

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09408

研究課題名（和文）2光子励起顕微鏡を用いた網膜および視神経疾患における眼球深部動態観察

研究課題名（英文）Observation of ocular deep dynamics in retinal and optic nerve diseases using two-photon excitation microscopy.

研究代表者

臼井 審一（Usui, Shinichi）

大阪大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：20546882

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：マウスの眼球深部を生体で解析するための観察系の確立と新たなマウス高眼圧モデルの作成を行った。観察系には、非侵襲的な深部観察性能と高分解能を併せ持つ2光子励起顕微鏡を用いた。専用固定台を作成し、全身麻酔下で視神経を露出させ、眼外から生体観察を行うことに成功した。しかし、視神経を露出するための侵襲が問題で、今度は特殊なコンタクトレンズを用いて径瞳孔的にアプローチする手法を構築した。また、眼圧上昇モデルは、特殊針を用いて高濃度の粘弾性物質を前房内に留置する高眼圧モデルの作成に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑内障、視神経炎、圧迫性視神経症などの視神経疾患の病態を解明するためには生きた状態で観察する手法が不可欠であるが、これら眼球深部組織の生体観察は極めて難しい。そこで非侵襲的な深部観察性能と高分解能を併せ持つ2光子励起顕微鏡による深部イメージング技術を用いた眼球深部生体観察系の確立と、同時に新しい緑内障高眼圧モデルマウスを構築した。今後、視神経疾患の病態解明と軸索変性の抑制、さらには軸索再生に関わる研究に繋がりたいと考えている。

研究成果の概要（英文）：An observation system was established for in vivo analysis of the deep ocular surface of the mouse eye and a new mouse model of high intraocular pressure was created. For the observation system, a two-photon excitation microscope was used, which combines non-invasive depth observation performance with high resolution. A dedicated fixation table was created and the optic nerve was exposed under general anaesthesia, allowing in vivo observation from outside the eye. However, the invasiveness of exposing the optic nerve was a problem, and now a radial pupillary approach using special contact lenses was constructed. In addition, a model of elevated intraocular pressure was successfully created using a special needle to implant a high concentration of viscoelastic material in the anterior chamber.

研究分野：緑内障

キーワード：2光子励起顕微鏡 眼球深部 網膜 視神経 高眼圧 緑内障 生体観察

## 1. 研究開始当初の背景

緑内障をはじめとする視神経疾患は、網膜神経節細胞 (Retinal Ganglion Cell: RGC) の軸索障害とそれに伴う細胞死が病態と考えられている。その過程にはアポトーシスを招くさまざまな因子の関与が報告されているが、未だ不明な点も多い。近年、脳神経を取り巻くグリア細胞の役割が徐々に明らかにされ、視神経においてもアストロサイトが網膜神経節細胞の生存や軸索突起の伸展に重要な役割を担っていることが示唆されてきた。しかし、視神経疾患のように眼球深部組織に関する基礎研究は *in vivo* で行うことが難しく、主として *in vitro* での報告にとどまっている。そこで我々は、生きた現象を観察するための手法として2光子励起顕微鏡による深部イメージング技術を用いた眼球深部生体観察系の確立に取り組むことにより、これまでの基礎研究を裏付ける病態が解明され、創薬や遺伝子治療、再生医療などさまざまな分野で治療に寄与するものと考えられる。

