

総 説

サイクリン依存性キナーゼ5阻害剤であるロスコピチンが、ラットの挫滅後の視神経に対して、タウ蛋白のリン酸化と網膜神経節細胞死を抑制する過程の検討

廣 川 貴 久

大阪医科薬科大学眼科学教室

要旨: タウオパチーは、タウタンパク質の凝集体である神経原線維変化が出現する疾患群である。タウオパチーは視神経傷害によっても生じ、タウタンパク質の過剰なリン酸化が網膜神経節細胞 (retinal ganglion cell: RGC) で生じる。そのリン酸化の一部には、サイクリン依存性キナーゼ5 (Cdk5) が関与していると考えられている。視神経傷害 (optic nerve crush: ONC) 後にCdk5阻害剤であるロスコピチンを硝子体内に注射し、Cdk5が果たす役割を検討した。ロスコピチンの神経保護効果は、ONC後7日目に、Tuj-1でRGCを染色し、RGC密度によって評価した。リン酸化タウタンパク質、カルパイン-1、および α -フォドリン分解産物の変化は、ONC後3日目にimmunoblotで検討し、さらにCdk5活性化因子であるP35/P25の発現変化を免疫組織化学的に評価した。結果として、ロスコピチンがリン酸化タウタンパク質の発現を減少させることが示された。カルパイン-1および α -フォドリン分解産物は3日目に増加し、カルパインシグナル伝達経路が活性化されたことが示唆された。P35/P25は、ONC後Tuj-1による染色性が低いRGCに蓄積されており、カルパイン阻害剤により、リン酸化タウタンパク質の増加が抑制された。RGCの細胞密度は、コントロール群では $2191 \pm 178/\text{mm}^2$ であったが、ONCによって $1216 \pm 122/\text{mm}^2$ に減少し、ロスコピチン投与群では $1622 \pm 130/\text{mm}^2$ 、カルパイン阻害剤投与群では $1671 \pm 34/\text{mm}^2$ にそれぞれ保たれ、神経保護作用が認められた。今回の研究から、カルパインを介したCdk5の活性化が、タウタンパク質の病的なリン酸化に関連している可能性が示された。

Key words: タウオパチー, サイクリン依存性キナーゼ5 (Cdk5), ロスコピチン, カルパイン, 視神経傷害

緒 言

タウタンパク質は、中枢神経系 (CNS) の微小管の機能を安定化および維持するタンパク質であり、軸索輸送において重要な役割を果たす。しかし、軸索が損傷すると、タウタンパク質は過剰にリン酸化され、凝集して神経細胞死につながる¹⁾。これらの病態はタウオパチーと呼ばれ²⁾アルツハイマー病に代表される慢性進行性の神経変性疾患でみられる³⁾。我々は、視神経傷害 (ONC) 後の逆行性軸索変性過程において、網膜神経節細胞 (RGC) 内でリン酸化タウタンパク質が増加していることを示し

た⁴⁾。低分子干渉RNA (siRNA) によってタウタンパク質の遺伝子サイレンシングを行うと、ONC後のRGC死が抑制されたことから、タウオパチーは視神経傷害後の軸索変性にも関連し⁴⁾、リン酸化タウタンパク質を抑制することが、視神経傷害後の神経保護につながる可能性が示された。

サイクリン依存性キナーゼ (Cdk) は、プロテインキナーゼのひとつで、遺伝子の転写と分化を制御することによって細胞周期の制御に関与している⁵⁾。一方でCdk5は、主に有糸分裂後ニューロンに存在し、微小管制御に

関連しており⁶⁾⁷⁾他のCdkファミリーとは異なる特性を持っている。アルツハイマー病患者の脳では過剰リン酸化されたタウタンパク質が観察され、Cdk5はタウタンパク質の病的なリン酸化を引き起こす可能性がある主要なキナーゼの一つと考えられている⁸⁾。

カルパインは、神経細胞死に密接に関連するカルシウム依存性プロテアーゼの一つである⁹⁾。カルパインは、Cdk5活性化因子であるP35を含むさまざまなタンパク質を分解することが知られている¹⁰⁾。カルパインは視神経傷害後の網膜でも活性化されることが知られており、カルパインの阻害はONC後のRGCに対して神経保護効果があることが示されている⁹⁾。これらのことから、カルパインがタウタンパク質の過剰リン酸化にも関与している可能性が考えられている⁶⁾⁸⁾。

これらの背景から、カルパインによるCdk5の活性化が、タウタンパク質の過剰なリン酸化を引き起こすかどうかを検討した。方法としてはRGCにおけるP35/P25の発現の変化は免疫組織化学(IHC)によって測定し、リン酸化タウタンパク質に対するロスコピチン、Cdk5阻害剤、およびカルパイン-1阻害剤の効果はimmunoblotで検討した。ロスコピチンは、強力かつ特異的にCdk5を阻害することが示されている¹¹⁾。RGCに対する神経保護作用は、ONC後7日目にTuj-1染色してIHCによって検討した。

