

令和 4 年 4 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09964

研究課題名(和文)統合オミックス解析による視神経障害モデルマウスの病態機構解明

研究課題名(英文)Pathomechanisms of mouse models of optic neuropathy by integrated omics analysis

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体内の代謝産物およびmRNAの網羅解析をおこない、その結果を包括的に解釈する統合オミックス解析をおこなうことで、視神経障害における網膜神経節細胞の代謝異常のダイナミズムを予測し、緑内障モデル動物において網膜神経節細胞死との関連が報告されているNrf2の活性低下を調べることを目的とした。RNA-seqの結果、Nrf2発現や下流のNqo1の発現低下は認められなかった。一方で、グルコースの低下や解糖系に関連する遺伝子群の発現減少が生じており、視神経挫滅時における網膜神経節細胞内での解糖系の減衰によるエネルギー産生低下が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑内障の根本的な発症原因は高眼圧であり、眼圧下降治療以外に有効な治療がない。一方で、眼圧下降治療が有効ではない患者も少なからず存在することから、眼圧下降治療に対して抵抗性を示す患者群の病態解明は特に重要な課題である。本研究では、眼圧非依存的な網膜神経節細胞死に解糖系の代謝異常が関与することを示唆する重要な知見であり、新たな治療法開発への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed a comprehensive analysis of metabolites and mRNAs in vivo and an integrated omics analysis to comprehensively interpret. The results were used to predict the dynamics of abnormal retinal ganglion cell metabolism in optic neuropathy, which has been reported to be associated with retinal ganglion cell death in animal models of glaucoma. We aimed to investigate the reduced activity of Nrf2, which was reported to involve retinal ganglion cell death. RNA-seq results showed no reduction in Nrf2 expression or downstream Nqo1 expression. On the other hand, decreased glucose and decreased expression of a group of genes related to the glycolytic system occurred, suggesting decreased energy production due to attenuation of the glycolytic system in retinal ganglion cells during optic nerve crush.

研究分野：眼科学

キーワード：緑内障 オミックス

1. 研究開始当初の背景

緑内障は視神経を構成する RGC の軸索障害と、それに伴う RGC 死により視野障害を呈する眼科疾患である。主なり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。緑内障の根本的な発症原因は高眼圧であり、眼圧下降治療以外に有効な治療がない。一方で、眼圧下降治療が有効ではない患者も少なからず存在することから、眼圧下降治療に対して抵抗性を示す患者群の病態解明は特に重要な課題である。申請者らは、眼圧非依存的な緑内障病態の一つの側面を反映すると考えられる視神経軸索挫滅による障害モデルマウスを作製し、核酸、アミノ酸、脂質などの代謝産物を網羅的に解析するメタボロミクスをおこなった。代謝産物は組織や細胞の生理的環境を反映した最終的な表現型とも言える。そのためメタボロミクスは、細胞内における動的な生理的イベントを解析できる点で優れており、生命現象や病的機構の発見に有用である。申請者らは、メタボロミクスにより視神経軸索挫滅モデルマウスの網膜を解析したところ、RGC 死に伴って変動する代謝物群を同定した (Sato et al., *Sci Rep.* 2018)。申請者が着目したのは、網膜神経節細胞死が生じる前の障害初期 (軸索挫滅 2 日後) において減少した代謝物群であり、これにはグルコースやプリンヌクレオチド、グルタチオンが含まれていた。これらの代謝産物は、レドックス反応の代表的な転写因子である Nrf2 によって制御されることが知られており (Mitsuishi et al., *Cancer Cell.* 2012) 視神経障害後の網膜において RGC 死に先立って Nrf2 の転写活性が抑制されることが示唆された。緑内障病態の一因として酸化ストレスが関与することが近年多く報告されている。転写因子である Nrf2 は酸化ストレス環境下において活性化し、グルタチオンやヘムオキシゲナーゼなどの抗酸化因子の発現を誘導する。申請者の施設においても、Nrf2 ノックアウトマウスは軸索挫滅障害に対して脆弱であること (Himori et al., *J Neurochem.* 2013) Nrf2 の過剰発現が軸索挫滅マウスの RGC を保護すること (Fujita et al., *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2017) を報告しており、これらの結果は RGC の恒常性における Nrf2 の重要性を示している。さらに、加齢による Nrf2 活性の低下と酸化ストレスの増加が眼を含む臓器の疾患に関与しているとの報告もあり (Sachdeva et al., *Exp Eye Res.* 2014, Zhang et al., *Free Radic Biol Med.* 2015) 加齢による Nrf2 活性の低下が緑内障病態に関与する可能性を示唆している。上述の先行研究から、申請者は「視神経軸索障害による Nrf2 活性の低下が RGC 死へのトリガーとなる」との仮説を立て、モデルマウスを用いて検証する着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、視神経軸索障害マウスの RGC において Nrf2 活性が低下するかどうかを検証すること、Nrf2 活性の低下が RGC 死の原因となるかどうかを検証すること、の 2 点である。これにより、緑内障病態における RGC 死の病態分子メカニズム解明を目指す。