## 2. 研究の目的

緑内障、視神経炎、圧迫性視神経症などの視神経疾患は、網膜神経節細胞の軸索障害から不可逆性の細胞死に至る。このうち高眼圧がトリガーとされる緑内障の主たる治療は、点眼や手術による眼圧下降であるが、我が国では低眼圧でも進行する病型が最も多く、眼圧下降のみで進行を抑えることが困難な症例も多い。それ故、依然として失明原因の中で高い割合を占めている。従って、軸索障害の原因となる真の病態を解明し治療に結びつけることが求められる。ところで脳は、ニューロン、血管およびグリア細胞で構成されており、ヒトの脳にはニューロンのほぼ10倍のグリア細胞が存在すると言われている。このうちアストロサイトはたくさんの小さな突起が血管を覆い、ニューロンと血管を密接に繋げている。以前は情報の伝達や処理には関与しないと考えられていたアストロサイトであるが、これまでの研究で、神経伝達物質受容体の発現や、受容体刺激により細胞内カルシウムイオン濃度が上昇しダイナミックに反応すること、その結果グルタミン酸などグリア伝達物質を遊離すること、エネルギー源の取り込みに直接関与していること、抗酸化力を持っていること、細動脈の血管径を変化させること、アクアポリン4や9といった水チャネルを発現していることなどが明らかとなり、今では網膜神経節細胞の生存、軸索障害に対する防御、軸索突起伸展に重要な役割を担っていると考えられるようになった。一方で、軸索障害に伴う反応性アストロサイトの増殖により形成されたグリア増殖は神経突起伸長阻害因子も大量に含み、軸索再生の障害になるとも言われている。このように、アストロサイトや軸索変性に関する知見が数多く報告されているが、こうした基礎研究は主として *in vitro* での結果が多く、生体観察という壁を乗り越えない限り真の現象は見えてこない。近年めざましい発展を遂げた生体イメージング技術は、神経科学、発生学、免疫学、血液学、がん研究などさまざまな分野に応用され、今や病態解明には不可欠である。とくに2光子励起顕微鏡は軸性方向の分解能が高く空間解像度をもった画像を取得できること、また蛍光分子の励起波長が近赤外線領域にあり、生体試料への吸収効率が低いため深部到達性が高いといった利点がある。このような特性によって脳の深部神経細胞の動態を非侵襲的に観察できるようになり、神経細胞の微細構造や活動のダイナミックな変化など、生体ならではの新しい発見が次々と報告されている。眼科領域でも、ライブイメージングによるミトコンドリアの軸索輸送など新知見が報告されている (Takahara Y et al.; Proc Natl Acad Sci. 2015)。このように視神経疾患をはじめとする

病態解明には生体観察が必要不可欠であるが、視神経をはじめとする眼球深部の生体観察は未だ難しく、これをいかに克服するかが今後の課題である。そこで、2光子励起顕微鏡を用いて網膜および視神経を主とした眼球深部生体観察系の確立を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### ( ) 2光子励起顕微鏡を用いた眼球深部生体観察系の確立

2光子励起顕微鏡の特徴である非侵襲的な不透明標本の深部観察性能と高分解能を活かして、生体における眼球深部組織、すなわち後極網膜から視神経乳頭さらに後部視神経にわたり精密な生体観察を行う。2光子励起顕微鏡の使用にあたっては、我々はこれまでに、マウス視神経乳頭部のアストロサイトを蛍光マーカである sulforhodamine101 の全身投与により染色し、全身麻酔下で生体観察することに成功している。マウス眼球深部観察用として改良を重ねた専用固定台を用い、イソフルラン吸入による全身麻酔下で尾静脈ルートを確認する。体温を一定に保つために固定台の温度調節を行い、心拍数をモニタリングした上で尾静脈から目的の蛍光色素を注入してタイムラプスで観察する。視神経乳頭付近のオリエンテーションには Hoechst33342 による核染色を予め行い、乳頭内及び周囲血管の同定には、Qtracker655 もしくは rhodamine dextran (60kD 以上) を使用する。観察には、これまでに行った手法で視神経に糸をかけて眼球を回旋し、眼球深部を外側からアプローチして行う手法の他、特殊なコンタクトレンズを用いて経角膜的に眼内から眼球深部の観察を行う手法を試みる。

#### ( ) 新規高眼圧モデルマウスの作成

粘弾性物質を前房内に注入する手法を確立する。腹腔内麻酔を施したマウスを散瞳剤で散瞳後、35G 針を用いて角膜輪部から粘稠度の高い粘弾性物質を前房内に注入し、前後で経時的に眼圧を測定する。眼圧測定は、手持ち眼圧計 rebound tonometer (TonoLab) を用いて両眼行う。

