

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893100

研究課題名(和文) 生体イメージングを用いた外因性ストレスが網膜神経節細胞の軸索流に与える影響の解析

研究課題名(英文) Live imaging of effect of cytokines and oxidative stress on axonal transport of retinal ganglion cells.

研究代表者

三宅 誠司 (Seiji, Miyake)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：50572765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：緑内障の病態として網膜神経節細胞の軸索変性および細胞死が知られている。最近では、軸索障害が細胞死の前段階に関与していると考えられるようになってきた。そこで申請者は、細胞死に至るまでに軸索流の停滞が起こると考え、単離した網膜神経節細胞の軸索輸送を可視化し、緑内障の進行に関与する種々のストレスを負荷することで、軸索輸送機能が受ける影響を動的に検証した。

研究成果の概要(英文)：The pathologies of glaucomatous optic neuropath are cell death of retinal ganglion cells (RGCs) and degeneration of their axons. Recently it is proposed that dysfunction of axonal transport was occurred before the RGC death. In fact, our group confirmed that dysfunction of axonal transport activity, which was induced by microtubule depolymerization and axotomy, is followed by cell death. However, relationship of cellular stresses and dynamics of axonal transport is unknown. In this study, effect of cytokines, which involves in glaucomatous neurodegeneration, and oxidative stress on axonal transport was evaluated in living RGCs.

研究分野：細胞生物学

キーワード：緑内障 網膜神経節細胞 軸索輸送 細胞小器官 サイトカイン 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

緑内障は中途失明の原因の第一位であり、その病態は個人差や症状の差はあるものの、網膜神経節細胞およびその軸索の消失である。病態の進行抑制や神経保護のためにも細胞変性メカニズムの解明が急がれている。申請者のグループでは以前から視神経の軸索流を指標とした無侵襲の緑内障診断法の開発を進めており、その過程でラット網膜からの単離培養細胞において軸索輸送の停止が網膜神経節細胞の細胞死に関与している可能性を示唆した (Takahara Y, et al., Invest Ophthalmol Vis Sci., 52, 3039-3045, 2011.)。興味深いことに、眼圧を低下させても進行する場合や、眼圧が正常範囲内であるにも関わらず視野が欠失するタイプ (正常眼圧緑内障) も存在することから、なぜ軸索機能が障害されるのか、眼圧は起点ではあるものの網膜神経節細胞に対して直接的ではなく、周辺環境由来のサイトカインや酸化ストレスなどが関係しているのではないかと考えられるようになった。しかし、軸索流にこれらの外的要因がどのような影響を与えるのかについての報告はない。そこで申請者は、我々のグループが開発した基盤技術を利用することで、これまで検討されていないアプローチで、網膜神経節細胞の軸索輸送の機能障害メカニズムを解明できると考えた。

2. 研究の目的

緑内障は網膜神経節細胞や軸索が消失する神経変性疾患である。神経細胞は一度障害されると再生を望めないことから、臨床現場では薬剤による病態の進行抑制が治療の中心となっている。しかし、早期からの進行予測と適切な処置ができれば神経保護が可能ではないかと考えられており、新しい診断法の創出に加え、神経保護技術の開発が急務となっている。これまでの神経保護は神経細胞の細胞死の抑制を目指していたが、近年ではその方策の対象として細胞死の前駆段階である軸索障害が注目されている。しかし、何れの場合も静的な結果からの軸索機能の評価であり、リアルタイムの変化からの検討は行われていない。そこで本研究では網膜神経節細胞の軸索流に着目し、生体内可視化技術を用いて細胞死を誘導する外的刺激が軸索流にどのような影響を与えるのか動的に明らかにし、これまでとは異なる視点で神経変性メカニズムの解明に挑んだ。

3. 研究の方法

緑内障の動物モデルや臨床データから、その病態には TNF- α /TNF- α 受容体シグナル経路が関与しており、網膜神経節細胞に細胞毒性を引き起こしていると考えられている。しかし、網膜神経節細胞の軸索輸送に対する種々のサイトカインや酸化ストレスと細胞死の関係についての検討は行われていない。そこで本研究では、生体内で生じる神経変性

を軸索機能を指標として経時的に捉え、種々のストレスが軸索流に与える影響を以下の方法に従って解析した。

(1) 実験の前段階として、ラットの網膜神経節細胞を単離培養し、可視化技術を用いて軸索輸送の検出を試みた。これまでの緑内障研究の多くは株化細胞や網膜構成細胞の混合培養が使用されてきた。株化細胞は継代や処理により性質変化が顕著であること、混合培養は他の細胞の影響を受けやすいことから、生体から単離した網膜神経節細胞が障害モデルの構築には必須であると報告されている。そこで、Barres らの報告 (Barres BA, et al., Neuron, 1, 791-803, 1988.) をもとに、ラットの網膜神経節細胞の単離および長期培養を行った。

