

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23659814

研究課題名（和文）視神経軸索流のライブイメージングを用いた緑内障の神経保護治療評価の確立

研究課題名（英文）Establishment of therapeutic assessment in glaucoma neuroprotection using live-imaging of axonal transport in optic nerve.

研究代表者

谷原 秀信（TANIHARA HIDENOBU）

熊本大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：60217148

研究成果の概要（和文）：2光子レーザー顕微鏡を用いてミトコンドリアが蛍光標識された遺伝子改変マウスの網膜神経節細胞の観察を行った。上強膜静脈をレーザーで焼灼して眼圧の上昇を促し緑内障のモデルとしたところ、網膜神経節細胞が細胞死を起こす前の段階で、網膜神経節細胞軸索内のミトコンドリアの軸索輸送が障害されていることを非侵襲的にリアルタイムに観察できた。網膜神経節細胞における軸索輸送異常は緑内障病態に関わっていると推測された。

研究成果の概要（英文）：*In vivo* imaging of the mice in which fluorescent proteins are expressed specifically in neuronal mitochondria was conducted using two-photon microscopy. As a glaucoma model, ocular hypertension was induced by laser treatment of episcleral veins in mice. *In vivo* imaging of retinal ganglion cells reveals the disturbance of mitochondrial axonal transport in the mouse glaucoma model before RGC death, suggesting that the abnormal axonal transport is involved in glaucoma pathology.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：緑内障

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼細胞生物学

キーワード：緑内障、網膜神経節細胞、軸索輸送

1. 研究開始当初の背景

緑内障視神経症の進行には、篩状板近傍での視神経の軸索障害が強く関わっていることが指摘されてきたが、生物の眼の中でその軸索障害を直接観察した報告はない。最近、我々の研究グループでは、マウス眼で非侵襲的に網膜神経節細胞の軸索流をライブイメージで観察出来ることを確認した。さらに、自然発症の緑内障マウス系統の DBA/2J マウスで、網膜神経節細胞の細胞死の前に、軸索流が停滞していることをライブイメージで確認した。この研究結果から、軸索流のライブイメージが視野計に代わるより鋭敏な緑内障視神経症の機能評価システムとなり得

ると考えられた。ただし、従来から広く用いられている疑似緑内障モデルは、緑内障視神経症を実際に反映したモデルであるのかという疑問があった。

2. 研究の目的

過去に報告されている疑似緑内障モデルで、現在我々が確認した DBA/2J マウスでの網膜神経節細胞の軸索流停滞と同じ現象が再現できるのかを検証するために、新たな緑内障モデルマウスを作成し、このモデルマウスにおける神経保護治療効果を軸索流のライブイメージで捕捉できるかを観察し、緑内障の神経保護治療による効果判定に有効なシス

テムかを明らかにすること。

3. 研究の方法

ミトコンドリアがCFP 蛍光標識された4ヶ月齢のトランスジェニックマウスの上強膜静脈をアルゴンレーザーで焼灼して房水流出抵抗を上昇させることで、眼圧の上昇を促し、開放隅角緑内障のモデルとした。術後一定期間飼育し、マウス用眼圧計 (Tonolab) によって眼圧が有意な高値である 30mmHg 程度で維持されていることを確認した後、このモデルマウスの眼球を摘出、固定して網膜切片を作成し、網膜神経節細胞が細胞死を起こす時期を特定した。このマウスに対して2光子顕微鏡を用いて、網膜神経節細胞のミトコンドリア軸索輸送を in vivo でタイムラプス法で動画撮影を行った。得られた動画をキモグラフで解析することにより、ミトコンドリア軸索輸送の速度を定量し、正常なマウスと緑内障モデルマウスとで比較した。

4. 研究成果

緑内障モデルで、レーザー後3日目に網膜神経節細胞密度の有意な減少はなかったが、同密度はレーザー後14日目では有意に減少していた ($P < 0.0001$)。このモデルマウスを用いて網膜神経節細胞が細胞死を起こす前の段階で2光子顕微鏡を用いて、網膜神経節細胞のミトコンドリア軸索輸送を in vivo で観察した。対照群のミトコンドリア輸送数は、軸索1mmあたり、 102 ± 6 個であったが、レーザー後3日目では 65 ± 7 個へ減少した ($P = 0.0001$)。ミトコンドリア長は、 $2.23 \pm 0.08 \mu\text{m}$ から $1.81 \pm 0.06 \mu\text{m}$ へ短縮した ($P < 0.0001$)。また、12ヶ月齢の老マウスのミトコンドリア長も4ヶ月齢マウスに比して、 $1.57 \pm 0.04 \mu\text{m}$ へ短縮した ($P < 0.0001$) が、輸送数は 125 ± 8 個/mm と増加した ($P = 0.048$)。以上のことより、緑内障モデルマウスにおいて、網膜神経節細胞の細胞死前にミトコンドリア軸索輸送が低下することをライブイメージで観察できた。加齢によってもミトコンドリア長は短縮するが、輸送数は減少しない点が緑内障性視神経症と異なっていることが分かった。これらの結果から、網膜神経節細胞の軸索輸送の異常が複数の緑内障モデルで確認できたこととなり、この軸索輸送異常は高い眼圧によって普遍的に誘導される現象であることが示唆された。したがって、網膜神経節細胞における軸索輸送異常は緑内障病態と本質的に関わっていると推測された。

