

あたらしい緑内障治療法の創出を指向した網膜神経節細胞における 圧ストレス誘導性遺伝子の発現解析

(Gene expression analysis of retinal ganglion cells under the pressure gradient and its application to gene therapy.)

研究代表者：辻 隆宏 (医学研究科部門・助教)

共同研究者：工学系部門・教授：沖 昌也、医学系部門・助教：三宅誠司

概 要	緑内障は網膜神経節細胞 (Retinal ganglion cell; 以下 RGC) 死やその軸索の変性・消失により、視機能障害をきたす視神経疾患である。その唯一の治療法は眼圧下降である。しかしながら、眼圧が下降しても病状は進行する例も数多くあり、網膜神経節細胞の眼圧への脆弱性がその一因であると考えられている。そこで、本研究では眼圧による RGC の細胞死に対して、抵抗性あるいは脆弱性をきたす因子があるとの仮説をたて、耐圧因子の同定およびその付与により治療できるのではないかと考えた。これまで、細胞体への圧力 (高眼圧) がこれらの現象に関与していると思われていたが、軸索側の圧が低い (低髄圧) もまた緑内障の進行に関わることが近年注目されている。今回、申請者らは圧脆弱因子同定のため、 <i>in vitro</i> の圧負荷モデルの作製し、耐圧因子の同定を目指した。
関連キーワード	緑内障、網膜神経節細胞、圧力、細胞体、軸索

研究の背景および目的

緑内障は本邦を含め世界でも中途失明の原因の上位を占める疾患であり、種々の物理的、遺伝的な原因により網膜神経節細胞が変性・細胞死およびその軸索の脱落を起こす疾患である。その主な原因は眼圧上昇であるといわれているが、眼圧が下降しても病態が進行する症例が多数存在する。しかしながら、現在唯一の治療法が眼圧下降であり、外科治療も薬物治療も眼圧下降に主眼が置かれている。

緑内障患者の脳脊髄圧を測定すると、眼圧と脳脊髄圧の差が大きいほど緑内障になりやすいという傾向があった (Ophthalmology, 2008)。眼圧と脳脊髄圧は篩状板構造により分離されており、この部位を通過する視神経線維が損傷をうけるのではないかという説が提唱されている。この説によれば、低眼圧でも緑内障が進行するのは、髄圧もまた低いからであると考えられる。

緑内障では鼻側階段など特徴的な視野障害を示し、細胞死を起こしやすい部位がある。実際に、

申請者らのグループによる初代網膜神経節細胞を用いた *in vitro* の実験で、ミトコンドリアの軸索流の停滞した細胞は脱落し、残存した細胞では再生された (Yokota et al, IOVS, 2016)。この結果は、網膜神経節細胞のなかでも物理的刺激による細胞死抵抗性のある細胞の存在が示唆される。

外因に対する網膜神経節細胞死の違いは、圧力に対する体制遺伝子があるのではないかと考えた。圧抵抗性のある細胞とそうでない細胞の発現遺伝子群を比較することで、耐性遺伝子を同定することを目的として本研究を開始した。

網膜神経節細胞は、網膜組織の中でも約 1% 未満に過ぎず、動物モデルでは圧力耐性遺伝子の発現比較は困難である。そこで、申請者らは初代網膜神経節細胞のシステムにより、細胞体と軸索側で圧力較差を作製するシステムを構築し、前アポトーシスマーカーを指標に単一細胞を分離し、発現遺伝子の差を比較検討することにした。

研究の内容および成果

1、細胞体と軸索を分離するシステムの作製

近年、iPS 細胞を含めた特殊な細胞を培養するために微小環境を実現するために、マイクロデバイスの開発が進められている。神経細胞においても細胞体と軸索を分離するための培養装置として、XONA 社と AXIS 社からそれぞれ販売されている

(図 1)。このマイクロデバイスは細胞を播種する well といずれもこれまで、小脳顆粒細胞、大脳皮質や運動神経などで軸索と細胞体を分離して、神経突起の機能解析に使用されてきた。しかし、長い軸索を形成する初代網膜神経節細胞 (RGC) を用いて、同様のシステムを使用した例はこれまで

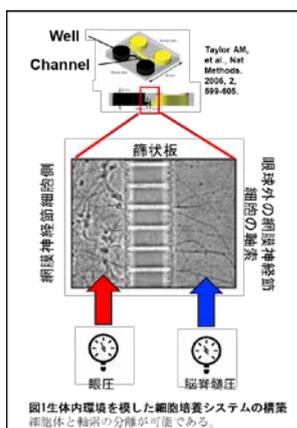


図1 生体内環境を模した細胞培養システムの構築。細胞体と軸索の分離が可能である。

報告されていない。そこで、申請者らは、RGC でこれらのデバイスにより、軸索と細胞体を分離できるかについて検討した。XONA 社のデバイスでは RGC が生着したが、AXIS 社のデバイスでは生着しなかった。XONA 社のデバイスにより細胞体と軸索を分離することができた (図

