

機関番号：32713

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791718

研究課題名 (和文) 緑内障性視神経症の無髄軸索内ミトコンドリア行動異常の制御機構

研究課題名 (英文) Modulation of mitochondrial behavior in unmyelinated axon of glaucomatous optic neuropathy.

## 研究代表者

宗正 泰成 (MUNEMASA YASUNARI)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：30440340

研究成果の概要 (和文)：ラット高眼圧モデルにおいて、異常ミトコンドリアの集積かつ正常ミトコンドリアの減少が視神経篩状板近傍で認められた。眼圧上昇 2 及び 5 週間後の視神経ミトコンドリア抽出蛋白でミトコンドリア膜制御因子である Thioredoxin2 (Trx2) 及び AIF の減少が認められた。さらに軸索内小器官内において AIF の上昇が認められた。網膜神経節細胞の核抽出蛋白において AIF の上昇が認められた。さらにエレクトロポレーションにより Trx2 プラスミド DNA を網膜神経節細胞に強制発現すると、緑内障による軸索変性に対し保護的に働くことがわかった。これらの結果はミトコンドリア外膜制御機構破綻による AIF の軸索内への流入及び網膜神経節細胞内の核内移行が緑内障性視神経症に大きく寄与していることが判明した。

研究成果の概要 (英文)：A decrease in Mitotracker labeled mitochondria around lamina area at the optic nerve was observed in glaucomatous eye. Significant decrease in thioredoxin2 (Trx2) level was observed in the glaucomatous mitochondria. The change of mitochondrial apoptosis-inducing factor (AIF) was slightly decreased, whereas significant increase in axoplasmic AIF was observed in the glaucomatous optic nerve. Furthermore, substantial increase in nucleus AIF was observed in RGCs after IOP elevation. Thus, a decreased mitochondrial membrane potential and subsequent AIF translocation were involved in glaucomatous neurodegeneration. Furthermore, modulation of mitochondria through the inhibition of AIF translocation may become new strategy for neurodegenerative disease, such as glaucoma.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：緑内障,ミトコンドリア,軸索変性,網膜神経節細胞死,Thioredoxin2,AIF,酸化ストレス,TNF- $\alpha$

### 1. 研究開始当初の背景

開放隅角緑内障は篩状板近傍で視神経の軸索が障害を受け、その細胞体である網膜神経節細胞(RGC)がアポトーシス死に至り、結果として不可逆的な視野障害を来す神経変性疾患である。現在までに軸索変性の機序として、眼圧上昇に伴った篩状板近傍の deformation と remodeling の異常にあると考えられている。

近年本邦で行われた疫学調査によると、眼圧が正常範囲にもかかわらず神経変性が進行する、正常眼圧緑内障の頻度が90%以上と欧米諸国に比し高い。これらは緑内障における視神経変性が眼圧上昇のみならず、眼圧非依存的にも進行すると推測される。よって今後我々に課せられる研究として、**眼圧下降以外の神経保護治療**が挙げられる。

過去に我々は網膜神経節細胞株(RGC-5)において、レドックス調節蛋白であるミトコンドリア局在型チオレドキシシン(Trx2)強制発現が酸化ストレスに対し、**神経保護効果を示す**ことを報告した。さらに**Trx 2の網膜神経節細胞への強制発現は、視神経切断や緑内障による網膜神経節細胞死を有意に抑制**した。それ故に、緑内障には酸化ストレスに関わるミトコンドリア機能障害が示唆された。

### 2. 研究の目的

**緑内障性視神経症にはミトコンドリアの軸索内輸送及び機能障害が関わりと仮定する。**

- (1) 軸索内のミトコンドリアを蛍光色素にて順行性もしくは逆行性に標識し、ラット緑内障モデル(慢性高眼圧モデル)及びTumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$ 誘発視神経障害モデルを作成する。

- (2) 眼圧上昇もしくは障害誘発後、視神経の水平及び垂直切片を作成し、軸索変性時におけるミトコンドリアの軸索内での局在を共焦点走査顕微鏡及び電子顕微鏡にて解析する。
- (3) 視神経(有髄線維部)、視神経篩状板部・乳頭部(無髄線維部)及び網膜神経節細胞と部位別に採取し、分子生物学的手法によりミトコンドリアの輸送障害さらには機能障害を評価する。
- (4) ミトコンドリアの軸索内輸送や機能を制御する遺伝子を強制発現することで軸索変性を保護する。

### 3. 研究の方法

(1) **ラット緑内障(高眼圧)モデル作成**  
雄性ラットの前房内に India Ink を注射し、その5日後に Ink により染められた線維柱帯にアルゴンレーザーを照射する。レーザーは2週間後にも同様に行う。ラットの眼圧は手持ち眼圧計(トノラボ)にて週一回無麻酔下で計測する。

### (2) ミトコンドリアの標識と軸索内輸送及び分布の評価

上記モデル作成前に順行性ミトコンドリアの標識として、ミトコンドリア蛍光色素 100  $\mu$ M(2  $\mu$ l)を顕微鏡下で硝子体注射する。逆行性標識は中脳上丘より 500nMの蛍光色素を浸透させる。軸索内輸送の確認は、上記モデル誘導前、誘導後1日、2週、5週と行う。眼球を視神経ごと摘出し(視神経は眼球附着部5mmまで)、視神経の矢状断・水平断(乳頭部、前篩状板、篩状板、有髄視神経線維部)