### 4. 研究成果

視神経および網膜には多くのアストロサイトが存在し、ニューロンである RGC と血管を取り巻き、ネットワークを形成している。まず、オリエンテーションを確認するためにマウスの尾静脈から FITC-デキストランと硫黄修飾ローダミンを投与し、血管と成熟アストロサイトを蛍光標識した摘出眼球を共焦点顕微鏡を用いて撮影し、細部に渡る鮮明な画像を得ることに成功した。しかし、共焦点顕微鏡を用いて眼球深部を生体で観察することは極めて困難なため、非侵襲的な高空間分解能を持つ多光子励起顕微鏡を用いた生体眼球深部組織観察系の確立を目指し、年月をかけて試行錯誤を繰り返した末、ようやく解析可能なレベルに到達することが出来た。当初は視神経のライブイメージングを強膜側からアプローチすることを試み生体画像を得ることに成功したが、糸を用いて眼球を回旋し視神経を露出させるため、牽引による侵襲をいかに軽減出来るかが課題であった。この問題を克服するために、角膜側から経瞳孔的にアプローチする方法を試みた。瞳孔を介して多光子励起顕微鏡で網膜を観察するためには収差を補償するための複雑な光学系を用いる必要があったが、近年の新たな光学系の技術進歩により、特殊なコンタクトレンズを用いて鮮明な網膜血管画像を生体で取得することに成功した。さらに、Brainbow 法を用いたマウスの眼球深部撮影を試み、網膜を構成する神経細胞を異なる複数の蛍光タンパクで標識した3次元網膜画像を取得することに成功し、個々の単一神経細胞やグリア細胞からなる網膜の立体構造を鮮明に把握することが可能となった。眼圧上昇モデルは、過去に報告された手法では安定した十分な高眼圧が得られにくいため、特殊針を用いて高濃度の粘弾性物質を前房内に

留置したところ、1時間毎に6時間まで安定して高眼圧が持続した。この手法により、確実に短時間の高眼圧が持続する独自の緑内障モデルマウスの作成に成功した。今後さらに検証を重ね、この高眼圧モデルを用いて RGC の細胞死を誘導し、多光子励起顕微鏡を用いた生体ライブイメージングにより視神経疾患の病態解明と軸索変性の抑制、さらには軸索再生に関わる研究に繋がりたいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件/うち国際共著 15件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Winegarner Andrew, Miki Atsuya, Kumoi Miho, Ishida Yuichiro, Wakabayashi Taku, Sakimoto Susumu, Usui Shinichi, Matsushita Kenji, Nishida Kohji	4. 巻 257
2. 論文標題 Anterior segment Scheimpflug imaging for detecting primary angle closure disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 161 ~ 167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00417-018-4171-x	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 該当する
1. 著者名 Sakimoto Susumu, Okazaki Tomoyuki, Usui Shinichi, Ishibashi Tomoyuki, Oura Yoshihito, Nishida Kentaro, Miki Atsuya, Kawasaki Ryo, Matsushita Kenji, Sakaguchi Hirokazu, Nishida Kohji	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 Investigative Ophthalmology and Visual Science	6. 最初と最後の頁 5745 ~ 5745
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Rong Shi Song, Lu Shi Yao, Matsushita Kenji, Huang Chukai, Leung Christopher K.S., Kawashima Rumi, Usui Shinichi, Tam Pancy O.S., Young Alvin L., Tsujikawa Motokazu, Zhang Mingzhi, Nishida Kohji, Wiggs Janey L., Tham Clement C., Pang Chi Pui, Chen Li Jia	4. 巻 180
2. 論文標題 Association of the SIX6 locus with primary open angle glaucoma in southern Chinese and Japanese	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Eye Research	6. 最初と最後の頁 129 ~ 136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exer.2018.12.014	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 該当する
1. 著者名 Miki Atsuya, Ikuno Yasushi, Weinreb Robert N., Asai Tomoko, Usui Shinichi, Nishida Kohji	4. 巻 2
2. 論文標題 En Face Optical Coherence Tomography Imaging of Beta and Gamma Parapapillary Atrophy in High Myopia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ophthalmology Glaucoma	6. 最初と最後の頁 55 ~ 62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ogla.2018.11.008	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 該当する

