

令和元年6月11日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16958

研究課題名(和文)メタボロミクスによる緑内障モデルマウスの病態解明

研究課題名(英文)elucidation of pathophysiology of glaucoma model mouse by metabolomics

研究代表者

佐藤 孝太 (Sato, Kota)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50732327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：病態メカニズム解明と新たなバイオマーカーを特定するために、最新のノンターゲットメタボロミクス分析を組み合わせ、視神経挫滅(NC)の2、4、および7日後のマウス全網膜における代謝産物変動をプロファイルした。NC後に濃度が変化した30の代謝産物を同定した。イメージングMSを用いて、代謝産物の変動を調べた結果、L-アセチルカルニチンは、網膜全体のみならず網膜神経節細胞層においても、網膜神経節細胞死に伴って増加していた。質量分析計とイメージングMSを組み合わせメタボロミクス分析は、病理メカニズムやバイオマーカーを明らかにし、緑内障の新たな治療標的の探索を可能にすることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、網膜神経節細胞死の進行度を予測する代謝物として、アセチルカルニチンの測定が有用である可能性が示された。本研究によって、眼圧非依存的な視神経障害を原因とした網膜神経節細胞死に関連する分子が明らかにされたことから、今後、ヒト臨床検体での詳細な解析やコホート研究におけるオミックス解析等のビッグデータ解析を通じ、緑内障の疾患予防に資する新たなバイオマーカーの開発と臨床診断への応用を目指した研究の発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：To provide new mechanistic insights and identify new biomarkers, we combined latest non-targeting metabolomics analyses to profile altered metabolites in the mouse whole retina 2, 4, and 7 days after optic nerve crush (NC). We highlighted 30 metabolites that changed its concentration after NC. After studying the specificity of the identified metabolites to RGCs in histological sections using imaging mass spectrometry, L-acetylcarnitine was increased not only preceding the peak of RGC death in the whole retina but also at the RGC layer. The combinatory metabolomics analyses promise to illuminate pathomechanisms, reveal biomarkers, and allow the discovery of new therapeutic targets of glaucoma.

研究分野：緑内障

キーワード：視神経障害 メタボロミクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

緑内障は我が国の中途失明原因のおよそ 25% を占め、視覚障害による **Quality Of Life (QOL)** の低下は社会的な問題となっている。このため、緑内障の病態を明らかにし、有効な予防及び治療を講ずることは重要な臨床課題である。緑内障は視神経を構成する網膜神経節細胞の軸索障害と、それに伴う網膜神経節細胞死により視野障害を呈する眼科疾患である。主なリスクファクターは加齢であり、近年の超高齢化社会に伴う高齢者の増加により緑内障患者は増加の一途を辿っている。緑内障の発症原因に関してこれまで多くの研究がなされており、加齢の他に高眼圧、近視、遺伝的素因、眼血流循環、酸化ストレスなどの関与が報告されている。しかしながら、本疾患は多因子疾患であることが近年広く提唱されており、その病態進行に関わる分子メカニズムについては未だ不明な点が多い。

代謝産物を検出するメタボロミクスは網羅解析の手法のひとつとして近年着目されている。代謝産物はゲノム情報の最終的な表現型であり、疾患の実態を鋭敏に反映していると考えられることから、生体内の代謝産物を網羅的に探索するメタボロミクスは疾患の発症や進行機序の解明に繋がる可能性がある。

メタボロミクスなどの網羅解析は組織全体をサンプルとした場合、検出された因子の変動が組織内のどの部位で生じているのかを特定することができず、これは既報における網羅解析研究の問題点となっていた。この問題点を克服するため、申請者らはイメージング質量分析 (イメージング **MS**) を用いることで、メタボロミクスにより検出した代謝産物の変動が網膜内のどの部位で生じているのかを特定することを試みる。緑内障は網膜神経節細胞に障害を来す疾患であるが、網膜神経節細胞の割合は網膜内の数パーセントと言われているため、網膜全体を用いた網羅解析の結果だけでは、緑内障病態の本態である網膜神経節細胞内でのイベントを詳細に把握することは困難である。本申請では、メタボロミクスとイメージング **MS** の手法を組み合わせることで、緑内障眼におけるより詳細な代謝産物の動態を解析することを目指す。これにより、緑内障病態の分子メカニズムの解明と新たな緑内障治療の標的因子および標的経路の同定が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、メタボロミクスとイメージング **MS** を組み合わせた高精度な網羅解析手法により、マウス緑内障モデルにおける網膜神経節細胞死の病態解明を目指す。網膜内の生体内化合物および代謝物を、メタボロミクス技術を用いて網羅的解析・比較検討することにより、緑内障の発症ならびに進展に関わる未知の代謝経路異常の同定と新規バイオマーカーの検出を目指す。