材料と方法

9週齢の雄Wistarラットを使用した。ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) が推奨する動物使用に関する倫理基準を順守し、実験プロトコルは大阪医科大学動物使用管理委員会の承認を受けた(第28024号)。視神経傷害に関しては、全身麻酔下で左側視神経を露出させ、眼の後方2mmの位置を鉗子で10秒間圧迫控滅して生じさせた。過去の研究にならい網膜虚血が生じていないことを確認した¹²⁾。コントロール群は、視神経を露出させる段階で手術を終了し作成した。すべての動物で右眼には処置を行わなかった。

Cdk5阻害剤とカルパイン-1阻害剤の効果を調べるために、10 μ Mロスコピチンと200 μ Mカルパイン-1阻害剤をONC直後のラットの硝子体に注射した。ONCの直後に、プラセボ対照群に対しては3 μ Lのジメチルスルホキシド(DMSO)の硝子体内注射を行った。

ONC後7日目に網膜フラットマウントを作成してP35/P25の発現変化を免疫組織科学的に観察し、神経保護に関してはTuj-1でRGCを標識し網膜神経節細胞の密度を計測して検討した。RGCの細胞密度は視神経損傷後5日目までは大きな変化を示さないが、7日目には50%に減

少し、14日目には10%未満に減少していたとする報告があり¹³⁾、RGCの細胞密度はONC後7日目に計測した。

Immunoblotでは、リン酸化タウタンパク質の発現レベルの変化を測定した。タウタンパク質のリン酸化は多くの部位で起こることが知られているが、そのうち、ser 396と404のリン酸化はアルツハイマー病の初期に観られる変化の一つであり、タウタンパク質の重合を惹起することが知られている¹⁴⁾。これらの部位のリン酸化は過去に行われた実験的緑内障ラットの網膜でも生じており¹⁵⁾、今回の実験ではser 396のリン酸化タウタンパク質に対するモノクローナル抗体(Abcam)を使用した。RGC死は7日目で顕著に認められるため、3日目の時点でリン酸化タウタンパク質(ser 396)の発現変化を測定した。カルパインの活性化は、カルパイン-1およびその基質である α -フォドリン分解産物をimmunoblotによって測定した。

結果

視神経傷害後のリン酸化タウタンパク質の変化

ONC後3日目の総タウタンパク質およびリン酸化タウタンパク質バンドを示す(図1A)。実験的緑内障ラット網膜では、50、55、および100 kDaでのリン酸化タウ蛋白(ser 396)が増加することが示されており¹⁷⁾、50 kDa付近に観られるバンドのリン酸化タウ蛋白(ser 396)を測定した(図1)。50 kDaにみられるバンドでは、総タウタンパク質およびリン酸化タウタンパク質の両者が、ONC後3日目に増加していた。総タウタンパク質はshamの1.5 \pm 0.03倍に増加し(p<0.01, Scheffe)、ロスコピチン投与で0.97 \pm 0.01倍にまで有意に抑制された。sham群とロスコピチン投与群の間では、リン酸化タウタンパク質の発現に有意差はなかった(p=0.21, Scheffe, 図1B)。リン酸化タウタンパク質は、shamから3.5 \pm 0.07倍(p<0.01, Scheffe)に増加し、ロスコピチン投与群では1.6 \pm 0.05倍(p<0.01, Scheffe, 図1C)にとどまった。

視神経傷害後のカルパイン-1とその活性

次に、ONC後3日目にカルパイン活性を検討した(図2A)。ONC後、カルパイン-1はsham群と比較して3.8倍に増加していた(p<0.01, Scheffe)が、ロスコピチン投与群では2.1倍にとどまり、有意に抑制された(p<0.01, Scheffe; 図2B)。 α -フォドリンはカルパインの基質であり、ONC後 α -フォドリン分解産物(150 kDa)は1.5倍に増加していた(p=0.0096, Scheffe)。ロスコピチン投与群では、 α -フォドリン分解産物は0.8倍と抑制された(p=0.002, Scheffe, 図2C)。

カルパイン阻害剤とロスコピチンを投与した時のリン酸化タウタンパク質

カルパインの阻害がタウタンパク質のリン酸化におよぼす影響をimmunoblotにより検討した(図3A)。ONC後3日目の50 kDa付近のリン酸化タウタンパク質(ser

396)はsham群より2.3倍増加していたが、ロスコピチン投与によって1.13倍($p=0.01$, Scheffe), カルパイン阻害剤によって1.1倍($p<0.01$, Scheffe, 図3B)のと、その増加が有意に抑制された。

