

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22682

研究課題名（和文）緑内障視神経症における軸索流変化を捉える画期的な眼底イメージング

研究課題名（英文）Retinal imaging for axonal transport in glaucoma optic neuropathy

研究代表者

稲谷 大（Inatani, Masaru）

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：40335245

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、独自に作成したYFP-Thy1-mitoトランスジェニックマウスを用いて、医療用の共焦点走査型ダイオードレーザー検眼鏡で、マウスの網膜の視神経に分布するミトコンドリアを無侵襲で観察することに成功した。マウスで緑内障を再現したところ、視神経内のミトコンドリアが視神経軸索内で、一様な状態を保ったまま、サイズが縮小し、数が減少することが示された。ミトコンドリアのサイズと数減少が先行したあとで、網膜神経節細胞が細胞死を起こすことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、既存の医療機器を用いて、無侵襲で、網膜におけるミトコンドリアの分布を観察できた点に、学術的意義がある。眼球は透明な組織で構成されており、中枢神経組織である網膜における神経機能を光を用いて観察できるという点で大きなアドバンテージがあると言える。緑内障は日本人の失明原因のトップに位置する疾患であり、視神経が非可逆的に障害される前段階の視神経の機能を明らかにすることで、緑内障の早期発見早期治療に役立てられる社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：We have successfully observed mitochondria distributed in the optic nerve of the mouse retina noninvasively with a medical confocal scanning diode laser ophthalmoscope using our originally generated YFP-Thy1-mito transgenic mice. When glaucoma occurred in mice, mitochondria in the optic nerve were shown to shrink in size and decrease in number within the optic nerve axon, while maintaining a uniform distribution. Retinal ganglion cells were found to undergo cell death after the preceding reduction in mitochondrial size and number.

研究分野：緑内障

キーワード：緑内障

1. 研究開始当初の背景

緑内障は眼圧に依存して視神経乳頭付近の軸索輸送が停止することで、細胞死が生じると言われていた。しかし、その病態に関しては、組織学的な研究結果に基づいたものだけで、軸索輸送を動的に観察したデータではなかった。我々は、細胞内小器官のミトコンドリアが、網膜神経節細胞の軸索に豊富に分布し、軸索内を順行性逆行性に輸送されていることをライブイメージで明らかにした。しかし、この我々の研究の欠点として、2光子レーザー顕微鏡で用いた現在の観察システムでは、網膜の周辺部の網膜神経節細胞の軸索のごく一部を定点観測することしかできず、緑内障の病態の主座である視神経乳頭付近のミトコンドリア軸索流の変化を観察することや網膜全領域でのミトコンドリアの状態を観察することができなかった。したがって、眼圧上昇によって、網膜内のミトコンドリアが視神経乳頭付近でうっ滞するのか、逆に、密度が疎になるのかも不明である。

2. 研究の目的

緑内障では網膜神経節細胞の軸索(視神経)がダメージを受け、細胞生存に必要な物質の軸索輸送が停止し細胞死を起こし失明する。しかし、細胞死を起こす前に軸索輸送が停止する現象を網膜全領域で無侵襲かつ経時的に観察した報告はない。本研究の目的は、緑内障における軸索輸送の時間空間的变化を無侵襲かつライブイメージで観察し、その病態をあきらかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 我々は YFP-Thy1-mito-Tg マウスを独自に作成し繁殖維持している。網膜神経節細胞のマーカーである Thy1 のプロモータで誘導される YFP 蛍光色素で標識された COX8A 遺伝子(ミトコンドリア特異分子)を導入したマウスである。したがって、網膜神経節細胞のミトコンドリアが選択的に YFP 蛍光標識される。YFP の蛍光波長は、眼科診療で用いられている医療用の共焦点走査型ダイオードレーザー検眼鏡での蛍光検出に適しており、ヒトの眼科診療と同様に無侵襲で、網膜神経節細胞のミトコンドリアを経時的に撮像することが可能となる。さらに、網膜全領域を同時撮影可能であり、ミトコンドリアの分布やサイズの変化を網膜の各領域で比較することができる。

(2) マウスの緑内障モデルを作成し、ニデック社の F-10 共焦点走査型ダイオードレーザー検眼鏡で観察した。網膜神経節細胞が細胞死を起こすまでのミトコンドリアの経時的な変化を無侵襲に撮像した。

(3) マウスの緑内障モデルで観察されたミトコンドリア変化の分子メカニズムを検証するために、神経細胞培養実験をおこなった。細胞培養実験において、mitoTracker で軸索内のミトコンドリアを標識し、KillerRed を用いた chromophore-assisted 光不活化法で局所的にミトコンドリアを不活化させ、ミトコンドリアの軸索輸送をキモグラフで解析した。

4. 研究成果

(1) 我々は、独自に作成した YFP-Thy1-mito トランスジェニックマウスを用いて、医療用の共焦点走査型ダイオードレーザー検眼鏡(ニデック社 F-10)で、マウスの網膜の視神経に分布

するミトコンドリアを無侵襲で観察することに成功した。網膜神経線維層における視神経軸索内のミトコンドリアのうち、F-10の解像度で、静止しているミトコンドリアを観察することができた。以前の我々の研究で、2光子レーザー顕微鏡を用いた実験では、軸索輸送される動的なミトコンドリアも観察することができたが、F-10では、動的なミトコンドリアを検出することはできなかった。

