

令和元年6月3日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26462684

研究課題名(和文) ラマン分光法を用いた生体内ミトコンドリア機能の評価法の開発と視神経疾患の病態解明

研究課題名(英文) Development of Raman imaging technique of Mitochondrial function in optic neuropathies

研究代表者

森本 壮 (Morimoto, Takeshi)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00530198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：分子特有の振動を検出できるラマン分光法を用いて視神経疾患患者の網膜神経節細胞の機能や変性の進行を評価するために、ラマン分光法を用いてミトコンドリア機能の評価する方法を確立するために、本研究を遂行した。当初の目標であった視神経疾患での網膜神経節細胞のミトコンドリア機能の評価するところまでは、研究は進まなかったが、培養網膜細胞でのグルタミン酸を用いた細胞死モデルでは、細胞死を起こす細胞ではミトコンドリア内に存在する還元型cytochrome cが酸化型cytochrome cに変化することをラマン分光法を用いて捉えることができることを他の分子生物学的手法と比較検討し証明し、論文発表を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラマン分光法を眼科領域に用いた研究は少なく、本研究は、網膜細胞の酸化還元状態をラマン分光法で評価できることを示した、最初の論文であり、学術的意義が高いと考える。また本研究によって、今後、ラマン分光法の眼科領域への応用が活発になされるものと考えている。また、ラマン分光法は従来の分子生物学的検査とはことなり、物体に照射した光の反射のうちラマン散乱光を測定するだけであり、ラマン分光法を捉えるためには特殊な計測装置は必要であるため簡便ではないが、生体を固定したり、染色したりする必要がなく、生体のありのままの状態を捉えることができるため、将来の臨床応用が可能であり社会的な意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial activity is a widely used criterion to judge the metabolic condition of a living specimen. In this study, we demonstrate that the redox state of cytochromes can serve as a sensitive mitochondrial activity indicator in glutamate-stressed neuronal cells. Mitochondrial dysfunction was detected by Raman imaging as early as 30 min after glutamate-stress induction. By comparing this result with other commonly used mitochondrial function assays, we found Raman imaging has a similar sensitivity to ATP production and trans-membrane potential assays. Other viability tests, such as MTT assay and ROS production tests, showed a slower response than our method. A thorough understanding of cytochrome dynamics with our new method will help establish Raman spectroscopy as a competitive clinical diagnosis tool for neurodegenerative diseases involving mitochondrial dysfunction.

研究分野：眼科学

キーワード：ラマン分光法 視神経疾患 ミトコンドリア機能 酸化ストレス 細胞死 網膜神経節細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

近年、光学系の研究の進歩により、生体を非侵襲的に計測できる機器が開発され、これらが医療の分野にも応用されている。眼科領域では光断層干渉計や補償光学眼底カメラなどが臨床で用いられている。これらの機器では、組織や細胞の形態あるいは構造について詳細な情報を得ることが可能で、つまりどの程度、組織や細胞が損傷され変性しているかを詳細な“形”として把握することが可能である。この形態の情報は、治療を行う上で非常に有用であるが、一度の測定だけでは進行の予測はできない。つまり、これらの機器では、現時点での組織や細胞の変性の程度を知ることができるが、この組織や細胞の変性が今後進行していくのか止まるのかを知ることができない。このため、新たな方法で、生体組織や細胞の機能を把握する評価法の開発が必要である。

最近、ラマン分光法の研究が進み、生命科学分野へ応用されるようになってきている。ラマン分光法は、ラマン散乱光を利用した方法である。ラマン散乱光とは光が物質に入射して分子と衝突した際に、生じるわずかな散乱光のうちの極わずかな成分で、このラマン散乱光の振動数が、その分子の固有振動数になっており、ラマン分光法は、このラマン散乱光の性質を調べることで、物質の分子構造や結晶構造などを非染色で非破壊的に知る方法である。