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 17 件)

- ① Ogata-Iwao M, Inatani M, Takihara Y, Inoue T, Iwao K, Tanihara H. A prospective comparison between trabeculectomy with mitomycin C and phacotrabeculectomy with mitomycin C. *Acta Ophthalmologica*. In press. doi: 10.1111/aos.12133 査読有り
- ② Iwao K, Inatani M, Seto T, Takihara Y, Ogata-Iwao M, Okinami S, Tanihara H. Long-term Outcomes and Prognostic Factors for Trabeculectomy With Mitomycin C in Eyes With Uveitic Glaucoma: A Retrospective Cohort Study. *J Glaucoma*. In press. doi: 10.1097/IJG.0b013e3182685167 査読有り
- ③ Kojima S, Inoue T, Kawaji T, Tanihara H. Filtration Bleb Revision Guided by Three-Dimensional Anterior Segment Optical Coherence Tomography. *Journal of Glaucoma*. In press. doi: 10.1097/IJG.0b013e3182741ee6 査読有り
- ④ Kojima S, Inatani M, Shobayashi K, Haga, A, Inoue T, Tanihara H. Risk factors for hyphema after trabeculectomy with mitomycin C. *Journal of Glaucoma*. In press. doi: 10.1097/IJG.0b013e3182741c85 査読有り
- ⑤ Goto A, Inatani M, Inoue T, Awai-Kasaoka N, Takihara Y, Ito Y, Fukushima M, Tanihara H. Frequency and risk factors for neovascular glaucoma after vitrectomy in eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Journal of Glaucoma*, in press. doi:10.1097/IJG.0b013e31824d514a 査読有り
- ⑥ Kameda T, Inoue T, Inatani M, Tanihara H; Japanese Phaco-Goniosynechialysis Multicenter Study Group. Long-term efficacy of goniosynechialysis combined with phacoemulsification for primary angle closure. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 251:825-830, 2013. doi: 10.1007/s00417-012-2091-8 査読有り
- ⑦ Awai-Kasaoka N, Inoue T, Takihara Y,

