

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09774

研究課題名（和文）緑内障における、ミトコンドリアを軸とした神経節細胞機能障害の新規生体イメージング

研究課題名（英文）Novel intravital imaging of the retina to study retinal ganglion cell dysfunction related to mitochondria for glaucoma research

研究代表者

瀧原 祐史（Takahara, Yuji）

熊本大学・病院・講師

研究者番号：50640140

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではまず後極部を含めた網膜を生体にてイメージングするため、網膜神経節細胞(RGC)内のミトコンドリアが標識されているマウスを用いてRGCの細胞体、神経突起を認識できる解像度での経角膜的な網膜生体イメージングを確立した。RGCを比較的均一に障害するため視神経挫滅モデルを、自由度の高い標識を実現するためマウス硝子体注射の系を立ち上げた。加えてRGCの代謝を支えている網膜循環を評価するため、血管を標識し、経角膜および経強膜的な網膜循環の多色生体イメージングを確立した。今後、本研究で確立した経角膜および経強膜的な網膜の多色生体イメージングを駆使し、緑内障の新規治療法の創出を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本の中途失明原因の第一位である緑内障は視神経乳頭での網膜神経節細胞(RGC)の軸索絞扼で始まり、最終的にRGCの細胞死が生じると考えられている。この研究では、RGC内のミトコンドリアが標識されているマウスを用いて、RGCの細胞体、神経突起を認識できる解像度での、視神経乳頭周囲を含めた網膜の経角膜的な生体イメージングを確立した。加えてRGCの代謝を支えている網膜の循環を評価するため、血管を標識し、経角膜および経強膜的な網膜循環の多色生体イメージングを確立した。本研究で確立した経角膜および経強膜的な網膜の多色生体イメージングが緑内障の新規治療法の開発に役立つことが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, intravital imaging of the retina including the posterior pole through the cornea has been established with the resolution that can identify the cell bodies and neurites of retinal ganglion cells (RGCs), using mice in which RGC mitochondria were labeled. An optic nerve crush model to uniformly damage the mouse RGCs and intravitreal injection for mice have been set up. Additionally, in order to evaluate the retinal circulation that supports the metabolism of the RGCs, multi-color intravital imaging of the retina through both the cornea and sclera with the labeling of blood vessels has been established in this study. In the future, we aim to develop new therapies for glaucoma by using multi-color intravital imaging of the retina through the sclera and cornea established in this study.

研究分野：緑内障

キーワード：緑内障 経角膜的な網膜生体イメージング 多色同時励起による網膜生体イメージング ミトコンドリア 視神経挫滅モデル 前房注入による高眼圧モデル 2光子励起顕微鏡 網膜循環

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

老化関連疾患である緑内障は超高齢社会の日本において中途失明原因の第一位であり、眼圧下降以外の新規治療法の創出は社会的に重要課題である。しかし緑内障は多因子疾患であり、その病態を十分に解明できているとはいえない。申請者らは緑内障で障害される網膜神経節細胞(RGC)内のミトコンドリアの経強膜的な生体イメージングを確立し、RGCのミトコンドリア障害が緑内障病態に関わっていることを報告した。一方、申請者らが報告した、経強膜的な網膜の生体イメージングには後極部の観察が困難であるという、レーザー誘発高眼圧モデルには急性の高眼圧モデルであるという limitationがあった。

2. 研究の目的

そこで本研究では①経角膜的な後極部、視神経乳頭を含めた網膜の多色生体イメージングの確立、②新たな緑内障マウスモデルの検討、③マウスへの硝子体注射の系の確立、④経角膜および経強膜的な網膜循環の多色生体イメージングの検討、を目的とした。

3. 研究の方法

経角膜的な網膜の多色生体イメージング：RGCのミトコンドリアが標識されている Thy1-CFP-MitoS マウスの角膜が上を向くよう設置し、蛍光デキストランコンジュゲートを静脈注射した。2光子励起顕微鏡(エビデント、Fluoview FV1000MPE)にて、まず水銀灯下で虹彩に焦点を合わせた後、2光子励起モードに切り替え、Z面を下げて網膜に焦点を合わせ、RGCと網膜血管の生体イメージングを行った。

視神経挫滅モデル：外眼角を切り、結膜とテノン囊を切開して強膜を露出させた。次に視神経を露出し self-crossing forceps にて視神経を挫滅した。結膜と外眼角を縫合、抗生剤入り眼軟膏を塗布した。

