

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25年 6 月 14日現在

機関番号：14501
 研究種目：若手（B）
 研究期間：平成23年度～平成24年度
 課題番号：23791983
 研究課題名（和文） 各種視神経症における軸索輸送の制御蛋白の関与
 研究課題名（英文） Involvement of regulating protein in axonal transport in optic neuropathies.
 研究代表者
 金森 章泰 (KANAMORI AKIYASU)
 神戸大学・医学部附属病院眼科・助教
 研究者番号：10444572

研究成果の概要（和文）：

軸索輸送のアンカー蛋白であるsyntaphilinの視神経内での発現、関与を調べた。視神経内ではアストロサイトに発現していた。網膜内では、網膜神経節細胞、網膜神経線維、アストロサイトが発現していた。また、脳内の視覚路である上丘では、神経細胞体に発現していた。網膜内でのsyntaphilinの発現をウエスタンブロットにて確認した。視神経切断により軸索障害をおこし、syntaphilinの変化を調べた。切断3日・7日後、視神経内でsyntaphilinの発現が有意に減少することをリアルタイムPCRおよび免疫染色にて確認した。視路におけるsyntaphilinの発現ならびに軸索障害時での変化は未だ報告がなく、今回の研究により初めて明らかになった。

また、視神経線維における臨床研究として、光干渉断層計を用いて緑内障ならびに圧迫性視神経症、外傷性視神経症における神経線維層厚の検討を行い、いくつかの海外雑誌で論文化された。

研究成果の概要（英文）：

We investigated the expression of syntaphilin in the rat retina, optic nerve and brain. The expression of syntaphilin had a various pattern in the visual system; syntaphilin was occasionally expressed at astrocytes, axons and retinal ganglion cells in the retina, and at cell bodies of neurons in the superior colliculus, while syntaphilin was abundant in the astrocytes of rat optic nerve, which was confirmed by human optic nerve. After optic nerve transection which caused RGC death and axonal degeneration, the gene expression change by quantitative real-time RT-PCR in rat retina and optic nerve was evaluated. Syntaphilin gene and protein expression in optic nerve was down-regulated at 3 and 7 days after optic nerve transection. Our study suggested that syntaphilin in astrocyte at the optic nerve might be involved in axonal injury. Furthermore, we reported axonal loss in human with optic neuropathies including glaucoma using optical coherence tomography.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	33000000	9900000	42900000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：眼生化学・分子生物学

1. 研究開始当初の背景

緑内障では軸索輸送障害がその初期の病態

から生じることが知られているが、その詳細なメカニズムや調節機構は不明である。軸索

輸送障害を解明することで、新たな治療法が発見される可能性がある。

2. 研究の目的

緑内障における網膜神経線維および視神経線維内の軸索輸送に関わる制御因子、特にミトコンドリア輸送のアンカー蛋白として近年発見された syntaphilin の関与を明らかにする。また輸送蛋白である kinesin, dynein についても同時検討する。

3. 研究の方法

(1) In vitro 系として、網膜神経節細胞の継体培養可能な細胞株である RGC-5 を用いて、各種ストレス負荷をかけ、3種の軸索輸送蛋白の変化を検討する。

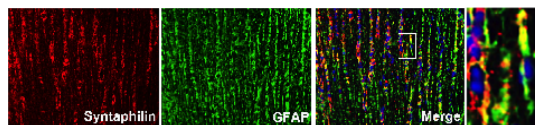
(2) 動物モデルとして、視神経切断モデルを用いる。フルオロゴールドにより逆行性標識された RGC を定量する。網膜伸展標本、網膜ならびに視神経の凍結切片、網膜伸展標本において、網膜神経線維ならびに視神経線維における kinesin, dynein, syntaphilin の蛋白発現を免疫染色を用いて経時的・空間的に検証する。ウェスタンブロッティングにより網膜および視神経における上記蛋白の蛋白量を定量化する。また、リアルタイムPCRを用いて遺伝子レベルでの変化を検討する。

4. 研究成果

(1) RGC-5細胞において、血清除去によるストレス下では3種の蛋白の有意な変化は認めなかった。高浸透圧負荷やストレッチによる機械的伸展負荷モデルを試したが、安定した病態モデルの確立には至らなかった。

