

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861624

研究課題名(和文) 新規ライブイメージングを駆使した、緑内障進行を予測する軸索輸送パラメータの同定

研究課題名(英文) In vivo and in vitro imaging of axonal transport for the prediction of glaucoma progression

研究代表者

灌原 祐史 (TAKIHARA, Yuji)

福井大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50640140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：加齢性疾患である緑内障に対して、本研究目的は生きたマウス(生体)と培養細胞のイメージングを用いて、軸索輸送と緑内障、加齢の関係を明らかにすることである。

興味深いことに、我々は二光子励起顕微鏡を用いて、世界に先駆けて哺乳類中枢神経系のミトコンドリア軸索輸送の生体イメージングを成功した。緑内障モデルマウスでは網膜神経節細胞における細胞死前の軸索輸送減少を検出した。対照的に、加齢マウスでは、軸索輸送距離の短縮が検出された。培養細胞のイメージングにおいても、軸索傷害後の軸索輸送障害を示した。本研究により、軸索輸送の生体イメージングが緑内障患者の視野障害の発生、進行を予測できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Similar to other neurodegenerative diseases, the incidence of glaucoma increases with aging. We used in vivo (living mice) and in vitro imaging of the retinal ganglion cells (RGCs) to reveal the disturbances of axonal transport in glaucoma models and age-related changes of axonal transport.

Importantly, we have, for the first time, succeeded in imaging of axonal transport of mitochondria in the mammalian central nervous system in vivo. This in vivo imaging of mouse RGCs with a two-photon microscope showed that the number of transported mitochondria decreased before RGC death. In contrast, with increasing age up to 23-25 months, axonal transport of mitochondria (distance, duration, and duty cycle) shortened. Also, in vitro imaging showed the disturbances of axonal transport after laser-induced axonal injury. In vivo imaging of axonal transport in RGCs may lead to the prediction of RGC death in glaucoma patients.

研究分野：緑内障

キーワード：緑内障 生体イメージング 加齢 哺乳類中枢神経系 軸索輸送

1. 研究開始当初の背景

(1) 加齢性疾患である緑内障の、現在の診療の問題点は緑内障性視神経症の進行の個人差が大きく、視野進行の予測が困難であることである。緑内障性視神経症の病態は、眼圧ストレスによる篩状板での網膜神経節細胞の軸索の絞扼が軸索輸送障害を生じ網膜神経節細胞の細胞死を引き起こすことである。

(2) そこで我々は生きた網膜神経節細胞の軸索輸送をライブイメージングすることにより、各患者の網膜神経節細胞の軸索障害を細胞死前に検出できる可能性に着目した。特に我々は、緑内障性視神経症の病態への関与が示唆されるミトコンドリアの軸索輸送に注目した。これまで多くの研究でミトコンドリア軸索輸送は神経細胞の生存に不可欠であることが示されてきた。しかし、それらの研究の多くは培養神経細胞か生体のショウジョウバエ神経細胞を用いた研究であった。哺乳類ではマウスの末梢神経の生体イメージングが報告されていた。つまり、これまで哺乳類中枢神経系におけるミトコンドリア軸索輸送の生体イメージングに成功した例はなかった。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、まず網膜神経節細胞をターゲットとして、哺乳類中枢神経系におけるミトコンドリア軸索輸送の生体イメージングの確立を目指した (Takahara Y et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015)。

(2) 確立した網膜神経節細胞のミトコンドリア軸索輸送の生体イメージングを用いて、緑内障モデルにおいて、どのような軸索輸送障害が生じるかを検討した (Takahara Y et al. *PNAS*. 2015)。

(3) 確立した網膜神経節細胞のミトコンドリア軸索輸送の生体イメージングを用いて、加齢により、軸索輸送に変化が生じるかを評価した (Takahara Y et al. *PNAS*. 2015)。

(4) 新規に培養網膜神経節細胞のレーザー誘発軸索傷害モデルを作成し、軸索傷害後のミトコンドリア軸索輸送を検討した (Yokota S, Takahara Y et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015)。

