

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462660

研究課題名(和文)2光子励起顕微鏡を用いた眼球深部生体観察による緑内障マウス酸化ストレスの解析

研究課題名(英文) Analysis of oxidative stress in deep part of the glaucomatous eyes in mice by in vivo imaging using two photon excitation microscope

研究代表者

臼井 審一 (USUI, SHINICHI)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：20546882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：マウス緑内障モデルにおける酸化ストレスを生体で解析するための観察系の確立を行った。解析は2光子励起顕微鏡を用いて吸入麻酔下でマウスの眼球深部生体観察を行うための専用固定台を作成した。また、眼球深部観察のために視神経を露出させる手法を検討した。さらに、尾静脈の点滴ルートを確認し、薬物を常時全身投与可能とした。この系を用いて標的組織を生体で観察するために必要な薬物の投与量および時間経過を野生型マウスで検討した。

研究成果の概要(英文)：We established an observation system in vivo for analyzing oxidative stress in mouse glaucoma model. For the analysis, the special fixed base for observing the deep part of the eyeball in mice under inhalation anesthesia using a two-photon-induced microscope was prepared. We also examined a method of exposing the optic nerve. Furthermore, an intravenous route of the tail vein was secured, and the drug could be administered at any time. The dosage and time course of the drug required to observe the target tissue in vivo using this system was examined in wild type mice.

研究分野：緑内障

キーワード：2光子励起顕微鏡 緑内障 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

視神経が障害される代表疾患である緑内障は、我が国の失明原因の1位である。網膜神経節細胞の軸索障害とそれに伴う細胞死が病態と考えられているが、未だ詳細なメカニズムは解明されていない。現在の主たる治療は眼圧下降であるが、我が国では低眼圧で進行する正常眼圧緑内障が大部分を占めており、割合も世界で最も多い。病態解明と新規の治療が急務である中、これまでに細胞死の過程で生じる活性酸素種(Reactive Oxygen Species :ROS)が病態に関わっていることが報告されている。我々は、過去の知見をもとに、視神経において抗酸化に重要な役割を担っているであると推測されるアストロサイトに注目し、2光子励起顕微鏡を用いた眼球深部組織の分子生体観察という新たな手法を用いて、緑内障性神経症における酸化ストレス発生メカニズムの更なる解明と新規神経保護治療法の確立を目的とする。

2. 研究の目的

酸化ストレスとは生体内で活性酸素種(ROS)の生成と消去システムのバランスが乱れ、活性酸素群が過剰になる状態を言う。通常、酸素の一部はNADPH オキシダーゼ(NOX)によりスーパーオキシドに還元され、さらにスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)などにより酸素と過酸化水素に、過酸化水素はさらにカタラーゼ(catalase)やグルタチオンペルオキシダーゼ(GPX)により水まで還元されるが、この還元システムが崩れると、活性酸素のなかで非常に反応性が高いヒドロキシラジカルが生じる。ヒドロキシラジカルは100万分の1秒と寿命は短い酸化力は非常に強く、酵素蛋白質や細胞骨格蛋白質、脂質、糖質、核酸などと反応する。特に脂質を連鎖的に酸化させてしまい、細胞死を引き起こす。網膜色素変性症では、SOD1 もしくは SOD2 を単独で過剰発現させると酸化ストレスはかえって増大し二次的な錐体細胞死は加速するが、GPX4 やカタラーゼのような過酸化水素を水に還元する酵素を共に過剰発現させると酸化ストレスは軽減し、二次的な錐体細胞死は抑制された(Usui S, et al. *Mol Ther.* 2009;17(5):778-786)。また、SOD は SOD1 が細胞質基質に、SOD2 はミトコンドリアに発現するため、還元酵素である GPX4 やカタラーゼも各コンパートメントに共発現させて初めて抗酸化作用を示すこともわかった(Usui S, et al. *Free Radic Biol Med.* 2011;51:1347-1354)。また、SOD の上流、即ち酸素分子をスーパーオキシドに還元する NADPH Oxidase (NOX) の抑制剤である apocynin を rd1 マウスに腹腔内投与して酸化ストレスと二次的錐体細胞死の関係を解析したところ、二次的な錐体細胞死を抑制することが可能であった(Usui S, et al. *J Neurochem.* 2009;110(3):10281037, Komeima K, Usui S et al. *Free Radic Biol*

Med. 2008;45(6):905-912)。今回、研究のターゲットとしている視神経は、網膜神経節細胞の軸索を中心に構成された組織で、網膜からの視覚情報を大脳視覚中枢へ伝達する。視神経疾患のうち緑内障は、我が国では失明原因の常に上位を占め、社会的にも非常に重要な疾患で、疫学調査によると40歳以上の日本人における緑内障有病率は約5%に及ぶことがわかった。また新規発見率は89%であったことから、より多くの無治療患者が潜在していることが容易に推測される。その病態は、眼圧上昇などにより視神経乳頭内の篩状板が変形し、その中を通過する視神経線維が周囲のグリア細胞などの支持組織や血管組織とともに物理的に障害され、軸索輸送による神経栄養因子の輸送が逆行性に阻害されて網膜神経節細胞がアポトーシスを来し、対応した視野異常を起こすと考えられている。眼圧下降が現在の主たる治療であるが、正常眼圧でも進行するタイプがあり、今なお不明な点も多く、病態の解明と治療法の新規開発が必要とされている。