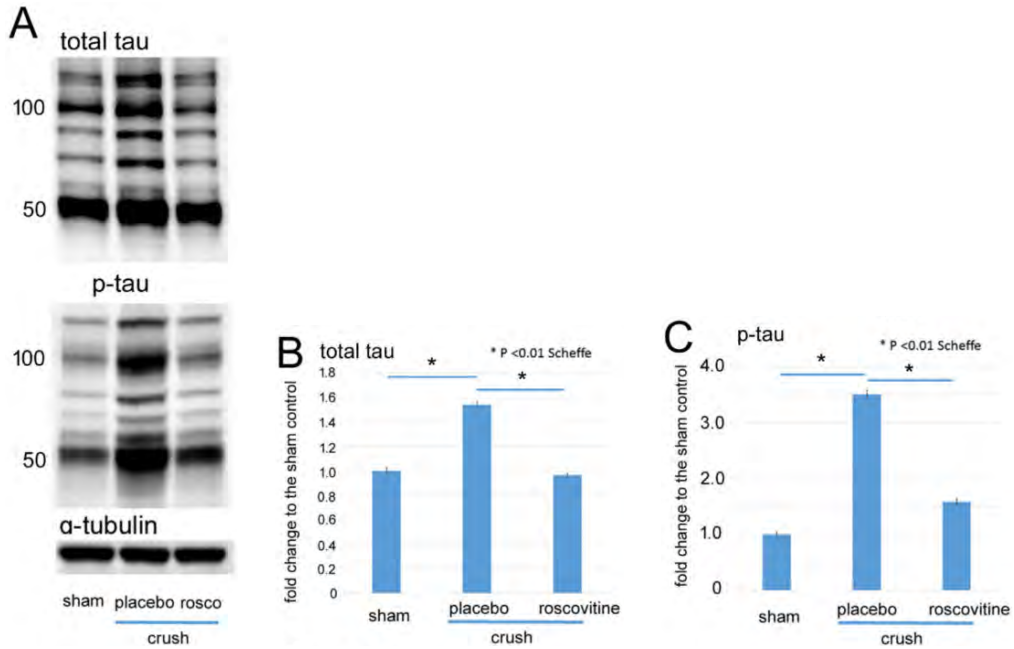


図1

ONC後の網膜におけるリン酸化タウタンパク質。(A): ONC後3日目の網膜の総タウタンパク質およびリン酸化(ser 396)タウタンパク質のバンド。 α -チューブリンで補正した50 kDa総タウタンパク質(B)およびリン酸化タウタンパク質(C)を、shamと比較した倍率変化として示す。ONC後の網膜ではどちらも有意に増加しているが、ロスコピチン投与群はその増加が抑制された。(* $p<0.01$, Scheffe, $n=3$)。

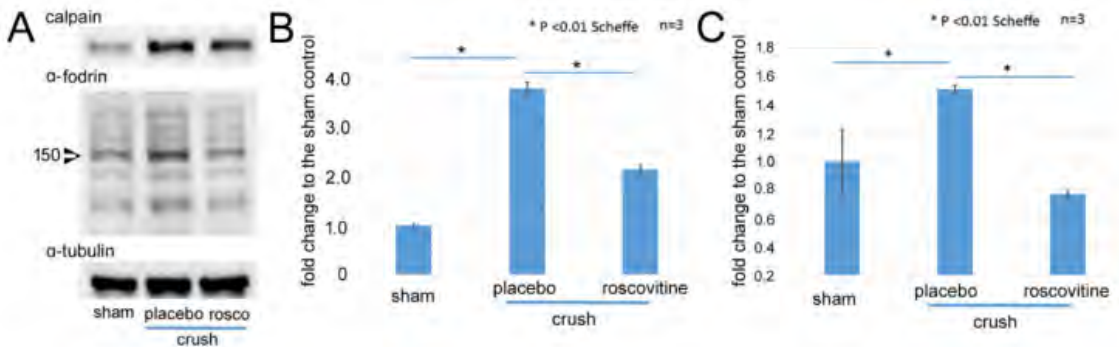


図2

ONC後の網膜におけるカルパイン-1および切断された α -フォドリン。(A): ONC後3日目のカルパイン-1とその基質である α -フォドリンのバンド。(B, C): α -チューブリンで補正した150 kDaカルパイン-1(B)および切断された α -フォドリン(C)の、shamに対する倍率変化。ONC後の網膜では両方が大幅に増加したが、ロスコピチンはその増加を抑制させた。(* $p<0.01$, Scheffe, $n=3$)。

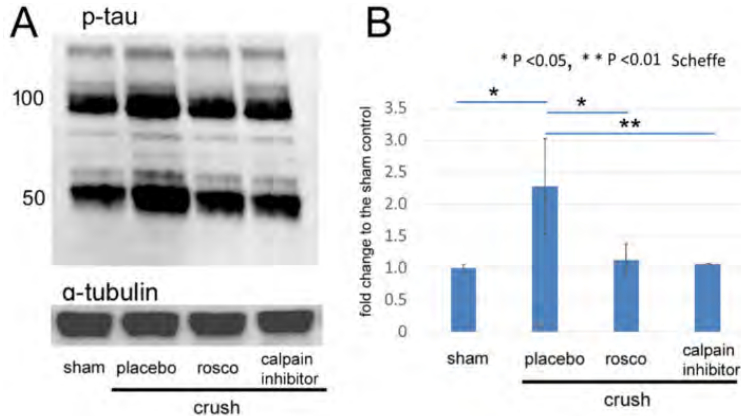


図 3

ONC後の網膜におけるリン酸化タウタンパク質、およびロスコピチンとカルパイン阻害剤の影響。(A): ONC後3日目のリン酸化 (ser 396) タウタンパク質のバンド。(B): α -チューブリンで補正した50 kDaリン酸化 (ser 396) タウタンパク質のshamに対する倍率変化。ONC後の網膜ではリン酸化タウタンパク質が著明に増加したが、ロスコピチンとカルパイン阻害剤によって、その増加は抑制された。(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Scheffe, $n = 3$)。