- Kawaguchi A, Inatani M, Ogata-Iwao M, Tanihara H. Impact of phacoemulsification on failure of trabeculectomy with mitomycin C. *Journal of Cataract and Refractive Surgery* 38:419-424, 2012. doi: 10.1016/j.jcrs.2011.09.035 査読有り
- ⑧ Hayashi H, Eguchi Y, Fukuchi-Nakaishi Y, Takeya M, Nakagata N, Tanaka K, Vance JE, Tanihara H. A potential neuroprotective role of apolipoprotein E-containing lipoproteins through low density lipoprotein receptor-related protein 1 in normal tension glaucoma. *J Biol Chem.* 2012 Jul 20;287(30):25395-406. doi: 10.1074/jbc.M112.370130 査読有り
- ⑨ Kameda T, Inoue T, Inatani M, Fujimoto T, Honjo M, Kasaoka N, Inoue-Mochita M, Yoshimura N, Tanihara H. The effect of Rho-associated protein kinase inhibitor on monkey Schlemm's canal endothelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53:3092-3103, 2012. doi: 10.1167/iovs.11-8018 査読有り
- ⑩ Inoue T, Kawaji T, Inatani M, Kameda T, Yoshimura N, Tanihara H. Simultaneous increases in multiple proinflammatory cytokines in the aqueous humor of pseudophakic glaucomatous eyes. *Journal of Cataract and Refractive Surgery* 38:1389-1397, 2012. doi: 10.1016/j.jcrs.2012.04.028 査読有り
- ⑪ Inoue T, Inatani M, Takihara Y, Awai-Kasaoka N, Ogata-Iwao M, Tanihara H. Prognostic risk factors for failure of trabeculectomy with mitomycin C after vitrectomy. *Japanese Journal of Ophthalmology* 56:1389-1397, 2012. doi: 10.1007/s10384-012-0171-2 査読有り
- ⑫ Tsuboi N, Inoue T, Kawai M, Inoue-Mochita M, Fujimoto T, Awai-Kasaoka N, Yoshida A, Tanihara H. The Effect of Monocyte Chemoattractant Protein-1/CC Chemokine Ligand 2 on Aqueous Humor Outflow Facility. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53:6702-6707, 2012. doi:10.1167/iovs.12-10376 査読有り
- ⑬ Fujimoto T, Inoue T, Kameda T, Awai-Kasaoka N, Inoue-Mochita M, Tsuboi N, Tanihara H. Involvement of RhoA/Rho-Associated Kinase Signal Transduction Pathway in Dexamethasone-induced Alterations in Aqueous Outflow. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53:7097-7108, 2012. doi: 10.1167/iovs.12-9989 査読有り
- ⑭ Kawai M, Inoue T, Inatani M, Tsuboi N, Matsukawa A, Yoshida A, Tanihara H. Elevated Levels of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in the Aqueous Humor after Phacoemulsification. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53:7951-7960, 2012. doi: 10.1167/iovs.12-10231 査読有り
- ⑮ Inoue T, Matsumura R, Kuroda U, Nakashima KI, Kawaji T, Tanihara H. Precise Identification of Filtration Openings on the Scleral Flap by Three-Dimensional Anterior Segment Optical Coherence Tomography. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53:8288-8294, 2012. doi: 10.1167/iovs.12-10941 査読有り
- ⑯ Takihara Y, Inatani M, Seto T, Iwao K, Iwao M, Inoue T, Kasaoka N, Murakami A, Futa R, Tanihara H. Trabeculectomy with mitomycin C for open-angle glaucoma in phakic eyes vs pseudophakic eyes after phacoemulsification. *Archives of Ophthalmology* 129:152-157, 2011. doi:10.1001/archophthalmol.2010.348. 査読有り
- ⑰ Takihara Y, Inatani M, Hayashi H, Adachi N, Iwao K, Inoue T, Iwao M, Tanihara H. Dynamic imaging of axonal transport in living retinal ganglion cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52:3039-3045, 2011. doi: 10.1167/iovs.10-6435 査読有り

[学会発表] (計 32 件)