の切片作成し、網膜はフラットマウントを作成し、共焦点顕微鏡にて観察する。軸索内輸送・分布の評価は上記モデルを作成前に行う。

### (3) 視神経及び網膜神経節細胞におけるミトコンドリア輸送・機能の分子生物学的評価

上記に準ずるモデルにおいて視神経（有髄線維部）、視神経篩状板部・乳頭部（無髄線維部）及び網膜神経節細胞内の motor protein (Kinesin, Dynein, Myosin,) とミトコンドリアの複合体の変化を Co-immunoprecipitation 法で解析する。レドックス調節蛋白の Trx2 やアポトーシス関連因子である AIF (apoptosis-inducing factor) はおのおのの部位でミトコンドリア、細胞質、核を抽出し、immunoblot にて確認する。

### (4) in vitro による神経保護（予備実験）

RGC-5 に対し、TNF と buthionine sulfoximine (BSO) を投与し障害を誘発する。投与後ミトコンドリア輸送に関わる因子（上記参照）の変化を解析し、さらにミトコンドリアの機能障害（上記参照）も評価する。ミトコンドリアの膜透過性を制御する Trx2 をプラスミドやウィルスペクターを用いて強制発現させ、Bax, Bcl-2, AIF の核、細胞質移行を解析する。さらに Trx2 強制発現による TNF 及び BSO 誘発神経障害に対する神経保護効果を検討する。

### (5) in vivo による神経保護効果の検討

ミトコンドリアの膜を制御する Trx2 の強制発現がミトコンドリア軸索内輸送に及ぼす影響を共焦点顕微鏡にて確認し、さらに軸索変性や神経節細胞死に対する保護効果の評価する。神経保護効果の評価として、ソフトウェアである Aphelion を用いて客観評価を行う。視神経軸索は軸索直径の大きさに応じた軸索数をヒストグラムで表すことで、直径別の軸索障害の評価をし、神経トレーサーで

ラベルされた網膜神経節細胞は直径別に細胞数を評価する。

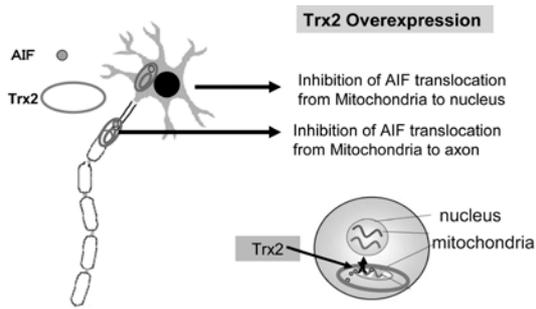
### 4. 研究成果

緑内障モデル作成後眼圧上昇 2 週目における変性軸索内の Kinesin1 (KIF5B) 及び MyosinVa の減少を認めた。ミトコンドリア分画における膜透過制御蛋白 Thioredoxin2 (Trx2) の減少及び細胞死誘導因子である apoptosis-inducing factor (AIF) の減少、それに伴う軸索原形質内及び網膜神経節細胞体核内の AIF の上昇を認めた。これらの結果は高眼圧による視神経変性軸索内ミトコンドリア輸送の減少及びミトコンドリア関連細胞死因子の外膜透過性亢進によるミトコンドリア外への流出に伴う軸索変性及び細胞体死を示唆した。In vitro の系では RGC5 細胞に TNF 及び BSO を負荷し酸化ストレスを誘導した。ストレス誘導後ミトコンドリア抽出分画の Trx2 及び AIF の減少と、核内分画における AIF の上昇を認めた。

神経保護効果に関しては、Trx2 cDNA の硝子体注射及び electroporation によるミトコンドリア外膜への強制発現により検討された。Trx2 のミトコンドリアへの強制発現は immunoblot 及び共焦点顕微鏡で確認された。immunoblot では強制発現された網膜及び視神経において Trx2 の上昇が認められた。共焦点顕微鏡では GFP で標識された Trx2 のミトコンドリア外膜での発現が認められた。

眼圧上昇 5 週間での軸索数は高眼圧群では約  $27 \times 10^4$  に対し、Trx2 強制発現群では約  $32 \times 10^4$  と神経保護効果を得ることができた。本研究において、高眼圧による軸索変性にはミトコンドリアの外膜透過性制御破綻及びミトコンドリア輸送蛋白の分解・減少さらには AIF 等ミトコンドリア関連細胞死誘導蛋白の軸索内及び細胞体核内での上昇が関与しており、Trx2 強制発現による外膜透過性制御

によりその軸索変性保護が得られた。



#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Kuribayashi J, Kitaoka Y, Munemasa Y, Ueno S. Kinesin-1 and degenerative changes in optic nerve axons in NMDA-induced neurotoxicity. Brain Research. 2010, 1316; 133-140. 査読有
- ② Munemasa Y, Kitaoka Y, Kuribayashi J, Ueno S. Modulation of mitochondria in the axon and soma of retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. Journal of Neurochemistry. 2010, 115; 1508-1519. 査読有
- ③ Yasushi Kitaoka, Yasunari Munemasa, Yasuhiro Hayashi Junko Kuribayashi, Natsuko Koseki, Kaori Kojima, Toshio Kumai, Satoki Ueno. Axonal Protection by 17 $\beta$ -Estradiol through Thioredoxin-1 in Tumor Necrosis Factor-Induced Optic Neuropathy. Endocrinology. in press. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 日本緑内障学会 宗正泰成 2010年9月25日 福岡 高眼圧モデルラットにおける軸索輸送関連蛋白の変化
- ② The Association for Research in Vision and Ophthalmology. Yasunari Munemasa 5/3/2010 Fort Lauderdale. Modulation of Axonal Transport of Mitochondria in Rat Glaucoma Model.
- ③ 日本眼科学会 宗正泰成 2010年4月10日 名古屋 緑内障性視神経症におけるミトコンドリア外膜の透過性制御と細胞死機構

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

宗正 泰成 (MUNEMASA YASUNARI)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：30440340

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし