

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03840

研究課題名（和文）緑内障視神経症における圧較差を介したミトコンドリア障害の解明

研究課題名（英文）Mitochondrial damage mediated by pressure gradient in glaucomatous optic neuropathy.

研究代表者

稲谷 大（Inatani, Masaru）

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：40335245

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、緑内障における視神経障害のメカニズムを解明するために篩状板のないマウスを使用し、網膜神経節細胞の軸索内のミトコンドリアの動態及び細胞内ATP勾配の変化を観察した。緑内障モデルを作成して観察したところ、網膜神経節細胞軸索内のミトコンドリアの分布が増加し、軸索内での運動も低下した。この結果から、篩状板のない動物でも、神経細胞内のミトコンドリア動態に影響を与える可能性を示唆された。軸索内でのミトコンドリアの停止がみとめられると同時に、細胞内ATP勾配も変化していた。特に、ミトコンドリアの動態変化は、軸索内でのATP供給にも影響を与え、細胞の機能や生存に重要な役割を果たす可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究から、緑内障視神経症における篩状板の役割に新しい概念をもたらすことができた。さらに、網膜神経節細胞の機能維持におけるミトコンドリアの役割と、網膜神経節細胞の細胞死の過程におけるミトコンドリアとATP勾配の役割を明らかにすることができた。本研究結果は、将来におけるヒトの緑内障の視神経障害の診断や治療に役立つ情報を提供できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We used mice without lamina cribrosa to investigate the mechanism of optic nerve damage in glaucoma, observing the dynamics of mitochondria within retinal ganglion cell axons and changes in intracellular ATP gradients. Creating a glaucoma model, we observed an increase in mitochondrial distribution within the axons of retinal ganglion cells and a decrease in axonal movement. These findings suggest a potential impact on mitochondrial dynamics within neurons even in animals without lamina cribrosa. Concurrently, we observed mitochondrial stoppage within axons, accompanied by changes in intracellular ATP gradients. Specifically, changes in mitochondrial dynamics were thought to affect ATP supply within axons, potentially playing a crucial role in cell function and survival.

研究分野：緑内障

キーワード：緑内障

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

緑内障は眼圧値が高いと視神経が障害され、その視神経軸索の細胞体である網膜神経節細胞がアポトーシスを起こし、不可逆な視力障害に至る日本人の失明原因トップに位置する疾患である。緑内障では、視神経乳頭近傍の篩状板の変形がみられることから、眼圧が視神経乳頭に負荷をかけ、篩状板を変形させると言われている。そのため、篩状板を通過する視神経軸索が絞扼され、軸索内を輸送されるタンパクや細胞内小器官が途絶し、網膜神経節細胞が細胞死を起こすと考えられている。しかし、篩状板のないマウスでも眼圧上昇で網膜神経節細胞が細胞死を起こすことや、我々の研究でマウスでも眼圧上昇で軸索内を輸送される細胞内小器官であるミトコンドリアが停止したのちに、網膜神経節細胞の細胞死が生じるという非常に矛盾する現象がみられた。篩状板の存在が緑内障視神経症を誘発させるのではなく、むしろ篩状板が緑内障による視神経障害を保護する可能性がある。

### 2. 研究の目的

篩状板のないマウスで緑内障モデルを作成し、ヒトと類似した緑内障視神経症が生じる際に、ミトコンドリアの軸索輸送と分布がどのように変化が見られるかを検証した。また、眼圧と脳脊髄液圧との圧較差を再現し、正常眼圧緑内障モデルにおいて、ミトコンドリアのサイズと分布の変化がみられるのかを明らかにすることを目的とした。