3. 研究の方法

(1) 神経細胞のミトコンドリアにおいて特異的にシアン色蛍光タンパク質を発現するミトマウスの中から、網膜神経節細胞における発現レベルが最適なラインを検討した。こ

のミトマウスに二光子励起顕微鏡を用いて、全身麻酔下、経強膜的に網膜神経節細胞のミトコンドリア軸索輸送をタイムラプス法で撮影した。撮影された画像をメタモルフにより解析した。

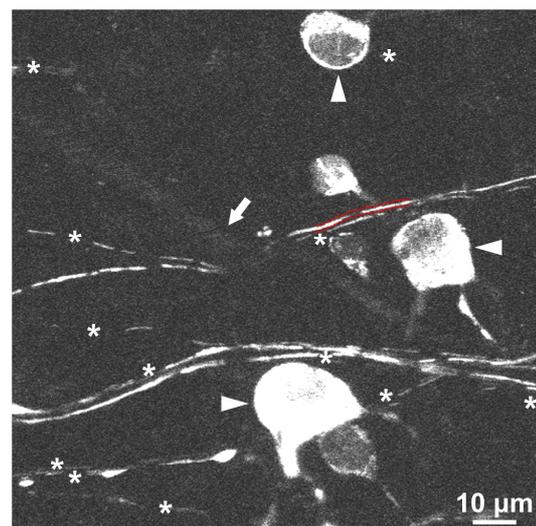
(2) 緑内障モデルとして、マウスの上強膜静脈をレーザー照射し、トノラボにより眼圧を測定した。眼圧上昇後の軸索変性をパラフェニレンジアミン染色を用いて評価した。網膜神経節細胞の細胞死の評価として、抗 Brn-3 抗体によるフラットマウントの免疫染色を行った。

(3) 加齢マウスとして、中年を 12-13 ヶ月齢、高齢を 23-25 ヶ月齢と定義した。ミトマウスを飼育、維持し、生体イメージングを行った。得られた結果を成体マウス(4ヶ月齢)の結果と比較した。

(4) ラット網膜からイムノパンニング法により単離培養した網膜神経節細胞に対して、レーザーにより物理的に軸索を切断した後、37度、5%二酸化炭素下にてタイムラプス法で軸索を撮影した。

4. 研究成果

(1) 全身麻酔下、二光子励起顕微鏡により、生体内で共通の方向へ伸長する個々の網膜神経節細胞の軸索を網膜各層とともにイメージングできた。次に網膜神経節細胞の軸索をタイムラプス撮影した結果、血流が保たれていた生理的条件下で、網膜神経節細胞の軸索内ミトコンドリアの高頻度な順行性、逆行性輸送を検出した (図1)。



矢印: 血流、矢頭: 網膜神経節細胞、アスタリスク: 軸索

図1 網膜におけるミトコンドリア軸索輸送の生体イメージング

(2) 緑内障モデルとして、レーザー後 2 日間、眼圧が 30mmHg 台後半まで上昇、術 1 から 2 週間後ではほぼ正常眼圧に戻るレーザー誘発高眼圧症モデルを作成した。高眼圧による軸索障害を評価した結果、対照群と比べて、レーザー後 3 日目では軸索本数の有意な減少はなかったが、レーザー 14 日後では有意に減少していた。高眼圧による細胞死を評価した結果、対照群と比べて、レーザー後 3 日目では Brn-3 陽性細胞の有意な減少はなかったが、レーザー 14 日後では有意に減少していた。この緑内障モデルを生体イメージングしたところ、生理的条件下、活動的にミトコンドリアが輸送されている軸索がある一方、軸索輸送が低下している軸索を認めた。軸索輸送されるミトコンドリア数を解析した結果、軸索 100 μm あたりに輸送されるミトコンドリア数が、対照群と比べて、レーザー後 3 日目では減少していた。しかし、緑内障モデルマウスにおいて、輸送時間、輸送距離は減少していなかった。

