

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09406

研究課題名（和文）網膜内リモデリング現象による緑内障再生治療法開発

研究課題名（英文）Development of glaucoma regeneration treatment method by intraretinal remodeling phenomenon

研究代表者

松下 賢治（Matsushita, Kenji）

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：40437405

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は網膜内リモデリングを利用した再生医療の実現と新たな創薬基盤を目指した。網膜内層には、OFF層とON層があるが、緑内障の初期にOFF層が障害を受けることが知られ、我々は緑内障モデルマウスにて網膜内層のシナプス形成（シナプトジェネシス）がOFF層で起こる可能性を見出した。そこで、OFF層を分離するマーカーを探索し、網膜内の細胞接着分子Necl-1が、OFF層の経路を分離することを見出した。次いで、Necl-1が網膜内発現と機能について解析した。シナプトジェネシスにおけるNecl-1の機能を解析するため、レポータマウスと多光子顕微鏡観察による網膜内リモデリング観察の基盤を完成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、Necl-1レポータマウスの高眼圧モデル上で、二光子顕微鏡を用いて生体観察することで、網膜内層の新たなシナプス形成（シナプトジェネシス）とそれを促進する分子機序を解明できる準備を完成した。これにより、神経再生回復観察システムにおけるシナプトジェネシス現象が観察でき、その現象を促進する有効な薬物の探索システムを確立でき、有効性評価も容易になる。このことにより、これまで不可能であった緑内障の再生医療の一端を拓くことができる。

研究成果の概要（英文）：Our research aimed at the realization of regenerative medicine using intraretinal remodeling and a new drug discovery platform. There are OFF layer and ON layer in the inner layer of the retina, but it is known that the OFF layer is damaged in the early stage of glaucoma. We found the possibility of it happening in glaucoma model mouse. Therefore, we searched for a marker that separates the OFF layer, and found that the cell adhesion molecule Necl-1 in the retina separates the pathway of the OFF layer. We analyzed where Necl-1 expressed in retina and how it work. We completed the basis of intraretinal remodeling observation by reporter mouse and multiphoton microscopy so we can now analyze the function of Necl-1 in synaptogenesis.

研究分野：緑内障

キーワード：緑内障 シナプトジェネシス OFF層 接着分子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

緑内障は眼圧上昇により視神経乳頭が変形し、視神経線維が周囲支持組織とともに物理的に障害され、網膜神経節細胞が視神経軸索輸送障害によるアポトーシスを来し発症する。眼圧下降に反応しない緑内障に対して、神経保護的予防治療や網膜神経節細胞再生治療が期待されている。しかし、神経保護治療では長期経過評価の困難さや、再生医療では外側膝状体まで至る軸索の全長回復および外側膝状体でのシナプス形成という新たな課題を克服する必要があり十分な有効性を得たものがない。近年、緑内障の高眼圧モデルマウスにおいて、網膜神経節細胞障害をきたす初期段階では、網膜神経節細胞が刺激伝達を受ける網膜内網状層 (IPL)において、OFF 層が ON 層より先行して障害を受けることが指摘され (Santina LD J Neuroscience 2013)、その OFF 層で網膜神経節細胞が dendrite を伸ばしシナプス再形成することから、網膜内リモデリングによる再生能の存在が示唆された。緑内障患者では、視野が消失して暗いと自覚する前にぼやけ、つまり解像度の低下を自覚することが最近知られており、ヒトの緑内障でも IPL の OFF 層が ON 層より先行して障害を受ける可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、緑内障モデルマウスを用いて IPL の新たなシナプス形成 (シナプトジェネシス) の分子機序を解明する。そのため、IPL の OFF 層と ON 層を分離するマーカーが必要であり、我々はこれ迄の基盤研究から高眼圧で影響を受ける OFF 層 dendrite 再生に関わる可能性のある網膜内接着分子 Necl-1 注目している。まずその特性を定めるため、Necl-1 が網膜内のどこで発現し、どのような機能を司るのかを解明し、次いで高眼圧によってどう変化するかを、Necl-1 レポータマウスの高眼圧モデル上で、二光子顕微鏡を用いて生体観察することで、網膜内層の新たなシナプス形成 (シナプトジェネシス) とそれを促進する分子機序を解明する。最後に神経再生回復観察システムによりシナプトジェネシスに有効な薬物の探索システムを確立し有効性評価を容易にする。本研究の成果は、網膜内リモデリングを利用した再生医療の実現と新たな創薬基盤となる。

