

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18379

研究課題名（和文）網膜内層シナプスリモデリングの解明と緑内障治療への応用

研究課題名（英文）The synaptic remodeling in the inner retina is possible to treat the glaucoma

研究代表者

河嶋 瑠美（Kawashima, Rumi）

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00843616

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではマウス網膜に多く存在する接着分子Necl-1が短波長光誘導シグナル経路の中でも錐体OFF経路のシナプス形成及び伝達に重要であること、さらにマウスの眼球運動の制御に関与していることを報告した。また既報で報告されているsingle cell 解析のサブ解析を行いNecl-1の発現細胞を把握し、形態学的にNecl-1発現細胞の網膜内での分布を3次元で解析する方法を確立することができた。緑内障モデルマウスとして一過性高眼圧マウスの作製に成功したが、モデルマウスにおける網膜内層シナプス解析までは至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性視神経変性疾患である緑内障は眼圧という圧負荷によって網膜内層が障害され視神経が障害される疾患であり日本の途中失明原因の1位である。網膜に存在する接着分子であるNecl-1はシグナル伝達におけるOFF経路に重要な役割を持つ。さらに近年緑内障モデル動物において網膜神経節細胞死が起こる前に網膜内層の1つである内網状層（IPL）のOFF層が先行して障害されOFF型網膜神経節細胞が眼圧依存性にシナプス可塑性を持つことが報告された。本研究ではNecl-1を用いて高眼圧負荷時における修復再生に関わる分子基盤を解明することで初期緑内障におけるシナプスリモデリングの病態解明に挑んだ。

研究成果の概要（英文）：In this study, we reported that Necl-1, an adhesion molecule abundant in the mouse retina, was important for synapse formation and transmission of cone OFF pathway among short-wavelength light-induced signaling pathways and was involved in the regulation of mouse eye movements. In addition, we have performed a sub-analysis of the single cell analysis previously reported and established a method to morphologically analyze the distribution of Necl-1-expressing cells in the retina in three dimensions. We succeeded in creating transient ocular hypertension mice as a model for glaucoma, but we did not reach the point of analyzing synapses in the inner retinal layers in the model mice.

研究分野：網膜シナプス研究

キーワード：網膜内層シナプス シナプスリモデリング 緑内障

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、高眼圧マウスモデルにおいて IPL の ON 層においてもシナプス終末の増加現象が発見されただけでなく、網膜神経節細胞障害をきたす初期段階で網膜内網状層 (IPL) の OFF 層が ON 層より先行して障害を受けることが指摘されてきた (Santina LD, 2013)。また OFF 経路障害が網膜神経節細胞死に先行する (Santina LD, 2013) ことも動物実験で報告されている。さらに、OFF 型網膜神経節細胞が眼圧依存性にシナプス可塑性を起こす (Della Santina L, 2013, El-Danaf RN, 2015, Ou Y, 2016) ことが複数報告されている。またヒトにおける極早期緑内障において青色シグナル経路が選択的に障害されること (Jung Y, 2015, Arvind H, 2009) が知られている。そこで我々は Nectin, Necl (Nectin-like) ファミリーのスクリーニングの結果、マウス網膜内に多数存在する接着分子 Necl-1 に注目してきた。Necl-1 は中枢神経ではグリア細胞と神経軸索の接着やミエリン化に重要な役割を果たしているだけでなく、シナプス形成や可塑性に関与することが知られている (Honda T, 2006, Gruber-Olipitz M, 2006)。我々は Necl-1 が OPL 層のシナプス部位において青色を認識する S 錐体の OFF シグナル経路に形態学および機能的に重要な役割を果たしていることを発見し、IPL 層の OFF 層および網膜神経節細胞にも Necl-1 が発現していることを免疫組織染色で確認した。さらにレーザー誘発高眼圧緑内障モデルマウスを作成し観察した結果、Necl-1 の IPL の OFF 層での発現が増強していることを予備実験で確認しており、緑内障における網膜内層シナプス再形成における Necl-1 の重要性を検討したいと考えた。しかし、Necl-1 の IPL の OFF 層の発現プロファイルは網膜神経細胞種の多さから困難で未だ同定できていない。よって細胞種の特定のために網羅解析のシステムが必要と考えた。