3. 研究の方法

動物はオスの C57BL/6J 系統マウスを用いた。申請者の既報に従いケタミン/キシラジン混合による全身麻酔下において視神経挫滅をおこなった。2 日後にマウスを安楽死させ、眼球ならびに網膜を摘出し、GentlMax により膜組織内の細胞を single cell に調整した。本手法で調整した細胞を既報に基づき Cd11b, Cd11c, Cd34, Cd45.2 陰性、Thy1.2 陽性細胞をセルソーター (BD 社、Aria) によりバルクソートし、キアゾルにダイレクトソートしたのち市販キット (キアゲン社) を用いて RNA 抽出し、Tape Station (アジレント社) を用いてクオリティチェックをおこなった。MART-seq v4 Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing (Takara, #634888) を用いてライブラリー作製して、NextSeq 500 instrument (Illumina) により 75 ペアエンドでシーケンシングした。イメージング MS は申請者の既報 (Sato et al., *Sci Rep.* 2018) で作製したサンプルおよび取得データを再解析した。具体的には、IMAGEREVEAL™ MS software を用い、GCL に限局した部位に ROI を設定して m/z データを取得し、HMDB データベースを用いて化合物同定をおこなった。

4. 研究成果

予備検討の結果、マウス眼球 4 眼程度で RNA-seq が可能なクオリティの RNA サンプルが調整できることを確認した。本予備検討結果に基づき網膜神経節細胞の単離をおこない RNA-seq による網羅的な遺伝子発現データを取得した。その結果、正常マウスと視神経挫滅後のマウス RGC において、Nrf2 の発現に有意な発現変動の差異は認められなかった。一方で、解糖系に関連する酵素群の遺伝子発現が減少傾向であり、特に hexokinase 2 (HK2) が視神経挫滅群で有意な発現減少を認めた。HK2 は Nrf2 の co-activator であるとの報告があり (Sheikh et al., *J Biol Chem.* 2018) 視神経挫滅後の網膜神経節細胞では HK2 の発現減少に伴う Nrf2 活性低下が生じている可能性が示唆された。また、脂質代謝関連遺伝子群の発現が減少傾向であることも認められた。近年の緑内障を対象したゲノムワイド関連

解析 (GWAS) の結果から、緑内障病態における脂質代謝の重要性が示唆されている。本研究結果で得られたモデルマウスにおける脂質代謝関連遺伝子の発現変動と既報の GWAS におけるヒット遺伝子との関連を検討することで、今後の緑内障病態のメカニズムを明らかにできる可能性があると考えられる。一方で、TCA サイクルに関連する遺伝子群の発現は増加傾向を示しており、解糖系によるエネルギー代謝の減衰を代償するための反応であることが示唆された。

また、網膜神経節細胞における代謝物を網羅的に測定する方法として、当初はレーザーマイクロダイセクション (LMD) を進めていた。予備検討として種々の方法を試したが、代謝物を網羅的に測定することは困難であり、また目的の代謝物を測定するには非常に多くの網膜神経節細胞層 (GCL) を含む切片が必要であり、多大な労力とコストがかかることが判明した。そのため、当初予定を変更し、イメージング MS の手法により GCL における代謝物を検出する方法に変更した。その結果、カルニチン関連代謝物の増加が認められ、網膜全体をサンプルとした申請者の既報 (Sato et al., Sci Rep. 2018) と一致した。

これらの結果は、申請者の既報 (Sato et al., Sci Rep. 2018) に基づき設定した変え s 津である「GCL 局所における Nrf2 の活性低下ならびにグルタチオンの低下」を示す直接的な証拠を得ることはできなかった。しかしながら、解糖系の重要な酵素であり、Nrf2 の co-activator でもある HK2 がモデルマウスで有意な低下を示していたことから、軸索障害に伴う網膜神経節細胞死は Nrf2-HK2 を介した病態が関与する可能性が示唆された。今後、この仮説を検証するために HK2 の過剰発現や CRISPR/Cas9 によるノックアウトの実験が重要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------