1. 著者名 Ishihara Kentaro, Hashida Noriyasu, Asao Kazunobu, Usui Shinichi, Maruyama Kazuichi, Nishida Kohji	4. 巻 10
2. 論文標題 Rare Histological Type of Adenoma of the Nonpigmented Ciliary Epithelium	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Case Reports in Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 75 ~ 80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000497033	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 該当する

1. 著者名 Shiozaki Daiki, Sakimoto Susumu, Shiraki Akihiko, Wakabayashi Taku, Fukushima Yoko, Oie Yoshinori, Usui Shinichi, Sato Shigeru, Sakaguchi Hirokazu, Nishida Kohji	4. 巻 9
2. 論文標題 Observation of treated iris neovascularization by swept-source-based en-face anterior-segment optical coherence tomography angiography	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10262 ~ 10262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46514-z	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 該当する

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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

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 and 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 該当する

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 該当する

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 and 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 該当する

1. 著者名 Takahashi Shizuka, Usui Shinichi, Hashida Noriyasu, Kubota Hiroshi, Nishida Kentaro, Sakaguchi Hirokazu, Nishida Kohji	4. 巻 21
2. 論文標題 Multimodal imaging of indapamide-induced bilateral choroidal effusion: a case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 386 ~ 386
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12886-021-02147-3	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 該当する

1. 著者名 Miki Atsuya, Okazaki Tomoyuki, Weinreb Robert N., Morota Misa, Tanimura Aki, Kawashima Rumi, Usui Shinichi, Matsushita Kenji, Nishida Kohji	4. 巻 31
2. 論文標題 Evaluating Visual Field Progression in Advanced Glaucoma Using Trend Analysis of Targeted Mean Total Deviation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Glaucoma	6. 最初と最後の頁 235 ~ 241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/IJG.0000000000001985	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 該当する

1. 著者名 Shiraki Akihiko, Sakimoto Susumu, Oie Yoshinori, Soma Takeshi, Miki Atsuya, Usui Shinichi, Sato Shigeru, Matsushita Kenji, Sakaguchi Hirokazu, Nishida Kohji	4. 巻 11
2. 論文標題 Inferior Removal of Dislocated Polymethyl Methacrylate Intraocular Lens and Scleral Refixation in Glaucomatous Eyes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ophthalmology and Therapy	6. 最初と最後の頁 881 ~ 886
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s40123-022-00477-z	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 該当する

1. 著者名 Sugimoto Ikki, Usui Shinichi, Okazaki Tomoyuki, Kawashima Rumi, Miki Atsuya, Kawasaki Ryo, Matsushita Kenji, Nishida Kohji	4. 巻 11
2. 論文標題 Early Three-Dimensional Intraocular Structural Changes in Primary-Open Angle Glaucoma and Exfoliation Glaucoma After Ex-PRESS Surgery	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Translational Vision Science and Technology	6. 最初と最後の頁 32 ~ 32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/tvst.11.2.32	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 該当する

1. 著者名 Usui Shinichi, Okazaki Tomoyuki, Fujino Takahiro, Kawashima Rumi, Hashida Noriyasu, Matsushita Kenji, Morii Eiichi, Nishida Kohji	4. 巻 23
2. 論文標題 Long-term course with iris changes after trabeculectomy for uveitic glaucoma associated with iris mammillation: a case report	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 103 ~ 103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12886-023-02854-z	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

〔学会発表〕 計0件

〔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	松下 賢治  (Matsushita Kenji)  (40437405)	大阪大学・大学院医学系研究科・准教授    (14401)	



## 6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	石井 優  (Ishii Masaru)		
研究協力者	菊田 順一  (Kikuta Junichi)		
研究協力者	河嶋 瑠美  (Kawashima Rumi)		
研究協力者	保倉 祐一  (Yasukura Yuichi)		
研究協力者	黄 為然  (Huang Wei Ran)		
研究協力者	山本 彩乃  (Yamamoto Ayano)		
研究協力者	山口 魁人  (Yamaguchi Kaito)		

## 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
---------	---------