

氏 名	廣川 貴久
(ふりがな)	(ひろかわ たかひさ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第53号
学位審査年月日	令和 5年 1月 18日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Roscovitine, a Cyclin-Dependent Kinase-5 Inhibitor, Decreases Phosphorylated Tau Formation and Death of Retinal Ganglion Cells of Rats after Optic Nerve Crush (サイクリン依存性キナーゼ 5 阻害剤であるロスコビチ ンが、ラットの挫滅後の視神経に対して、タウタンパク質 のリン酸化と網膜神経節細胞死を抑制する過程の検討)
論文審査委員	(主) 教授 荒若 繁樹 教授 矢野 貴人 教授 小野 富三人

学位論文内容の要旨

《目的》タウタンパク質は微小管結合タンパク質の一種で、軸索の機能維持に関与している。軸索が傷害されると、タウタンパク質は過剰にリン酸化され凝集し、神経細胞死の原因となることが知られている。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はタウオパチーと総称され、アルツハイマー型認知症がその代表として知られている。タウタンパク質の異常なリン酸化に関与する酵素として、Cdk5 (cyclin-dependent kinase 5) が考えられている。その証左として、Cdk5 活性化因子である P35 は、P25 に分解されることで Cdk5 をより強力に刺激するが、P25 がアルツハイマー病患者の脳に蓄積されていることが報告されている。一方、P35 から P25 への分解には、カルパインの関与が考えられている。カルパインはカルシウム依存性プロテアーゼであり、P35 を含むさまざまなタンパク質を分解する。視神経損傷や興奮性神経毒性などの傷害機序により、網

膜では Ca イオンが流入し、カルパインの活性化が生じることが知られている。さらにカルパインの阻害が、視神経傷害による網膜神経節細胞死に対して、保護的に作用することが多くの論文で報告されている。今回、タウタンパク質の過剰なリン酸化に、カルパインを介した Cdk5 の活性化が関与している可能性を、immunoblot および免疫組織学的方法で評価し、Cdk5 阻害剤であるロスコビチンの神経保護作用について検討した。

《方法》9 週齢のオスの Wistar ラットの視神経を球後 2 mm で傷害し、Cdk5 阻害剤であるロスコビチン 10 μ M、カルパイン阻害剤 200 μ M を硝子体内に注射した。コントロール群としてジメチルスルホキシド (DMSO) 3 μ L を硝子体内に注射した。Day3 の時点で網膜を摘出し、タウタンパク質の発現変化を immunoblot で評価した。カルパインの活性化は、 α -fodrin の分解産物の発現を用いて検討した。さらに Day7 に網膜を取り出しフラットマウントを作成し、Tuj-1 染色で網膜神経節細胞 (retinal ganglion cell; RGC) を標識し、逆行性軸索変性の程度を RGC の細胞密度で評価した。同様に Cdk5 活性化因子である P35/P25 の発現についても、免疫組織学的に検討した。

《結果》immunoblot による解析で、視神経傷害によりカルパイン-1 の発現はコントロール群の約 3.8 倍、 α -fodrin の分解産物は約 1.5 倍にそれぞれ増加しており、カルパインシグナル伝達経路が活性化されていることが示唆された。Cdk5 阻害剤であるロスコビチン投与群では、カルパイン-1 発現および α -fodrin 分解産物が、コントロール群の約 2.1 倍および約 0.8 倍にそれぞれ有意に抑制されていた。また、視神経傷害によって増加した Ser396 のリン酸化タウタンパク質は、ロスコビチンやカルパイン阻害剤を投与によって有意に抑制されていた。カルパインを介した Cdk5 の活性化が、タウタンパク質のリン酸化に関与している可能性が示唆された。免疫組織学的検討では、P35/P25 の発現は、Tuj-1 の染色性が低下している RGC で亢進しているように観察されたが、ロスコビチン投与群では、P35/P25 の発現は低下していた。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、視神経傷害によって $1216 \pm 122/\text{mm}^2$ に減少し、ロスコビチン投与群では

1622±130/mm²、カルパイン阻害剤投与群では 1671±34/mm²にそれぞれ保たれ、神経保護的な作用が認められた。

《考察》ロスコビチンによる Cdk5 阻害は、網膜におけるリン酸化タウタンパク質の発現を抑制し、視神経傷害後の RGC に対して保護的作用を示した。カルパイン阻害剤による神経保護作用は良く知られているが、今回の結果から、作用機序の 1 つにタウタンパク質リン酸化抑制が含まれている可能性が示された。また、ロスコビチンによる Cdk5 阻害は、カルパイン-1 および α -fodrin の減少をもたらし、カルパインシグナル伝達経路の活性化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、相互作用がある可能性が考えられた。

《結論》今回の研究結果は、視神経傷害後の網膜神経節細胞死においてリン酸化タウタンパク質が関与し、Cdk5 の阻害によってタウタンパク質のリン酸化を抑制することによって神経保護につながる可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

タウタンパク質が蓄積する疾患にはアルツハイマー型認知症などがある。アルツハイマー病および関連する神経変性疾患では、高度にリン酸化されたタウタンパク質が凝集し、神経細胞死に関与する。このようなタウタンパク質凝集体が出現する疾患群はタウオパチーと総称される。サイクリン依存性キナーゼ (cyclin-dependent kinase; Cdk) のひとつである Cdk5 がタウタンパク質のリン酸化に関与する候補酵素として考えられ、さらに Cdk5 の活性化にはカルパインの関与が考えられている。カルパインはカルシウム依存性プロテアーゼであり、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。また、視神経損傷や興奮性神経毒性などによる傷害時に、網膜では神経細胞に Ca イオンが流入し、カルパインの活性化が生じることが知られている。

本研究では、ラット視神経損傷モデルに Cdk5 阻害剤であるロスコビチンを投与し、タウタンパク質のリン酸化の変化を検討した。また、カルパイン阻害剤を投与し、タウタンパク質のリン酸化に与える影響およびタウタンパク質の過剰なリン酸化がカルパインや Cdk5 の活性化から引き起こされる可能性を、immunoblot や免疫組織学的に評価した。その結果、Cdk5 の阻害は網膜におけるリン酸化タウタンパク質の発現を抑制し、視神経傷害後の網膜神経節細胞の保護につながることを示された。カルパイン阻害剤による神経保護作用は以前から知られているが、本研究は、そのメカニズムの1つとしてタウタンパク質のリン酸化抑制が含まれている可能性が示唆された。

本研究は、Cdk5 阻害が網膜における異常なタウタンパク質のリン酸化を抑制する可能性を示唆し、Cdk5 阻害剤が視神経傷害の新たな治療薬になる可能性を示した。

以上の内容から、本論文は本学大学院学則第13条第1項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES

22(15): 8096, 2021 Aug

doi: 10.3390/ijms22158096.