### 2. 研究の目的

慢性視神経変性疾患である緑内障は眼圧という圧負荷によって網膜内層が障害される疾患である。網膜内層にはシナプス形成部位である内網状層 (IPL) が存在する。一方、中枢神経系において重要な細胞接着分子群である Nectin, Necl (Nectin-like) ファミリーは網膜内接着分子としてあまり知られていない。我々は Necl-1 がマウス網膜内に広く存在し特に IPL 内の OFF 層に強く局在していることを見出した。近年緑内障モデル動物において網膜神経節細胞死が起こる前に IPL の OFF 層が先行して障害され OFF 型網膜神経節細胞が眼圧依存性にシナプス可塑性を持つことが報告された。そこでまず網膜内の Necl-1 発現細胞を解析し IPL における発生的シナプス形成を検討する。さらに高眼圧負荷時における修復再生に関わる分子基盤を解明することで初期緑内障におけるシナプスリモデリングの病態を解明する。

### 3. 研究の方法

マウス網膜における Necl-1 の局在に関して in situ hybridization, single cell データのサブ解析、免疫組織染色、独自で自動で細胞認識するソフトを用いた細胞同定を行った。機能解析において網膜電図(ERG)、視機能性眼球反応(OKR)を施行した。さらに Necl-1 発現細胞の可視化のため Necl-1 に Crisper-Cas9 法で CreERT をノックインしたマウスと Brainbow マウスと掛け合わせを試みた。最後に高眼圧緑内障モデルマウス作製および二光子顕微鏡を用いた観察を試みた。

#### 4 . 研究成果

本研究では網膜内に多数存在する接着分子のうち Necl-1 に注目した。まずマウス網膜の局在と役割に関する報告を行った。マウス網膜に存在する S, S/M, M 錐体のうち Necl-1 は S opsin を含有している S, S/M 錐体に発現していること、さらに S, S/M 錐体に接続するとされている錐体 OFF 型双極細胞に発現していることを既報の single cell データのサブ解析及び免疫組織染色で示した。また Necl-1 が短波長を認識する経路に関与していることを裏付けるために、細胞を 3 次元で認識し網膜全体の双極細胞における Necl-1 陽性双極細胞の割合を解析するソフトを開発し、Necl-1 の網膜内での分布を検討した。その結果、Necl-1 陽性細胞が腹側に分布していることを示すことができた。この結果は短波長を認識する双極細胞に Necl-1 が発現していることを裏付ける結果となった。さらに解析を進め、Necl-1 は錐体 OFF 型双極細胞の中でも 4 型双極細胞にのみ細胞体から樹状突起にかけて局在し、ノックアウトマウスでこの双極細胞の樹状突起だけが位置異常を起こしていることを見出した。また OFF 型双極細胞に存在するシナプス受容体は AMPA, Kainate 受容体であるが、AMPA 受容体の位置異常を同時に示すことができた。さらに機能解析として網膜電図(ERG)を施行した。我々が独自で作製した紫外線 LED を刺激光にした紫外線 ERG (Kawashima R, et al. Curr Eye Res. 2019) を用いてノックアウトマウスの解析を行ったところ、紫外線由来の OFF 経路のシグナル伝達が遅延していること、さらにその伝達遅延が AMPA 賦活剤硝子体投与によってレスキューできたことを示した。つまり Necl-1 は紫外線(短波長)を認識する視細胞から OFF 型錐体双極細胞へのシナプス形成と AMPA 受容体を介したシグナル伝達に重要であることが証明できた。さらに、Necl-1 は水平細胞の核の位置決定にも関与していること、マウスの眼球運動制御にも影響していることを報告した (Kawashima R, et al. iScience. 2024)。

このようにマウス網膜においてシグナル伝達に重要な役割を果たしていることがわかった接着分子 Necl-1 に Crisper-Cas9 法で CreERT をノックインしたマウスの作製を行った。このマウスと Brainbow マウスと掛け合わせ、タモキシフェン投与を行うことで Necl-1 発現細胞の可視化を試みた。繁殖に難渋したのち維持可能となったが、発現効率が悪く死亡例も多くみられた。そのため現在タモキシフェン投与時期および投与量の検討中である。

