

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390395

研究課題名(和文) ミトコンドリア視神経軸索流をバイオマーカーにした新しい緑内障診断法の創出

研究課題名(英文) New diagnostic strategy for glaucoma optic neuropathy using the visualization for mitochondrial transport in the optic nerve

研究代表者

稲谷 大 (Inatani, Masaru)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：40335245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：緑内障視神経症の進行を予測に、視神経軸索流の観察が有効かを検証するマウス実験をおこなった。神経節細胞の軸索内をミトコンドリアは順行性と逆行性に移動していた。緑内障では神経節細胞が細胞死を起こす前に、ミトコンドリアの輸送が停滞し、ミトコンドリアのない軸索領域が拡大し、ミトコンドリアのサイズも縮小した。加齢でミトコンドリアの輸送は停滞せずに、ミトコンドリアのない軸索領域が拡大しミトコンドリアのサイズも縮小したが、さらに緑内障にすると、若年よりも著しく軸索輸送が低下した。本研究で、世界で初めて生理的条件下で神経軸索輸送が動画観察し、緑内障では軸索輸送が緑内障視神経症の前に低下することを証明した。

研究成果の概要(英文)：We examined whether live imaging for optic nerve axonal flow was useful for predicting the progression of glaucoma optic neuropathy. Our experiments using transgenic mice revealed the movement of mitochondria in the axons of retinal ganglion cells anterogradely and retrogradely. In glaucoma axons, the number of mitochondrial transport was decreased; mitochondria-free axonal regions were increased; mitochondrial sizes were shortened. In aged axons, the number of mitochondrial transport was unchanged; mitochondria-free axonal regions were increased; mitochondrial sizes were shortened. The aged glaucoma axons showed more decreased number of mitochondrial transport than the young glaucoma axons did. These results are the first data about live imaging of axonal transport in a physiologic condition, demonstrating the deterioration of axonal transport before glaucoma optic neuropathy.

研究分野：緑内障

キーワード：軸索流 ミトコンドリア 緑内障 二光子レーザー顕微鏡 網膜 視神経

## 1. 研究開始当初の背景

緑内障の進行には、眼圧が正常でも進行する正常眼圧緑内障から、高眼圧でも緑内障を発症しない高眼圧症に至るまで、進行に対する眼圧依存性にはかなりの個人差がある。したがって、視神経の機能を評価して、今後の進行を予測する診断法の確立が必要である。緑内障視神経症を評価する方法として、現在、視野検査とOCTを代表とする画像診断装置がある。まず、視野検査の問題として、結果が患者の体調や集中力などに大きく影響を受け、視野欠損の進行を確実に判定できず、視野欠損が相当変化してからでないと、治療の変更を判断できないという問題点がある。一方、OCTでの解析は、客観的に視神経症を評価することができ、すでに視野検査で欠損がある緑内障患者では、視野検査のほうがむしろ鋭敏であると言われている。なぜならば、画像診断装置では網膜神経節細胞が細胞死をおこし分解され体積が減り視神経乳頭の形状が変形してから、「事後報告で進行した」と判定しているために、緑内障による視神経の機能低下を観察していないからである。そこで、現在進行形の軸索障害を把握するには、視神経がダメージを受けつつあることを不可逆な網膜神経節細胞の細胞死が生じる前に判定する必要がある。

## 2. 研究の目的

眼という透明度の高い臓器を利用して、網膜神経節細胞の軸索流を動画撮影し、緑内障視神経症よりも前に軸索流の停滞が確認できるかを目的に研究をおこなった。神経の軸索流を世界で初めて無侵襲で観察する画期的な研究であると同時に、緑内障視神経症の病態の本質である軸索流の停滞を世界で初めてライブイメージで証明する臨床的観点からも極めて重要な研究目的である。

## 3. 研究の方法

網膜神経節細胞に極めて豊富に存在し、最も大きな細胞小器官であるミトコンドリアの軸索流をライブイメージで観察する実験をおこなった。2光子レーザー顕微鏡を用いて、ミトコンドリアを蛍光標識したマウスの視神経軸索流を無侵襲で観察する研究をおこなった。高眼圧モデルマウスにおける軸索流の変化およびミトコンドリアのサイズ変化を正常眼圧マウスと比較し、網膜神経節細胞の細胞死が予測できるかを検証した。加齢によって緑内障の有病率や進行速度が上がる臨床データと関連して、加齢によって軸索流がどのように変化するのかを観察した。

