

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09946

研究課題名（和文）フェレット緑内障モデルを用いた視覚中枢神経障害の解析

研究課題名（英文）Analysis of visual central nervous system using ferret glaucoma model

研究代表者

藤代 貴志（Fujishiro, Takashi）

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：60789600

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、培養結膜をフェレットの前房内へ投与することで、世界で初めてフェレット緑内障モデルを作成することに成功した。この緑内障モデルを用いることで、緑内障による神経障害は、眼球だけにとどまるのではなく、緑内障眼から投射する外側膝状体と視覚野にまで障害の影響が及んでいることを解明することができた。また、網膜神経節細胞の軸索障害、視覚中枢神経細胞の障害とグリア細胞の活性化を免疫染色法を用いることで確認できたが、眼圧上昇の程度と神経細胞障害とグリア細胞の活性化の関連性については、有意な関連性は確認できなかった。緑内障眼から投射する大脳の視覚野で代謝活性の減少が起きていることも確認することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の我々が行った研究から、緑内障による眼球の神経障害は、眼球だけで発症するのではなく眼球から神経が投射する中枢神経系の外側膝状体、大脳の視覚野にまで障害が及ぶことがわかった。緑内障は高眼圧によって視神経に障害が起き、視野欠損を生じるものとされ、眼圧下降が唯一の治療方法である。しかし、視覚中枢神経系にまで神経障害が起きるということは、眼圧を下げる治療だけでなく視覚中枢神経系の保護が緑内障治療において重要であると確認でき、中枢神経における神経保護を目的とした新しい緑内障治療法の重要性を確認する重要な研究となった。

研究成果の概要（英文）：We have succeeded in creating the ferret glaucoma model by injecting cultured conjunctiva into the anterior chamber of the ferrets for the first time in the world. Using this glaucoma model, we were able to elucidate that the neurological damage caused by glaucoma is not confined to the eyeball alone, but also affects the lateral geniculate nucleus and visual cortex projecting from the glaucoma eye. Axonal damage to retinal ganglion cells and damage to visual center neurons and glial cell activation were confirmed using immunostaining techniques, but no significant association between the degree of intra-ocular pressure elevation and neuronal damage and glial cell activation could be identified. It was also possible to confirm that a decrease in metabolic activity occurred in the visual cortex of the cerebrum projecting from the glaucoma eye.

研究分野：緑内障

キーワード：緑内障 フェレット 外側膝状体 視覚野

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでにマウスやラットを利用した多くの緑内障モデルが開発されているが、フェレットでは確立された緑内障モデルがない。我々は、迷入した結膜上皮細胞が前房内で増殖し続発性緑内障をきたすという epithelial downgrowth の病態を模倣し、in vitro で培養した結膜細胞懸濁液の注入することでフェレットでの緑内障モデルを世界で初めて確立する事ができた。網膜神経節細胞(Retinal Ganglion Cell: RGC)は、ヒトを含む霊長類では、Parvo cell、Magno cell、Konio cell の3つの細胞型に機能的に分類され、フェレットでそれに対応する細胞はX、Y、W cell として知られている。

(表1)

表1. ヒト、サルとフェレットの RGC の対応表

フェレット	サル、ヒト	RGC	機能
X	P	Parvo cell	形態覚、色覚の認識
Y	M	Magno cell	空間視、運動視の認識
W	K	Konio cell	青/黄の識別? 詳細は不明

この眼球の網膜における Parvo cell、Magno cell、Konio cell の3つのタイプの細胞は、高眼圧による障害の感受性が異なり、視神経からシナプスを介して外側膝状体に接続し最終的には視覚野(V1)へ投射するが、そこでの神経変性が解剖学的な網膜からの接続部位の異なりから生じている。これらの中で、青緑/黄色の識別処理を行う Konio cell (フェレットの W cell) の障害は、緑内障初期から Parvo cell (フェレットの X cell)、Magno cell (フェレットの Y cell) の障害よりも早くから起こるとされている。以上のことから、ヒトやサルにおける Konio cell すなわちフェレットの W cell の解析は緑内障研究において非常に重要となる。また、視覚の中継核である外側膝状体の構造は、サルやヒトと同様にフェレットでも6層の層構造を形成している。サルにおける LGN の層構造は1から6層と定義され、1, 4, 6層へは同側眼球の神経線維が投射し、2, 3, 5層へは対側眼球の神経線維が投射している。1, 2層は Magno cell から構成される細胞群を占めている一方、3, 4, 5, 6層は Parvo cell から構成される細胞群で占められている。Konio cell から構成される細胞群は、この6層にはっきりとした分布を示さず、1から6層の層間にわずかに存在するだけである。ヒトやサルの LGN において、Konio cell の解析が難しいため、緑内障の病因における LGN における Konio cell の障害や V1 の解析はこれまではほとんどなく、今後の検討が待たれていた。