さらに高眼圧緑内障モデルマウス作製のため、前房内粘弾性物質注入を行った。注入直後より眼圧が上昇し 1 時間後に定常状態に達した後、4-6 時間後に下降し始め、12 時間後にはベースラインに戻った。負荷 1 ヶ月後には網膜神経節細胞(RGC)数及び神経線維マーカー Nef や RGC マーカー Brn3a の mRNA の発現が減少し時間依存性であった。また二光子顕微鏡を用いて前眼部からの観察を行うためにマウス用コンタクトレンズを用いた視神経乳頭の観察を試みた。乳頭および網膜の大血管の観察に成功したがより詳細な観察には顕微鏡のレンズなどの工夫が必要であり現在検討中である。また長時間の観察に耐えることができるような麻酔や蛍光強度の検討が必要であることが判明したためより効率よく安全に観察する条件検討を行う予定である。今後 Necl-1 発現細胞をラベルしたマウスに対して高眼圧負荷を行い網膜内層のシナプス変化及び ERG による機能評価を行う。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kawashima R, Matsushita K, Ohnuma K, Maeda N, Koh S, Nishida K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Getting a Peek at the Angle of a Patient with Severe Keratoconus.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers In Ophthalmology.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Matsushita Kenji, Kawashima Rumi, Hashida Noriyasu, Hamano Yuki, Harada Kazuo, Higashisaka Kazuma, Baba Koichi, Sato Shigeru, Huang Weiran, Matsumoto Hiroshi, Hamanaka Teruhiko, Quantock Andrew J., Nishida Kohji	4. 巻 online
2. 論文標題 Barium-induced toxic anterior segment syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 online
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/11206721211069223	査読の有無 無
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Kawashima Rumi, Baba Keita, Matsushita Kenji, Soma Takeshi, Kurashige Masako, Umeda Daisuke, Nakamura Makoto, Morii Eiichi, Nishida Kohji	4. 巻 12
2. 論文標題 Intraocular Endoscopy Resolved Tube Occlusion of an Ahmed Glaucoma Valve	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Case Reports in Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 706 ~ 711
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000518286	査読の有無 無
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Kawashima Rumi, Matsushita Kenji, Kawasaki Ryo, Nishida Kohji	4. 巻 21
2. 論文標題 Efficacy and safety of 5-fluorouracil in infrared monitor guided bleb revision	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12886-021-01843-4	査読の有無 無
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Matsushita Kenji, Kawashima Rumi, Kawasaki Ryo, Nishida Kohji	4. 巻 65
2. 論文標題 Prognostic factors for successful Baerveldt glaucoma implant surgery for refractory glaucoma after multiple surgeries	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 820 ~ 826
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10384-021-00864-2	査読の有無 無
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Matsushita Kenji, Kawashima Rumi, Uesugi Koji, Okada Haruka, Sakaguchi Hirokazu, Quantock Andrew J., Nishida Kohji	4. 巻 10
2. 論文標題 Assessment of a self-assembling peptide gel, SPG-178, in providing a clear operative field for trabeculectomy surgery for glaucoma in an animal model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-68171-3	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Kawashima Rumi, Matsushita Kenji, Hashida Noriyasu, Kuniyoshi Kazuki, Fujikado Takashi, Nishida Kohji	4. 巻 41
2. 論文標題 Complete Visual Recovery From Severe Outer Retinitis After Tonsillitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuro-Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 e578 ~ e583
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/WNO.0000000000001073	査読の有無 無
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Kawashima Rumi, Matsushita Kenji, Nishida Kohji	4. 巻 34
2. 論文標題 Comparison of the 1-year surgical outcomes of ab interno trabeculotomy using three types of microhooks	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 European Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 461 ~ 470
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/11206721231189111	査読の有無 無
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Kawashima Rumi, Matsushita Kenji, Mandai Kenji, Sugita Yuko, Maruo Tomohiko, Mizutani Kiyohito, Midoh Yoshihiro, Oguchi Akiko, Murakawa Yasuhiro, Kuniyoshi Kazuki, Sato Ryohei, Furukawa Takahisa, Nishida Kohji, Takai Yoshimi	4. 巻 27
2. 論文標題 Necl-1/CADM3 regulates cone synapse formation in the mouse retina	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 109577 ~ 109577
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2024.109577	査読の有無 無
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 河嶋瑠美
2. 発表標題 Necl-1/CADM3のマウス網膜における青色色覚シナプス形成への関与
3. 学会等名 第127回 日本眼科学会
4. 発表年 2023年

〔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
---------	---------