

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：32713

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659315

研究課題名（和文） オートファジーを介した新規軸索保護経路の解明

研究課題名（英文） Autophagy and axonal protection

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：オートファジーはミトコンドリアによりその過程が調節されることが知られており、ミトコンドリア関連因子を視神経で検討した。ミトコンドリアに存在するチオレドキシン2は視神経において高眼圧モデルで減少していた。軸索内のマイクロチューブルやニューロフィラメントの減少が軸索数減少よりも鋭敏であることを報告した。オートファジーのマーカーであるLC-3Ⅱが高眼圧モデルの視神経で上昇しており、オートファジーをさらに誘起することで軸索に保護的に働くことを見出した。ミトコンドリアとオートファジーを調節することで軸索保護治療に寄与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Since mitochondria regulate the multistep process of autophagy, we examined mitochondrial dysfunction in optic nerve. A significant decrease in mitochondrial thioredoxin 2 (Trx2) level was observed in the optic nerve after intraocular pressure (IOP) elevation. We also showed the quantification of microtubules and neurofilaments in axon in optic nerve degeneration. LC-3Ⅱ, which is an autophagy marker, is upregulated in the optic nerve after IOP elevation. Rapamycin, an inducer of autophagy, ameliorated the axonal loss induced by IOP elevation. Thus, these findings suggest the modulation of mitochondria and autophagy as a new treatment strategy for optic nerve degeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	0	1,800,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	330,000	3,230,000

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：緑内障、オートファジー、軸索保護、LC-3、Nmnat、TNF、microtubule、neurofilament

## 1. 研究開始当初の背景

緑内障性視神経症は網膜神経節細胞死が起こるが、その死はアポトーシスであるとされてきた(Kerrigan et al., Arch Ophthalmol, 1997)。我々はアポトーシスを起こすモデルである NMDA 神経節細胞障害を用いて、一酸化窒素や心房ナトリウム利尿ペプチドの保護作用の過程で、チロシン水酸化酵素とその下流物質であるドパミンが関与していることを報告した(Kitaoka et al. Brain Res, 2003; Kitaoka and Kumai, In vivo, 2004; Kuribayashi et al. Brain Res, 2006)。更に、NF- $\kappa$ B p65、Rho/Rho キナーゼ系、c-Jun N-terminal kinase (JNK)、p38、c-Jun が神経節細胞死に関与していることも報告した(Kitaoka et al. Mol Brain Res, 2004; Kitaoka et al. Brain Res, 2004; Munemasa et al. Brain Res, 2005; Munemasa et al. J Neurosci Res, 2006)。しかし我々も含めて国内外でも anti-apoptotic 作用を持つ薬剤の研究がされてきたが、依然臨床応用に至っていない。そこで我々は細胞体保護のみならず軸索保護に注目し研究してきた (Kitaoka et al. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006; Fujino et al., Acta Neuropathol, 2009; Kitaoka et al., J Neuropathol Exp Neurol, 2009)。一方、OPA1 遺伝子多型が正常眼圧緑内障に関係しているとの報告 (Mabuchi et al., Am J Ophthalmol, 2007) があり、更に最近 OPA1 遺伝子異常マウスの視神経障害にオートファジーの関与が示唆された(White et al., Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009)。このことも我々の軸索保護研究に新しい概念をあたえる機会となった。

## 2. 研究の目的

緑内障患者の神経線維層欠損は限局性で扇形をしており、軸索障害が網膜神経節細胞体死より先行している根拠となる。緑内障モデルである DBA/2J マウスの網膜神経節細胞の細胞体死には pro-apoptotic 因子である BAX が関係しているが、その視神経軸索変性には関係しないことが報告されており、細胞体死と軸索変性の機序は異なると考えられる。そ

れゆえ細胞体保護のみでは有効な治療には結びつかないと考えられている。本研究では視神経原発の軸索障害を起こす TNF 及び高眼圧誘発視神経障害モデルを用い、オートファジーの関与を明らかにし、軸索保護の観点から革新的な神経保護治療法を確立する。

## 3. 研究の方法

### 視神経障害モデル作製

TNF 誘発視神経障害モデルラットは、TNF- $\alpha$  10ng を顕微鏡下にて 32G で硝子体に注射する。ラット高眼圧モデルは前房内に India Ink を注射し、その5日後に Ink により染められた角膜輪部にアルゴンレーザーを照射する。ラットの眼圧は手持ち眼圧計 (トノラボ) にて週一回無麻酔下で測定する。

### 網膜神経節細胞の isolation

網膜内には多彩な神経細胞やグリア細胞が存在し、TNF モデルや高眼圧モデルを研究する上で、時に弊害となることがある。我々は magnetic beads 法により神経節細胞のみを isolation することが可能である。

### オートファジー及びミトコンドリア関連因子の分子生物学的検討

TNF 誘発視神経障害モデルラット及び高眼圧ラットを作製し1, 2, 及び3週間後に眼球摘出し、網膜は上記 isolation 後、または視神経から蛋白抽出後、LC3、Trx1、Trx2、Nmnat3、p62、kinesin-1、AIF の抗体を用い Immunoblot を行う。またパラフィン切片も作製し、ニューロンのマーカー (NF-L, -H, Thy-1)、ミトコンドリアマーカー (VDAC, COXIV) などを用いて2重染色し、分布を明らかにする。