緑内障以外で神経細胞死を起こす中枢神経系疾患の中で、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病のような神経変性疾患における神経細胞死の過程で生じる ROS が、病態において重要な因子であることがわかっている。これは、脳の酸素消費量が多く ROS を産生しやすい環境であること、脂質に富んでいるため脂質過酸化も来しやすいこと、さらにカテコールアミンが豊富で自動酸化による酸化ストレスを生じやすいことにあると考えられる。神経変性疾患の一種である緑内障における篩状板レベルでの不可逆性軸索障害についても同様に酸化ストレスの影響が示唆されている。これまでに酸化ストレスにより生成されるラジカルが攻撃因子としてどのように関わっているか、また、どの攻撃因子を抑制すれば細胞死を免れるかが報告されてきた(Nakazawa et al. *J Neurosci.*, 2006;6;26(49):12633-12641, McElnea EM et al. *Mol Vis.*, 2011;17:1182-1191, Ryu M et al. *J Neurosci Res.*, 2012;90(4):802-815, Harada C. *Cell Death Differ.*, 2010;17(11):1751-1759)。中でも、主として神経細胞の栄養を担う細胞と考えられてきたアストロサイトが、抗酸化に重要な役割を担い、神経保護に大きく寄与していることが明らかになった。アストロサイトは、成熟した中枢神経系において最も豊富なグリア細胞で、Hernandez らによると緑内障眼の視神経におけるアストロサイト培養細胞は、脂質合成や代謝、ステロイド代謝、グルタチオン代謝に関わる遺伝子発現が上昇し(Hernandez MR et al. *Glia*, 2002;38,45-64)。また脂質酸化により産生される代謝産物の4-hydroxy-2E-nonenal (HNE)は、cfos、NFkB、nuclear factor erythroid 2-related factor2 (Nrf2)といった内因性抗酸化ストレス蛋白発現を制御する転写因子の発現を誘導するとともに、選択的抗酸化酵素である aldo-keto reduce

1C family member 1 (AKR1C1)や glutathione S-transferase- $\alpha 4$ (GCLC)の発現も上昇させる (Malone PE et al. *Exp Eye Res*, 2007;84(3),444-454)。これらの知見から申請者らは、緑内障性視神経症における軸索損傷で重要な役割を演じていると考えられるアストロサイトに注目し、正常眼および高眼圧モデルでのアストロサイトと網膜神経節細胞の形態変化を生体内で経時的に観察することにした。ただ、これまでの生体内評価は網膜レベルを共焦点顕微鏡 (Sabel BA et al. *Nat Med*, 1997;3:244-247) や走査レーザー顕微鏡 (Higashide T et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006;47: 2943-2950) により観察する手法で、眼球深部の観察は困難であるため、低侵襲かつ組織深部の微細構造や機能を生体観察できる 2 光子励起顕微鏡を用いて、視神経レベルの生体内組織観察を経時的に行う系を確立し、その上で緑内障眼における酸化ストレスとの関係を解析することを目的とする。

3. 研究の方法

観察系の確立

2 光子励起顕微鏡の特徴である非侵襲的な不透明標本の深部観察性能と高分解能を活かして、生体における眼球深部組織の精密な観察を行う。マウスの視神経乳頭部において、核、血管、アストロサイトなどの蛍光色素で染色し、生体観察する。より安定した系を確立するため、固定台の設計、マウス眼球の視神経の露出、麻酔法、蛍光マーカーの投与方法、観察時間の調整、白内障など観察中に起こり得る病態を確認する。アストロサイト生体染色は、蛍光マーカーである sulforhodamine101 をマウス尾静脈内に注射し、吸入麻酔下で後極網膜から視神経乳頭さらに後部視神経にわたり生体観察を行う。網膜神経節細胞の可視化には、Thy1-GFP transgenic mice (もしくは Thy1-CFP および Thy1-YFP transgenic mice)を用いる。

緑内障モデルマウス

レーザー誘発高眼圧モデルマウス (laser induced ocular hypertension mice) を作成する。生後 3 か月から 4 か月の CD-1 マウスおよび C57BL6 マウスの雄を使用し、麻酔は 90mg/kg ketamine HCl 6mg/kg Xylazine を腹腔内に注射する。角膜輪部と強膜上静脈にダイオードレーザー (532nm) を用い、100 μ m X 150mW x 0.2S で 270 から 300° の範囲、片眼のみ照射する。ICG を併用し強膜上静脈を特定することで C57BL6 マウスに応用する。眼圧測定は、90mg/kg ketamine HCl と 6mg/kg xylazine で麻酔した後、手持ち眼圧計 rebound tonometer (TonoLab) で測定する。日内変動を考慮して、午前 10 時と正午の間で測定し、麻酔の影響を除くために立ち直り反射が無くなり次第直ちに測定する。レーザーを施行した眼の眼圧が 21mmHg を越えたマウスのみ、高眼圧モデルとして使用する。

