

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09722

研究課題名(和文) 視力障害に関わる視神経障害及び、網膜神経節細胞死に対する中枢神経因子の解明

研究課題名(英文) Optic neuropathy and related to the visual impairment, elucidation of the central nervous factor on retinal ganglion cell death

研究代表者

高 知愛 (Ko, Ji-Ae)

広島大学・医系科学研究科(医)・准教授

研究者番号：70314797

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)：本研究は視覚障害に関わる疾患に対する神経保護に有効な治療薬を開発することが目的です。網膜神経節細胞と中脳(上丘)、またはグリア細胞との相互作用も調べ、神経細胞保護に関連するメカニズムも明らかにしようとする研究でもあります。神経節細胞と周囲組織、細胞との共培養法を確立させました。網膜神経節細胞と中脳組織と共培養を行い中脳アストロサイト由来神経栄養因子(MANF)が同定され、その結果を論文で発表しました。またグリア細胞からはNGF、IGFBP-5、VEGFの三つの因子が同定されました。今後はこれらの因子がどのように網膜神経節細胞の保護に影響を与えているのかを解析を進めていきます。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑内障は網膜神経節細胞が障害され、視野が狭くなる病気である。その網膜神経節細胞の障害には高眼圧が大きな原因となり、その克服のためには第1選択として、眼圧の低下に効果がある既存の薬を点眼する治療法が優先になる。しかし、その点眼薬の適応も限界があり、いずれにしろ、網膜神経節細胞の変性を止めることができない。しかも、日本人に多い正常眼圧緑内障でも眼圧が正常にも拘らず、神経節細胞の変性が見られる。次第には失明に繋がる。本研究は、神経保護治療に着目し、その為に、一番生体内と変わらない環境で神経細胞に影響を及ぼす因子を突き止め、治療薬を開発することに学術、または社会的意義があると考えている。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research is to develop effective therapeutic agents for neuroprotection against visual impairment. Research aimed at elucidating the interaction between retinal ganglion cells and the midbrain (superior colliculus) and their effects on glial cells, and as a result, established a co-culture method for ganglion cells, surrounding tissues, and cells. It's done. First, as a result of co-culturing retinal ganglion cells and midbrain tissue, we found that midbrain astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) was the signal, and published the results in a paper. Furthermore, three factors, NGF, IGFBP-5, and VEGF, were identified in their interactions with glial cells. We are currently analyzing how these factors affect the protection of retinal ganglion cells.

研究分野：細胞生理学

キーワード：神経保護 神経眼科 共培養

1. 研究開始当初の背景

- (1) 視力及び、視野障害に関わる疾患は様々である。視神経炎または我が国における失明原因の第一位となる緑内障は視中枢の障害で視野障害に大きく関わっている。また失明原因の最も深刻である緑内障では眼圧下降のみの治療には限界があり、最終的には網膜神経節細胞の細胞死を食い止めなければならない。このような視野障害に関わる疾患には最終的にはその神経細胞の保護、つまり細胞死を止めなければならないことから神経保護に関わる因子を同定し、その有効な治療薬を開発することが不可避である。
- (2) 近年の緑内障の研究は上記で述べた理由から網膜神経節細胞に関わる研究が主流になっている。しかし、現在までは既存の緑内障薬、あるいは、報告されている神経関連の栄養因子などを用いた研究では、間接的なアプローチから解明しようとする研究が殆どである。そこで、何とか直接に証明できる方法を検討していた。
- (3) 近年、培養細胞内に生体内環境を付与することを目指して、「コラーゲンピトリゲル膜」が開発され、さまざまな組織において再生医療あるいは創薬研究への応用に向けての *in vitro* での細胞間の情報交換の解明の研究が進められている。
- (4) 実際、申請者の最近の研究で、角膜上皮細胞と実質細胞の相互作用を調べるために、コラーゲンピトリゲル膜を用い共培養を試み、異なる細胞の存在下で細胞同士の相互作用を調べることに成功している。さらに、共培養条件が困難とされる神経細胞（三叉神経）との共培養も成功し、論文として発表している。そこで、本研究の申請者はこの培養系を応用することにした。
まずは、緑内障の原因となる網膜神経節細胞との共培養として、生体内で網膜神経節細胞と直接つながっている組織（中脳）さらに、網膜神経節細胞の周辺の細胞（グリア細胞）などに着目し、生体内と最も近い環境で共培養を試すことにする。

2. 研究の目的

本研究の究極の目的は、今までの研究で確立されたコラーゲン膜、または Millipore Insert などを用いた共培養系をさらに応用し、網膜神経節細胞と眼球運動障害などに関わる中枢神経の組織切片、またはグリア細胞との共培養により、神経細胞保護作用の機能を果たす因子を同定することである。

