

## 2022年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	<b>TNF 誘発視神経障害モデルでの NFATc1 の役割と IL-1<math>\beta</math></b> ー緑内障性視神経障害における病態解明と神経保護治療を目指してー
キーワード	① VIVIT、② TNF 誘発視神経障害モデル、③ NFATc

### 研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	ツカハラ チヒロ 塚原 千広
配付時の所属先・職位等 (令和4年4月1日現在)	聖マリアンナ医科大学 医学部 眼科学 助教
現在の所属先・職位等 (令和5年7月1日現在)	聖マリアンナ医科大学 医学部 眼科学 助教
プロフィール	初期臨床研修を修了後は、眼科において緑内障を中心とした臨床診療に従事しています。診療を行う中で、緑内障治療として眼圧下降だけではなく、神経保護による治療の発展に関心を持ちました。そこで臨床診療と平行してTNF誘発視神経障害モデルを使用した軸索保護と薬物の作用機序について基礎研究に励んでいます。

### 1. 研究の概要

ヒト緑内障患者の前房水ではTNF上昇(Sawada et al., IOVS, 2010)や視神経軸索にTNF-receptor1発現(Yuan and Neufeld, Glia, 2000)が確認されるなど緑内障とTNFの関連性が多く報告されており(Sawada et al., IOVS, 2010)、動物モデルとしてTNF硝子体注射による視神経障害モデルが緑内障モデルとして認知されてきた(Ko KW et al., J Cell Biol, 2020)。また緑内障において視神経軸索障害が網膜神経節細胞死に先行する構造的特徴を持つ。我々はTNF誘発視神経障害モデルラットにおいてTNF硝子体注射2週間後に視神経軸索数減少を認め、2か月後に網膜神経節細胞数が有意な減少を来すことを報告しており(Kitaoka Y et al., Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006)、緑内障モデルとして有用であると考えます。

またAlzheimer病モデルラットへのNFATc阻害剤であるVIVIT投与による海馬でamyloid $\beta$ の発現抑制(Rojanathammanee L et al., J Neuroinflammation, 2015)や外傷性脳損傷モデルラットにてVIVITは海馬シナプス機能の改善(Furman JL et al., J Neurosci, 2016)といった、NFATcと神経障害の関与が示されている。しかし視神経におけるVIVITの影響及びNFATc発現を研究した報告はない。このため視神経を用いて、カルシニューリン/NFATc系を探索することは緑内障性視神経障害の機序の解明および治療への発展性があり有用であると考えられる。

### 2. 研究の動機、目的

緑内障による日本での成人新規視覚障害認定者数は増加しており、原疾患として最多である(Morizane Y et al., Jpn J Ophthalmol, 2019)。緑内障は視神経と視野に特徴的な変化を来す進行性の疾患であり、点眼や手術による眼圧下降が視神経障害の進行を抑制し、視野障害の進行も軽減し得る特徴がある(緑内障診療ガイドライン第4版)。しかし日本人には正常眼圧緑内障患者数が多く(Iwase A et al., Ophthalmology, 2004)、また正常眼圧緑内障では十分に眼圧を低下させた上でも進行する症例も少なくないため(Killer HE et al., Eye (Lond),

2018)、緑内障の生体内での病態と神経保護治療の研究に関心を向けた。

カルシニューリン阻害薬であるタクロリムスの投与により、高眼圧モデルラットにて視神経軸索と網膜神経節細胞の保護効果(Huang W et al., PNAS, 2005)が報告されている。また外傷性脳損傷モデルラットではNFATc1活性の上昇(Qiaoli W et al., Neurochem Res, 2016)が報告されており、神経障害におけるカルシニューリン/NFATc系の関与が示唆されている。

我々はTNF誘発視神経障害モデルラットの視神経において、タクロリムスがNFATc1の発現上昇を抑制し視神経軸索の保護効果を有することを発表した(Tsukahara et al., Neurochem Res, 2019)。さらにヒト緑内障患者における篩状板でのNFATc3の発現上昇(Irnaten M et al., IOVS, 2018)も報告されており、緑内障におけるNFATcの関連が推測される。