### 神経節細胞軸索の形態的評価 (光学顕微鏡)

篩状板、眼球より1mmの位置の薄切横断切片を作製しPPD染色後デジタルカメラで写真を撮り、コンピューターソフトウェアで軸索直径別の軸索数を解析する。

### 神経節細胞軸索の形態的評価 (電子顕微鏡)

篩状板、眼球より1mmの位置の超薄切横断切片を作製し酢酸ウラニル等処理後TEMで撮影。コンピューターソフトウェアで1軸索あたりのmicrotubule数、neurofilament数を解析する。

#### オートファジーの役割の解明

既存のオートファジー enhancer である rapamycin の効果と inhibitor である 3-MA の軸索障害への効果を検討する。またミトコンドリア関連蛋白の強制発現の軸索障害への効果も検討する。

#### 4. 研究成果

最初に軸索輸送に注目し、輸送に関与する蛋白の kinesin-1 の変化を検討した。軸索変性の際には軸索数減少に先行して neurofilament の減少が起こること、さらに neurofilament の減少に先行して kinesin-1 の減少が起こることを報告した (Brain Res, 2010)。オートファジーはミトコンドリアによりその過程が調節されることが知られており、ミトコンドリア関連因子を視神経で検討した。ミトコンドリアに存在するチオレドキシシン2は視神経において高眼圧モデルで減少していた。チオレドキシシン2強制発現で軸索保護効果を示すことを報告した (J Neurochem, 2010)。チオレドキシシン1は軸索内に存在し、TNF 視神経障害モデルでは保護的に働くことを見出した。その過程で軸索内のマイクロチューブルやニューロフィラメントの減少が軸索数減少よりも鋭敏であることを報告した (Endocrinology, 2011)。オートファジーのマーカーである LC-3 II が高眼圧モデルの視神経で上昇しており、電子顕微鏡所見でも高眼圧モデルでは視神経軸索内にオートファゴソームが多数存在することが分かった。Rapamycin によりオートファジーをさらに誘起することで軸索に保護的に働くことを見出した。ミトコンドリアとオートファジーを調節することで軸索保護治療に寄与することが示唆された。

#### 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5件)

- ① Koseki N, Kitaoka Y, (他5名). 17 $\beta$ -estradiol prevents reduction of retinal phosphorylated 14-3-3 zeta protein levels following a neurotoxic insult. Brain Res. 1433:145-152, 2012 査読有

- ② Takada K, Munemasa Y, Kuribayashi J, Fujino H, Kitaoka Y. Protective effect of thalidomide against N-methyl-D-aspartate-induced retinal neurotoxicity. J Neurosci Res. 89:1596-1604, 2011 査読有

- ③ Kitaoka Y, Munemasa Y, (他6名). Axonal protection by 17 $\beta$ -estradiol through thioredoxin-1 in tumor necrosis factor-induced optic neuropathy. Endocrinology 152:2775-2785, 2011 査読有

- ④ Munemasa Y, Kitaoka Y, (他2名). Modulation of mitochondria in the axon and soma of retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. J Neurochem. 115:1508-1519, 2010 査読有

- ⑤ Kuribayashi, J, Kitaoka Y, (他2名). Kinesin-1 and degenerative changes in optic nerve axons in NMDA-induced neurotoxicity. Brain Res. 1362:133-140, 2010 査読有

[学会発表] (計9件)

- ① 北岡康史、(他5名)、視神経軸索内 neurofilaments 及び microtubules の定量化、第22回日本緑内障学会、2011年9月23日、秋田アトリオン (秋田県)

- ② 北岡康史、(他4名)、Nmnat3 強制発現による視神経軸索保護における LC3 の変化、第31回日本眼薬理学会、2011年9月18日、ホテル一畑 (島根県)

- ③ Kitaoka Y, (他4名). Involvement of Autophagy in Axonal Protection by Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase3 (Nmnat3) Overexpression Against High IOP-induced Optic Nerve Degeneration. 2011 ARVO annual meeting, May 4, 2011, Fort Lauderdale, U.S.A

- ④ Kojima K, Kitaoka Y, (他2名). Phosphorylation of PS1 And Up-regulation of APP In TNF-induced Optic Nerve Degeneration. 2011 ARVO annual meeting, May 4, 2011, Fort Lauderdale, U.S.A

- ⑤ 北岡康史、(他5名)、高眼圧モデルにおける Nmnat3 の役割、第21回日本緑内障学会、2010年9月25日、アクロス福岡 (福岡県)

- ⑥ Kitaoka Y, (他4名). Axonal protection by nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase3 (Nmnat3) in TNF-induced and high IOP-induced optic nerve degeneration.

2010 ARVO annual meeting, May 2, 2010, Fort Lauderdale, U.S.A

⑦Munemasa Y, Kitaoka Y (他 4 名). Modulation of Axonal Transport of Mitochondria in Rat Glaucoma Model. 2010 ARVO annual meeting, May 3, 2010, Fort Lauderdale, U.S.A

⑧北岡康史、(他 5 名)、緑内障モデルとしての TNF 誘発網膜神経節細胞及び軸索障害、第 2 回神奈川眼科学会、2010 年 4 月 24 日、ホテルキャメロットジャパン (神奈川県)

⑨北岡康史、(他 4 名)、TNF 誘発視神経障害における Nmnat3 の役割、第 114 回日本眼科学会総会、2010 年 4 月 15 日、名古屋国際会議場 (愛知県)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし