

令和元年6月13日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20311

研究課題名(和文) 網膜神経節細胞のミトコンドリア動態と細胞死誘導機構の相関性解明とその臨床応用

研究課題名(英文) Elucidation of the relationship of mitochondrial dynamics in the axons and induction mechanism of apoptosis of retinal ganglion cells

研究代表者

三宅 誠司 (Miyake, Seiji)

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：50572765

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)：本研究では種々のストレスが網膜神経節細胞の軸索輸送機能に与える影響を動的に検証した。ラット網膜より単離した網膜神経節細胞に緑内障に関連すると考えられているTNF- α 、過酸化水素、NMDA、IL-6を添加したところ、TNF- α 、過酸化水素において輸送動態に変化が見られたが、いずれの場合も細胞死を誘導しなかった。軸索輸送の低下が細胞死の前段階として生じることが明らかになっていることから、サイトカインや酸化ストレスが眼圧に関係なく緑内障を進行させる一因であることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑内障治療のポイントは網膜神経節細胞の消失を少しでも遅らせることである。しかし、手術や点眼を行っても患者によって得られる効果が一定ではないことから、医療現場ではこれまでとは異なるアプローチの治療法が強く望まれている。研究代表者が進める神経保護を指向した緑内障治療法の開発は、治療戦略の幅を広げることができ、視覚障害から生じる総合的なコストを減ずるための方策を、眼圧下降とは異なる視点から提案できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, effect of external stimulation of several stresses such as oxidative stress, cytokines, and excitatory amino acid on dynamics of axonal transport of retinal ganglion cells was evaluated. TNF- α and hydrogen peroxide caused axonal shortening and decline in number of mobile mitochondria, however, cell death was not induced by these stimulations in this experimental condition. On the other hands, NMDA and IL-6 had no effect on axonal dynamics and cell viability. Previous our study revealed that depression of axonal transport activity occurred prior to cell death. These data suggested cytokine and oxidative stress were contribute to the risk for progression of glaucomatous optic neuropathy, regardless of ocular pressure.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜神経節細胞 軸索輸送 ミトコンドリア 酸性顆粒 緑内障 酸化ストレス サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

緑内障の進行抑制には眼圧下降が唯一の科学的根拠を持った治療法である。しかし、眼圧を下降させても進行するタイプも存在しており、その場合は有効な治療法がないのが現状である。このことから、緑内障のメカニズムとして、眼圧は病態の起点となるものの、網膜神経節細胞に対して直接的ではなく、周辺環境に作用することで、それに由来する因子が間接的に影響を与えているのではないかと考えられるようになった。事実、緑内障の基礎および臨床研究が進むにつれて、眼圧にかかわらず炎症性サイトカインである TNF- α や酸化ストレスが網膜神経節細胞の運命を決定付けていることや、網膜神経節細胞の細胞死の実態として、炎症の存在が示唆されるようになった。その一方で、TNF- α による網膜神経節細胞の細胞死の誘導率が 100%ではないことや、活性酸素が蓄積しても完全に網膜神経節細胞が消失しないことも明らかになった。つまり、ストレス条件下でも生存できる網膜神経節細胞が存在しており、細胞死のシグナルに対する個々の細胞の反応が不均一であることを示唆していた。そこで、我々のグループが確立した軸索輸送可視化技術を用いて、単一細胞での軸索輸送機能と細胞死の関係を明らかにすることで、その過程で得られる細胞の遺伝子発現プロファイルが網膜神経節細胞の保護を可能にする遺伝子治療法開発の一助になると考えた。

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、医療現場では治療の基本となる薬剤によって眼圧を下降させることで病態の進行を抑制している。しかし、十分な効果を得られない場合や眼圧が下降しても進行する例もあり、治療方法の選択肢を増やすためにも眼圧以外の因子を標的とした緑内障治療方法の開発が急務とされている。本研究ではストレス負荷した細胞のシングルセル解析を行い、軸索でのミトコンドリア動態と遺伝子解析による細胞の死や生存に関連する因子の遺伝子発現変化を明らかにし、得られた知見をもとに神経保護を指向した新規の遺伝子治療戦略法の確立を目指す。