3. 研究の方法

8-12 週令の C57BL/6J マウス (オス) を用いた。緑内障モデルとして、視神経軸索挫滅モデルを用いた。軸索挫滅後の 2, 4, 7 日後に網膜を回収し、網膜神経節細胞細胞障害を評価するため、網膜神経節細胞特異的なマーカーである RBPMS に対する免疫染色ならびにウェスタンブロッティングを実施した。メタボロミクスのサンプル前処理は既報 (Saigusa et al) に従った。メタボロミクスは UHPLC-QTOF/MS ならびの LC-FTMS を使用し、それぞれ HILIC カラムと C18 カラムを用いた。得られたデータから human metabolome database と lipidmaps により代謝物同定をおこなった。同定された代謝物を主成分分析ならびに判別分析したのち、クラスター解析をおこなった。イメージング **MS** 用のサンプルは、軸索挫滅後の眼球を経時的にサンプリングしたのちドライアイスで凍結し、凍結切片を作製して調整した。測定には iMScope を用いた。

網膜神経節細胞内のカルニチンアセチルトランスフェラーゼ量を測定するため、網膜神経節細胞に感染する AAV2 ベクターに mCherry を搭載したコンストラクトを作製し、CMV プロモーターで mCherry をドライブするよう設計した。本ベクター (AAV2-CMV-mCherry) をマウス硝子体内に投与し、4 週間飼育した。その後、軸索挫滅をおこないその 2 日後に mCherry 陽性網膜神経節細胞をセルソーターにより単離し、カルニチンアセチルトランスフェラーゼの遺伝子発現量を qPCR により測定した。

4. 研究成果

マウス軸索挫滅後の網膜神経節細胞細胞数を評価したところ、軸索挫滅 2、4 および 7 日後において RBPMS 陽性細胞数は経時的に減少し、軸索挫滅 4 日後以降で未処置群に比べて有意に減少することが確認された。抗 RBPMS 抗体を用いたウェスタンブロッティングによる結果も、免疫染色を同様な傾向を確認した。

メタボロミクスによる解析の結果、数千種類の代謝物が網膜内で検出された。そのうち、軸索挫滅により変動する網膜内代謝物は 30 種類同定され、これらをクラスター解析により 4 つのカテゴリーに分類した。具体的には、軸索挫滅 2、4 日後に減少し、7 日後に再度上昇する代謝物群 (グループ A)、軸索挫滅後に減少する代謝物群 (グループ B)、軸索挫滅 2 日後に一時的に増加する代謝物群 (グループ C)、軸索挫滅 4 日後をピークに増加する代謝物群 (グループ D) に分類された。これらの結果から、グループ D に属する代謝物群は網膜神経節細胞障害に伴って増加することが示唆された。また、グループ D として同定された 7 代謝物のうち 4 つがカルニチン関連代謝物であったことから、カルニチン関連代謝物は網膜神経節細胞障害のマーカー

候補である可能性が示唆された。

加えて、マウス網膜をイメージング MS により解析したところ、グループ D で同定されたアセチルカルニチンが軸索挫滅 2 日後の網膜神経節細胞層において、コントロール群に比較して有意に増加することを明らかにした。さらに、アセチルカルニチンの合成酵素であるカルニチンアセチルトランスフェラーゼの mRNA 発現量が軸索挫滅 2 日後の網膜神経節細胞層において、有意な増加が認められた。これらの結果から、視神経軸索挫滅によりアセチルカルニチンの発現量が網膜神経節細胞内で亢進し、アセチルカルニチン量が網膜神経節細胞層で増加すること、またアセチルカルニチン量は網膜神経節細胞障害に伴って増加することを示唆している。そのためアセチルカルニチンは視神経障害に伴う網膜神経節細胞障害の有力なマーカー候補のひとつとして考えられるため、本内容を特許出願するに至った。以下に本申請研究の代表的なデータを示す。