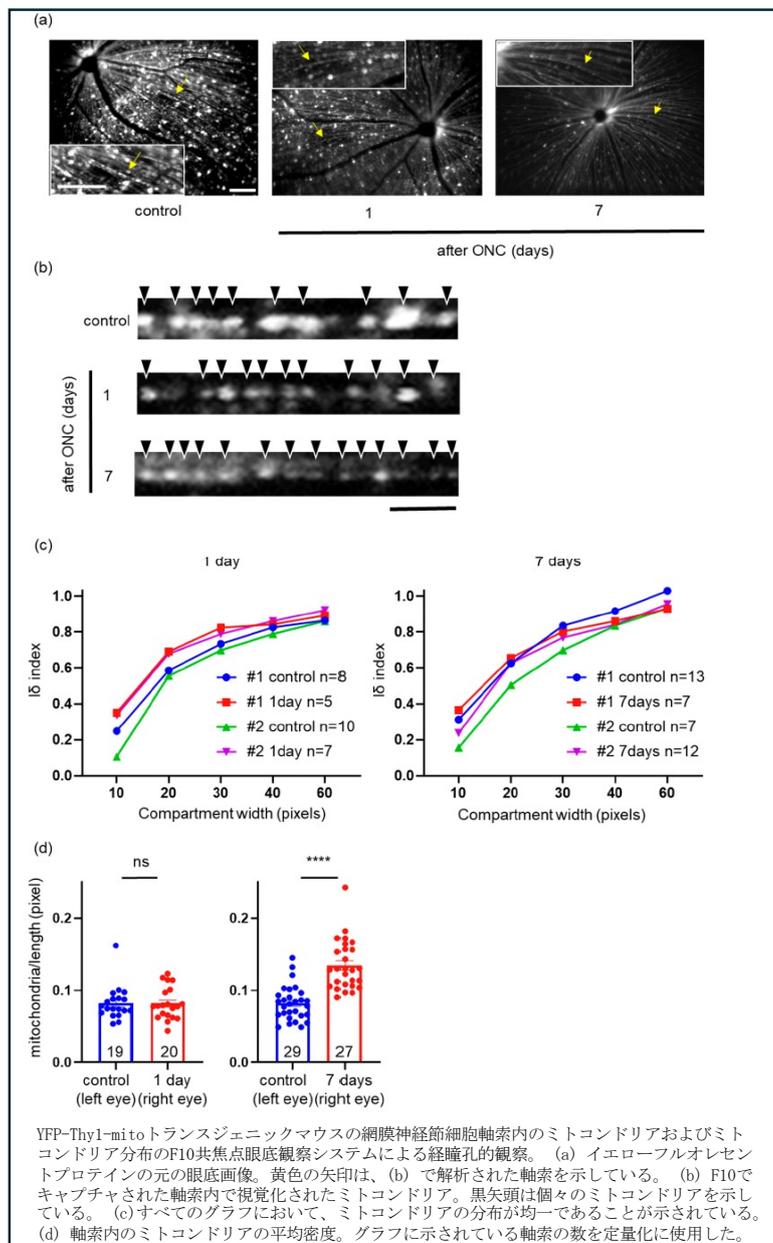
さらに、神経細胞における機能維持のために、ミトコンドリアが軸索内での分布変化を定量化するとともに、細胞への障害による ATP 勾配の変化で、軸索内のミトコンドリアの反応を検証した。

### 3. 研究の方法

網膜神経節細胞にのみミトコンドリアを標的とした蛍光タンパク質 YFP または CFP を発現させた Thy1-ミトコンドリアトランスジェニックマウス (YFP-Thy1-mito マウスと CFP-Thy1-mito マウス) を用いて、*in vitro* のフラットマウント網膜切片と *in vivo* でのニデック社の F10 共焦点眼底観察システム、および、オリンパス製 2 光子レーザー顕微鏡により、緑内障モデルで、ミトコンドリア分布の変化を評価した。正常眼圧緑内障モデルとして、マウスの脊髄腔を開放させて脳脊髄圧を下降させたモデルを作成した。また視神経切断モデルも作成し、F10 共焦点眼底観察システムでミトコンドリアの分布を観察した。

