

令和 6 年 5 月 4 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09690

研究課題名（和文）統合解析を用いた網膜神経節細胞別の脆弱性に関わる緑内障障害シグナル伝達経路の探索

研究課題名（英文）Exploring glaucoma damage signaling pathways involved in vulnerability by retinal ganglion cells using integrated analysis

研究代表者

面高 宗子（Omodaka, Kazuko）

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：80569583

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）：多因子疾患である緑内障のシンプルな障害動物モデルとしてマウスに視神経挫滅を実施し、挫滅2日後に眼球を摘出してFACSを実施した。RGCについて細胞サイズの大きい分画と小さい分画の2パターンに分けて細胞を回収した。視神経挫滅前の細胞サイズの小さいRGCと細胞サイズの大きいRGCを比較すると細胞サイズの大きいRGCでは、EGFやNGFなどの栄養因子がシグナルの中心にあることが示唆された。視神経挫滅前および視神経挫滅2日後における遺伝子発現変動を比較すると細胞サイズの小さいRGCではmp53やSP1など、細胞サイズの大きいRGCではp53やSP1などの転写因子がシグナルの中心にあることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑内障は成人中途失明原因第一位の眼疾患で、今後も緑内障による失明患者数の増加が確実視されている。緑内障の本態は網膜神経節細胞（RGC）の細胞死であるが、現行の治療は眼圧を下降させる治療のみでありアンメットメディカルニーズが存在する。

緑内障では太い軸索を有する大きなRGCが早期から障害され、小さなRGCはミトコンドリア障害に脆弱であることが知られている。本研究では緑内障のシンプルな障害動物モデルを作成し、RGCをセルソータでサイズ別に分取し、大小RGCの細胞死シグナルメカニズムを探索した。本研究結果より緑内障の個別化医療に資する薬剤開発に繋がられる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we used a simple animal model of glaucoma, a multifactorial disease, in which mice were subjected to optic nerve crush, and two days after crush, eyes were harvested and FACS was performed.

Comparison of RGCs with small cell size before optic nerve crush with those with large cell size suggested that trophic factors such as EGF and NGF were central to the signal in RGCs with large cell size. Comparison of gene expression changes before and 2 days after optic nerve crush suggests that transcription factors such as mp53 and SP1 are central to the signal in RGCs with small cell size and p53 and SP1 in RGCs with large cell size.

研究分野：眼科

キーワード：緑内障 網膜神経節細胞

## 1. 研究開始当初の背景

緑内障は現在も失明患者数が増加している眼疾患で、現行の眼圧下降治療をより適切に行うだけでは、正常眼圧緑内障が緑内障の70%を占める本邦においては、失明患者を減らすことに限界がある。その理由には緑内障は多因子疾患であることが挙げられ、眼圧以外にも近視や慢性虚血、酸化ストレス、ミトコンドリア障害など様々な障害因子が絡まって網膜神経節細胞(RGC)の細胞死が引き起こされる。申請者のグループはこれまでも、緑内障モデル動物を用いた網羅解析を行ってきたが、ヒト網膜には大きく分けて5種類の神経細胞が存在し、またRGCだけでも複数の種類があることが知られている。緑内障剖検眼の検討で、太い軸索を有するRGCの障害が病初期に引き起こされることが知られている。一般的な緑内障では周辺部から視野障害を生じやすい。一方、優性遺伝性視神経萎縮では、ミトコンドリアの融合に関わる遺伝子OPA-1が異常となり、黄斑部に局在する細い軸索を有するRGCの障害が著しく認められ、中心視野障害や視力障害を来す。このように、眼圧による軸索絞扼や、ミトコンドリア障害ではRGCの細胞サイズによって分類される細胞の種類によって脆弱性が異なり、ヒト緑内障眼のメカニズムを解明するヒントはこの細胞の種類とその特徴にあるのではないかと考えた。本研究では、RGCの種類を見分けるためにRGCの細胞サイズに着目し、虚血や酸化ストレスなどの障害因子における反応性の違いを網羅的アプローチで候補シグナル伝達経路明らかにすることにより、ヒト緑内障眼の新規治療のブレークスルーに繋がることを期待される。