(2) 本研究は無侵襲での生体深部の観察を視野に入れていることから、軸索流の検出に 2 光子励起顕微鏡を使用する予定であった。しかし、二光子顕微鏡 (ZEISS, LSM710 NLO) の利用には、観察中の細菌の混入や培養プレート上での細胞の探索の困難さ、などの問題が生じることが分かったことから、共焦点顕微鏡 (OLYMPUS, FV10i) での観察へ切り替えた。

(3) これまで我々のグループでは軸索流の検出に緑色蛍光タンパク質 (GFP) 融合 BDNF を強制発現させていた。しかし、GFP 融合タンパク質はシグナル強度が弱くなる傾向にあることから、検出感度を上げるためにミトコンドリアを特異的に検出できる蛍光プローブを使用した。

(4) サイトカインや酸化ストレスが軸索流に与える影響の検証では、当初、細胞培養時に Taylor らの方法 (Taylor AM, et al., Nat Methods, 2, 599-605, 2005.) に従い、Campanot チャンバーを用いることで、軸索およびそれを発する細胞体を同定し、神経突起のどの領域へのサイトカインや過酸化水素などのストレス負荷が軸索障害や細胞本体の死を誘導するのか、細胞の領域ごとの刺激に対する反応性を調査する予定であった。しかし、Campanot チャンバーを使用して細胞を播種するだけの細胞数を現在の系では確保できなかったため、直接、培養ディッシュに播種した網膜神経節細胞を観察に使用した。そして、TNF や IL-6 などのサイトカインや酸化ストレスとしての過酸化水素の培地中への投与が軸索輸送に与える影響を観察し無処理群と比較した。

4. 研究成果

緑内障の病態として網膜神経節細胞の細胞死が知られている。これまでの基礎研究では緑内障の進行状況や程度、進行抑制剤の効果を経組織切片や電子顕微鏡を利用して、どの

程度細胞死が誘導されているかを基準に評価してきた。しかし、最近になり、網膜神経節細胞の細胞死の前駆段階として、軸索障害が関与していると考えられるようになってきた。そこで申請者は、細胞死に至る過程に軸索流の停滞が起こると考え、単離した網膜神経節細胞の軸索輸送を可視化し、緑内障の進行に関与する活性酸素やサイトカインなど種々のストレスを負荷することで、軸索輸送機能が受ける影響を動的に検証した。

(1) 軸索輸送を捉えるためにミトコンドリアの可視化が必要となる。そこで、細胞小器官を特異的に染色できる蛍光色素の検討を行った。Rhodamine 123 (Rh123)、MitoTracker Green FM、JC-1、NAO の蛍光持続時間や細胞毒性を比較したところ、蛍光持続時間の長さ、細胞毒性の低さともに Rh123 が優れ、一度の染色で1週間以上検出できただけではなく、細胞毒性もなかった。さらに、溶媒の持ち込みも他の色素に比べて最小限にできたことから、以降の実験では Rh123 をミトコンドリアの染色に使用した。

(2) 緑内障では硝子体中に TNF や IL-6 が上昇することが報告されていた。そこで、それらのサイトカインが濃度依存的に網膜神経節細胞の軸索の断片化や細胞体の消失を誘導するのか検討した。いずれの場合も高濃度 (1 µg/mL) の添加では、検出対象として細胞によって輸送させるミトコンドリア量が減少し、輸送スピードが減少するケースがあり、軸索の断片化や細胞体の消失を確認することができた。しかし、すべての網膜神経節細胞が細胞死に至ることはなかった。予想に反してサイトカインに対する濃度依存性が見られなかっただけでなく、断片化や細胞体の消失が誘導されるまでの時間に規則性も得られなかった。

TNF や IL-6 には炎症反応と抗炎症反応の二面性が知られていることから、障害保護的作用として軸索障害の閾値や軸索流亢進作用がある可能性も期待された。しかし添加濃度にかかわらず、輸送されるミトコンドリア量やスピードが増加することはなかった。

(3) 緑内障の原因の1つとしてミトコンドリアの機能障害が考えられている。ミトコンドリアは細胞にエネルギーを供給するために必要不可欠な細胞小器官である。しかし、ATP の産生と同時に細胞を傷害する酸化ストレスの原因となる活性酸素を発生させる。そこで、酸化ストレスやミトコンドリア障害が軸索輸送に与える影響を検討した。酸化ストレスを誘導する活性酸素として、過酸化水素や Tert-ブチルヒドロペルオキシド (TBHP) をミトコンドリア障害として、膜電位を消失させる脱共役剤であるカルボニルシアニド-m-クロロフェニルヒドラゾン (CCCP) を ATP 合成阻害剤であるオリゴマイシンを使用した。こ