(3) 加齢モデルの中年、高齢マウスにおいては、対照的に、ミトコンドリア輸送数は減少していなかったが、ミトコンドリアが軸索内を輸送される時間、距離、デューティーサイクルは月齢依存性に減少していた。加えて、月齢依存性に、軸索内にミトコンドリアが存在しない部分の割合の増加、軸索内を輸送されるミトコンドリアの長さの減少を認めた。さらに緑内障モデルを、成体マウス、高齢マウスのそれぞれで作成し、ミトコンドリア軸索輸送の動態を比較したところ、成体マウスに比べて、高齢マウスでは有意にミトコンドリア輸送数が減少していた。

(4) レーザーマイクロダイセクションの系を用いた、培養網膜神経節細胞のレーザー誘発軸索傷害モデルを作成し、培養細胞のイメージングを行ったところ、緑内障モデルの生体イメージングの結果と一致して、軸索傷害後のミトコンドリア輸送は減少していた。軸索傷害し軸索輸送速度が減少後、速度が改善しなかった細胞では、細胞死が有意に多く生じていた。

(5) 本生体イメージングにより、生理的条件下、哺乳類中枢神経系での、非常に活動的なミトコンドリアの軸索輸送が示された。緑内障モデルマウスの眼圧上昇早期、網膜神経節細胞の細胞死前に、ミトコンドリアの軸索輸送数が減少していた。一方、23-25 ヶ月齢までの加齢では、ミトコンドリアの軸索輸送数は減少していなかったが、輸送時間、輸送距離は減少していた。高齢マウスの網膜神経

節細胞は、成体マウスのそれと比べて、眼圧上昇に対してより脆弱であった。本研究結果より、緑内障モデルの眼圧上昇早期と加齢マウスにおいては、それぞれミトコンドリアに異なる現象が生じている可能性が示唆された。過去に、加齢マウスの脳内ミトコンドリアにおいて、電子伝達系に関わる酵素の活性低下が報告されている。本研究の加齢マウスにおける、ミトコンドリア全体の輸送時間、距離の低下に、ミトコンドリアによるエネルギー産生能低下が関与している可能性が考えられた。一方、緑内障モデルの眼圧上昇早期には、軸索障害による、エネルギー消費の増加が生じていると考えられた。高齢マウスの眼圧に対する脆弱性は、ミトコンドリアのエネルギー産生能低下に伴うストレスに耐える予備能の低下に起因する可能性が示唆された。

(6) 本研究は、哺乳類中枢神経系でのミトコンドリア軸索輸送の生体イメージング (Takahara Y et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015) を世界に先駆けて成功した研究である。本研究のインパクトとして、加齢によって増加する緑内障の発症率増加に、加齢に伴うミトコンドリアの機能低下が寄与している可能性が示唆された点、軸索輸送の生体イメージングが緑内障患者の視野障害の発生、進行予測につながる可能性を示唆した点がある。今後の展望として、大型動物を用いた軸索輸送の生体イメージング研究を行い、軸索輸送の生体イメージングの臨床応用を目指す。

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 21 件)

Gozawa M, Takamura Y, Miyake S, Yokota S, Sakashita M, Arimura S, Takahara Y, Inatani M. Prospective observational study of conjunctival scarring after phacoemulsification. *Acta Ophthalmol.* in press. doi: 10.1111/aos.13071. 査読有り

Tomomatsu Y, Tomomatsu T, Takamura Y, Gozawa M, Arimura S, Takahara Y, Inatani M. Comparative study of combined bevacizumab/targeted photocoagulation vs bevacizumab alone for macular oedema in ischaemic branch retinal vein occlusions. *Acta Ophthalmol.* in press. 94:e225-230, 2016. doi: 10.1111/aos.12721. 査読