免疫組織化学によるP35/P25の発現

フラットマウント網膜を共焦点レーザー顕微鏡により観察し、RGCにおけるCdk5活性化因子であるP35/P25発現の継時的変化を示す(図4)。Tuj-1で染色されたRGCの密度は、shamと比べて、ONC後1日目と3日目では

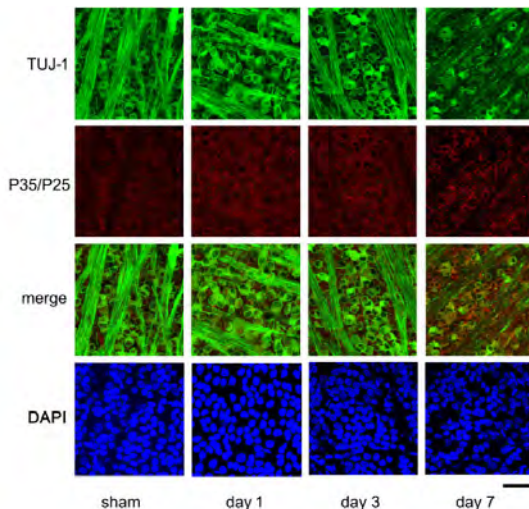


図 4

フラットマウント網膜を作成しTuj-1およびP35/P25の時間による変化を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。Tuj-1(緑色)に染色された顆粒(RGC)は、shamで最も密度が高く、P35/P25(赤色)で染色された顆粒は、主にRGCの細胞質に分布している。Tuj-1で染色された細胞の数はONC1日目と3日目ではあまり変化ないが、P35/P25は1日目から蛍光濃度が增强していた。(Bar = 100 μ m)。

大きな変化を認めないが、Tuj-1陽性細胞の数は7日目に明らかに減少していた(図4)。P35/P25抗体によって染色された顆粒は、主にRGCの細胞質に存在していた。これらの顆粒の蛍光強度はONC後1日目から增强していた(図4)。蛍光強度の変化はImageJプログラムを使用してAIU (arbitrary intensity unit) で表す。Sham群では 12.7 ± 2.2 AIUであったが、ONC後1日目、3日目、7日目にはそれぞれ 16.3 ± 0.9 , 16.3 ± 1.7 , 19.0 ± 2.1 AIUに増加した(図4)。また、ロスコピチン投与によるP35/P25の発現変化(図5)をみてみると、プラセボ群では染色性が增强され、ロスコピチン投与群ではその染色性は低下していた(図5A)。蛍光強度は、sham群の 13.2 ± 1.7 AIUからプラセボ群では 23.0 ± 2.2 AIUに增强し、ロスコピチン投与群では 18.9 ± 1.1 AIUと有意に抑制された($p = 0.002$, t検定)。高倍率でみてみると(図5B) P35/P25抗体によって染色された顆粒は、Tuj-1染色性が低下しているRGCで特に認められる傾向があった。

ロスコピチンおよびカルパイン阻害剤の効果

ONC後7日目のフラットマウント網膜の画像を示す(図6A)。RGCは、Tuj-1およびタウタンパク質で二重染色を行った。Tuj-1陽性細胞はONC後に減少したが¹⁰⁾、タウタンパク質はRGCの細胞質で発現が增加していた(図6A, placebo)。タウタンパク質の蛍光強度は、sham群では 22.8 ± 2.0 AIUであったが、プラセボ群では 29.6 ± 2.0 AIUと有意に增强していた($p < 0.01$, t検定)。ロスコピチン投与群では 26.6 ± 1.9 AIU、カルパイン阻害剤投与群では 25.5 ± 1.2 AIU(図6)であり、両群ともプラ

セボ群に比較して有意に抑制されていた ($p < 0.01$, t検定)。使用したタウタンパク質抗体はリン酸化タウタンパク質に特異的ではないが、視神経傷害後、リン酸化タウタンパク質の増加が顕著であったことから、リン酸化タウタンパク質の増加を反映していると考えられた(図1)。タウタンパク質の発現は、Tuj-1の染色性が低下しているRGCの細胞質で増加しており(図6A, placebo), タウタンパク質の増加がRGC死に関連し、ロスコピチンやカルpain阻害剤はONC後のRGC死の抑制に寄与している可能性が示された。

ONC後のRGC密度

ONC 後7日目のRGCの数を蛍光顕微鏡(BZ X700)によって観察した(図6)。Tuj-1陽性細胞の数をカウントし(図6B) Tuj-1抗体によって染色されたRGC数の平均細胞密度は、sham群($n=4$)の 2191 ± 178 細胞/ mm^2 から、