3. 研究の方法

本研究では組織全体や細胞集団ではなく、単一細胞を実験対象として解析を進め、細胞の特徴を捉えると共に遺伝子導入による細胞の制御を試みる。まず、酸化ストレスや炎症性サイトカインによって網膜神経節細胞の軸索輸送機能が低下することをミトコンドリア動態を指標として検証する。それと同時にストレス耐性を示す網膜神経節細胞において発現変動する遺伝子を同定するために、細胞の死や生存、ミトコンドリア生合成などの経路を中心に遺伝子パスウェイ解析を行う。そして、顕著な変化を示す候補遺伝子を網膜神経節細胞に導入することで、ストレス環境下での細胞死が抑制されることや軸索輸送機能が維持・亢進されることを示す。

4. 研究成果

病理的狀態におけるミトコンドリアの動態解析

網膜神経節細胞の遺伝子解析を実施するための前段階として、サイトカインや酸化ストレスによって軸索動態が変化することを検証した。緑内障に関連すると考えられているサイトカインとして TNF- α 、酸化ストレスとして過酸化水素を負荷させ、ミトコンドリア動態の変化を観察した(図1)。

ラットの網膜から単離した網膜神経節細胞に TNF- を添加したところ、1.0 μg/ml の TNF- 存在下で 24 時間後の移動性のミトコンドリアの割合が優位に減少した (図 2 左側)。

1.0 μg/ml では軸索の短縮が生じたため、n 数が減少したが、観察できた軸索における移動性のミトコンドリアの数が減少していたことから、TNF- が軸索輸送動態に影響を与えていると考えた。一方、静止したミトコン

ドリアの数に変化はなかった (図 2 右側)。さらに、リソソームなどの酸性顆粒の軸索輸送動態に対する TNF- の影響を同様に検証したが、影響がなかった (図 3)。また、50 μM の過酸化水素を添加後、6~12 時間経過後に移動性ミトコンドリアが減少する傾向が観察された (Data not shown)。ポジティブコントロールとして使用したコルヒチンでは処理後 120 時間以内に観察対象とした網膜神経節細胞が細胞死に至ったことから (発表論文) サイトカインや酸化ストレスは、細胞死を誘発しないものの、軸索輸送動態に影響を与えることが示された。今回軸索輸送の指標とした軸索輸送体の中ではミトコンドリアが TNF- の影響を受けた。このことから移動性のミトコンドリアが影響を受けることで、軸索の恒常性が破綻し、短縮や変性が生じると考えられる。また、動物を用いた緑内障研究で用いられる NMDA (N-methyl-D-aspartic acid) では軸索輸送動態に変化が見られず、緑内障患者の房水中で増加すると報告されている IL6 を種々の濃度で添加しても細胞死が誘導されなかった (Data not shown)。このことは、緑内障の病態を *in vitro* で再現するためには、網膜神経節細胞だけではなく、グリア細胞や視細胞などとの共培養によって網膜を模した環境を構築しなければならない可能性を示唆しており、網膜神経節細胞を用いた実験系の今後の検討課題となった。