網膜フラットマウントの免疫染色：4%パラホルムアルデヒド水溶液にて灌流固定を行い、網膜を摘出した。網膜に4箇所、切開を入れて網膜フラットマウントを作成し抗 RBPMS 抗体溶液、二次抗体溶液(遮光下)にインキュベートした。スライドガラス上に移し、VECTASHIELD Mounting Medium を滴下してカバーガラスを乗せた後、イメージングを行った。

経強膜的な網膜の多色生体イメージング：Thy1-CFP-MitoS マウスの強膜が上を向くよう設置し、蛍光デキストランコンジュゲートを静脈注射した。2光子励起顕微鏡にて、まず水銀灯下で強膜表面に焦点を合わせた後、2光子励起モードに切り替え、網膜色素上皮細胞に焦点を合わせた。そこからZ面を下げてRGCと網膜血管の生体イメージングを行った。

4. 研究成果

(1) 経角膜的な後極部、視神経乳頭を含めた網膜の多色生体イメージングの確立

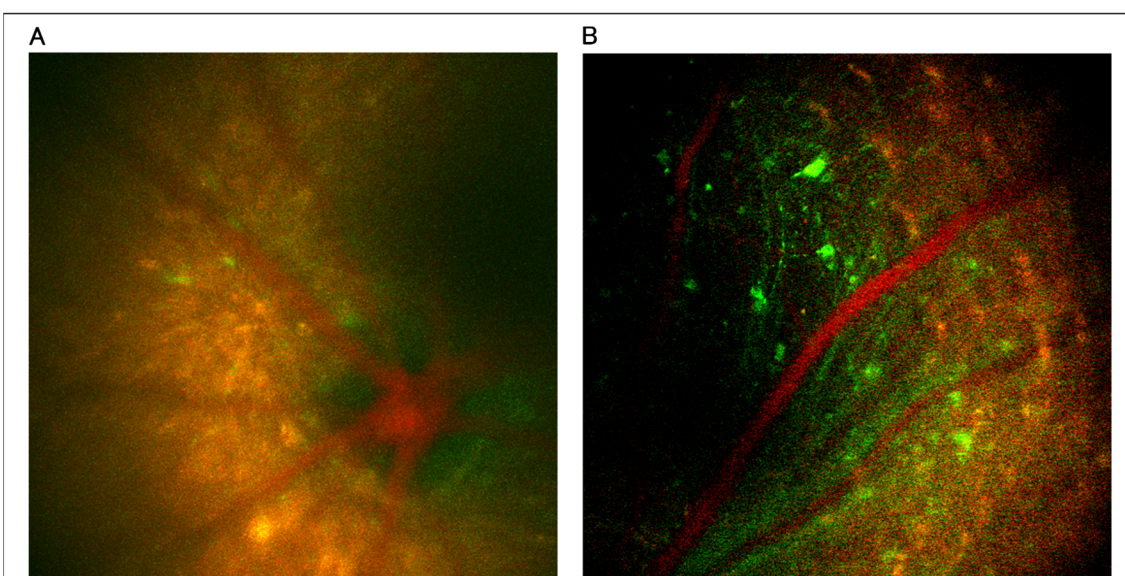
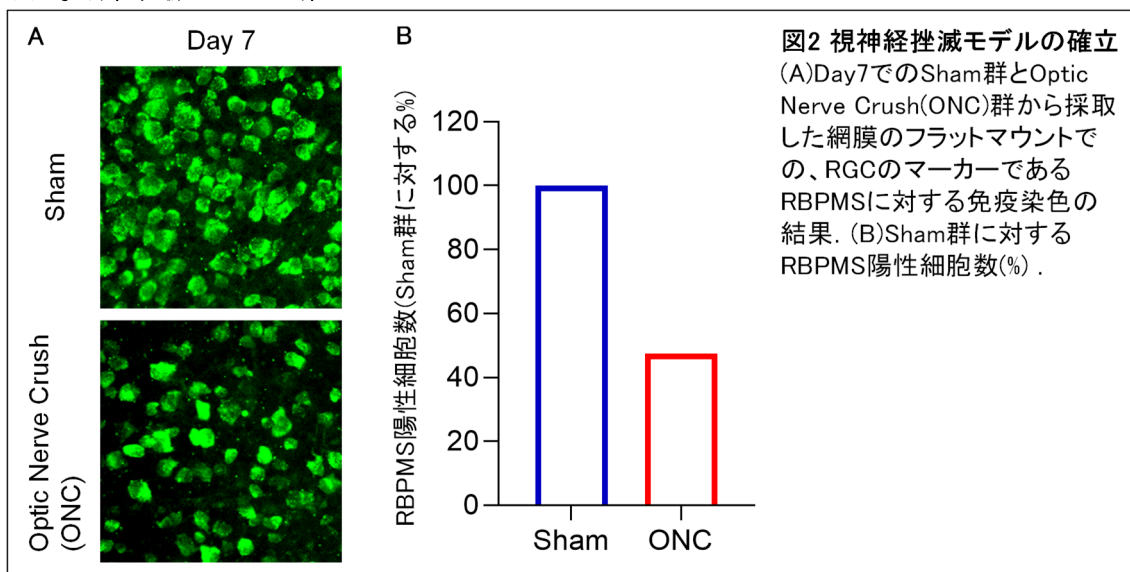