- (1) 中脳(上丘)から網膜神経節細胞に作用する因子の同定; 共培養系において、中脳(上丘)の有無で網膜神経節細胞内で現れる現象を見出して、そこから想定できる、つまり、影響に関わっていると今までの報告から思われる既知の因子に対して、その培養液中に追加、あるいは inhibitor の処理など、conditioning medium を用い、網膜神経節細胞内での分化マーカーなどの蛋白質の発現変化、あるいは生理現象での変化などを明らかにし、その調節機構を明確にする。
- (2) 周辺の細胞(グリア)から網膜神経節細胞に作用する因子の同定; 中脳との共培養系を参考にし、中脳の時と同様にグリア細胞の有無で網膜神経節細胞内で起こる現象を解析すると共に影響を与えている因子を同定する。

3. 研究の方法

- (1) 今まで難しいとされたプライマリー神経細胞(網膜神経節細胞)と中脳(上丘)組織の共培養法を用いた解析; 神経細胞との共培養系を確立させながら、さらに、*in vivo* 状態での神経細胞を用いて中脳(上丘)組織との共培養系も確立させる。中脳切片との共培養で、網膜神経節細胞内での変化が認められた(細胞死が抑えられた)場合、その共培養に用いた培地を conditioning 培地とし、網膜神経節細胞単独培養での効果、つまり神経細胞のダメージを抑えられるかを Western Blot 法、蛍光抗体法、また、RT-PCR 法により解析した。

- (2) 共培養系における中脳またはグリア細胞から分泌される網膜神経節への制御因子の同定; conditioning 培地の添加により、神経細胞のダメージが抑えられた結果が認められた場合、conditioning 培地と単独培養時の培地の中に分泌されている成分を Multi-Plex assay,あるいはプロテオミクス手法を用い、その両者を比較し、conditioning 培地には含まれているのに、単独培養時の培地の中には含まれていない成分(成長因子、neuropeptide、サイトカインなど)の同定を行う(ただし、その成分は一つではなく多数存在すると考えられる)。
- (3) 同定された因子に対して、まずは既存の因子(購入可能因子)を用い、in vitro 実験を行う。つまり、網膜神経節細胞の培養時、酸素ストレスなど神経細胞のダメージを起こしてその因子による神経細胞保護作用があるかどうかを調べる。ここでも通常の Western Blot 法、RT-PCR 法、免疫染色法などを用いる。ここで一番神経節細胞保護作用がありうる因子に絞る。
- (4) 緑内障疾患モデル動物(マウス、ラット)を用いて in vivo 実験を行う。In vitro 実験で神経節細胞保護機能が認められた因子を点眼剤として投与し、in vivo でもその神経節細胞保護の機能があるかどうかを解析する。

4. 研究成果

(1) 令和3年度

研究初年度は、申請時研究計画である網膜神経節細胞と異なる組織、細胞である中脳との共培養システムの確立に関して、その method に用いるフィルター (pore membrane, Millipore insert) での中脳培養に成功し、さらにそのフィルターでの中脳と網膜神経節細胞との共培養も成功している。その結果を学会発表、論文などで報告している。その培養条件からさらに複雑な生体内に近い環境での共培養ができると考えられ、研究当初の計画通りに進行できていると考えられる。

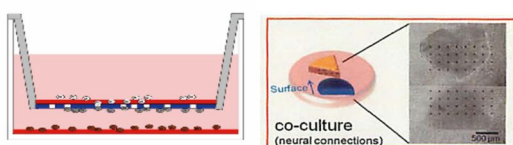
- 1) 確立された共培養実験系から中脳から分泌される中脳アストロサイト由来神経栄養因子(MANF)がそのシグナルである可能性が示唆された。
- 2) MANF の機能を確認する為に、MANF の siRNA によるノックダウンされた中脳切片との共培養を試みた。その結果、siRNA によりノックダウンされた中脳切片との共培養では網膜神経節細胞の神経軸索の伸長が顕著に抑えられることが明らかになった。しかも、MANF ノックダウンされた中脳との共培養の網膜神経節細胞では明らかに細胞死が増加していることも確認された。

(2) 令和4年度

令和3年度の研究成果を元に今度は網膜内の神経節細胞とその周囲で一番神経節細胞と密接な関係であるグリア細胞との相互作用も調べた。その方法としては Multi Array 法を行った。その結果、NGF、IGFBP-5、VEGF の三つの因子が同定された。まずは NGF に対する神経保護作用を調べた。その結果、酸化ストレス下で受けたダメージを NGF により抑えられた結果が得られた。

(3) 令和5年度

さらに、NGF 他 IGFBP-5、VEGF に関しても同様にそのメカニズムの解析を進めており、前年度に報告した MANF を含めて、これらの因子がどのように絡んで網膜神経節細胞の保護に影響を与えているのか、解析を進めている。今度は動物モデルも使い、点眼剤として使える機能ドメイン(アミノ酸、peptide)を絞っていく計画を立てている。その結果、更なる新しい治療薬の開発への基盤を提供できる様になるのではと期待している。