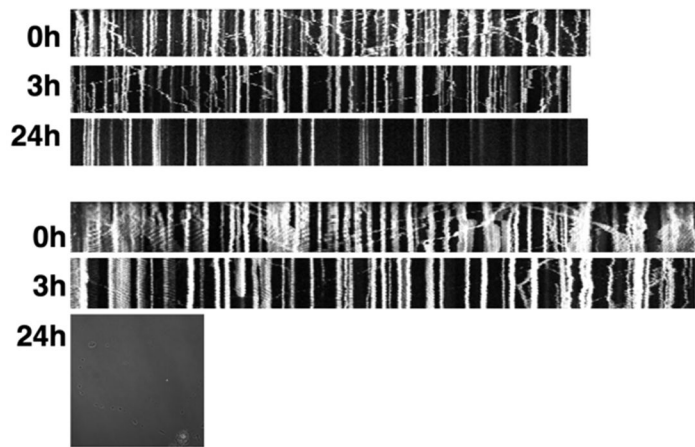


図1. TNF α (1.0 μg/ml) を添加した時の軸索におけるミトコンドリアのライブイメージング
この実験では、軸索の末端領域に近い部分を観察対象とした。試薬を添加し24時間後に観察すると、ほぼ静止したミトコンドリアが観察される場合や、細胞体や軸索は存在するものの、観察していた軸索が短縮し、観察できなくなるケースがあった。この結果がきっかけとなり、以降の実験では細胞体に近い軸索領域を観察対象にすることになった。

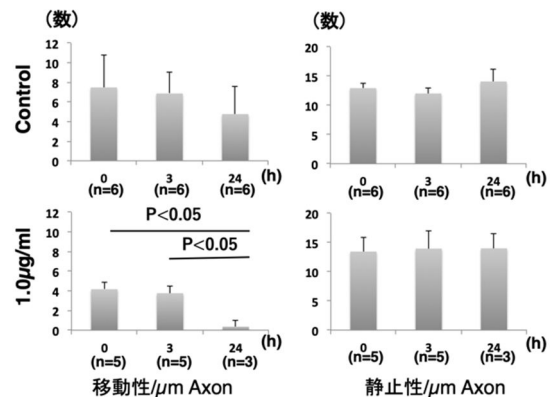


図2. 移動性・静止性のミトコンドリアの数
図1のキモグラフから単位軸索長あたりのミトコンドリアの数を算出した。コントロールには溶媒である水を使用した。Tukey's testを用いて統計学的解析を行った。

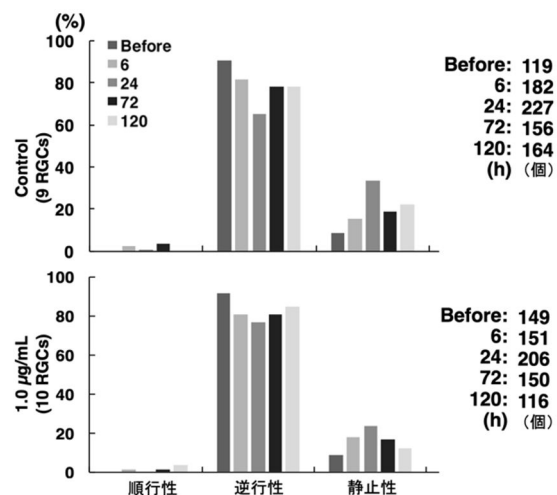


図3. TNF α (1.0 μg/ml) が酸性顆粒の軸索輸送に与える影響
酸性顆粒のほとんどが逆行性であった。さらに、TNF α を添加してもその挙動に変化はなかった。右側の数字は添加前後の酸性顆粒の個数を表している。ここでは図1および2の結果に従い、細胞体に近い軸索領域を観察対象とした。そのため5日間の経過を追うことができた。末端領域が短縮している軸索もあったことから (Data not show)、TNF α が軸索の生理状態に影響していると考えられる。

網膜神経節細胞を用いた実験系の今後の検討課題となった。

次に、シングルセル解析を実施するためには、単一の網膜神経節細胞を培養器から拾い上げる必要があることから、Laser micro dissection (LMD) を利用した単一細胞の単離を試みた。LMD用のフィルムがスライドに貼り付けてある特殊スライドを用いた網膜神経節細胞の培養を試みたものの、思ったように培養できないことが分かり、網膜神経節細胞とは異なる株化された神経細胞種の使用を検討している。

ストレス条件下でも生存できる網膜神経節細胞に特異的に発現する遺伝子を単離し、それもしくはそれらによって網膜神経節細胞を形質転換させれば、種々のストレスに対する抵抗性が付与され、緑内障による視野進行を抑制できると考えている。今後も本研究を継続し、遺伝子治療法開発の一助としたい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

Miyake S, Takihara Y, Yokota S, Takamura Y, Inatani M.

