

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：塚原 千広

専攻分野：分子神経科学

指導教授：北岡 康史

主論文の題目：

Axonal Protection by Tacrolimus with Inhibition of NFATc1 in
TNF-Induced Optic Nerve Degeneration

(TNF誘発視神経変性モデルにおけるNFATc1阻害を介したタクロリムスの軸索保護効果)

共著者：

Kana Sase, Naoki Fujita, Hitoshi Takagi, Yasushi
Kitaoka

緒言

緑内障は視神経における軸索変性が網膜神経節細胞死に先行する特徴がある。また tumor necrosis factor (TNF)誘発視神経変性モデルは軸索保護研究に使用されている。外傷性脳損傷モデルラットにおいて大脳皮質での nuclear factor of activated T cells (NFATc) 1の上昇が報告されている。NFATc はカルシニューリン(CaN)によって脱リン酸化され核内へ移行することにより転写調整を行う。このCaNを阻害するタクロリムスは、高眼圧モデルにおいて網膜神経節細胞や視神経軸索の保護作用が報告されているが、その機序は不明である。本研究では、重症アレルギーに対する点眼として臨床使用されているタクロリムスがTNFによる軸索変性を抑制するか、またCaN/NFATc1に影響を与えるかを検

討した。

方法・対象

8週齢雄性ラットに phosphate buffered saline (PBS)、TNF、タクロリムスもしくは TNF とタクロリムスの硝子体注射を施行し、3、7、14日後に視神経を摘出し、CaNA α 、NFATc1、TNF の発現を Western Blot 法にて解析した。硝子体注射後 1 週間後に視神経を摘出し、免疫染色にて GFAP と NFATc1 の局在を確認した。また、硝子体注射から 2 週間後に軸索数を定量した。

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 1808004 号)の承認を得たものである。統計は ANOVA 後 Dunnett's 検定を用いた。

結果

視神経における Western Blot 法にて PBS 群と TNF 群で CaNA α 蛋白量は 3、7、14 日後いずれにおいても有意差を認めなかった。また同様に NFATc1 を定量した結果、硝子体注射 7 日後において TNF 群が PBS 群と比較して有意な上昇を認めた ($p < 0.05$)。この上昇はタクロリムスの同時投与によって有意な抑制を認めた ($p < 0.05$)。また、PBS 群とタクロリムス単独群では NFATc1 蛋白発現に有意な変化を認めなかった ($p > 0.05$)。続いて PBS 群と TNF 群における TNF 蛋白発現を Western Blot 法にて定量した。硝子体注射 3 日後では PBS 群と TNF 群で明らかな変化を認めなかった。7 日後では TNF 群が PBS 群と比較して TNF タンパク量の増加傾向であったが、有意差を認めなかった ($p > 0.05$)。14 日後では TNF 群において TNF タンパク量は有意な上昇を認めた ($p < 0.05$)。この上昇はタクロリムスの同時投与によって有意に抑制された ($p < 0.05$)。

免疫組織学的所見では PBS 群と比較して TNF 群では NFATc1、GFAP の発現は増強し、また発現部位は GFAP と一致していることがわかった。

この発現増強はタクロリムスによって抑制されていた。

PBS 群と比較して TNF 群では軸索数の有意な減少を認めた ($p < 0.005$)。またこの減少はタクロリムスの同時投与により濃度依存的に保護され、 10^{-5}M ($p < 0.05$) と 10^{-4}M ($p < 0.005$) で統計的有意であった。

考察

本研究では、TNF 誘発視神経変性モデルにおいて視神経での CaN の発現は変化をきたさなかったが、NFATc1 の発現は硝子体注射 1 週間後において上昇した。この上昇はタクロリムスによって抑制された。また、免疫染色にて GFAP と NFATc1 が一致しており、NFATc1 のアストロサイトにおける局在が示された。そして TNF は TNF 硝子体注射 14 日後にて上昇し、この上昇はタクロリムスによって抑制された。

Ca チャネルアゴニストが CaN/NFATc1 系を介して TNF を増加させた報告や、アストロサイトにおいて TNF が CaN を促進し NFAT 系を刺激したとの報告もある。タクロリムスは脳虚血モデルにおいてアストロサイト活性を抑制や、グリアにおいて TNF といったサイトカイン発現を抑制することによって神経保護効果が報告にある。本研究でも TNF 誘発視神経変性モデルにおいて、タクロリムスの濃度依存的に軸索保護効果を有した。これらの報告からも、TNF 誘発視神経変性モデルにおいて、タクロリムスは CaN/NFATc1 系を阻害することによりアストロサイトにおける TNF 分泌を減少させ、軸索変性を抑制し神経保護効果を有すると示唆される。

結論

タクロリムスは CaN/NFATc1 系の阻害により、その下流にある TNF 発現を抑制することで、軸索保護効果を得られる可能性が示唆された。