プラセボ群では 1216 ± 122 細胞/ mm^2 ($n=4$)に減少していた。ONC後7日目のRGC密度は、ロスコピチン投与群では 1622 ± 130 細胞/ mm^2 ($n=6$, $p=0.001$), カルpain阻害剤投与群では 1671 ± 34 細胞/ mm^2 ($n=3$, $p=0.02$)とRGCが温存されていた。

考 察

ONC後の網膜では、リン酸化タウタンパク質が増加することが示された。Cdk5の阻害剤であるロスコピチン

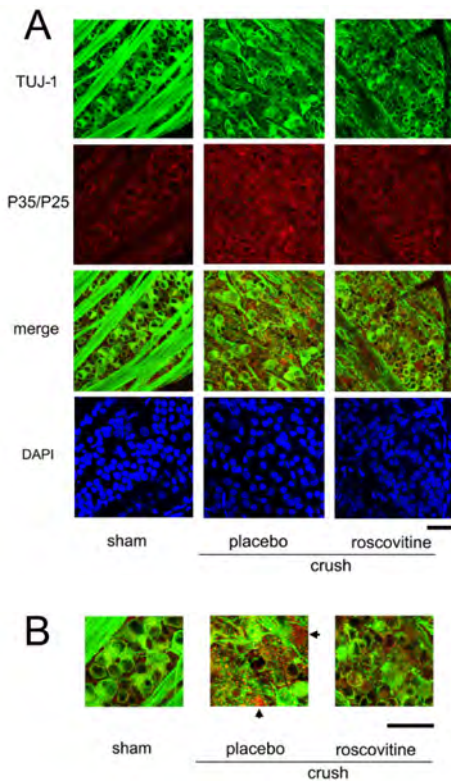


図 5

Tuj-1およびP35/P25のロスコピチンによる効果。(A) P35/P25顆粒は、ONC後に蛍光濃度が増強し不均一に分布している。(B) ONC後、P35/P25の顆粒は染色性の低下したRGC(➡)に蓄積されていたが、ロスコピチン投与群ではP35/P25の顆粒の蛍光濃度が低下していた。(Bar = 100 μm)。

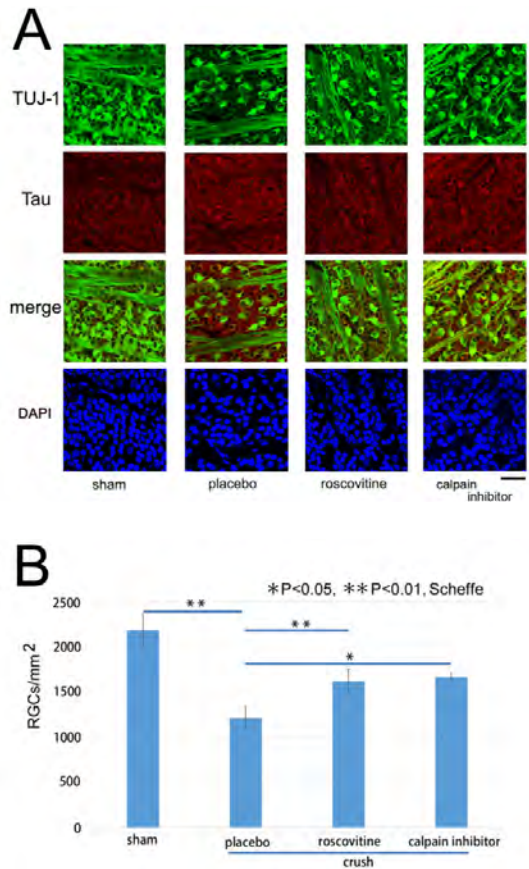


図 6

Tuj-1およびタウタンパク質抗体で二重染色したフラットマウント網膜。(A): Tuj-1(緑色)で染色されたRGCの数はONC後に明らかに減少しているが、ロスコピチンとカルpain阻害剤投与群ではRGCの減少を抑制した。タウタンパク質(赤色)の発現は、ONC後にTuj-1の染色性の低いRGCで特にみられた。ロスコピチンおよびカルpain阻害剤は、ONC後のタウタンパク質の発現を減少させた。(Bar = 100 μm)。(B): ONC 7日目のTuj-1陽性細胞(RGC)の数は7日目のプラセボ群では大幅に減少していたが、ロスコピチンとカルpain阻害剤によりその減少が抑制された。(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Scheffe, $n = 3 \sim 6$)。

は、ONC後の網膜のリン酸化タウタンパク質の増加と、RGC細胞密度の減少を抑制した。ONC後3日目には、網膜でカルパイン-1および α -フォドリン分解産物の増加が認められ、カルパインシグナル伝達経路が活性化されたことが示唆された。P35/P25の発現は、主にTuj-1の染色性が低下したRGCで増加していた。カルパイン阻害により、リン酸化タウタンパク質の増加とRGC数の減少を抑制し、ロスコピチンがカルパインおよび α -フォドリン分解産物を抑制したことから、Cdk5とカルパインシグナル伝達経路の間に交叉反応がある可能性が考えられた。