れらを用いた場合もサイトカインの場合と同様に軸索輸送機能が低下し、軸索の断片化および細胞体の消失が生じることを確認できたが、それらが誘導されるまでの時間が実験を行う毎に一致せず、再現性を得られなかった。

(4) これらのことから、サイトカインや酸化ストレスなどの種々のストレスは網膜神経節細胞の軸索の断片化や細胞体の消失を誘導できるが、添加する濃度とそれらの現象に相関はなかった。つまり、全ての網膜神経節細胞がストレスに対して同じ反応を示すのではなく、細胞ごとにストレスに対する閾値が異なり、

ストレスの存否が評価対象とした細胞運命を決定しているのではないかと考えている。

現在、軸索に直接的に障害を与えられるレーザーマイクロダイセクションを用いた軸索切断モデル、軸索輸送に不可欠な微小管の解離を促進するコルヒチン添加による軸索輸送障害モデルを用いて、網膜神経節細胞が細胞死に至る過程で軸索輸送が受ける影響を検討している。

この2年間を成果としてまとめることはできなかったが、ストレスに対しても生存可能な細胞が存在していることを明らかにでき、その細胞の遺伝子プロファイルの解明が神経保護に有効であるとの着想に至り、平成28年度からの若手研究(B) (課題番号16K20311) に繋がったと考えている。申請者が着目している研究領域を深化させるために、今後も全力で実験に取り組む所存です。

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8件)

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 U S A. 査読有, 112, 2015, 10515-10520, DOI: 10.1073/pnas.1509879112.

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. 査読有, 56, 2015, 8019-8025, DOI: 10.1167/iovs.15-17876.

Narimatsu T, Negishi K, Miyake S, Hirasawa M, Osada H, Kurihara T, Tsubota K, Ozawa Y. Blue light-induced inflammatory marker expression in the retinal pigment epithelium-choroid of mice and the protective effect of a yellow intraocular lens material in vivo. *Exp Eye Res*. 査読有, 132, 2015, 48-51, DOI: 10.1016/j.exer.2015.01.003.

Nagai N, Izumi-Nagai K, Suzuki M, Shinoda H, Koto T, Uchida A, Mochimaru H, Tomita Y, Miyake S, Kobayashi S, Sasaki M, Tsubota K, Ozawa Y. Association of macular pigment optical density with serum concentration of oxidized low-density lipoprotein in healthy adults. *Retina*. 査読有, 35, 2015, 820-826, DOI: 10.1097/IAE.0000000000000382.

Kamoshita M, Ozawa Y, Kubota S, Miyake S, Tsuda C, Nagai N, Yuki K, Shimmura S, Umezawa K, Tsubota K. AMPK-NF- B axis in the photoreceptor disorder during retinal inflammation. *PLoS One*. 査読有, 9, 2014, e103013, DOI: 10.1371/journal.pone.0103013.

Narimatsu T, Ozawa Y, Miyake S, Nagai N, Tsubota K. Angiotensin II type 1 receptor blockade suppresses light-induced neural damage in the mouse retina. *Free Radic Biol Med*. 査読有, 71, 2014, 176-185, DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.020.

Miyake S, Kobayashi S, Tsubota K, Ozawa Y. Phase II enzyme induction by a carotenoid, lutein, in a PC12D neuronal cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有, 446, 2014, 535-540, DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.02.135.

Narimatsu T, Ozawa Y, Miyake S, Kubota S, Yuki K, Nagai N, Tsubota K. Biological effects of blocking blue and other visible light on the mouse retina. *Clin Experiment Ophthalmol*. 査読有, 42, 2014, 555-563, DOI: 10.1111/ceo.12253.

[学会発表](計1件)

金田文人、高村佳弘、三宅誠司、内田博之、沖昌也、糖尿病白内障のエピジェネティックな発現機構の解明、第二回北陸エピジェネティクス研究会、2015年11月11日、富山大学 杉谷キャンパス

6. 研究組織

(1)研究代表者

三宅 誠司 (MIYAKE Seiji)
福井大学・医学部・助教
研究者番号：50572765

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

稲谷 大 (INATANI Masaru)
福井大学・医学部・教授
研究者番号：40335245

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

横田 聡 (YOKOTA Satoshi)
京都大学・医学研究科・大学院生