図1 経角膜的な後極部、視神経乳頭を含めた網膜の多色生体イメージング (A)蛍光デキストランコンジュゲートを静脈注射したThy1-CFP-MitoSマウスにおける、経角膜的な視神経乳頭周辺の多色生体イメージング. 緑:ミトコンドリア、赤:血管 (B)蛍光デキストランコンジュゲートを静脈注射したThy1-CFP-MitoSマウスにおける、経角膜的な網膜の多色生体イメージング. 緑:ミトコンドリア、赤:血管. RGCの細胞体、神経突起を認識できる解像度であることがわかる

経角膜的な網膜の生体イメージングの条件を検討後に得た結果を図1に示した。図1Aでは放射状に走行する網膜血管を確認でき、視神経乳頭をイメージングできていることがわかる。図1B

においては、この経角膜的な網膜生体イメージングにより RGC の細胞体、神経突起を認識できる解像度の画像を取得できていることがわかる。

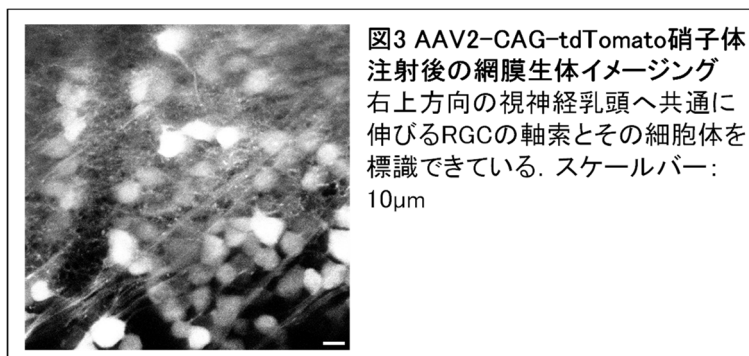
(2) 視神経挫滅モデルの確立



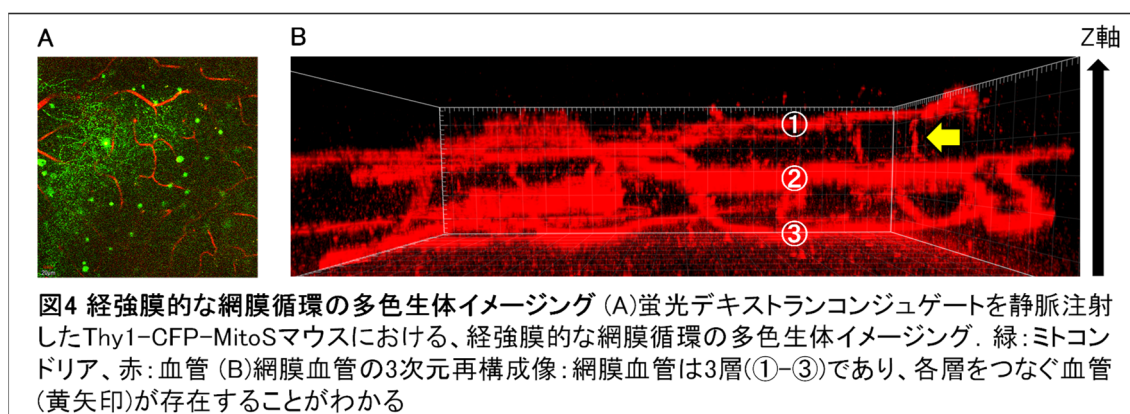
まずRGC障害を比較的均一に誘導するため、視神経挫滅モデルの手技を確立した。Day7でSham群とOptic Nerve Crush(ONC)群から採取した網膜のフラットマウントを作成し、RGCのマーカであるRBPMsに対する免疫染色を行ったところ、約50%までRGCが減少していた(図2)。より緑内障病態を反映している慢性眼圧上昇を誘導する前房注入モデルの系も現在、立ち上げつつある。