ラットの硝子体腔の推定容積が20 μ Lである場合、使用されたロスコピチンの濃度は約10 μ Mに相当する。Cdk5/p35阻害作用に対するロスコピチンの IC_{50} 値は0.16 μ Mであると報告されているため¹⁷⁾、本研究ではこの濃度のロスコピチンを使用した。さらに同様の濃度のロスコピチンは、選択的Cdk5阻害剤として広く使用されており、タウタンパク質の過剰リン酸化を抑制し、Tuj-1陽性RGCの数を維持することが報告されている^{18) 19)}。Cdk5活性は脳虚血の誘導後3時間ですでに起こっているとする報告があり²⁰⁾、本研究ではONCの直後にロスコピチンを注射した。

カルシウムイオンの流入によるカルパインの活性化は、虚血後再灌流²¹⁾、ONC^{9) 22)}、興奮毒性²³⁾などのさまざまな損傷後に網膜で起こることが知られており、カルパインの阻害は、神経保護的に作用する^{9) 21) 22)}。さらに、カルパインの阻害剤であるカルバスタチンは、変性した軸索では減少しており、カルバスタチンが視神経損傷後の軸索変性を抑制させたとの報告がある²⁴⁾。カルパインを介したシグナル伝達経路は、視神経損傷、網膜虚血、および興奮毒性によるRGC死において重要な役割を果たしていると考えられる。今回の結果は、カルパインの阻害が網膜におけるタウタンパク質のリン酸化を抑制している可能性があり、これがONC後のカルパイン阻害による神経保護効果のメカニズムの1つである可能性があることを示唆している。同様に、カルパイン阻害がONC後のCdk5活性とタウタンパク質の過剰なリン酸化を抑制することを示した²⁵⁾。

α -フォドリンはカルパインの主要な基質であり、150 kDaバンドの増加は、カルパインシグナル伝達経路が活性化されたことを示唆する²⁶⁾。カルパインは様々なものを分解するが²⁷⁾、Cdk5活性化因子であるP35もカルパインによってP25に分解され、Cdk5の強力な活性化を引き起こす^{8) 28)}。しかし、網膜でのP35の有意な変化は検出できず、immunoblotによってP35からP25への分解も検出できなかった(今回のデータでは示さず)。過去に、視

神経切断^{24) 29)}およびラットの実験的緑内障³⁰⁾によるRGCに対するCdk5阻害の神経保護効果を検討した研究においてもONC後3日目にはP25が検出されず、今回と一致していた。過去の報告では、Cdk5の活性化は視神経損傷後急速に起こり³¹⁾、分解はより早い時期に一過性に起こる可能性を検討していた³⁰⁾。今回の研究では、RGCにおけるP35/P25顆粒の発現増加が経時的に認められ、P35/P25顆粒の分布は不均一であり、Tuj-1の染色性が低いRGCで特に蓄積されていた。これらの結果は、Cdk5活性化因子であるP35/P25がRGC死に関与している可能性を示唆している。

一方、ロスコピチンによるCdk5の阻害は、カルパイン-1および α -フォドリン分解産物の減少によって示されるように、カルパインシグナル伝達経路の活性化を抑制させることが示唆された。このことから、Cdk5とカルパインシグナル伝達経路の間に交差反応が存在する可能性がある。Cdk5はNMDA受容体の活性化後に網膜損傷を増強し、その結果カルシウムイオンの流入とカルパインの活性化が増加したことや¹⁸⁾、ロスコピチンが一部のカルシウムチャンネルを阻害する可能性があることも示されている¹⁹⁾。

今回の研究の概要を図に示す(図7)。ロスコピチンによるCdk5阻害により、網膜内のリン酸化タウタンパク質が減少し、ONC後のRGC数が保持された。このメカ

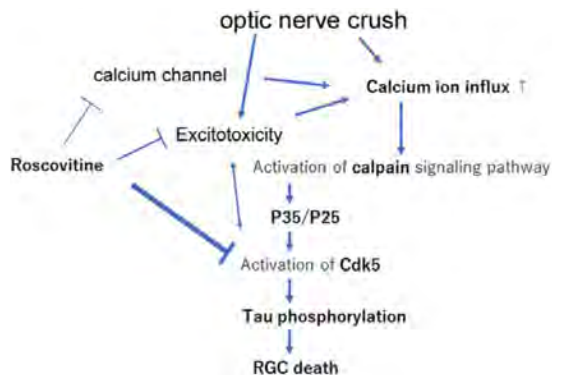


図7

ロスコピチンの効果を示す概略図。視神経損傷はカルシウムイオンの流入を増加させ、カルパインシグナル伝達経路を活性化し、その後、P35/P25を介してCdk5を活性化する。Cdk5の活性化はタウタンパク質の異常なリン酸化を引き起こし、RGC死につながる。ロスコピチンは、Cdk5の活性化を抑制し、異常なリン酸化を減少させる。Cdk5は興奮毒性にも関連しており、ロスコピチンは興奮毒性に関与するメカニズムを通じてカルシウムイオン流入を減少させる可能性があり、ロスコピチンは一部のカルシウムチャンネルを阻害し、それによってカルパインシグナル伝達経路を抑制する可能性がある。