2)。さらに、自作の加圧装置を作製した。これにより、細胞体側と軸索側に自由に異なり圧力をかけることが可能になる。まだ少数の細胞しかこのデバイスにはいっていかないことから、効率よく入っていくシステムや条件を検討している。

2、眼圧モデル以外の物理的細胞死モデルの構築

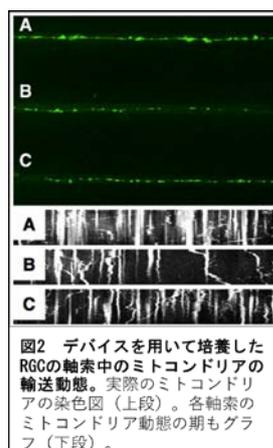


図2 デバイスを用いて培養したRGCの軸索中のミトコンドリアの輸送動態。実際のミトコンドリアの染色図(上段)。各軸索のミトコンドリア動態の期もグラフ(下段)。

上記モデルが機能しなかった場合に備えて、申請者らは、軸索切断モデルにより、アポトーシスする運命のものとして分離して、シングルセルレベルでマイクロアレイをすることを考えていた。しかしながら、軸索切断に使用した機器 (LMD, Leica, 共通機器センター所有) が故障し、修理の予定もないため断念した。現在、ガラスマイクロピペットによる軸索切断、低酸素モデル (CoCl₂処理) や TNF- α による細胞死誘導モデルを導入し、ミトコンドリア軸索輸送と細胞死の関係を検討している。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

責任著書および筆頭著書のみ

「主な発表論文等」

1. Tsuji C, Higashida H, Tsuji T. Maternal behavior of CD38 Knockout Dams is improved by social support. *Messenger*, vol.6, 76, 2018.
2. Tsuji T, Liang M, Lopatina O, Yuhi T, Tsuji C, (他 10名). TRPM2, a new player, in cyclic ADP-ribose/CD38-dependent oxytocin release in the hypothalamus. *Messenger*, vol.6, 71, 2018.

国際学会

1. Pinyue Fu, Jing Zhong, Takahiro Tsuji, Shuki Yamaguchi, Anna A. Shabalova, Maria Gerasimenko, Stanislav M. Cherepanov, Shegeru Yokoyama, Chiharu Tsuji. *Int. Symposium on Chronic Disease and Glycation Biology*, Kanazawa Uni., Japan, Jan. 15, 2019
2. Tomoaki Fujisaku, Chiharu Tsuji, Yoshinari Nasu, Anna A. Shabalova, Stanislav M. Cherepanov, Shigeru Yokoyama, Takahiro Tsuji. *Int. Symposium on Chronic Disease and Glycation Biology*, Kanazawa Uni., Japan, Jan. 15, 2019.
3. Takahiro Tsuji, Shigeru Yokoyama, Yasuhiko Yamamoto, Haruhiro Higashida, Chiharu Tsuji. *Int. Symposium on Chronic Disease and Glycation Biology*, Kanazawa Uni., Japan, Jan. 15, 2019
4. Chiharu Tsuji, Kazumi Furuhashi, Maria Gerasimenko, Kana Minami, Shigeru Yokoyama, Haruhiro Higashida, Takahiro Tsuji. *Int. Symposium on Chronic Disease and Glycation Biology*, Kanazawa Uni., Japan, Jan. 15, 2019

国内学会

1. Takahiro Tsuji, Haruhiro Higashida, Chiharu Tsuji. 第40回日本生物学的精神医学会・第61

回日本 *神経化学学会* 合同年会, 2018/9/6-8, 神戸国際会議場。

2. Tomoaki Fujisaku, Chiharu Tsuji, Takahiro Tsuji. 第40回日本生物学的精神医学会・第61回日本 *神経化学学会* 合同年会, 2018/9/6-8, 神戸国際会議場。

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

科学研究費 (基盤 C) (採択)

研究課題名: 社会性ホルモンバソプレシンの嗅覚系神経回路の解明

研究代表者名 (所属): 辻隆宏 (金沢大学子どものこころの発達研究センター)

研究分担者 辻隆宏

研究期間: 2018年 ~ 2020年

助成額: 340万円 (直接経費)

学内 (平成30年度金沢大学附属病院臨床研究等に係る公募研究) (採択)

研究課題名: 社会性障害を改善するバソプレシン受容体特異的アゴニストの開発

研究代表者名 (所属): 辻隆宏 (金沢大学子どものこころの発達研究センター)

研究期間: 2018年 ~ 2019年

助成額: 140万円 (総額)

3. 申請中の研究費

科学研究費 (基盤 C) (申請中)

研究課題名: 網膜神経節細胞バソプレシン神経の概日リズムと精神機能への生理的役割の解析

研究代表者 辻隆宏

研究期間: 2019年 ~ 2021年

助成額: 5000 (千円) 総額