2. 研究の目的

フェレットを用いて緑内障モデルを確立し、緑内障による視神経障害に伴う視覚中枢神経系の組織学的変化を検討すること

3. 研究の方法

- (1) 我々が開発したフェレットの緑内障モデルにおいて、眼球を視神経が付着した状態で頭蓋から摘出し、眼球は、凍結後の水平断面の切片(組織厚 : 10 μ m)を作成し、H.E で染色を行い、光学顕微鏡を用いて組織切片から網膜、視神経を評価した。LGN の組織変化とグリア系細胞の反応について解析を行った。
- (2) 眼球に蛍光色素でラベルをしたコレラ毒素 B を注入することで、緑内障眼からの投射を受ける LGN の各層でコレラ毒素 B の蛍光色素の取り込みを検討した。さらに LGN での神経細胞、グリア系細胞のアストロサイト、ミクログリアを特異的に標識するために NeuN、GFAP、Iba-1 を用いた免疫染色を行った。
- (3) 大脳の視覚中枢である V1 の A 層および C 層に CO 染色を行い、眼球から投射する V1 における代謝活性の違いを緑内障フェレットで比較した。

4. 研究の成果

- (1) 緑内障眼では、眼球の網膜、視神経における神経の障害が明らかになっただけでなく、そこから投射を受ける LGN の各層でコレラ毒素 B の蛍光色素の取り込みの減弱があることがわかった。(図 1、2)

図 1. 正常の眼球から LGN への神経投射

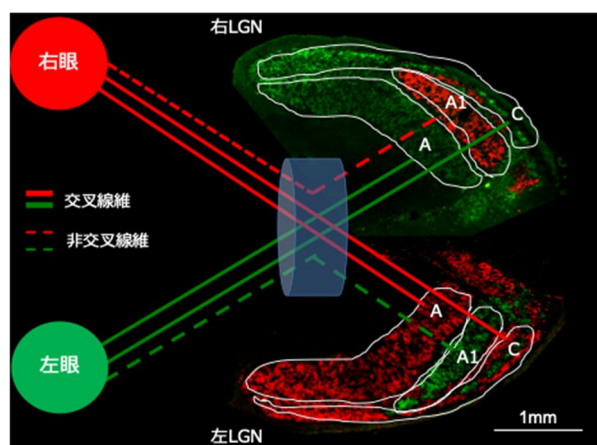
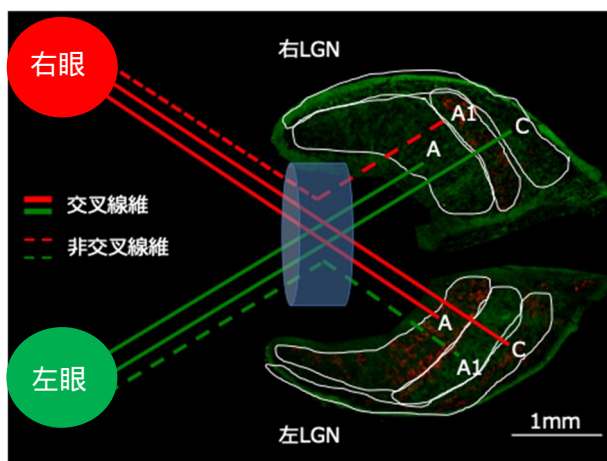


図 2. 緑内障(右眼)の眼球から LGN への神経投射



(2) 緑内障眼からの投射を受けた LGN の各層では、NeuN 陽性細胞の減少、GFAP と Iba-1 染色強度の上昇が観察された。LGN におけるこの免疫染色の違いは LGN の各層によって有意に異なっていた。具体的には C 層(W 細胞)が、A 層(X 細胞、Y 細胞)や A1 層(X 細胞、Y 細胞)よりも強い障害を受けていた。(表 2)