4. 研究成果 マウスの脊髄腔を開放させて、脳脊髄液圧を3ヶ月にわたって下降させることができた。CFP-Thy1-mito マウスの低脳脊髄液圧のモデルを作成し、ミトコンドリアの視神経軸索輸送の変化を2光子レーザー顕微鏡を用いて、ライブイメージで観察することができ、その軸索内のミトコンドリアの分布および動態を定量評価することができた。さらに、我々は、医療用の共焦点走査型ダイオードレーザー検眼鏡であるニデック社の F-10 の検出波長に最適な蛍光色素タンパク YFP の遺伝子に置換した YFP-Thy1-mito トランスジェニックマウスを新たに作成し、そのマウスの瞳孔から、F-10 を用いて眼底観察することができた。網膜神経節細胞におけるミトコンドリアの分布をライブイメージで録画したところ、網膜内のミトコンドリアは、網膜神経節細胞の細胞体と軸索に一樣に分布していることがわかった。一方、緑内障モデルにおける網膜神経節細胞の無髄軸索におけるミトコンドリア分布は、密度は増加するものの、均一であることが確認された。標識されたミトコンドリアには、静止したミトコンドリア (stationary ミトコンドリア) と移動するミトコンドリア (motile ミトコンドリア) に分類された。生理的条件下においても、細胞培養の条件下においても、神経細胞の軸索における stationary ミトコンドリアの分布は、均一に分布していた。細胞培養実験において、mitoTracker で軸索内のミトコンドリアを標識し、KillerRed を用いた chromophore-assisted 光不活化法で局所的にミトコンドリアを不活化させると、ミトコンドリアの分布の均一性が乱れた。フォスフォクレアチニン処理を行い、軸索内に ATP を供給すると、motile ミトコンドリアが活性化され、他のミトコンドリアの移動を促進した。軸索内の ATP:ADP 比が高いことと、軸索内のミトコンドリアの分布の不均一性には、負の相関が示された。Motile ミトコンドリアが軸索内で活発に移動し、ATP を供給することで、軸索内における stationary ミトコンドリアの分布の均一化に関与することが示された。これらの研究結果は、緑内障視神経症において、視神経軸索が局所的に軸索絞扼された場合、絞扼された局所でミトコンドリアの輸送が停止するだけではなく、停止したミトコンドリアによって、ATP の供給が低下し、他のミトコンドリアの移動も停止し、軸索全体のミトコンドリア輸送の停止が引き起こされる我々のこれまでの観察データを反映しているものと思われる。YFP-Thy1-mito マウスで作成した緑内障モデルにおいて、網膜神経節細胞の無髄軸索におけるミトコンドリア分布は、密度は増加するものの、均一であることが確認された。さらに、*in vitro* での解析により、緑内障ではミトコンドリアの大きさが減少することがわかった。これらの結果は、緑内障を発症すると、ミトコンドリアの均一な分布を崩すことなくミトコンドリア分裂を誘導し、軸索の変性やアポトーシスを防いでいる可能性を示唆している。

さらに、AIを用いた画像処理システムを構築し、網膜神経節細胞の無髄線維におけるミトコンドリアをさらに鮮明に定量評価することに成功した。このAIシステムにより、緑内障と正常とのミトコンドリア密度と軸索内分布との変化を定量評価することができる。以上の結果から、軸索ミトコンドリアの *in vivo* 可視化システムは、動物実験やヒトにおける緑内障視神経症の進行の検出に応用できる可能性があることを示すこともできた。



#### <引用文献>

Tsuji T, Murase T, Konishi Y, Inatani M. Optic nerve injury enhanced mitochondrial fission and increased mitochondrial density without altering the uniform mitochondrial distribution in the unmyelinated axons of retinal ganglion cells in a mouse model. *International Journal of Molecular Sciences* 2023 Feb 22;24(5):4356. doi: 10.3390/ijms24054356.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 10件）