本研究で使用するラマン顕微鏡は、本工学部応用物理学科(河田研)で開発され、細胞内の **cytochrome c (cyt c)** のラマン波を精密に計測することが可能で、この **cyt c** に基づいたラマン画像を作成することに成功している。その技術を用いて、ヒト由来の不死化細胞である **Hela** 細胞の細胞分裂時のミトコンドリアの変化 (**Watanabe, et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007**) や **Hela** 細胞に対するアポトーシス刺激で、ミトコンドリアからの **cyt c** の放出現象を捉えることに成功している (**Okada, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2012**)。これらの研究結果から、**cyt c** とミトコンドリアは細胞の生存や細胞死において密接に関係しており、**cyt c** の変化がミトコンドリアの状態の指標、つまりミトコンドリアの機能とそれに伴う細胞の生死を判別できる可能性がある。しかも非染色で、非侵襲的に計測が可能であるため医療への臨床応用が多いに期待が持てる。

しかしながら、ラマン分光法の医療への利用を目的とした研究はまだ十分行われておらず、本研究を行うに至った。

## 2. 研究の目的

本研究はラマン分光法を利用したラマン顕微鏡を用いて、生体内のミトコンドリア機能の新たな評価方法を開発し、このミトコンドリア機能の評価に基づき、**Leber** 遺伝性視神経症(ミトコンドリア病)やその他の網膜視神経変性疾患の病態の解明を目指す。しかしながら、生体に対するラマン分光法の応用は始まったばかりで技術や用途は確立されておらずラマン画像の示す生物学的意味についても十分解明されていない。そのために、研究期間内に以下に示す研究を行う。

(1) グルタミン酸負荷による培養網膜神経細胞 (**RGC5**) 細胞の細胞死に至る各段階での **cytochrome c (cyt c)** のラマン画像の生物学的意味の解明、(2) 細胞死に至る過程でのラマンシフトの全体的な変化を解析し、ラマンシフト全体での生物学的意味の解明。

## 3. 研究の方法

(1) グルタミン酸負荷による培養網膜神経細胞 (**RGC5**) の細胞死に至る各段階での **cytochrome c (cyt c)** のラマン画像の生物学的意味の解明。

本研究(1)については以下の4項目について研究を行う。

網膜神経細胞の不死化した細胞である **RGC5** を用い、**RGC5** に対してグルタミン酸を負荷し細胞死を誘導させ、投与から細胞死に至るまで、経時的にラマン顕微鏡で測定する。測定したラマン波から **cyt c** のラマン波に基づいたラマン画像を作成する。

ラマン画像が何を示すのか解明するため、**cyt c** の免疫組織染色や細胞の生死に関係するミトコンドリアを **Mitotracker®** を用いて染色し、ラマン画像と対比させる。また電子顕微鏡標本を作製し、細胞死に至る過程でのミトコンドリアや核の形態変化についても検討する。

形態学的検討だけでなく、細胞内の **cyt c** のタンパク濃度とラマン画像の **cyt c** のシグナル強度の関連についても **ELISA** 法を用いて検討する。またミトコンドリアの変性について生化学的にミトコンドリアエネルギー代謝を測定し、ラマン画像と比較する。

ラマン信号の定量法は現時点では、確立されていない。このため統計解析が可能なラマン信号の定量方法を確立し、定量を行い、ラマン信号の生物学的意味を解明する。

(2) 細胞死に至る過程でのラマンシフト波形の全体的な変化を解析し、ラマンシフト全体での生物学的意味の解明

ラマン波は **cyt c** だけでなく様々な分子振動のラマン波が測定され、ラマンシフトと呼ばれる波として捉えられる。本研究の前段階の実験で、正常細胞のラマンシフトと細胞死を起こした細胞のラマンシフトを比べると大きく異なっていた。特に細かい波が変性の進行によって消失していた。この変化を数値化できる方法として独立成分分析などの線形分析の手法を用いて解析する。目標は、客観的な評価に用いられるように数値化や記号化することであり、それが可能かどうか検討する。

## 4. 研究成果

研究方法(1) - の結果: グルタミン酸投与による **RGC5** のラマンシグナルの変化。グルタミン酸投与により **RGC5** に細胞死が誘導され、投与後 30 分、1 時間、90 分、2 時間と徐々に細胞死が進行した。