表 2. 緑内障フェレット LGN の A、A1、および C 層における軸索、神経細胞と神経グリア細胞の免疫染色強度と陽性細胞数の変化

Target	Labeling Method	Red (Elevated IOP)			Green (Normal IOP)		
		A	A1	C	A	A1	C
Axon	CTB	-66.79%	-71.5%	-80.9%	-25.1%	-22.1%	-26.8%
Neuron	NeuN	-36.6%	-34.6%	-38.4%	-6.4%	-3.5%	-6.6%
Astrocyte	GFAP	+42.3%	+6.4%	+30.4%	+4.9%	-3.1%	+1.6%
Microglia	Iba-1	+16.2%	+22.1%	+27.5%	-3.2%	-2.3%	+3.3%

A : LGN の A 層、A1 : LGN の A1 層、C : LGN の C 層

(3) 緑内障フェレットの V1 の右および左 C 層における C0 染色強度は、 39.8 ± 10.3 、 41.9 ± 9.2 arb.unit であった。コントロール群では 88.1 ± 8.1 arb.unit であった。緑内障眼から投射する C 層の C0 染色強度は、コントロール群よりも有意に低かった(図 3)。次に、緑内障フェレットの V1 の右および左 A 層の C0 染色強度は、 60.3 ± 12.8 、 60.0 ± 13.5 arb.unit であった。コントロール群では、 111.4 ± 9.6 arb.unit であった。緑内障から投射する IVC 層の C0 染色強度は、コントロール群よりも有意に低かった(図 4)。以上から、緑内障眼から投射する V1 では C0 染色強度が低下し、代謝活性の低下が示唆され、緑内障は眼球だけでなく、高次の視覚中枢の V1 にまで代謝活性の低下という神経活動の障害を引き起こすことを明らかにすることができた。

図3. V1の - 層におけるC0染色強度

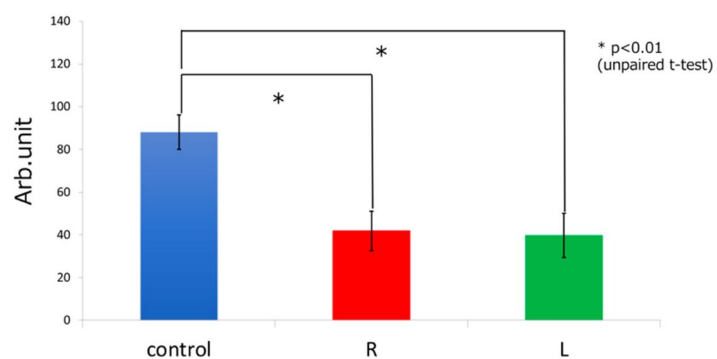
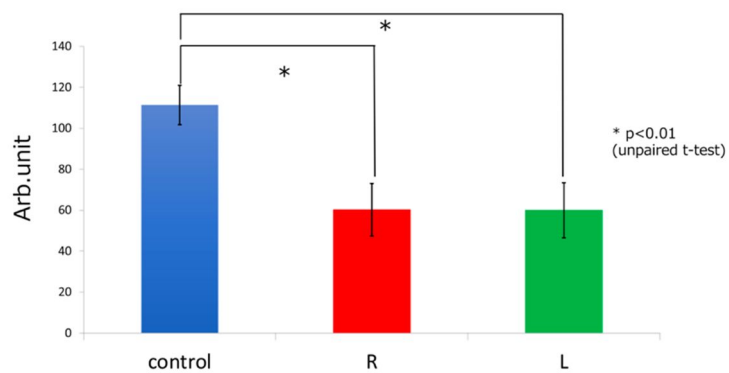


図4. V1の C層のC0染色強度



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fujishiro Takashi, Honjo Megumi, Kawasaki Hiroshi, Aihara Makoto	4. 巻 66
2. 論文標題 Visual cortex damage in a ferret model of ocular hypertension	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 205 ~ 212
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10384-022-00901-8	査読の有無 無
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 Fujishiro Takashi, Honjo Megumi, Kawasaki Hiroshi, Asaoka Ryo, Yamagishi Reiko, Aihara Makoto	4. 巻 21
2. 論文標題 Structural Changes and Astrocyte Response of the Lateral Geniculate Nucleus in a Ferret Model of Ocular Hypertension	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1339 ~ 1339
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21041339	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
---------------------------	-----------------------	----

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