ニズムには、カルパインシグナル伝達経路に対する阻害効果が関与している可能性があり、リン酸化タウタンパク質を低下させる治療的介入が視神経損傷に対して神経保護的に作用する可能性があることを示している。

文 献

- 1) Goedert M, Eisenberg D.S, Crowther R.A. Propagation of Tau Aggregates and Neurodegeneration. *Annu. Rev. Neurosci* 2017;40: 189-210. doi: 10.1146/annurev-neuro-072116-031153.
- 2) Arendt T, Stieler J, Holzer M. Tau and tauopathies. *Brain Res. Bull* 2016;126:238-292. doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.08.018.
- 3) Mroczko B, Groblewska M, Litman-Zawadzka A. The Role of Protein Misfolding and Tau Oligomers (TauOs) in Alzheimer's Disease (AD) *Int. J. Mol. Sci* 2019;20:4661. doi: 10.3390/ijms20194661.
- 4) Oku H, Kida T, Horie T, Taki K, et al. Tau Is Involved in Death of Retinal Ganglion Cells of Rats from Optic Nerve Crush. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2019;60:2380-2387. doi: 10.1167/iovs.19-26683.
- 5) Malumbres M. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol.* 2014;15:122. doi: 10.1186/gb4184.
- 6) Cruz J.C, Tseng H.-C, Goldman J.A, et al. Aberrant Cdk5 Activation by p25 Triggers Pathological Events Leading to Neurodegeneration and Neurofibrillary Tangles. *Neuron.* 2003;40:471-483. doi: 10.1016/S0896-6273(03)00627-5.
- 7) Lopes J.P, Agostinho P. Cdk5: Multitasking between physiological and pathological conditions. *Prog. Neurobiol.* 2011;94:49-63. doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.03.006.
- 8) Patrick G.N, Zukerberg L, Nikolic M, et al. Tsai L.H. Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature.* 1999;402:615-622. doi: 10.1038/45159.
- 9) Ryu M, Yasuda M, Shi D, et al. Critical role of calpain in axonal damage-induced retinal ganglion cell death. *J. Neurosci. Res.* 2011;90:802-815. doi: 10.1002/jnr.22800.
- 10) Taniguchi S, Fujita Y, Hayashi S, et al. Calpain-mediated degradation of p35 to p25 in postmortem human and rat brains. *FEBS Lett.* 2001;489:46-50. doi: 10.1016/S0014-5793(00)02431-5.
- 11) Meijer L, Borgne A, Mulner O, et al. Biochemical and Cellular Effects of Roscovitine, a Potent and Selective Inhibitor of the Cyclin-Dependent Kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *JBC J. Biol. Inorg. Chem* 1997;243:527-536. doi: 10.1111/j.1432-1033.1997.t01-2-00527.x.
- 12) Tonari M, Kurimoto T, Horie T, et al. Blocking Endothelin-B Receptors Rescues Retinal Ganglion Cells from Optic Nerve Injury through Suppression of Neuroinflammation. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci* 2012;53:3490-3500. doi: 10.1167/iovs.11-9415.
- 13) Berkelaar M, Clarke D, Wang Y, et al. Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *J. Neurosci* 1994;14: 4368-4374. doi: 10.1523/JNEUROSCI.14-07-04368.1994.
- 14) Abraha A, Ghoshal N, Gambin T.C, et al. C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease. *J. Cell Sci* 2000;113 Pt 21:3737-3745. doi: 10.1242/jcs.113.21.3737.
- 15) Chiasseu M, Cueva Vargas J.L, Destroismaisons L, et al. Tau Accumulation, Altered Phosphorylation, and Missorting Promote Neurodegeneration in Glaucoma. *J. Neurosci* 2016;36:5785-5798. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3986-15.2016.
- 16) Sharma R.K, Netland P.A. Early born lineage of retinal neurons express class III beta-tubulin isotype. *Brain Res* 2007;1176:11-17. doi: 10.1016/j.brainres.2007.07.090.
- 17) Dureau P, Bonnel S, Menasche M, et al. Quantitative analysis of intravitreal injections in the rat. *Curr. Eye Res.* 2001;22:74-77. doi: 10.1076/ceyr.22.1.74.6974.
- 18) Miao Y, Dong L.D, Chen J, et al. Involvement of calpain/p35-p25/Cdk5/NMDAR signaling pathway in glutamate-induced neurotoxicity in cultured rat retinal neurons. *PLoS ONE.* 2012;7:e42318. doi: 10.1371/journal.pone.0042318.
- 19) Yarotskyy V, Elmslie K.S. Roscovitine Inhibits CaV3.1 (T-Type) Channels by Preferentially Affecting Closed-State Inactivation. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 2011;340:463-472. doi: 10.1124/jpet.111.187104.
- 20) Menn B, Bach S, Blevins T.L, et al. Delayed treatment with systemic (S)-roscovitine provides neuroprotection and inhibits in vivo CDK5 activity increase in animal stroke models. *PLoS ONE* 2010; 5:e12117. doi: 10.1371/journal.pone.0012117.
- 21) Sakamoto Y.R, Nakajima T.R, Fukiage C.R, et al. Involvement of calpain isoforms in ischemia-