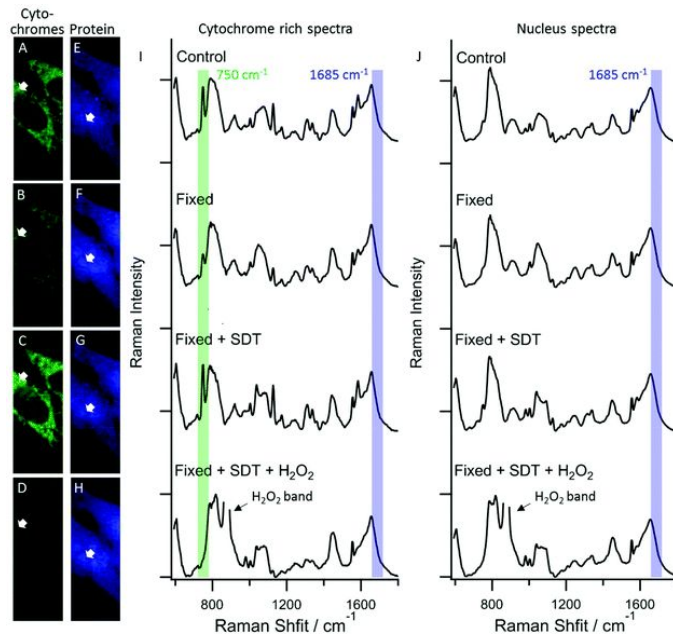


図 1 グルタミン酸投与による RGC5 内のラマンシフトの変化

図 1 のように細胞質内の cyt c のラマンシグナル(緑)が徐々に低下した(中央)。一方、核では cyt c のシフトは見られず(右) たんぱくのシグナル(青)は変化がなかった。

方法(1) - の結果：

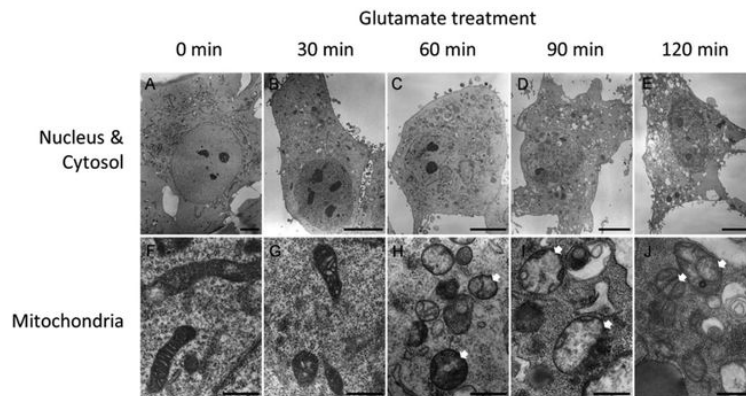


図 2 RGC5 の電子顕微鏡像

ラマンシグナルの変化について、電子顕微鏡像と比較したところ、図 2 のように cyt c のラマンシグナルが低下する 30 分後ではミトコンドリアの変性が始まっていた。

ミトコンドリアを染める Mitotracker や cyt c の免疫染色と比較したところ図 3 のように、形態は変化しているが染色は変化しなかった。このことからグルタミン酸投与によって減少した cyt c のラマンシグナルは、還元型 cyt c から酸化型 cyt c に変化したためであることが分かった。