(pore membrane を用いた共培養システム)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ko JA., Komatsu K., Minamoto A., Kondo S., Okumichi H., Hiroka K., Kiuchi Y.	4. 巻 48
2. 論文標題 Effects of Ripasudil, a Rho-Kinase Inhibitor, on Scar Formation in a Mouse Model of Filtration Surgery	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Current Eye Research	6. 最初と最後の頁 826-835
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/02713683.2023.2217367	査読の有無 有
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 Komatsu K., Ko JA., Shimizu A., Okumichi H., Kiuchi Y.	4. 巻 50
2. 論文標題 Functional Analysis of Semaphorin 3A in Retinal Ganglion Cells under Hypoxia in Vitro.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biology Bulletin	6. 最初と最後の頁 194-202
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 Shinji K., Chikama T., Okazaki S., Sueoka K., Ko JA., Kiuchi Y., Sakaguchi T.	4. 巻 21
2. 論文標題 Synergistic effect of TONS504-mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy and additives widely contained in ophthalmic solutions benzalkonium chloride and ethylenediaminetetraacetic acid.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Photochem. Photobiol. Sci.	6. 最初と最後の頁 1895-1905
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s43630-022-00266-4.	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Ji-Ae Ko, Kaori Komatsu, Hideaki Okumichi, Yoshiaki Kiuchi	4. 巻 39
2. 論文標題 Functional analysis of mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor in retinal ganglion cells under oxidative stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Biochemistry and Function	6. 最初と最後の頁 98-106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbf.3567	査読の有無 有
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 Yunialthy Dwia Pertiwi, Taiichiro Chikama, Kentaro Sueoka, Ji-Ae Ko, Yoshiaki Kiuchi, Makoto Onodera, Takemasa Sakaguchi	4. 巻 53
2. 論文標題 Efficacy of Photodynamic Anti-Microbial Chemotherapy for Acanthamoeba Keratitis In Vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Lasers Surgical Medicine	6. 最初と最後の頁 695-702
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lsm.23355	査読の有無 有
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 Koichiro Shinji, Taiichiro Chikama, Shigetoshi Okazaki, Yoshihiro Uto, Kentaro Sueoka, Yunialthy Dwia Pertiwi, Ji-Ae Ko, Yoshiaki Kiuchi, Takemasa Sakaguchi	4. 巻 221
2. 論文標題 Molecular characteristics of the photosensitized TONS504: Comparison of its singlet oxygen quantum yields and photodynamic antimicrobial effect with those of methylene blue	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal Photochemistry and Photobiology B	6. 最初と最後の頁 112239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphotobiol.2021.112239	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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 高知愛 皆本瑛 奥道秀明 廣岡一行 木内良明
2. 発表標題 低酸素ストレスによる網膜神経節細胞におけるNGFの神経保護機能解析
3. 学会等名 日本眼科学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ko JA., Minamoto A., Okumichi K., Hiroka K., Kiuchi Y.
2. 発表標題 Functional Analysis of Glia Cells in RGC using coculture system
3. 学会等名 Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ko JA., Minamoto A., Okumichi H., Hiroka K., Kiuchi Y.
2. 発表標題 Functional analysis of glia cells in retinal ganglion cells using coculture system
3. 学会等名 American Society for Cell Biology (ASCB) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高知愛 皆本瑛 小松香織 奥道秀明 木内良明
2. 発表標題 共培養を用いた網膜グリア細胞の網膜神経節細胞に対する神経保護機能解析
3. 学会等名 日本眼科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ko JA., Minamoto A., Komatsu K., Okumichi H., Kiuchi Y.
2. 発表標題 Functional Analysis of Glia Cells in RGC using coculture system.
3. 学会等名 European Glaucoma Society (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高知愛
2. 発表標題 共培養を用いた網膜グリア細胞の網膜神経節細胞に対する神経保護機能解析
3. 学会等名 日本緑内障学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高知愛 皆本瑛 小松香織 奥道秀明 木内良明
2. 発表標題 共培養を用いた網膜グリア細胞の網膜神経節細胞に対する神経保護機能解析
3. 学会等名 日本眼科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ji-Ae Ko, Kaori Komatsu Hideaki Okumichi Yoshiaki Kiuchi
2. 発表標題 Functional Analysis of Glia Cells in Retinal Ganglion Cells using coculture system
3. 学会等名 European Glaucoma Society
4. 発表年 2021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
研究 分担者	木内 良明 (Kiuchi Yoshiaki) (40214738)	広島大学・医系科学研究科(医)・教授 (15401)	

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
---------	---------