- reperfusion injury in rat retina. *Curr. Eye Res* 2000;21:571-580. doi: 10.1076/0271-3683(200007)2111-ZFT571.
- 22) McKernan D.P, Guerin M.B, O'Brien C.J, et al. A Key Role for Calpains in Retinal Ganglion Cell Death. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci* 2007;48:5420-5430. doi: 10.1167/iovs.07-0287.
- 23) Maekawa S, Sato K, Fujita K, et al. The neuroprotective effect of hesperidin in NMDA-induced retinal injury acts by suppressing oxidative stress and excessive calpain activation. *Sci. Rep* 2017;7:6885. doi: 10.1038/s41598-017-06969-4.
- 24) Yang J, Weimer R.M, Kallop D, et al. Regulation of Axon Degeneration after Injury and in Development by the Endogenous Calpain Inhibitor Calpastatin. *Neuron* 2013;80:1175-1189. doi: 10.1016/j.neuron.2013.08.034.
- 25) Hung K.-S, Hwang S.-L, Liang C.-L, et al. Calpain Inhibitor Inhibits p35-p25-Cdk5 Activation, Decreases Tau Hyperphosphorylation, and Improves Neurological Function after Spinal Cord Hemisection in Rats. *J. Neuropathol. Exp. Neurol* 2005;64:15-26. doi: 10.1093/jnen/64.1.15.
- 26) Saido T.C, Yokota M, Nagao S, et al. Spatial resolution of fodrin proteolysis in postischemic brain. *J. Biol. Chem* 1993;268:25239-25243. doi: 10.1016/S0021-9258(19)74593-1.
- 27) Donovan M, Cotter T. Caspase-independent photoreceptor apoptosis in vivo and differential expression of apoptotic protease activating factor-1 and caspase-3 during retinal development. *Cell Death Differ* 2002;9:1220-1231. doi: 10.1038/sj.cdd.4401105.
- 28) Kimura T, Ishiguro K, Hisanaga S.-I. Physiological and pathological phosphorylation of tau by Cdk5. *Front. Mol. Neurosci* 2014;7:65. doi: 10.3389/fnmol.2014.00065.
- 29) Weishaupt J.H. Inhibition of CDK5 is protective in necrotic and apoptotic paradigms of neuronal cell death and prevents mitochondrial dysfunction. *Mol. Cell. Neurosci* 2003;24:489-502. doi: 10.1016/S1044-7431(03)00221-5.
- 30) Chen J, Miao Y, Wang X.-H, et al. Elevation of p-NR2AS1232 by Cdk5/p35 contributes to retinal ganglion cell apoptosis in a rat experimental glaucoma model. *Neurobiol. Dis.* 2011;43:455-464. doi: 10.1016/j.nbd.2011.04.019.
- 31) Lefèvre K, Clarke P.G, Danthe E.E, Castagné V. Involvement of cyclin-dependent kinases in axotomy-induced retinal ganglion cell death. *J. Comp. Neurol* 2002;447:72-81. doi: 10.1002/cne.10215.

Roscovitine, a Cyclin-Dependent Kinase-5 Inhibitor, Decreases Phosphorylated Tau Formation and Death of Retinal Ganglion Cells of Rats after Optic Nerve Crush

Takahisa Hirokawa

*Department of Ophthalmology,
Osaka Medical and Pharmaceutical University*

Tauopathies are neurodegenerative diseases characterized by abnormal metabolism of misfolded tau proteins and are progressive. Pathological phosphorylation of tau occurs in the retinal ganglion cells (RGCs) after optic nerve injuries. Cyclin-dependent kinase-5 (Cdk5) causes hyperphosphorylation of tau. To determine the roles played by Cdk5 in retinal degeneration, roscovitine, a Cdk5 inhibitor, was injected intravitreally after optic nerve crush (ONC). The neuroprotective effect of roscovitine was determined by the number of Tuj-1-stained RGCs on day 7. The change in the levels of phosphorylated tau, calpain-1, and cleaved α -fodrin was determined by immunoblots on day 3. The expression of P35/P25, a Cdk5 activator, in the RGCs was determined by immunohistochemistry. The results showed that roscovitine reduced the level of phosphorylated tau by 3.5- to 1.6-fold. Calpain-1 (2.1-fold) and cleaved α -fodrin (1.5-fold) were increased on day 3, suggesting that the calpain signaling pathway was activated. P35/P25 was accumulated in the RGCs that were poorly stained by Tuj-1. Calpain inhibition also reduced the increase in phosphorylated tau. The number of RGCs decreased from 2191 ± 178 (sham) to 1216 ± 122 cells/mm² on day 7, and roscovitine preserved the level at 1622 ± 130 cells/mm². We conclude that the calpain-mediated activation of Cdk5 is associated with the pathologic phosphorylation of tau.