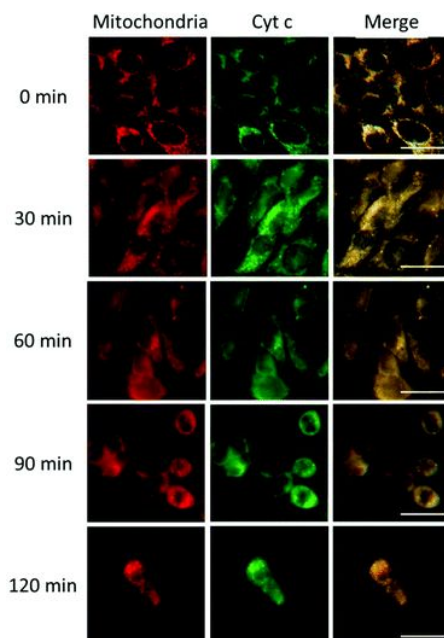


図 3 ミトコンドリアと cyt c の免疫染色像

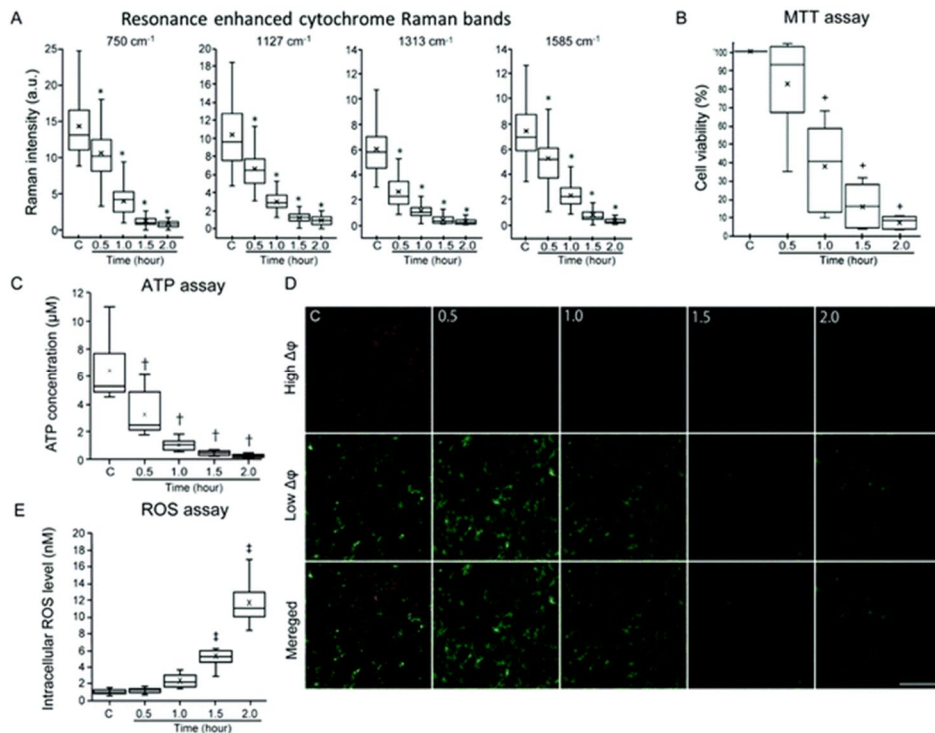


図4 ラマン cytc シグナルの定量解析、ATP、ROS 定量解析、細胞膜電位の変化

方法(1) - 、 の結果：

図4のようにラマンの cytc シグナル量は、グルタミン酸投与後に統計学的に有意に減少することがわかった。また、ATP量も減少し、エネルギー産生量の低下、すなわちミトコンドリア機能の低下を認めた。また同様に膜電位が低下し、ミトコンドリア機能の低下を認めた。一方 ROS(活性酸素種)が増加し、酸化ストレスが増大していることがわかった。このことから、ラマンシグナルは統計学的に評価できるレベルの定量が可能であり、また酸化ストレスの増大、ミトコンドリア機能を反映していることがわかった。

方法(2)の結果

ラマンシフトの生物学的意義については、今回の検討の結果 cytochrome のシグナル群が酸化ストレスやミトコンドリア機能を反映することがわかった。これはラマンシフトが指紋のように正常か異常かのパターンを示し、ラマンシフトによって判別できることがわかった。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

**Morimoto T, Chiu LD, Kanda H, Kawagoe H, Ozawa T, Nakamura M, Nishida K, Fujita K, Fujikado T. Using redox-sensitive mitochondrial cytochrome Raman bands for label-free detection of mitochondrial dysfunction. *Analyst*. 2019 Apr 8;144(8):2531-2540. doi: 10.1039/c8an02213e. PubMed PMID: 30839952. 査読あり。**

〔学会発表〕(計 1 件)

**Morimoto T, Kanda H, Chiu LD, Fujita K, Nishida K, Fujikado T. In situ monitoring of the redox dynamics of cytochrome c in glutamate-induced dying retinal cells by hybrid fluorescence-Raman imaging. ARVO2018, May 2018, Honolulu, USA.**

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

本研究は、本学工学部応用物理学科の藤田研究室の協力で施行した。

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、研究者個人に帰属されます。