(2) マウス緑内障動物モデルのミトコンドリアをF-10で観察したところ、視神経内のミトコンドリアが視神経軸索内で、一様な状態を保ったまま、サイズが縮小し、数が減少することが示された。ミトコンドリアのサイズと数減少が先行したあとで、網膜神経節細胞が細胞死を起こすことがわかった。

(3) 神経細胞培養実験での研究結果において、標識されたミトコンドリアには、静止したミトコンドリア (stationaryミトコンドリア) と移動するミトコンドリア (motileミトコンドリア) に分類された。生理的条件下においても、細胞培養の条件下においても、神経細胞の軸索におけるstationaryミトコンドリアの分布は、均一に分布していた。細胞培養実験において、mitoTrackerで軸索内のミトコンドリアを標識し、KillerRedを用いたchromophore-assisted光不活化法で局所的にミトコンドリアを不活化させると、ミトコンドリアの分布の均一性が乱れた。フォスフォクレアチン処理を行い、軸索内にATPを供給すると、motileミトコンドリアが活性化され、他のミトコンドリアの移動を促進した。軸索内のATP:ADP比が高いことと、軸索内のミトコンドリアの分布の不均一とは、負の相関が示された。Motileミトコンドリアが軸索内で活発に移動し、ATPを供給することで、軸索内におけるstationaryミトコンドリアの分布の均一化に関与することが示された。これらの研究結果は、緑内障視神経症において、視神経軸索が局所的に軸索絞扼された場合、絞扼された局所でミトコンドリアの輸送が停止するだけでなく、停止したミトコンドリアによって、ATPの供給が低下し、他のミトコンドリアの移動も停止し、軸索全体のミトコンドリア輸送の停止が引き起こされる我々のこれまでの観察データを反映していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Iwasaki K, Takamura Y, Orii Y, Arimura S, Inatani M.	4. 巻 13
2. 論文標題 Performances of glaucoma operations with Kahook Dual Blade or iStent combined with phacoemulsification in Japanese open angle glaucoma patients.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 941-945
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18240/ijo.2020.06.13.	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 Iwasaki K, Arimura S, Takamura Y, Inatani M	4. 巻 64
2. 論文標題 Clinical practice preferences for glaucoma surgery in Japan: a survey of Japan Glaucoma Society specialists.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 385-391
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10384-020-00749-w	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 Tsuji T, Inatani M, Tsuji C, Cheranov SM, Kadonosono K.	4. 巻 64
2. 論文標題 Oxytocin induced epithelium-mesenchymal transition through Rho-ROCK pathway in ARPE-19 cells, a human retinal pigmental cell line.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tissue Cell	6. 最初と最後の頁 101328
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tice.2019.101328.	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 Gozawa M, Takamura Y, Iwasaki K, Arimura S, Inatani M	4. 巻 20
2. 論文標題 Conjunctival structure of glaucomatous eyes treated with anti-glaucoma eye drops: a cross-sectional study using anterior segment optical coherence tomography.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 244
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12886-020-01518-6.	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 Iwasaki K, Kanamoto M, Arimura S, Takamura Y, Kimura H, Inatani M	4. 巻 3
2. 論文標題 Filtering Blebs after Baerveldt Glaucoma Implantation Using Magnetic Resonance Imaging: A Prospective Investigation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ophthalmology Glaucoma	6. 最初と最後の頁 221-224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ogla.2020.01.003.	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 Phan S, Satoh S, Yoda Y, Kashiwagi K, Oshika T; Japan Ocular Imaging Registry Research Group (Inatani M).	4. 巻 63
2. 論文標題 Evaluation of deep convolutional neural networks for glaucoma detection.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Jpn J Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 276-283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10384-019-00659-6.	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 Iwasaki K, Takamura Y, Arimura S, Tsuji T, Matsumura T, Gozawa M, Inatani M.	4. 巻 1
2. 論文標題 Prospective Cohort Study on Refractive Changes after Trabeculectomy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 4731653
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/4731653.	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 Yamazaki Y, Sugisaki K, Araie M, Murata H, Kanamori A, Inoue T, Ishikawa S, Yoshikawa K, Maeda H, Yamada Y, Negi A, Inatani M, Tanihara H, Okinami S, Mizuki K, Mishima K, Uchida K, Matsumoto S.	4. 巻 9
2. 論文標題 Relationship between Vision-Related Quality of Life and Central 10° of the Binocular Integrated Visual Field in Advanced Glaucoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 14990
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-50677-0.	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 Arimura S, Iwasaki K, Gozawa M, Takamura Y, Inatani M.	4. 巻 14
2. 論文標題 Trabeculectomy followed by phacoemulsification versus trabeculectomy alone: The Collaborative Bleb-Related Infection Incidence and Treatment Study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0223439
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0223439.	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2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 稲谷 大
2. 発表標題 How to create the excellent filtering bleb in Baerveldt glaucoma implantation. シンポジウム18 Hot topics: Glaucoma treatment
3. 学会等名 第74回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲谷 大
2. 発表標題 緑内障神経保護アップデート
3. 学会等名 第275回長野県眼科医会集談会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

福井大学眼科学教室
<http://www.med.u-fukui.ac.jp/GANKA/>
 福井大学医学部眼科学教室
<http://ganka-fukuimed.jp>

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