

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

小島 香

専攻分野：眼科学

コース：

指導教授：高木 均

主論文の題目：

Axonal Protection via Modulation of the Amyloidogenic Pathway in Tumor Necrosis Factor-Induced Optic Neuropathy

(TNF 誘発視神経軸索障害におけるアミロイド産生経路の調節を介した軸索保護)

共著者：

Yasushi Kitaoka, Yasunari Munemasa, Satoki Ueno

緒言

過去の研究で緑内障とアルツハイマー病(AD)の関連を示唆する多数の報告があるが、その因果関係は未だ解明されていない。ADの病態として、アミロイド前駆蛋白(APP)からアミロイド β (A β)を産生する分解過程を調節する γ セクレターゼの重要な構成因子であるプレセニリン(PS)が近年注目されている。Tumor Necrosis Factor(TNF)を介した神経毒性が緑内障性視神経症に関連すると報告があり、我々も以前より研究を重ねてきた。今回我々はTNF誘発視神経軸索障害モデルを用いて、リン酸化PS1(p-PS1)とAPPの変動や局在を明らかにし、視神経変性過程でのAPP分解における γ セクレターゼの役割を検討した。

方法

8週齢雄性ラットの片眼にTNF10ng 単独、あるいは 10^{-4} Mまたは 10^{-3}

M の BMS299897 (γ セクレターゼ阻害薬、以下 BMS)を TNF10 ng と同時に 2μ l 硝子体注射し、コントロールとして PBS を用いた。BMS 投与群は 3 日後に BMS を再度硝子体注射した。注射 1、2 週間後に視神経を摘出した。PS1, p-PS1, glial fibrillary acidic protein(GFAP), Neurofilament(NF) の各種抗体を用いて Immunoblotting(IB) を施行した。p-PS1、Vimentin、GFAP、NF、APP、TNF-receptor(R)1、TNF-R2 の各種抗体にて二重免疫染色を施行した。注射 1 週間後の視神経を用いて 6E10 抗体にて Immunoprecipitation(IP) を行った後、APP Intracellular Domain(AICD) 抗体にて IB を行った。注射 2 週間後の薄切視神経水平切片を 1% paraphenylene diamine にて染色し、Aphelion ソフトウェアを用いて軸索数を定量化した。統計学的解析には Mann-Whitney 検定を用いた。本研究は動物実験委員会の承認を得て施行した。

結果

硝子体注射後 1、2 週間後の視神経において p-PS1 蛋白はコントロールに比べて TNF 投与で有意に上昇した ($p<0.05$)。1 週間後の視神経において GFAP 蛋白はコントロールに比して TNF 投与で有意に上昇し ($p<0.05$)、2 週間後では NF 蛋白は TNF 投与群で有意に減少した ($p<0.05$)。

免疫染色では p-PS1 は Vimentin、GFAP と共存し、NF とは共存せず、視神経アストロサイトの核に局在することが確認された。p-PS1 の発現の強さは TNF 投与で有意に増加した ($p<0.05$)。APP は NF とは共存せず、Vimentin と共存した。APP と p-PS1 は共存しており、グリア細胞に存在することが確認された。TNF-R1、TNF-R2 は TNF 投与群で GFAP と一部共存した。

IP では APP の分解産物である C-terminal fragment (CTF) β が TNF 投与で減少し ($p<0.05$)、BMS 同時投与ではその減少が抑制された ($p<0.05$)。

視神経薄切切片の光顕写真では TNF 投与による軸索変性が BMS 同時投

与で抑制されており、軸索数でも TNF 投与による軸索数減少を BMS 同時投与で濃度依存性に有意に改善した ($p < 0.05$)。

考察

今回の結果から γ セクレターゼ活性の調節が TNF 関連視神経軸索変性疾患の治療に有用であることが示唆された。

近年、PS1 のリン酸化はヒト AD 患者の脳において増加しており、 γ セクレターゼ活性を上昇させ、 $A\beta_{42/40}$ の割合を上げると報告がある。今回の発見は視神経アストログリア細胞における PS1 リン酸化が TNF 誘発視神経軸索変性に重要な役割を果たしていることを示唆する。加えて TNF/TNFR シグナリングが緑内障性視神経変性のアストロサイトにおける免疫炎症反応を調節しているという報告があり、最近我々は高眼圧緑内障モデルの視神経において TNF の上昇を確認した。

APP は緑内障モデルのラットやマウスで視神経に蓄積することが報告されている。アミロイド産生経路では APP はまず β セクレターゼにより分解され CTF β となり、さらにこれが γ セクレターゼにより $A\beta$ と AICD に分解される。IP の結果は 6E10 抗体で pull down された視神経の CTF β が TNF 注射後に減少したことを示し、TNF 投与により γ セクレターゼが活性化し、CTF β 分解が促進したことを意味する。対して、 γ セクレターゼ阻害薬である BMS 投与では CTF β レベルは TNF 投与と比較し上昇しており CTF β 分解を抑制したことが証明された。

過去の論文では、 γ セクレターゼ阻害薬によるアポトーシスからの保護やカスパーゼ 3/7 活性の阻害、脳虚血再還流モデルマウスにおける脳損傷の軽減や機能改善、さらに神経軸索切断後の軸索再生の促進が報告されており、今回の結果と併せると γ セクレターゼ阻害薬は細胞体死のみならず軸索変性に対しても保護効果を持つと考えられた。