昨今の創薬研究では、動物種に由来するバイアスのために、げっ歯類を用いた研究成果がヒト緑内障創薬に繋がりにくい傾向がある。また、ヒト緑内障病態が多因子疾患であることも障壁となっている。これらの問題を克服するために、虚血や酸化ストレス、炎症などシンプルな障害因子によるモデル動物を作成し、げっ歯類から大型動物、ヒトサンプルの網羅解析により複数の動物種をシームレスに扱うことで、ヒト緑内障に意義のある真の分子ターゲットを絞り込む手法は、学術的にも独創性が高い。一方、薬剤の分子ターゲットを絞り込むにも、昨今の網羅解析複数の候補が出てくることから、絞り込みには工夫と知識が必要である。本研究では遺伝子発現網羅解析とメタボローム解析を統合的に解析することを計画している。それぞれのシグナル経路を同定することは、様々なアーチファクトを最小限に、より有効に作用している重要な経路の同定に繋がると考えられる。その先駆的技術をセルソータで分取した細胞別に同定していくことは、難解な問題を解決する唯一の方法と考えられる。一方RGCはアデノ随伴ウイルス(AAV)の感染効率がよく、細胞特異的な遺伝改変が出来るのも当研究室の強みである。更に、家兎・豚・マーモセットでは、臨床の現場で使用している臨床画像検査機器を用いた解析も可能で、動物実験の技術が臨床の検査方法確立に応用可能で、極めて創造性が高い。こうして、ヒト緑内障のRGCの治療に繋がる細胞死の本質に迫ることが本研究課題の核心をなす。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞サイズ別の障害因子に対する脆弱性と細胞内シグナル伝達を明らかにすることにより、新たな治療薬ターゲットを明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

C57BL/6Jマウスより摘出した網膜はNeural Tissue Dissociation Kits(P)(Miltenyi Biotec)を用いて細胞を分離した。分離した網膜細胞はCD90.1(Thy1.2, 53-2.1), CD11b(M1/70), CD11c(HL3), CD31(MEC13.3), CD34(RAM34), CD45(30-F11)で染色し、BD FACSAriaII(BD Bioscience)でThy1.2+(CD11b, 11c, 31, 34, 45-)画を網膜神経節細胞(RGCs)として分取した。この際、死細胞は7AADで染色し除去した。また、small RGCs(S-RGCs)およびlarge RGCs(L-RGCs)はFSCとSSCのプロット図により分かれたポピュレーションにより分取した。この際、細胞集団に含まれる細胞の大きさの同定にはFlow Cytometry Size Calibration Kit (nonfluorescent microspheres)(Thermo Fisher Scientific)を用いた。FACSで回収した細胞からRNAを抽出し、RNA-seqを実施しIPAソフトウェアによるパスウェイ解析をおこなった。

## 4. 研究成果

緑内障モデルとして全身麻酔下のマウスに視神経挫滅を実施し、挫滅2日後に眼球を摘出してFACSを実施した。網膜神経節細胞分画の展開し、細胞サイズの大きい分画と小さい分画の2パターンに分けて細胞を回収した。回収した網膜神経節細胞分画のうち、細胞サイズの小さい分画は56.8%、細胞サイズの大きい分画は39.9%と、細胞サイズの小さい網膜神経節細胞数がやや多い割合となった(図1)。