(3) マウスへの硝子体注射の系の確立

アデノ随伴ウイルス(AAV)によるRGCの自由度の高い標識を実現するため、熊本大学国際先端医学研究機構(IRCMS)の水野研との共同研究を開始し、マウスへの硝子体注射の系を検討した。コンタクトレンズでの眼底観察により針先の水晶体への接触を避けられる安定した系を立ち上げ、CAG-tdTomatoを組み込んだAAV2によりRGCの軸索とその細胞体を標識できることを生体イメージングで確認した(図3)。



(4) 経角膜および経強膜的な網膜循環の多色生体イメージングの確立



網膜は全身のなかで最も代謝が活発な臓器のひとつであり、その代謝を網膜循環が支えている。そのため、RGC周囲の網膜循環を生体イメージングで評価するため、Thy1-CFP-MitoSマウスに蛍光デキストランコンジュゲートを用いて血管を標識し、経角膜および経強膜的な網膜の多色生体イメージングを検討した。図1で示した経角膜的な網膜循環の多色生体イメージングに加え、経強膜的な網膜循環の多色生体イメージングの結果を図4に示した。例えば網膜血管の3

次元再構成像により、網膜血管の3つの層(図4Bの①から③)および各層をつなぐ血管(図4Bの黄矢印)をとらえた。

(5) 異分野融合による生体イメージング研究の基盤形成

生体イメージングに関連する成果として、熊本大学病院、熊本大学 IRCMS、国際先端科学技術研究機構(IROAST)から生体イメージング、生物画像解析、オミックス解析などの専門家が集結し、異分野融合による生体イメージング研究の基盤を形成した(Takihara et al. Commun Biol. 2022)。