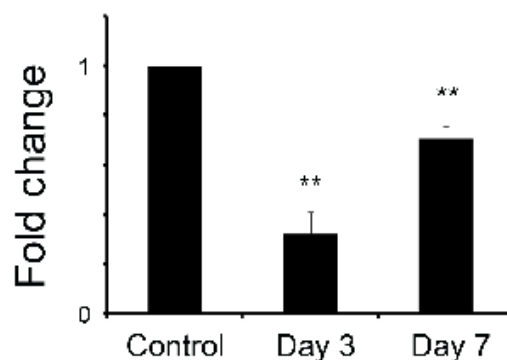
(2) 視神経切断を用いた in vivo モデルにおいて、kinesin, dynein は視神経切断前後で有意な変化を認めなかった。しかし、syntaphilin の視路における発現・機能に関する報告はな

く、本研究が初の試みとなる。視神経内では syntaphilin はアストロサイトに発現していることが免疫染色にて明らかになった。



(視神経内における syntaphilin (赤)、アストロサイトのマーカーである GFAP (緑)、核染色 (青) の免疫染色を示す。同一の染色パターンを有し、共存することから、syntaphilin はアストロサイトが発現していることが明らかになった。)

一方、網膜内では、網膜神経節細胞、網膜神経線維、アストロサイトで syntaphilin が発現していた。また、脳内の視覚路である上丘では、神経細胞体に発現していた。syntaphilin の発現はウェスタンブロットにて確認した。視神経切断により軸索障害をおこし、syntaphilin の変化を調べたところ、切断3日・7日後、視神経内では syntaphilin の発現が有意に減少することをリアルタイムPCRおよび免疫染色にて確認した。



(リアルタイムPCRによる視神経内の syntaphilin の発現変化を示す。視神経切断3日後、7日後において有意に発現が減少した。)

網膜内・上丘内でのリアルタイムPCRによる syntaphilin 発現変化は視神経切断3, 7日後で

は認めなかった。このように視神経切断によって視神経内のsyntaphilinはその発現が大きく減少し、軸索損傷後になんらかの関与をしている可能性がある。これらの成果は海外雑誌に投稿し、現在revise中である。

また、視神経線維における軸索障害の臨床研究として、光干渉断層計を用いて緑内障ならびに圧迫性視神経症、外傷性視神経症における神経線維層厚の検討を行い、いくつかの海外雑誌で論文化された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

1. Akashi A, Kanamori A, Nakamura M, Fujihara M, Yamada Y, Negi A. Comparative assessment for the ability of Cirrus, RTVue and 3D OCT to diagnose glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013 掲載確定.
2. Sakamoto M, Kanamori A, Fujihara M, Yamada Y, Nakamura M, Negi A. Assessment of IcareONE rebound tonometer for self-measuring intraocular pressure. *Acta Ophthalmol*. 2013 掲載確定.
3. Kanamori A, Nakamura M, Yamada Y, Negi A. Longitudinal study of retinal nerve fiber layer thickness and ganglion cell complex in traumatic optic neuropathy. *Arch Ophthalmol*. 掲載確定.
4. Kanamori A, Nakamura M, Tomioka M, Kawaka Y, Yamada Y, Negi A. Structure-function relationship among three types of spectral-domain optical coherent tomography instruments in measuring

parapapillary retinal nerve fibre layer thickness. *Acta Ophthalmol*. 2013;91:196-202.

5. Miki A, Kanamori A, Negi A, Naka M, Nakamura M. Loss of aquaporin 9 expression adversely affects the survival of retinal ganglion cells. *Am J Pathol*. 2013;182:1727-39.
6. Kanamori A, Nakamura M, Tabuchi K, Yamada Y, Negi A. Effects of ocular rotation on parapapillary retinal nerve fiber layer thickness analysis measured with spectral-domain optical coherence tomography. *Jpn J Ophthalmol* 2012.
7. Kanamori A, Nakamura M, Tomioka M, Kawaka Y, Yamada Y, Negi A. Agreement among three types of spectral-domain optical coherent tomography instruments in measuring parapapillary retinal nerve fibre layer thickness. *Br J Ophthalmol* 2012;96:832-837.
8. Kanamori A, Nakamura M, Yamada Y, Negi A. Spectral-domain optical coherence tomography detects optic atrophy due to optic tract syndrome. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2012.

[学会発表] (計2件)

1. 三木明子、金森 章泰、中村誠、根木昭視 神経切断モデルにおけるsyntaphilinの変化 (第23回日本緑内障学会、2012年9月27-29日、金沢)
2. Akiko Miki, Akiyasu Kanamori, Makoto Nakamura, Yoshiko Matsumoto, Junji Mizokami, Akira Negi, Syntaphilin is expressed in astrocytes in optic nerve and is down regulated in optic nerve after

axonal injury. (ARVO, 2013年05月04日～
2013年05月08日、シアトル 米国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金森 章泰 (KANAMORI AKIYASU)

神戸大学附属病院眼科助教

研究者番号：1 0 4 4 4 5 7 2