

## 主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

佐瀬 佳奈

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 by Short-term Hyperglycemia with Involvement of Autophagy in TNF-induced Optic Nerve Degeneration

(TNF 誘発視神経障害における短期高血糖による軸索保護とオートファジー)

共著者：

Yasushi Kitaoka, Yasunari Munemasa, Kaori Kojima, Hitoshi Takagi

緒言

糖尿病と緑内障の関係性は不明な点が多い。高眼圧緑内障モデルで短期間高血糖が視神経軸索に保護的に働いたとの報告があるがその機序は不明である。

最近我々はオートファジーの活性化が視神経軸索障害を抑制することを報告した。オートファジーは自己貪食作用であり様々な神経変性疾患に関与している。本研究では短期間高血糖が Tumor Necrosis Factor (TNF) による視神経軸索障害を抑制するか、またその過程にオートファジーが関与しているか検討した。

方法・対象

8週齢雄性ラットを2群に分け、1つは生理食塩水 (PSS) を腹腔内投与 (normoglycemic=NG群)、もう1つは streptozotocin (STZ) を腹腔内投与した。腹腔内投与4日後に血糖測定し、STZ群で血糖 250mg/dl

以上を hyperglycemic (HG)群とした。腹腔内投与 4 日後に NG 群、HG 群共に phosphate-buffer saline (PBS) 又は TNF を硝子体注射する群を作成した。HG 群ではオートファジー阻害剤である 3-methyladenine (3-MA) と TNF を同時投与する群も作成した。硝子体注射から 1 週間後に視神経を摘出し、microtubule associated protein light chain 3-II (LC3-II)、p62 の発現をウエスタンブロットで解析、免疫染色で neurofilament (NF) と LC3 の局在を確認した。硝子体注射から 2 週間後に軸索数を定量した。また、電子顕微鏡で視神経のオートファゴゾームのカウントを行った。

なお本研究は、聖マリアンナ医科大学動物実験委員会（承認番号 1508010 号）の承認を得たものである。統計は Mann-Whitney 検定を用いた。

## 結果

HG 群では平均 436mg/dl と有意 ( $p < 0.01$ ) な血糖上昇を認めた。PBS 群では NG 群 HG 群間で軸索数に有意差は認めなかった ( $p > 0.05$ )。一方、NG 群で PBS 群と TNF 群を比較すると TNF 群で約 35%の有意 ( $p < 0.05$ ) な軸索減少を認めた。しかし高血糖により TNF による軸索数減少が有意 ( $p < 0.05$ ) に保護され、この保護作用は 3-MA により有意 ( $p < 0.05$ ) に抑制された。

ウエスタンブロット法では、PBS 群、TNF 群の両群で、NG 群に比較し HG 群で LC3-II が有意 ( $p < 0.05$ ) に上昇した。高血糖による LC3-II の上昇は 3-MA により有意 ( $p < 0.05$ ) に抑制された。NG 群では PBS 群と比較して TNF 群で p62 の有意 ( $p < 0.05$ ) な上昇を認めた。しかし、p62 の上昇は高血糖により有意 ( $p < 0.05$ ) に抑制され、この抑制効果は 3-MA を併用すると認めなかった。

電顕所見でのオートファゴゾーム数の結果は PBS 群 TNF 群共に NG 群に比較し HG 群で有意 ( $p < 0.05$ ) に多かった。

免疫組織学的所見では、LC3 の発現は網膜では神経線維層に認められ、これらは NF と一致した。さらに視神経の神経線維においても LC3 は共存していた。

## 考察

本研究で短期間の高血糖で視神経軸索変性は生じず、むしろ TNF による視神経軸索変性を抑制した。視神経軸索や網膜神経節細胞に対するオートファジーの役割はいくつか報告されているが結論が出ていない。オートファジー誘導体の rapamycin が TNF による軸索変性を保護したという最近の報告も、今回の研究での高血糖による軸索保護効果がオートファジー阻害剤で抑制された結果を支持している。

LC3-II の発現量はオートファゴソーム数に相関する。今回の研究で高血糖により視神経の LC3-II の発現とオートファゴソーム数は有意に上昇した。免疫組織学的所見では、NF 陽性線維の中に dot 状の LC3 陽性発現を観察した。LC3 はオートファゴソームのマーカーであり、この所見は電顕での軸索内オートファゴソーム数観察と一致した。また、今回の研究では短期高血糖は TNF による視神経での p62 上昇を有意に抑制した。p62 低下はオートファジーフラックスの上昇を示すとの報告もあり、STZ 誘発高血糖が視神経でのオートファジーフラックスの増加につながっている可能性も考えられた。今回 p62 の血糖による差異は TNF 群のみで認められたため、高血糖は TNF による視神経変性においてオートファジーフラックスを改善するのかもしれない。オートファジーフラックスの増加が不必要な物質のクリアランスにつながり、視神経疾患で保護治療に有益との報告もされている。また、今回の研究では短期間高血糖のみで軸索保護効果を確認しており、長期高血糖では結果は異なると予想している。

#### 結論

TNF 誘発視神経軸索障害モデルにおいて短期高血糖により、軸索変性が有意に抑制された。そのメカニズムとして、オートファジーが関与している可能性が考えられる。