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Tsuji Takahiro, Murase Tomoya, Konishi Yoshiyuki, Inatani Masaru  | 4. 巻<br>24                    |
| 2. 論文標題<br>Optic Nerve Injury Enhanced Mitochondrial Fission and Increased Mitochondrial Density without Altering the Uniform Mitochondrial Distribution in the Unmyelinated Axons of Retinal Ganglion Cells in a Mouse Model | 5. 発行年<br>2023年               |
| 3. 雑誌名<br>International Journal of Molecular Sciences   | 6. 最初と最後の頁<br>4356 ~ 4356     |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/ijms24054356  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Inatani Masaru, Kohama Ichiro, Chu Alice  | 4. 巻<br>39                    |
| 2. 論文標題<br>iStent Trabecular Micro-bypass Stent Implantation Combined with Phacoemulsification for Open-Angle Glaucoma: A 2-Year Post-marketing Surveillance Study in Japan   | 5. 発行年<br>2022年               |
| 3. 雑誌名<br>Advances in Therapy   | 6. 最初と最後の頁<br>4076 ~ 4093     |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1007/s12325-022-02207-0  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>該当する                  |
| 1. 著者名<br>Nagaya Masaya, Kanada Fumito, Takashima Masaru, Takamura Yoshihiro, Inatani Masaru, Oki Masaya  | 4. 巻<br>17                    |
| 2. 論文標題<br>Atm inhibition decreases lens opacity in a rat model of galactose-induced cataract   | 5. 発行年<br>2022年               |
| 3. 雑誌名<br>PLOS ONE  | 6. 最初と最後の頁<br>274735 ~ 274735 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1371/journal.pone.0274735  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Suzuki Marie, Suzuki Yohei, Komori Ryohei, Orie Yusuke, Arimura Shogo, Iwasaki Kentaro, Takamura Yoshihiro, Inatani Masaru  | 4. 巻<br>12                    |
| 2. 論文標題<br>Aqueous column changes in the episcleral veins after the instillation of ripasudil versus latanoprost: a randomized, double-blind, crossover clinical trial  | 5. 発行年<br>2022年               |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>15255~15260     |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41598-022-19271-9  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-                     |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Iwasaki Kentaro, Kojima Sachi, Wajima Ryotaro, Okazaki Tomoyuki, Yokoyama Yu, Inoue Toshihiro, Higashide Tomomi, Miki Atsuya, Nakazawa Toru, Inatani Masaru | 4. 巻<br>5               |
| 2. 論文標題<br>Comparing Surgical Outcomes in Neovascular Glaucoma between Tube and Trabeculectomy  | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>Ophthalmology Glaucoma  | 6. 最初と最後の頁<br>672 ~ 680 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.ogla.2022.05.003  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-               |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Iwasaki Kentaro, Arimura Shogo, Takamura Yoshihiro, Inatani Masaru       | 4. 巻<br>99              |
| 2. 論文標題<br>Prospective study of corneal endothelial cell loss after trabeculectomy | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Acta Ophthalmologica   | 6. 最初と最後の頁<br>e614-e615 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/aos.14561                                      | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-               |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Arimura Shogo, Iwasaki Kentaro, Orii Yusuke, Takamura Yoshihiro, Inatani Masaru  | 4. 巻<br>21            |
| 2. 論文標題<br>Comparison of 5-year outcomes between trabeculectomy combined with phacoemulsification and trabeculectomy followed by phacoemulsification: a retrospective cohort study | 5. 発行年<br>2021年       |
| 3. 雑誌名<br>BMC Ophthalmology  | 6. 最初と最後の頁<br>188-188 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1186/s12886-021-01949-9   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-             |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Gozawa Makoto, Watanabe Naoki, Iwasaki Kentaro, Takamura Yoshihiro, Inatani Masaru   | 4. 巻<br>12              |
| 2. 論文標題<br>Application of moving particle semi-implicit (MPS) method on retro-oil fluid using three-dimensional vitreous cavity models from magnetic resonance imaging | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports   | 6. 最初と最後の頁<br>1735-1735 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41598-022-05886-5   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-               |

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Matsumoto Nozomu, Hori Ikuma, Kajita Masashi K., Murase Tomoya, Nakamura Wataru, Tsuji Takahiro, Miyake Seiji, Inatani Masaru, Konishi Yoshiyuki | 4. 巻<br>119                   |
| 2. 論文標題<br>Intermitochondrial signaling regulates the uniform distribution of stationary mitochondria in axons   | 5. 発行年<br>2022年               |
| 3. 雑誌名<br>Molecular and Cellular Neuroscience  | 6. 最初と最後の頁<br>103704 ~ 103704 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.mcn.2022.103704  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-                     |

