy and GABRs/GABAA receptors in rat glaucoma models.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 該当する
1. 著者名 Ishikawa M, Yoshitomi T, Covey DF, Zorumski CF, Izumi Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 Neurosteroids and oxysterols as potential therapeutic agents for glaucoma and Alzheimer's disease.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuropsychiatry (London).	6. 最初と最後の頁 344-359.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4172/Neuropsychiatry.1000356.	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 該当する
1. 著者名 Ishikawa M, Yoshitomi T, Covey DF, Zorumski CF, Izumi Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 Additive neuroprotective effects of 24(S)-hydroxycholesterol and allopregnanolone in an ex vivo rat glaucoma model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 12851
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-31239-2.	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 該当する

1. 著者名 Sawada Y, Araie M, Shibata H, Ishikawa M, Iwata T, Yoshitomi T.	4. 巻 125
2. 論文標題 Optic Disc Margin Anatomic Features in Myopic Eyes with Glaucoma with Spectral-Domain OCT.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 1886-1897.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.opthta.2018.07.004.	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 該当する

1. 著者名 Sawada Y, Araie M, Kasuga H, Ishikawa M, Iwata T, Murata K, Yoshitomi T.	4. 巻 190
2. 論文標題 Focal Lamina Cribrosa Defect in Myopic Eyes With Nonprogressive Glaucomatous Visual Field Defect.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Am J Ophthalmol	6. 最初と最後の頁 34-49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajo.2018.03.018	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 該当する

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Makoto Ishikawa, Takeshi Yoshitomi, Charles F. Zorumski, Yukitoshi Izumi
2. 発表標題 Protective effects of tamoxifen against pressure-induced injury in a rat ex vivo glaucoma model
3. 学会等名 8th WORLD GLAUCOMA CONGRESS (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shohei Ito, Makoto Ishikawa, Yu Sawada, Takeshi Yoshitomi
2. 発表標題 Surgical repair of severe traumatic cyclodialysis by a circumferentially inserted 5-0 prolene thread along the ciliary sulcus
3. 学会等名 8th WORLD GLAUCOMA CONGRESS (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川誠、柴田直弥、吉富健志、Zorumski Charles、和泉幸俊
2. 発表標題 Protective effects of tamoxifen against rat glaucoma model
3. 学会等名 第123回 日本眼科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川 誠、柴田 直哉、吉富 健志（秋田大） Douglas F. Covey、Charles F. Zorumski、和泉 幸俊（ワシントン大）
2. 発表標題 ex vivo緑内障モデルにおける神経ステロイドのオートファジー活性効果と神経保護
3. 学会等名 日本眼科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石川 誠、吉富 健志（秋田大） Covey DF、Zorumski CF、和泉 幸俊（ワシントン大）
2. 発表標題 ex vivo緑内障モデルにおける神経ステロイドの相加的神経保護効果の機序
3. 学会等名 日本緑内障学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柴田 直弥、石川 誠、吉富 健志（秋田大） 和泉 幸俊（ワシントン大）
2. 発表標題 神経ステロイドの光学異性体特異的な神経保護効果のメカニズム
3. 学会等名 日本緑内障学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 1) 石川 誠、柴田 直哉、吉富 健志 (秋田大眼科) 2) Douglas F. Covey、Charles F. Zorumski、和泉 幸俊 (ワシントン大)
2. 発表標題 ex vivo緑内障モデルにおける神経ステロイドの神経保護効果のメカニズム
3. 学会等名 日本眼薬理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松井孝子、安田節子、坂本貴子、石川誠、吉富健志
2. 発表標題 視神経低形成を認めた PAX2 PAX2 遺伝子変異を有した有した腎コロボーマ症候群の1例
3. 学会等名 日本臨床眼科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shohei Ito, Makoto Ishikawa, Yu Sawada, Takeshi Yoshitomi
2. 発表標題 Surgical repair of severe traumatic cyclodialysis by a circumferentially inserted 5-0 prolene thread along the ciliary sulcus
3. 学会等名 World Glaucoma Congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Makoto Ishikawa, Takeshi Yoshitomi, Charles F. Zorumski, Yukitoshi Izumi
2. 発表標題 Protective effects of tamoxifen against pressure-induced injury in a rat ex vivo glaucoma model
3. 学会等名 World Glaucoma Congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 The Enantiomer of Allopregnanolone for the Prevention and Treatment of Retinal Degeneration via Autophagy	発明者 石川誠, Douglas F. Covey他	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、62/801,187	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
研究 分 担 者	吉富 健志 (Yoshitomi Takeshi) (60191623)	福岡国際医療福祉大学・視能訓練学科・教授 (37130)	

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		
米国	ワシントン大学医学部精神科		