## 4. 研究成果

2光子レーザー顕微鏡で、CFP標識されたミトコンドリアトランスジェニックマウスの網膜を観察したところ、網膜神経節細胞の軸索では、順行性、逆行性に、軸索内をミトコンドリアが輸送されており、2光子レーザー顕微鏡のレーザー強度を上昇させても、軸索輸送に変化は認められず、さらに、グリア細胞の活性化もみられず、網膜に対する光障害は否定的で、生理的な条件下で観察出来ていることが確認できた。

4ヶ月齢の高眼圧マウスモデルを作成したところ、眼圧は、一過性に30 mmHg以上の高眼圧を呈した。眼圧上昇後7日目に網膜神経節細胞の有意な減少をみとめた。3日目では網膜神経節細胞の減少はみとめない時期であるにも関わらず、軸索内を移動するミトコンドリアの数は、順行性逆行性いずれも著しく減少していた。しかし順行性逆行性の移動比率は、眼圧が正常のマウスと一致しており、移動比率は眼圧上昇には依存していないことが示された。眼圧上昇マウスでは、軸索内でミトコンドリアが分布しない領域が有意に拡大しており、ミトコンドリアの大きさも縮小していた。加齢性変化を様々な年齢のマウスで観察したところ、加齢とともに軸索

内でミトコンドリアが分布しない領域が拡大し、ミトコンドリアの大きさも縮小した。しかし、眼圧上昇モデルと大きく異なる点は、軸索内を移動するミトコンドリアの数は年齢を通して一定であった点である。眼圧上昇モデルと加齢変化とを含めて、順行性逆行性のミトコンドリアの移動比率は一定であった。このようにミトコンドリアの形態、分布の変化には、加齢変化と眼圧上昇では共通点が見られる反面、動態に関しては、大きく異なった。したがって、緑内障の有病率が加齢と共に増加したり、加齢と共に進行速度が速いことは、高齢のミトコンドリアの形態、分布が緑内障と似ていることが関連している可能性がある。高齢マウスに眼圧上昇をおこなうと、軸索内を移動するミトコンドリアの数が若年マウスより有意に減り、加齢による緑内障発症を示唆するデータが得られた。以上の結果から、本研究において、解剖を加えることなく、神経の軸索流を世界で初めて動画撮影することに成功し、緑内障の網膜神経節細胞の細胞死よりも前に軸索流の低下が生じることを動画撮影で初めて確認することができた。本研究成果は、緑内障の診断技術革新に役立つだけでなく、神経変性疾患や加齢による神経変性の病態解明にも役立つとされる成果である。

## 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 14件) 全て査読有り

Kawai M, Inoue T, Inatani M, Tsuboi N, Shobayashi K, Matukawa A, Yoshida A, Tanihara H. Elevated Levels of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in the Aqueous Humor after Phacoemulsification. Investigative Ophthalmology & Visual Science 2012;53(13):7951-7960. doi:10.1167/iov

s.12-10231.

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 2013;251(3):825-830. doi:10.1007/s00417-012-2091-8.

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 2013;91(6)e500-501. doi:10.1111/aos.12133.

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 2013;22(7):572-576.

doi:10.1097/IJG.0b013e31824d514a.

Awai-Kasaoka N, Inoue T, Inatani M, Takihara Y, Ogata-Iwao M, Tanihara H. Study on prognostic factor in trabeculectomy with mitomycin C having history of previous glaucoma surgery. Japanese Journal of Ophthalmology 2013 57(6):514-519 doi:10.1007/s10384-013-0257-5.

Takihara Y, Inatani M, Ogata-Iwao M, Kawai M, Inoue T, Iwao K, Tanihara H. Prospective clinical study of trabeculectomy for open-angle glaucoma

in phakic vs pseudophakic eyes after phacoemulsification. JAMA Ophthalmology 2014;132(1):69-76. doi:10.1001/jamaophthalmol.2013.5605.

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. Journal of Glaucoma 2014;23(2):88-94. doi:10.1097/IJG.0b013e3182685167.