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Iwasaki Kentaro, Kakimoto Hiroshi, Orii Yusuke, Arimura Shogo, Takamura Yoshihiro, Inatani Masaru                                    | 4. 巻<br>11                |
| 2. 論文標題<br>Long-Term Outcomes of a Kahook Dual Blade Procedure Combined with Phacoemulsification in Japanese Patients with Open-Angle Glaucoma | 5. 発行年<br>2022年           |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Clinical Medicine   | 6. 最初と最後の頁<br>1354 ~ 1354 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/jcm11051354  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-                 |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Iwasaki K, Kakimoto H, Arimura S, Takamura Y, Inatani M                                  | 4. 巻<br>40              |
| 2. 論文標題<br>Prospective cohort study of risk factors for choroidal detachment after trabeculectomy. | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>International Ophthalmology  | 6. 最初と最後の頁<br>1077-1083 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1007/s10792-019-01267-6.  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-               |

|  |                        |
|--|------------------------|
| 1. 著者名<br>Iwasaki K, Takamura Y, Orii Y, Arimura S, Inatani M.   | 4. 巻<br>13             |
| 2. 論文標題<br>Performances of glaucoma operations with Kahook Dual Blade or iStent combined with phacoemulsification in Japanese open angle glaucoma patients | 5. 発行年<br>2020年        |
| 3. 雑誌名<br>International Journal of Ophthalmology   | 6. 最初と最後の頁<br>:941-945 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.18240/ijo.2020.06.13.   | 査読の有無<br>有             |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-              |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Iwasaki K, Arimura S, Takamura Y, Inatani M.   | 4. 巻<br>64            |
| 2. 論文標題<br>Clinical practice preferences for glaucoma surgery in Japan: a survey of Japan Glaucoma Society specialists | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>Japanese Journal of Ophthalmology  | 6. 最初と最後の頁<br>385-391 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1007/s10384-020-00749-w.  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-             |

|   |                      |
|---|----------------------|
| 1. 著者名<br>Tsuji T, Inatani M, Tsuji C, Cheranov SM, Kadosono K.   | 4. 巻<br>64           |
| 2. 論文標題<br>Oxytocin induced epithelium-mesenchimal transition through Rho-ROCK pathway in ARPE-19 cells, a human retinal pigmental cell line. | 5. 発行年<br>2020年      |
| 3. 雑誌名<br>Tissue Cell.  | 6. 最初と最後の頁<br>101328 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.tice.2019.101328.   | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-            |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Iwasaki K, Kanamoto M, Arimura S, Takamura Y, Kimura H, Inatani M   | 4. 巻<br>3             |
| 2. 論文標題<br>Filtering Blebs after Baerveldt Glaucoma Implantation Using Magnetic Resonance Imaging: A Prospective Investigation. | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>Ophthalmology Glaucoma  | 6. 最初と最後の頁<br>221-224 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.ogla.2020.01.003.   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-             |

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Inatani M, Suzuki M, Suzuki Y, Komori R, Orii Y, Aimura S.   |
| 2. 発表標題<br>Aqueous column changes in the episcleral veins after the instillation of ripasudil versus latanoprost: A randomized, double-blind, crossover clinical trial. |
| 3. 学会等名<br>The 38th APAO Congress (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2022年 ~ 2023年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Inatani M   |
| 2. 発表標題<br>Combined iStent trabecular micro-bypass and cataract surgery in Japanese glaucomatous eyes. |
| 3. 学会等名<br>5th Asia-Pacific Glaucoma Congress (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Inatani M  |
| 2. 発表標題<br>Treatment strategies for neovascular glaucoma in the new era.        |
| 3. 学会等名<br>The Chinese University of Hong Kong Virtual Grandround (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>稲谷 大   |
| 2. 発表標題<br>How to create the excellent filtering bleb in Baerveldt glaucoma implantation. シンポジウム18 Hot topics: Glaucoma treatment |
| 3. 学会等名<br>第74回日本臨床眼科学会   |
| 4. 発表年<br>2020年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

福井大学医学部眼科学教室  
<http://ganka-fukuimed.jp/index.html>

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                           | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                            | 備考 |
|-------|---|--|----|
| 研究分担者 | 高村 佳弘<br><br>(Takamura Yoshihiro)<br><br>(00283193) | 福井大学・学術研究院医学系部門・准教授<br><br><br><br>(13401)       |    |
| 研究分担者 | 有村 尚悟<br><br>(Arimura Shogo)<br><br>(20835029)      | 福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・助教<br><br><br><br>(13401) |    |
| 研究分担者 | 辻 隆宏<br><br>(Tsuji Takahiro)<br><br>(40787389)      | 福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・助教<br><br><br><br>(13401) |    |

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 |
|---------|---------|
|         |         |