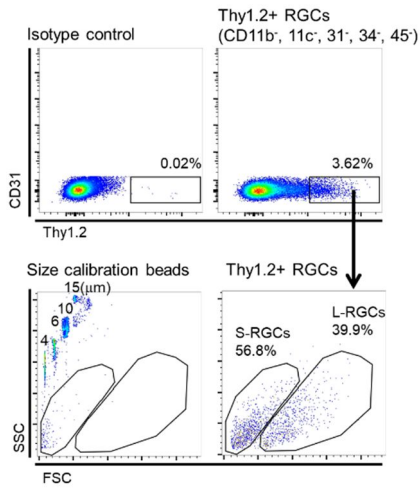


図 1、FACS による網膜神経節細胞細胞の単離とサイズ別分画のプロット

まず、視神経挫滅前のマウスにおいて細胞サイズの小さい網膜神経節細胞と細胞サイズの大きい網膜神経節細胞を比較したところ、細胞サイズの大きい網膜神経節細胞に特徴的な canonical pathway として Glutamate Receptor Signaling が抽出された。また、Upstream Regulators として RHO や CREB1, Causal Network として RHO が抽出された。代表的な変動遺伝子として NELL2 (fold 9.953), DOK5 (fold 9.596), GLRA3 (fold 9.551), PSCA (fold -26.887), KRT6B (-26.404), PDZK1IP1 (fold -24.214) が検出された。これら変動遺伝子情報から得られたネットワークから、EGF や NGF などの栄養因子がシグナルの中心にあることが示唆された (図 2)。

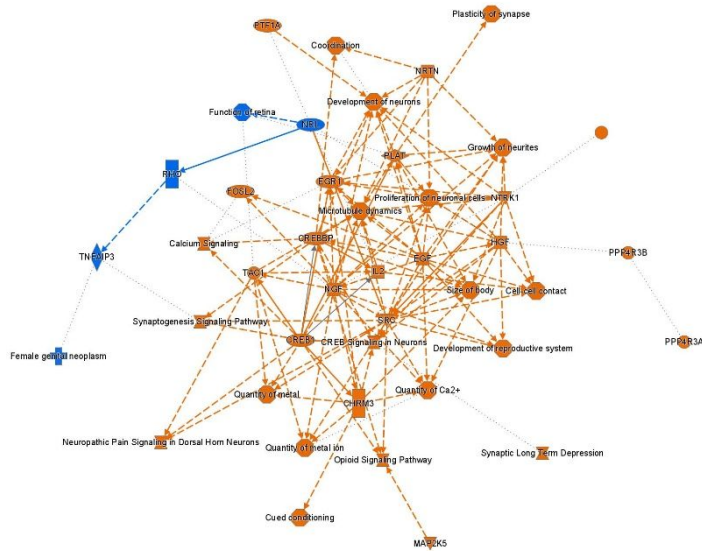


図 2、細胞サイズの大きい網膜神経節細胞に特徴的な遺伝子発現ネットワーク

続いて、細胞サイズの小さい網膜神経節細胞を対象として、視神経挫滅前および視神経挫滅 2 日後のマウスにおける遺伝子発現変動を比較したところ、特徴的な canonical pathway として GP6 Signaling pathway が抽出された。また、Upstream Regulators として TNF や TGFβ1, Causal Network として Alpha catenin が抽出された。代表的な変動遺伝子として MOB1 (fold 29.048), PRR18 (fold 11.103), ERMN (fold 9.715), ASPRV1 (fold -27.257), KRT12 (fold -26.949), Lypd2 (fold -26.267) が検出された。これら変動遺伝子情報から得られたネットワークから、p53 や SP1 などの転写因子がシグナルの中心にあることが示唆された (図 3)。