有り

Arimura S, Takahara Y, Miyake S, Iwasaki K, Gozawa M, Matsumura T, Tomomatsu T, Takamura Y, Inatani M. Randomized clinical trial for early postoperative complications of Ex-PRESS implantation versus trabeculectomy: complications postoperatively of Ex-PRESS versus trabeculectomy study (CPETS). *Sci Rep.* 17;6:26080. 2016. doi: 10.1038/srep26080. 査読有り

Takahara Y, Inatani M, Eto K, Inoue T, Kreymerman A, Miyake S, Ueno S, Nagaya 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. *Proc Natl Acad Sci USA.* 112:10515-10520, 2015. doi: 10.1073/pnas.1509879112. 査読有り

Yokota S, Takahara 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. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 56:8019-8025, 2015. doi: 10.1167/iovs.15-17876. 査読有り

Yokota S, Takahara 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. *Sci Rep.* 5:9290, 2015. doi: 10.1038/srep09290. 査読有り

Matsumura T, Takamura Y, Tomomatsu T, Arimura S, Gozawa M, Takahara Y, Inatani M. Changes in matrix metalloproteinases in diabetes patients' tears after vitrectomy and the relationship with corneal epithelial disorder. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 56:3559-3564, 2015. doi: 10.1167/iovs.15-16489. 査読有り

Takamura Y, Tomomatsu T, Matsumura T, Arimura S, Gozawa M, Takahara Y, Inatani M. Correlation between central retinal thickness after successful macular hole surgery and visual outcome. *Jpn J Ophthalmol.* 59:394-400, 2015. doi: 10.1007/s10384-015-0406-0. 査読有り

Takamura Y, Tomomatsu T, Matsumura T, Takahara 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. *J Ocul Pharmacol Ther.* 31:282-285, 2015. doi: 10.1089/jop.2015.0003. 査読有り

Arimura S, Takamura Y, Takahara Y, Matsumura T, Tomomatsu T, Inatani M. Determinants of anterior chamber angle narrowing after mydriasis in the patients with cataract. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 53:307-312, 2015. doi: 10.1007/s00417-014-2817-x. 査読有り

Takahara Y, Inatani M, Ogata-Iwao M, Kawai M, Inoue T, Iwao K, Tanihara H. Trabeculectomy for open-angle glaucoma in phakic eyes vs in pseudophakic eyes after phacoemulsification: a prospective clinical cohort study. *JAMA Ophthalmol.* 132:69-76, 2014. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2013.5605. 査読有り

Takamura Y, Tomomatsu T, Matsumura T, Arimura S, Gozawa M, Takahara Y, Inatani M. The effect of photocoagulation in ischemic areas to prevent recurrence of diabetic macular edema after intravitreal bevacizumab injection. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 55:4741-4746, 2014. doi: 10.1167/iovs.14-14682. 査読有り

Takamura Y, Tomomatsu T, Yokota S, Matsumura T, Takahara Y, Inatani M.

Large capsulorhexis with implantation of a 7.0 mm optic intraocular lens during cataract surgery in patients with diabetes mellitus. *J Cataract Refract Surg.* 40:1850-1856, 2014. doi: 10.1016/j.jcrs.2014.02.039. 査読有り

Inatani M, Takahara Y, Takamura Y. Management of neovascular glaucoma. *Expert Rev Ophthalmol.* 9, 33-42, 2014.
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1586/17469899.2014.879825> 査読無し

Iwao K, Inatani M, Seto T, Takahara 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.* 23:88-94, 2014. doi: 10.1097/IJG.0b013e3182685167. 査読有り

Ogata-Iwao M, Inatani M, Takahara Y, Inoue T, Iwao K, Tanihara H. A prospective comparison between trabeculectomy with mitomycin C and phacotrabeculectomy with mitomycin C. *Acta Ophthalmol.* 91:e500-501, 2013. doi: 10.1111/aos.12133. 査読有り