Effect of Microtubule Disruption on Dynamics of Acidic Organelles in the Axons of Primary Cultured Retinal Ganglion Cells. *Curr Eye Res.* 43(1), 77-83, 2018.

doi: 10.1080/02713683.2017.1370117. (査読有り)

〔学会発表〕(計 17 件)

三宅誠司、緑内障性視神経症における軸索障害、第 122 回日本眼科学会総会、シンポジウム、シンポジウム 3 : 緑内障性視神経症の発症機序のなぞを解く、2018。

Miyake S, Takihara Y, Yokota S, Takamura Y, Inatani M.

Effect of axonopathy on dynamics of acidic organelle in the axon of primary cultured retinal ganglion cells. *ARVO*, 2017.

三宅誠司、瀧原祐史、横田 聡、高村佳弘、稲谷 大、網膜神経節細胞の細胞死におけるオートファジーと軸索輸送障害との関係、第 121 回日本眼科学会総会、2017。

〔図書〕(計 4 件)

三宅誠司、瀧原祐史、緑内障：視神経の軸索輸送、あたらしい眼科、メディカル葵出版・Vol.33 (12) 1739-1740、2017。

三宅誠司、瀧原祐史、緑内障とミトコンドリア、あたらしい眼科、メディカル葵出版、Vol.34 (1) 83-84、2017。

三宅誠司・稲谷 大、Summing Up 「緑内障の病態」、Frontiers in Glaucoma、メディカルレビュー社、第 53 号、44-50、2017。

〔産業財産権〕

出願状況 (計 5 件)

名称：白内障の予防剤、治療剤、およびこれらを製造するための H A T 阻害剤の使用

発明者：沖 昌也、金田文人、高村佳弘、三宅誠司、内田博之

権利者：国立大学法人 福井大学

種類：特許

番号：特願 2016-208121

出願年：2016-10-24

国内外の別： PCT 出願

名称：白内障の予防剤および治療剤、並びに、これらを製造するための、DNA 損傷に応答するシグナル伝達経路を阻害する阻害剤の使用

発明者：沖 昌也、金田文人、高村佳弘、三宅誠司、稲谷 大、内田博之、甲斐田大輔

権利者：国立大学法人 福井大学

種類：特許

番号：特願 2017-108523

出願年：2017-5-31

国内外の別： 国内

名称：白内障の誘導方法、白内障のモデル生物、白内障の予防剤ならびに治療剤のスクリーニング方法、および、白内障誘導剤

発明者：沖 昌也、金田文人、高村佳弘、三宅誠司、稲谷 大、内田博之

権利者：国立大学法人 福井大学

種類：特許

番号：特願 2017-119108

出願年：2017-6-16

国内外の別： 国内

名称：白内障の予防剤および治療剤、ならびに、これらを製造するためのH I F 経路阻害剤の使用

発明者：沖 昌也、金田文人、釜田和馬、高村佳弘、三宅誠司、稲谷 大、内田博之

権利者：国立大学法人 福井大学

種類：特許

番号：特願 2017-181717

出願年：2017-9-21

国内外の別： 国内

名称：白内障の予防剤および治療剤、並びに、これらを製造するための、P P A R 活性化剤の使用

発明者：沖 昌也、金田文人、釜田和馬、高村佳弘、三宅誠司、内田博之、稲谷 大

権利者：国立大学法人 福井大学

種類：特許

番号：特願 2017-254614

出願年：2017-12-28

国内外の別： 国内

取得状況（計 0 件）

該当なし。

〔その他〕

ホームページ等
該当なし。

6．研究組織

(1)研究分担者
該当なし。

(2)研究協力者

研究協力者氏名：稲谷 大

ローマ字氏名：INATANI MASARU

研究協力者氏名：沖 昌也

ローマ字氏名：OKI MASAYA

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。