しかしタクロリムスはすべてのカルシニューリンホスファターゼ活性を阻害するため、カルシニューリン/NFATc系以外のカルシニューリン依存性経路も阻害する。このため緑内障性視神経障害における病態の解明のため、選択的にNFATcを阻害するVIVITを用いて緑内障におけるNFATcの病態への関与を検索する。TNF誘発視神経障害モデルにおけるVIVITの視神経軸索への保護効果の有無及び、保護効果をきたす有効濃度を検索する。

NFATcはサイトカイン等の転写を調節しているが、緑内障患者の前房水では複数のサイトカイン濃度の上昇を認め、眼圧との正の相関を認めた報告がある(Takai Y et al., Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012)。緑内障におけるNFATcを介した各種のサイトカインの影響として、IL-1 $\beta$ の発現の上昇やVIVIT投与による変動および局在を確認したい。

### 3. 研究の結果

TNF誘発視神経障害モデルにおけるVIVITの軸索保護効果を確認するため、各種薬剤を硝子体注射し、2週間後に視神経を摘出した。摘出した視神経を用いてPlastic blockを作成しPPD染色し、軸索数を解析した。コントロールであるPBS群と比較してTNF群では軸索変性を認め、軸索数の有意な減少を確認した。またTNFとそれぞれ $10^{-6}$ M VIVIT・ $10^{-5}$ M VIVIT・ $10^{-4}$ M VIVITの硝子体内への同時投与をしたところ、 $10^{-5}$ M VIVITおよび $10^{-4}$ M VIVITにて有意な軸索保護効果を認めた。この結果をもとにVIVITの有効濃度を $10^{-5}$ Mと設定した。

次にPBS、TNF、TNF+ $10^{-5}$ M VIVITの各群硝子体注射を施行し1週間後に視神経を摘出し、Western Boltにて視神経でのIL-1 $\beta$ の発現を比較した。PBS群と比較してTNF群ではIL-1 $\beta$ 発現は上昇し、TNF+ $10^{-5}$ M VIVIT群ではその発現上昇は抑制された。

PBS、TNF、TNF+ $10^{-5}$ M VIVITの各群硝子体注射を施行し1週間後に視神経・網膜を摘出した。IL-1 $\beta$ とNFATc1の発現部位と強度の変化を、免疫染色を用いて検索した。IL-1 $\beta$ とNFATc1は視神経にて共存を確認できた。PBS群と比較してTNF群においてIL-1 $\beta$ 発現の増強と、TNF+VIVIT $10^{-5}$ M群にてその抑制を認めた。

### 4. 研究者としてのこれからの展望

現在、眼科臨床診療に携わりつつ基礎研究も行っております。診療により基礎研究に割ける時間も限られることありますが、点眼治療を続けていても視野障害が進行してしまう緑内障の患者さんを直接診ることでより一層、神経保護の必要性を実感しています。基礎研究によりわずかでも医学の進歩の一助になれることを望みます。また様々なライフイベントを迎える際には、基礎研究の継続は一人だけでは困難なこともあります。そのような中で上司や同僚の研究者とともに協力をしながら研究を継続したいと考えます。

### 5. 支援者（寄付企業等や社会一般）等へのメッセージ

現在、日本における新規視覚障害の原疾患として緑内障が最多となっています。その緑内障の治療としては緑内障点眼や緑内障手術による眼圧下降が一般的となっていますが、日本人には正常眼圧緑内障患者数が多く、また正常眼圧緑内障では十分に眼圧を低下させた上でも進行する症例も少なくありません。

このため私は、緑内障の生体内での病態の解明と緑内障に対する神経保護治療に関する研究に興味を持ち、大学院に入学後はTNF誘発視神経障害モデルにおけるタクロリムスの軸索保護効果を研究しました。大学院卒業後も基礎研究を継続できているのは奨励金の支援者の

方々のご協力があったのことに深く感謝しております。今後も神経保護の研究が緑内障患者における視覚障害の減少へとつながるように、邁進したいと思います。