Future planとして、観察目的に応じて、本研究で確立した経角膜および経強膜的な網膜の多色生体イメージングを駆使し、視神経挫滅モデル、高眼圧モデルなどにおける検討により、多因子疾患である緑内障の病態解明と新たな治療法の創出を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yuji Takihara, Takumi Higaki, Tomomasa Yokomizo, Terumasa Umemoto, Kazunori Ariyoshi, Michihiro Hashimoto, Maiko Sezaki, Hitoshi Takizawa, Toshihiro Inoue, Toshio Suda, Hidenobu Mizuno	4. 巻 5
2. 論文標題 Bone marrow imaging reveals the migration dynamics of neonatal hematopoietic stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 776
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-03733-x	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 Satoshi Iraha, Yuji Takihara, Yui Urahashi, Takahiro Watanabe, Kenichi Nakamura, Mai Urahashi, Fumika Watanabe-Kitamura, Kei-Ichi Nakashima, Eri Takahashi, Sachi Kojima, Hidenobu Tanihara, Toshihiro Inoue	4. 巻 12
2. 論文標題 Factors associated with the surgical outcomes of Baerveldt glaucoma implant for open-angle glaucoma, an age-related eye disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1359
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-04570-4	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 Chong Yang, Mitsuhiro Endoh, Darren Q Tan, Ayako Nakamura-Ishizu, Yuji Takihara, Takayoshi Matsumura, Toshio Suda	4. 巻 193
2. 論文標題 Mitochondria transfer from early stages of erythroblasts to their macrophage niche via tunnelling nanotubes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 British Journal of Haematology	6. 最初と最後の頁 1260-1274
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bjh.17531	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 Tomoyo Matsumura, Tomokazu Fujimoto, Satoshi Iraha, Akiko Futakuchi, Yuji Takihara, Fumika Watanabe-Kitamura, Eri Takahashi, Miyuki Inoue-Mochita, Hidenobu Tanihara, Toshihiro Inoue	4. 巻 15
2. 論文標題 TGF- β -induced activation of conjunctival fibroblasts is modulated by FGF-2 and substratum stiffness	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0242626
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0242626	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16件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 村田夏実、高橋枝里、小島祥、瀧原祐史、井上俊洋
2. 発表標題 Kahook dual bladeを用いた線維柱帯切開術眼内法手術成績と緑内障病型
3. 学会等名 第76回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 眞名子聖史、高橋枝里、小島祥、瀧原祐史、井上俊洋
2. 発表標題 毛様溝挿入バルベルト緑内障インプラント手術における角膜内皮細胞の減少に関する因子の解析
3. 学会等名 第33回日本緑内障学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 瀧原祐史、渡邊隆弘、小島祥、井上俊洋
2. 発表標題 遺伝性アミロイドーシスによる続発緑内障への線維柱帯切開術：各変異型における眼圧下降効果
3. 学会等名 第33回日本緑内障学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村健一、小島祥、瀧原祐史、井上俊洋
2. 発表標題 血管新生緑内障に対するバルベルト緑内障インプラント手術成績への線維柱帯切除術既往の影響
3. 学会等名 第33回日本緑内障学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊隆弘、瀧原祐史、植田光晴、三隅洋平、増田曜章、高橋枝里、小島祥、井上俊洋
2. 発表標題 アミロイドーシスによる緑内障に対してバルベルト緑内障インプラント挿入術を施行した3例4眼
3. 学会等名 第38回九州緑内障カンファレンス
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yui Urahashi, Yuji Takihara, Satoshi Iraha, Kei-Ichi Nakashima, Eri Takahashi, Sachi Kojima, Takahiro Watanabe, Kenichi Nakamura, Mai Urahashi, Fumika Watanabe-Kitamura, Toshihiro Inoue
2. 発表標題 Baerveldt glaucoma implant for open angle glaucoma: prognostic factors for surgical outcomes
3. 学会等名 The 9th World Glaucoma Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomoyo Matsumura, Tomokazu Fujimoto, Satoshi Iraha, Akiko Futakuchi, Yuji Takihara, Fumika Watanabe-Kitamura, Eri Takahashi, Miyuki Inoue-Mochita, Toshihiro Inoue
2. 発表標題 TGF- β -induced activation of conjunctival fibroblasts is modulated by FGF-2 and substratum stiffness
3. 学会等名 The 9th World Glaucoma Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浦橋佑衣、瀧原祐史、伊良波諭、中島圭一、高橋枝里、小島祥、渡邊隆弘、中村健一、浦橋舞衣、渡邊文香、井上俊洋
2. 発表標題 開放隅角緑内障に対するバルベルト緑内障インプラント：手術成績予後因子の検討
3. 学会等名 第125回日本眼科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤一徳、小島祥、中原敦子、瀧原祐史、中島圭一、渡邊隆弘、渡邊文香、浦橋舞衣、小島撰、高橋枝里、井上俊洋
2. 発表標題 当院におけるパターンスキャンレーザー線維柱帯形成術の治療成績
3. 学会等名 第32回日本緑内障学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 眞名子聖史、小島祥、神宮隆臣、増田曜章、瀧原祐史、植田光晴、井上俊洋
2. 発表標題 新型コロナワクチン接種後に発症した抗MOG抗体陽性視神経炎の1例
3. 学会等名 第75回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 瀧原祐史
2. 発表標題 シンポジウム「手術の効果を最大限に発揮するには？」トラベクトミー術後成績に関わる因子
3. 学会等名 第32回日本緑内障学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 瀧原祐史
2. 発表標題 シンポジウム「糖尿病眼合併症の難治例に挑む」血管新生緑内障の眼圧コントロール不良例
3. 学会等名 第75回日本臨床眼科学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 瀧原祐史
2. 発表標題 ミトコンドリア軸索流と緑内障
3. 学会等名 第5回AGTSの会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 瀧原祐史
2. 発表標題 軸索流障害と網膜神経節細胞死
3. 学会等名 第31回日本緑内障学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上田 祥太郎、瀧原 祐史、小島 祥、高橋 枝里、井上 俊洋
2. 発表標題 眼内レンズ挿入眼において瞳孔ブロックにより高眼圧が生じた1例
3. 学会等名 第566回熊本眼科集談会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuji Takihara
2. 発表標題 Baerveldt glaucoma implant for open-angle glaucoma: prognostic factors for surgical outcomes
3. 学会等名 The 13th Joint meeting of Korea-China-Japan (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 瀧原祐史	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 12
3. 書名 All About 開放隅角緑内障 第2版 「緑内障性視神経症の病態と軸索輸送」	

1. 著者名 渡邊隆弘、瀧原祐史	4. 発行年 2021年
2. 出版社 全日本病院出版会	5. 総ページ数 6
3. 書名 Oculista 特集:硝子体混濁を見逃さない! 「アミロイドーシス」	

1. 著者名 瀧原祐史	4. 発行年 2020年
2. 出版社 メディカル葵出版	5. 総ページ数 1
3. 書名 あたらしい眼科 「ミトコンドリアの生体イメージングからみた老化関連疾患としての緑内障」	

1. 著者名 瀧原祐史	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 2
3. 書名 臨床眼科増刊号 すべて見せます! 患者説明同意書マニュアル 「トラベクレクトミー」	

〔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	井上 俊洋 (Inoue Toshihiro) (00317025)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授 (17401)	
研究分担者	高橋 枝里 (Takahashi Eri) (60622602)	熊本大学・病院・講師 (17401)	
研究分担者	水野 秀信 (Mizuno Hidenobu) (00567159)	熊本大学・国際先端医学研究機構・特任准教授 (17401)	

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