### 3. 研究の方法

(1) 網膜 OFF 層と関連性のある接着分子 Necl-1 が発現している網膜内局在をシングルセル公開情報からのサブ解析と超解像度顕微鏡 (Delta vision, GE Healthcare) により解析する。

(2) 一過性高眼圧負荷に対して接着分子がどのような反応するかを形態的に観察する。マウス網膜内層 (IPL 層) の OFF 層障害優位性および回復過程 (シナプトジェネシス) について、シナプス観察に優れている Delta vision を用いて経時的解析を行う。

(3) Necl-1KO を作成し、シナプス形成への影響を観察し、これまで開発してきたマウス UV/M 錐体細胞由来の網膜電図 (ERG) ON, OFF 分離システムを利用して、これまで困難であったマウス OFF 層の電気生理学的解析を非侵襲的に進める。

(4) 持続的な形態観察を可能とするため、接着分子 Necl-1 に Brainbow を繋げた Brainbow-Necl-1 マウスを作成する。

(5) 二光子励起顕微鏡を用いての観察では、時間的変化を捉えるため、これまで開発してきた侵襲性の高い球後観察法とは異なる、角膜を介した乳頭と網膜内層の観察法を開発する。特にマウスでは、眼球が小さく、角膜と水晶体による収差が問題となるため、収差を減じるシステムを構築する。

( 6 ) Brainbow-Necl-1 マウスを高眼圧にすることで、生体におけるシナプス再形成 ( シナプトジェネシス ) の経時的形態変化を観察する。

マウス薬物硝子体注射および静脈注射を併用し、電気生理学的解析薬理的により網膜内シナプトジェネシスを促進する薬物の探索システムを構築する。

#### 4 . 研究成果

( 1 ) Single cell sub analysis から接着分子 Necl-1 は OFF 双極細胞とアマクリン細胞に発現していた。Delta vision の解析から網膜内層 IPL では OFF 層を中心に一部 ON 層に発現し、OPL では OFF 網膜双極細胞と S-opsin 陽性視細胞の間に集約された。

( 2 ) 一過性高眼圧負荷に対して Necl-1 がどのような反応するかを Delta vision により観察したところ、IPL では OFF 層が増大したように観察された。

( 3 ) Necl-1KO マウスを作成し、マウス網膜シナプス形成への影響を観察したところ、S-opsin 陽性細胞と結合している Calsenilin 陽性双極細胞 ( マウス Type4 双極細胞 ) のシナプス形成に影響した。

( 4 ) Necl-1KO マウスを UV/M 錐体細胞由来の網膜電図 ( ERG ) ON,OFF 分離システムで観察したところ、OFF 層の電気生理学的機能低下が観察された。

( 5 ) R26R-Confetti を Jackson ラボから導入し、CRISPR/CAS9(大阪大学微生物研究所)にて Necl-1CreER マウスを作成した。今後、2 系統を掛け合わせて接着分子 Necl-1 発現細胞で Brainbow が発色する Brainbow-Necl-1 レポーターマウスを作成する。

( 6 ) 特殊コンタクトレンズを用いた二光子励起顕微鏡を用いて、角膜を介した乳頭と網膜内層の観察に成功した。今後、コンタクトレンズを改良し解像度を更に向上させる。

( 7 ) マウス薬物硝子体注射および静脈注射を併用し、電気生理学的解析薬理的により網膜内シナプスへの影響を観察する研究を補佐した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Usui Shinichi, Ikuno Yasushi, Asai Tomoko, Kikawa Tsutomu, Akiba Masahiro, Miki Atsuya, Matsushita Kenji, Kawasaki Ryo, Nishida Kohji	4. 巻 64
2. 論文標題 Effect of peripapillary tilt direction and magnitude on central visual field defects in primary open-angle glaucoma with high myopia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 414 ~ 422
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10384-020-00747-y	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 Miki Atsuya, Kumoi Miho, Maeda Naoyuki, Koh Shizuka, Matsushita Kenji, Nishida Kohji	4. 巻 64
2. 論文標題 Transient changes in refractive error and corneal tomography after 24-h continuous monitoring of intraocular pressure patterns with a contact lens sensor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 127 ~ 133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10384-020-00723-6	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 Lu Shi Yao, Rong Shi Song, Wu Zhenggen, Huang Chukai, Matsushita Kenji, Ng Tsz Kin, Leung Christopher K.S., Kawashima Rumi, Usui Shinichi, Tam Pancy O.S., Tsujikawa Motokazu, Young Alvin L., Zhang Mingzhi, Wiggs Janey L., Nishida Kohji, Tham Clement C., Pang Chi Pui, Chen Li Jia	4. 巻 48
2. 論文標題 Association of the CAV1 CAV2 locus with normal tension glaucoma in Chinese and Japanese	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical & Experimental Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 658 ~ 665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ceo.13744	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 Matsushita Kenji, Kawashima Rumi, Uesugi Koji, Okada Haruka, Sakaguchi Hirokazu, Quantock Andrew J., Nishida Kohji	4. 巻 10
2. 論文標題 Assessment of a self-assembling peptide gel, SPG-178, in providing a clear operative field for trabeculectomy surgery for glaucoma in an animal model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-68171-3	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 -