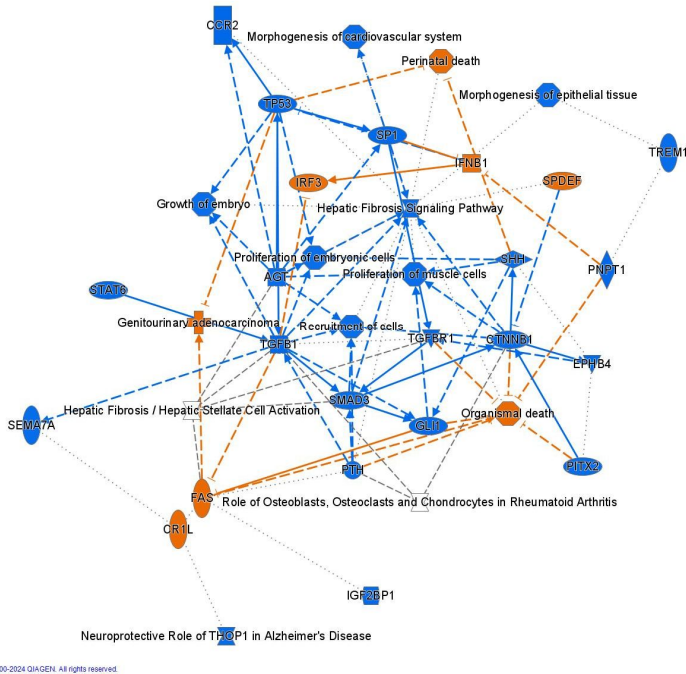


図 3、細胞サイズの小さい網膜神経節細胞の視神経挫滅における特徴的な遺伝子発現ネットワーク

細胞サイズの大きい網膜神経節細胞についても同様に、視神経挫滅前および視神経挫滅 2 日後のマウスにおける遺伝子発現変動を比較したところ、特徴的な canonical pathway として cGMP-mediated signaling が抽出された。また、Upstream Regulators として TNF や CR1L, Causal Network として IL-1R が抽出された。代表的な変動遺伝子として HBB (fold 9.432), HBA1/HBA2 (fold 8.415), Ecel1 (fold 8.390), LUM (fold -12.945), SPP1 (fold -12.329), ALDH3A1 (fold -10.063) が検出された。これら変動遺伝子情報から得られたネットワークから、p53 や SP1 などの転写因子がシグナルの中心にあることが示唆された (図 4)。

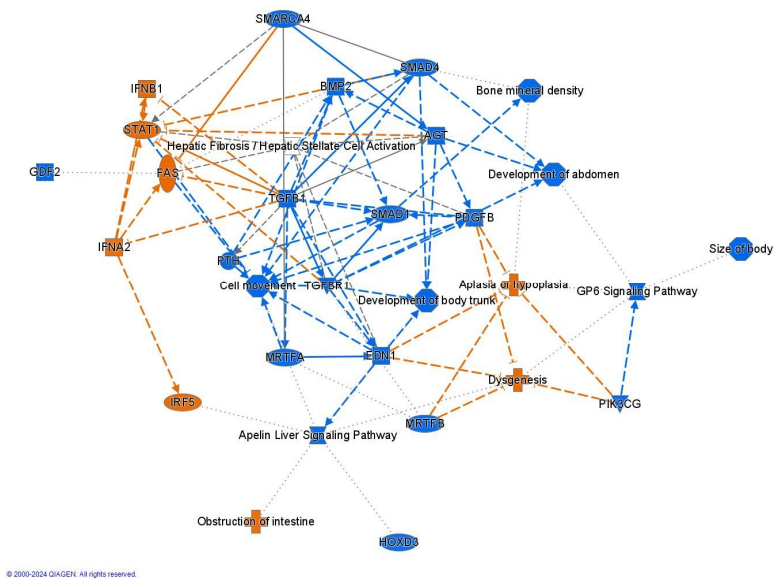


図 4、細胞サイズの大きい網膜神経節細胞の視神経挫滅における特徴的な遺伝子発現ネットワーク

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	岡田 眞里子  (Okada Mariko)  (10342833)	大阪大学・蛋白質研究所・教授    (14401)	
研究分担者	中澤 徹  (Nakazawa Toru)  (30361075)	東北大学・医学系研究科・教授    (11301)	
研究分担者	佐藤 孝太  (Sato Kota)  (50732327)	東北大学・医学系研究科・助教    (11301)	

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