- ① 第 66 回日本臨床眼科学会(平成 24 年 10 月 25~28 日, 京都国際会議場). 谷原

- 秀信:特別講演, 緑内障治療の新しい展開を目指して.
- ② European Glaucoma Society 2012 (June 17-22, 2012, Copenhagen, Denmark). Inoue T, Kawaji T, Matsumura R, Kuroda U, Nakashima K, Tanihara H. Pinpoint Identification of filtration opening on the scleral flap margins created by trabeculectomy.
 - ③ European Glaucoma Society 2012 (June 17-22, 2012, Copenhagen, Denmark). Fujimoto T, Inoue T, Inoue-Mochita M, Kameda T, Kasaoka N, Tanihara H. Involvement of RhoA/Rho-associated kinase signal transduction pathway in the dexamethasone-induced alterations in aqueous outflow.
 - ④ European Glaucoma Society 2012 (June 17-22, 2012, Copenhagen, Denmark). Tsuboi N, Inoue T, Fujimoto T, Inoue-Mochita M, Kasaoka N, Kawai M, Shobayashi K, Yoshida A, Tanihara H. The Effect of Monocyte Chemoattractant Protein-1/CC Chemokine Ligand 2 on The Aqueous Humor Outflow Facility
 - ⑤ European Glaucoma Society 2012 (June 17-22, 2012, Copenhagen, Denmark). Kojima S, Inoue T, Kawaji T, Tanihara H. Filtration bleb-associated tear film sign demonstrated by three dimensional anterior segment optical coherent tomography.
 - ⑥ The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (May 6-10, 2012, Fort Lauderdale, Florida, USA). Kawai M, Inoue T, Inatani M, Tsuboi N, Yoshida A, Tanihara H. Multiplex Immunoassay of Aqueous Humor in Cataract Patients: Impact of Phacoemulsification.
 - ⑦ The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (May 6-10, 2012, Fort Lauderdale, Florida, USA). Tanihara H, Inoue T, Kawaji T, Matsumura R, Kuroda U, Nakashima K. Pinpoint Identification of Filtration Opening on the Scleral Flap Margins Created by Trabeculectomy.
 - ⑧ The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (May 6-10, 2012, Fort Lauderdale, Florida, USA). Takahashi E, Tanihara H. Hyaluronic Acid as a Contributing Factor to Epithelial-Mesenchymal Transition in Retinal Pigment Epithelial Cells and Angiogenesis.
 - ⑨ The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (May 6-10, 2012, Fort Lauderdale, Florida, USA). Kawaji T, Hara R, Eiki D, Tanihara H. Diagnostic Usefulness of Indocyanine Green Fundus Angiography for Transthyretin-related Familial Amyloidotic Polyneuropathy.
 - ⑩ The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (May 6-10, 2012, Fort Lauderdale, Florida, USA). Fujimoto T, Inoue T, Inoue-Mochita M, Kameda T, Kasaoka N, Tanihara H. The Effects of Rho/ROCK Activation in Dexamethasone-Induced Increase of Aqueous-Outflow Resistance.
 - ⑪ The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (May 6-10, 2012, Fort Lauderdale, Florida, USA). Tsuboi N, Inoue T, Fujimoto T, Inoue-Mochita M, Kasaoka N, Kawai M, Shobayashi K, Yoshida A, Tanihara H. The Effect of Monocyte Chemoattractant Protein-1/CC Chemokine Ligand 2 on The Aqueous Humor Outflow Facility
 - ⑫ The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (May 6-10, 2012, Fort Lauderdale, Florida, USA). Ito Y, Oike Y, Tanihara H. Angptl2 Knockout Mice Suppress Inflammation In Retinal Vessels Induced By A High-fat Diet.
 - ⑬ The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (May 6-10, 2012, Fort Lauderdale, Florida, USA). Takihara Y, Inatani M, Iwao M, Kawai M, Inoue T, Iwao K, Tanihara H. A Prospective Study of Phakic vs Pseudophakic Eyes After Phacoemulsification in Trabeculectomy for Open-Angle Glaucoma.
 - ⑭ The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (May 6-10, 2012, Fort Lauderdale, Florida, USA). Kojima S, Inoue T, Kawaji T, Kuroda U, Nakashima K, Matsumura R, Tanihara H. Filtration Bleb-associated Tear Film Sign Demonstrated by Three Dimensional Anterior Segment Optical

- Coherence Tomography (3D AS-OCT).
- ⑮ 第116回日本眼科学会総会(平成24年4月5日～8日, 東京国際フォーラム). 瀧原祐史, 稲谷大, 岩尾美奈子, 川井基史, 井上俊洋, 岩尾圭一郎, 谷原秀信: 開放隅角緑内障の線維柱帯切除術: 有水晶体眼と超音波乳化吸引術既往眼との前向き比較.
- ⑯ 第65回日本臨床眼科学会(平成23年10月7～10日, 東京国際フォーラム). 笠岡奈々子, 井上俊洋, 稲谷大, 瀧原祐史, 岩尾美奈子, 正林耕平, 川井基史, 坪井尚子, 谷原秀信: 筈達緑内障に対する緑内障手術の治療成績.
- ⑰ 第22回日本緑内障学会(平成23年9月23～25日, 秋田アトリオン). 井上俊洋, 稲谷大, 亀田隆範, 吉村長久, 谷原秀信: 開放隅角緑内障における房水内 MCP-1 濃度が線維柱帯切除術の手術成績に与える影響.
- ⑱ 第22回日本緑内障学会(平成23年9月23～25日, 秋田アトリオン). 稲谷大, 岩尾美奈子, 瀧原祐史, 井上俊洋, 岩尾圭一郎, 谷原秀信: 開放隅角緑内障に対するトラベキュlectomy単独手術と超音波水晶体乳化吸引術同時手術との前向き比較研究.
- ⑲ World Glaucoma Congress 2011 (June 29 - July 2, 2011, Paris, France). Inoue T, Inatani M, Kameda T, Yoshimura N, Tanihara H. The Effect of Aqueous Monocyte Chemotactic Protein-1 Concentration on the Short-term Failure of Trabeculectomy with Mitomycin C in Eyes with Open-angle Glaucoma.
- ⑳ World Glaucoma Congress 2011 (June 29 - July 2, 2011, Paris, France). Fujimoto T, Inoue T, Inoue-Mochita M, Kameda T, Kasaoka N, Tanihara H. The Effects of Rho/ROCK Activation in Dexamethasone Induced Increase of Aqueous Outflow Resistance.

[その他]

ホームページ等

熊本大学大学院生命科学研究部眼科学分野
研究業績

[http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/ganka/
kyousitu/gyouseki.html](http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/ganka/kyousitu/gyouseki.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷原 秀信 (TANIHARA HIDENOBU)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授