Awai-Kasaoka N, Inoue T, Inatani M, Takahara Y, Ogata-Iwao M, Tanihara H. Prognostic factors in trabeculectomy with mitomycin C having history of previous glaucoma surgery. *Jpn J Ophthalmol.* 57:514-519, 2013. doi: 10.1007/s10384-013-0257-5. 査読有り

Takamura Y, Tomomatsu T, Arimura S, Tomomatsu Y, Matsumura T, Takahara Y, Inatani M. Anterior capsule contraction and flare intensity in the early stages after cataract surgery in eyes with diabetic retinopathy. *J Cataract Refract Surg.* 39:716-721, 2013. doi: 10.1016/j.jcrs.2012.12.029. 査読有り

Takamura Y, Matsumoto T, Tomomatsu T, Matsumura T, Takahara Y, Inatani M. Aldose reductase inhibitor counteracts the enhanced expression of matrix metalloproteinase-10 and improves corneal wound healing in galactose-fed rats. *Mol Vis.* 19:2477-2486, 2013.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov.libproxy1.nus.edu.sg/pmc/articles/PMC3857161/> 査読有り

Tomomatsu T, Kono S, Arimura S, Tomomatsu Y, Matsumura T, Takahara Y, Inatani M, Takamura Y. Relationship between lenticular power and refractive error in children with hyperopia. *Clin Ophthalmol.* 7:601-606, 2013. doi: 10.2147/OPHT.S42051. 査読有り

- 21 Goto A, Inatani M, Inoue T, Awai-Kasaoka N, Takahara Y, Ito Y, Fukushima M, Tanihara H. Frequency and risk factors for neovascular glaucoma after vitrectomy in eyes with proliferative diabetic retinopathy. *J Glaucoma.* 22:572-576, 2013. doi: 10.1097/IJG.0b013e31824d514a. 査読有り

[学会発表](計10件)

Takahara Y et al (合計6名、1番目). Totally organized mitochondrial axonal transport patterns in retinal ganglion cells of old mice in vivo. Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2015年5月5日、デンバー(米国)

瀧原祐史、眼圧上昇モデルの作成と網膜神経節細胞障害の評価、日本眼科学会総会、2015年4月18日、ロイトン札幌(北海道札幌市)

Takahara Y et al (合計6名、1番目). Age-related changes in mitochondrial axonal transport in the mammalian CNS in vivo. Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2014年5月5日、オーランド(米国)

瀧原祐史、バルベルト緑内障インプラントの合併症と術後管理、日本眼科学

会総会、2014年4月6日、東京国際フォーラム（東京都）

Takahara Y et al (合計6名、1番目). In vivo imaging of mitochondrial axonal transport in the diseased and aged mammalian CNS. World Ophthalmology Congress. 2014年4月3日、東京国際フォーラム（東京都）

瀧原祐史 他(合計11名、1番目)、哺乳類中枢神経系の疾患、加齢モデルにおける、ミトコンドリア軸索輸送 in vivo イメージング、厚生労働省網膜脈絡膜・視神経萎縮症調査研究班班会議、2014年1月25日、名古屋市立大学(愛知県名古屋市)

瀧原祐史 PEA + IOL既往眼に対するトラベクレクトミー、日本臨床眼科学会、2013年10月31日パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

瀧原祐史 網膜神経節細胞軸索におけるミトコンドリア輸送 in vivo イメージング、日本緑内障学会、2013年9月22日、京王プラザホテル（東京都）

Takahara Y et al (合計8名、1番目). In vivo imaging of mitochondrial axonal transport in the diseased and aged mammalian CNS. Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2013年5月5日シアトル（米国）

瀧原祐史 他(合計9名、1番目)、ライブイメージで観察した緑内障におけるミトコンドリア軸索輸送の変化、日本眼科学会総会、2013年4月5日、東京国際フォーラム（東京都）

〔図書〕(計1件)

Takahara Y, Inatani M. Springer. Neuroprotection and Neuroregeneration for Retinal Diseases. 2014年、133-141ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀧原 祐史 (TAKIHARA, Yuji)
福井大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：50640140