1. 著者名 Matsushita Kenji, Kawashima Rumi, Nishida Kohji	4. 巻 11
2. 論文標題 Development of an Infrared Monitor-Guided Bleb Revision Procedure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Case Reports in Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 234 ~ 241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000508606	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 -

1. 著者名 Kawashima Rumi, Matsushita Kenji, Kawasaki Ryo, Nishida Kohji	4. 巻 21
2. 論文標題 Efficacy and safety of 5-fluorouracil in infrared monitor guided bleb revision	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12886-021-01843-4	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 -

1. 著者名 Kawashima Rumi, Matsushita Kenji, Hashida Noriyasu, Kuniyoshi Kazuki, Fujikado Takashi, Nishida Kohji	4. 巻 Publish Ahead of Print
2. 論文標題 Complete Visual Recovery From Severe Outer Retinitis After Tonsillitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuro-Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/wno.0000000000001073	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 -

1. 著者名 Komoto Shimpei, Oie Yoshinori, Kawasaki Satoshi, Kawasaki Ryo, Nishida Nozomi, Soma Takeshi, Koh Shizuka, Maruyama Kazuichi, Usui Shinichi, Matsushita Kenji, Tsujikawa Motokazu, Maeda Naoyuki, Nishida Kohji	4. 巻 61
2. 論文標題 Quantitative Analysis of the Association Between Follow-Up Duration and Severity of Limbal Stem Cell Deficiency or Visual Acuity in Aniridia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 57 ~ 57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.61.6.57	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 Lu Shi Yao, Rong Shi Song, Wu Zhenggen, Huang Chukai, Matsushita Kenji, Ng Tsz Kin, Leung Christopher K.S., Kawashima Rumi, Usui Shinichi, Tam Pancy O.S., Tsujikawa Motokazu, Young Alvin L., Zhang Mingzhi, Wiggs Janey L., Nishida Kohji, Tham Clement C., Pang Chi Pui, Chen Li Jia	4. 巻 1
2. 論文標題 Association of the CAV1 CAV2 locus with normal tension glaucoma in Chinese and Japanese	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical & Experimental Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ceo.13744	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 該当する

1. 著者名 Miki Atsuya, Kumoi Miho, Maeda Naoyuki, Koh Shizuka, Matsushita Kenji, Nishida Kohji	4. 巻 64
2. 論文標題 Transient changes in refractive error and corneal tomography after 24-h continuous monitoring of intraocular pressure patterns with a contact lens sensor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 127 ~ 133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10384-020-00723-6	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 Mao Zaixing, Miki Atsuya, Mei Song, Dong Ying, Maruyama Kazuichi, Kawasaki Ryo, Usui Shinichi, Matsushita Kenji, Nishida Kohji, Chan Kinpui	4. 巻 10
2. 論文標題 Deep learning based noise reduction method for automatic 3D segmentation of the anterior of lamina cribrosa in optical coherence tomography volumetric scans	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomedical Optics Express	6. 最初と最後の頁 5832 ~ 5832
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/BOE.10.005832	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 該当する

1. 著者名 Nishiyama Issei, Oie Yoshinori, Matsushita Kenji, Koh Shizuka, Winegarner Andrew, Nishida Kohji	4. 巻 15
2. 論文標題 Transient extremely shallow anterior chamber caused by ciliochoroidal detachment in a patient with Mycobacterium chelonae keratitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Ophthalmology Case Reports	6. 最初と最後の頁 100530 ~ 100530
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoc.2019.100530	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 -

1. 著者名 Komoto Shimpei, Koh Shizuka, Matsushita Kenji, Nishida Kohji	4. 巻 73
2. 論文標題 Lattice corneal dystrophy with familial amyloid polyneuropathy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Practice	6. 最初と最後の頁 e13320 ~ e13320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ijcp.13320	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 Sakimoto S, Okazaki T, Usui S, Ishibashi T, Oura Y, Nishida K, Miki A, Kawasaki R, Matsushita K, Sakaguchi H, Nishida K.	4. 巻 59
2. 論文標題 Cross-Sectional Imaging Analysis of Epiretinal Membrane Involvement in Unilateral Open-Angle Glaucoma Severity.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Invest Ophthalmol Vis Sci.	6. 最初と最後の頁 5745-5751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.18-25292.	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 -