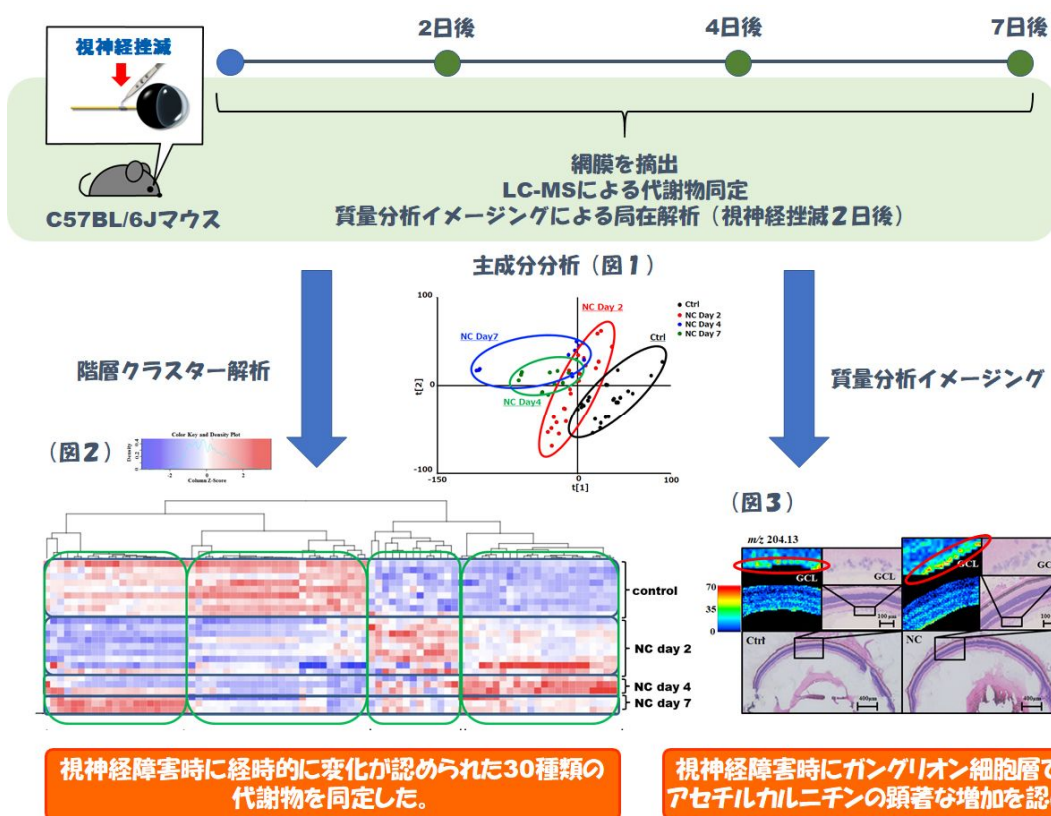


図 1. 多変量解析 (主成分分析、Score plot) の結果。コントロール (黒) 視神経挫滅 2 日後 (赤) 視神経挫滅 4 日後 (緑) および視神経挫滅 7 日後 (青) の 各群の特徴を示した分布が観察された。 図 2. 階層クラスタ解析の結果。コントロール群と各視神経挫滅群において有意に変動する代謝物を抽出し、特徴成分ごとに横に並べた。 図 3. 質量分析イメージングの結果。コントロール検体と視神経挫滅 2 日後検体 の眼組織切片の H&E 染色図と拡大図。代謝物の検出強度を示しており、ガングリオン細胞層 (赤線囲い部) で変化が観察された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Title : Metabolomic changes in the mouse retina after optic nerve injury.

Authors : Kota Sato*, Daisuke Saigusa*, Ritsumi Saito, Amane Fujioka, Yurika Nakagawa, Koji M Nishiguchi, Taiki Kokubun, Ikuko N. Motoike, Kazuichi Maruyama, Kazuko Omodaka, Yukihiro Shiga, Akira Uruno, Seizo Koshihara, Masayuki Yamamoto, Toru Nakazawa * Co-first Author

掲載誌名 : **Scientific Reports 8, Article number: 11930 (2018)** (査読有)

doi: **10.1038/s41598-018-30464-z.**

[学会発表](計 2 件)

第 29 回 緑内障学会 (2018/9/15、新潟)

「視神経挫滅モデル網膜のメタボローム解析」

佐藤孝太、三枝大輔、Ikuko N. Motoike、齋藤律水、藤岡周、山本雅之、中澤徹

第 121 回 日本眼科学会 (2017/4/6、東京)
「マウス緑内障モデル網膜のメタボローム解析」
佐藤孝太、三枝大輔、斉藤律水、中澤徹

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 1 件)

名称：視神経障害の診断用バイオマーカー
発明者：中澤徹、佐藤孝太、三枝 大輔
権利者：国立大学法人 東北大学
種類：基礎出願
番号：2017-238492
出願年：2017/12/13
国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
東北大学 プレスリリース
「視神経障害のバイオマーカーを同定」
<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2018/08/press-20180822-biomaker.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号 (8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。