Kojima S, Inatani M, Shobayashi K, Haga, A, Inoue T, Tanihara H. Risk factors for hyphema after trabeculectomy with mitomycin C. Journal of Glaucoma 2014;23(5):307-311. doi:10.1097/IJG.0b013e3182741c85.

Arimura S, Takamura Y, Takihara Y, Matsumura T, Tomomatsu T, Inatani M. Determinants of anterior chamber angle narrowing after mydriasis in the patients with cataract. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology 2015 253(2):307-312. doi:10.1007/s00417-014-2817-x.

Tanihara H, Inoue T, Yamamoto T, Kuwayama Y, Abe H, Suganami H, Araie M, K-115 Clinical Study Group. Intra-ocular pressure-lowering effects of a Rho kinase inhibitor, ripasudil (K-115), over 24 hours in primary open-angle glaucoma and ocular hypertension: a randomized, open-label, crossover study. Acta Ophthalmologica 2015 Jun;93(4):e254-260 doi:10.1111/aos.12599.

Yokota S, Takihara Y, Inatani M.

Limbus- versus fornix-based trabeculectomy for open-angle glaucoma eyes with prior ocular surgery: the Collaborative Bleb-Related Infection Incidence and Treatment Study. Scientific Reports 2015;5:9290. doi:10.1038/srep09290.

Takamura Y, Tomomatsu T, Matsumura T, Takihara Y, Kozai S, Arimura S, Yokota S, Inatani M. Vitreous and aqueous concentrations of brimonidine following topical application of brimonidine tartrate 0.1% ophthalmic solution in humans. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics 2015;31(5):282-285. doi:10.1089/jop.2015.0003.

Takihara Y, Inatani M, Eto K, Inoue T, Kreymerman A, Miyake S, Ueno S, Nagata M, Nakanishi A, Iwao K, Takamura Y, Sakamoto H, Satoh K, Kondo M, Sakamoto T, Goldberg JL, Nabekura J, Tanihara H. In vivo imaging of axonal transport of mitochondria in the diseased and aged mammalian CNS. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 2015;112(33):10515-10520. doi:10.1073/pnas.1509879112.

Yokota S, Takihara Y, Arimura S, Miyake S, Takamura Y, Yoshimura N, Inatani M. Altered transport velocity of axonal mitochondria in retinal ganglion cells after laser-induced axonal injury in vitro. Investigative Ophthalmology & Visual Science 2015;56(13):8019-8025. doi:10.1167/iovs.15-17876.

〔学会発表〕(計 6件)

Inatani M Visualization of glaucoma

optic neuropathy. The 1<sup>st</sup> Asia-Pacific Glaucoma Congress, Bali, Indonesia, 2012 December 7-9.

Inatani M Dynamic imaging of axonal transport in retinal ganglion cells. The 28<sup>th</sup> APAO Congress, Hyderabad, India, 2013 January 17-20.

Takahara Y, Inatani M, Eto K, Inoue T, Iwao K, Takamura Y, Nabekura J, Tanihara H. In vivo imaging of mitochondrial axonal transport in the diseased and aged mammalian CNS. The Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Seattle, Washington, USA, 2013 May 5-9.

Inatani M Molecular mechanism of axonal damage in glaucoma. Asia-ARVO 2015, Yokohama, Kanagawa, Japan, 2015 February 16-19.

Inatani M Visualization for axonal damage in glaucoma. SNEC 25<sup>th</sup> anniversary international meeting, Singapore, 2015 May 22-24.

Inatani M In vivo imaging of mitochondrial axonal transport in the diseased and aged mammalian CNS. The 31<sup>th</sup> APAO Congress, Taipei, Taiwan, 2016 March 24-27.

〔図書〕(計 1件)

Takahara Y, Inatani M Axonal transport. Neuroprotection and Neuroregeneration for Retinal Disease. 2014:133-142, Springer Japan, Tokyo, Japan.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.u-fukui.ac.jp/GANKA/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

稲谷 大 (INATANI, Masaru)

福井大学・医学部・教授

研究者番号 : 40335245

(2)研究分担者

高村 佳弘 (TAKAMURA, Yoshihiro)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号 : 00283193

友松 威 (TOMOMATSU, Takeshi)

福井大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 10401994

谷原 秀信 (TANIHARA, Hidenobu)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授

研究者番号 : 60217148