1. 著者名 Kawashima R, Matsushita K, Kuniyoshi K, Nishida K.	4. 巻 44
2. 論文標題 Contribution of Bipolar Cells of Cone ON and OFF Pathways to Electroretinograms Elicited by Ultraviolet and Middle Wavelength Stimuli.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Curr Eye Res.	6. 最初と最後の頁 413-422
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/02713683.2018.1549262.	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 -

1. 著者名 Ueno A, Omori Y, Sugita Y, Watanabe S, Chaya T, Kozuka T, Kon T, Yoshida S, Matsushita K, Kuwahara R, Kajimura N, Okada Y, Furukawa T.	4. 巻 22
2. 論文標題 Lrit1, a Retinal Transmembrane Protein, Regulates Selective Synapse Formation in Cone Photoreceptor Cells and Visual Acuity.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 3548-3561
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.03.007.	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12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 松下賢治、河嶋瑠美、西田幸二
2. 発表標題 当院における難治性緑内障に対するチューブシャント術の長期術後観察
3. 学会等名 日本緑内障学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Rumi Kawashima, Kenji Matsushita, Kuniyoshi Kazuki & Kohji Nishida.
2. 発表標題 Isolation of pure S-cone responses in the ultraviolet-elicited photopic electroretinograms under a bright middle-wave background.
3. 学会等名 ARVO (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河嶋瑠美、松下賢治、國吉一樹、西田幸二
2. 発表標題 紫外線誘導錐体網膜電図における最強度中波長光背景下でのマウス Pure S錐体の分離
3. 学会等名 日本臨床電気生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 濱野結貴、松下賢治、河嶋瑠美、西田幸二
2. 発表標題 Micro hooked needleにより瞳孔周囲炎症性線維膜を除去した一例
3. 学会等名 大阪眼科集談会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 馬場 圭太、河嶋 瑠美、松下 賢治、中村誠、西田 幸二
2. 発表標題 緑内障インプラントチューブ閉塞に対して内視鏡下手術が有用であった1例
3. 学会等名 日本緑内障学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河嶋瑠美、松下賢治、馬場圭太、西田幸二
2. 発表標題 Peters anomalyに併発した緑内障手術においてLumeraスリット照明とProveo8+OCT EnFocusの補助が術中判断に有用であった一例
3. 学会等名 日本緑内障学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千羽琢哉、松下賢治、河嶋瑠美、馬場圭太、西田幸二
2. 発表標題 チューブインプラント毛様溝挿入術にintra-operative OCT (iOCT) を用いて施行した一例
3. 学会等名 大阪眼科手術シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsushita K, Masaru Inatani, Tomomi Higashide, Yuji Iwamoto, Masato Kobayashi, Sergio Leal
2. 発表標題 Efficacy and Safety of Intravitreal Aflibercept Injection in Japanese Patients With Neovascular Glaucoma: The VEGA Study.
3. 学会等名 34th APAO Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河嶋瑠美, 松下賢治, 國吉一樹, 不二門尚, 西田幸二
2. 発表標題 紫外線および緑LED刺激によるマウス錐体ON,OFF経路の解析
3. 学会等名 日本眼科臨床電気生理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenji Matsushita, Rumi Kawashima, Takashi Fujikado & Kohji Nishida
2. 発表標題 Analysis for the association between functional and morphological recovery in a female case with severe outer retinitis after tonsillitis
3. 学会等名 ARVO
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Rumi Kawashima, Kenji Matsushita, Kenji Mandai, Tomohiko Maruo, Shujie Wan, Akira Mizoguchi, Yoshimi Takai & Kohji Nishida
2. 発表標題 The expression of Nectin-like (Necl) 1 in the murine retina.
3. 学会等名 ARVO
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masaru Inatani, Tomomi Higashide, Kenji Matsushita, Toshiaki Kubota, Masato Kobayashi, Yuji Iwamoto, Sergio Leal.
2. 発表標題 Efficacy and Safety of Intravitreal Aflibercept Injection in Japanese Patients with Neovascular Glaucoma: Outcomes From the Phase 3 VEGA Study
3. 学会等名 Euretina
4. 発表年 2018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	國吉 一樹  (Kuniyoshi Kazuki)  (30234470)	近畿大学・医学部・准教授   (34419)	電気生理学実験担当

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