高眼圧モデルマウスにおける視神経乳頭篩状板レベルの活性酸素検出

活性酸素の一つであるスーパーオキシドを、hydroethidine を用いて検出し、野生型マウスと高眼圧モデルマウスを比較する (Usui S, et al. *Mol Ther*. 2009;17(5):778-86)。希釈液(20mg/kg)を 30 分毎に 2 回腹腔内投与し 18 時間が経過した後、吸入麻酔下 (90mg/kg ketamine HCl 6mg/kg Xylazine) で 2 光子顕微鏡を用いて生体観察する。高眼圧になってから何日で検出できるか、経時変化についても確認する。

4. 研究成果

顕微鏡はライカ社製顕微鏡・2 光子励起顕微鏡 TCS SP8 Scan head を使用した。まず、マウス眼球後部を生体観察するための専用固定台を設計し、問題点を一つ一つ修正し加工を繰り返しながら作成した。鼻部からの持続吸入麻酔はマウス眼球の観察に邪魔にならないように鼻部先端チューブの形状を加工した。また、眼球をしずかに脱臼させ、専用シートで裏打ちし、視神経を圧迫させないように 8-0 バイクリル糸により回旋させ、水浸式対物レンズの形状にあわせて特別加工した金属で固定した。また固定台は、眼球深部の視神経露出部位が水平になるようマウス頭部の傾きを両眼ともに自由に調整できる設計を考案した。

続いて、野生型マウスの網膜伸展標本を用いて各種蛍光色素の検出条件を検討した。腹腔内麻酔を行った後、30G 針で尾静脈のルートを確認し、生理食塩水で極小チューブを満たした。最初に Hoechst33342 の検出条件を検討したところ、網膜および視神経近傍の核が十分に染色されるためには注入後 30 分以上の経過が望ましいことがわかった。次に sulforhodamine101 の染色条件を検討した。こちらは拡散が早く、ライブイメージングでは検出することが可能であるが不安定であり、固定標本には向かないと考えられた。また、フルオレセインイソチオシアナートデキストラン average mol wt 150,000 を用いて血管の検出を試みた。薬物注入後早期で検出可能であることが示唆される結果であったが、拡散が早いので固定標本には不向きでライブイメージングに適していると考えられた。以上の結果より、実際に 2 光子励起顕微鏡で観察する際には予め Hoechst33342 を注入し、少なくとも 30 分以上が経過した後に固定台を顕微鏡にセッティングし、眼球深部のオリエンテーションを確認した後に静脈ルートから sulforhodamine、フルオレセインイソチオシアナートデキストランを適宜注入して生体観察する手法が望ましいと考えられた。

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7件)

Miki A, Kumoi M, Usui S, Endo T, Kawashima R, Morimoto T, Matsushita K, Fujikado T, Nishida K. Prevalence and Associated Factors of Segmentation Errors in the Peripapillary Retinal Nerve Fiber Layer and Macular Ganglion Cell Complex in Spectral-domain Optical Coherence Tomography Images. *J Glaucoma*. 2017;26(11):995-1000.

Miki A, Ikuno Y, Weinreb RN, Yokoyama J, Asai T, Usui S, Nishida K. Measurements of the parapapillary atrophy zones in en face optical coherence tomography images. *PLoS One*. 2017;12(4): e0175347.

Miki A, Ikuno Y, Weinreb RN, Yokoyama J, Asai T, Usui S, Nishida K. Measurements of the parapapillary atrophy zones in en face optical coherence tomography images. *PLoS One*. 2017;12(4): e0175347.

Kobayashi R, Hashida N, Soma T, Koh S, Miki A, Usui S, Maeda N, Nishida K. Clinical Findings of Anterior Segment Spectral Domain Optical Coherence Tomography Images in Cytomegalovirus Corneal Endotheliitis. *Cornea* 2017; 36:411-414.

Miki A, Kawashima R, Usui S, Matsushita K, Nishida K. Treatment Outcomes and Prognostic Factors of Selective Laser Trabeculoplasty for Open-angle Glaucoma Receiving Maximal-tolerable Medical Therapy. *J Glaucoma*. 2016; 25:785-789.

Asai T, Ikuno Y, Akiba M, Kikawa T, Usui S, Nishida K. Analysis of Peripapillary Geometric Characters in High Myopia Using Swept-Source Optical Coherence Tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016; 57:137-144.

Miki A, Ikuno Y, Asai T, Usui S, Nishida K. Defects of the lamina cribrosa in highly myopia and glaucoma. *PLoS One*. 2015, 10:e0137909.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

臼井審一 (Shinichi Usui)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号：20546882

(2)研究分担者

松下賢治 (kenji Matsushita)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号：40437405

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者 なし