

In vivo ミトコンドリアライブイメージングの応用とその可能性

研究代表者： 辻 隆宏（医学部門・助教）
共同研究者： 小西 慶幸（工学部門・准教授）

概 要	<p>緑内障は、網膜神経節細胞死とそれに伴う軸索の変性を起こす神経変性疾患である。本邦における中途失明の第一位の疾患であり、28.6%を占める (JJO,2018)。眼圧下降こそが唯一エビデンスのある治療法として知られている。一方、最近、緑内障罹患患者では髄圧が低いことが報告された (Ophthalmology, 2008)。また、本邦の緑内障患者の 70%は低眼圧であることが知られている。網膜神経節細胞の神経線維は視神経乳頭で集約され、篩状板を貫通し視神経管を通過して、脳内へ達する。篩状板は眼球と中枢を隔てる部位であり、この部位に眼圧と脊髄圧の較差を受ける。そこで、この圧較差による網膜神経節細胞およびその軸索へのストレスが緑内障をひき起こす原因となりうるのではないかと考えた。</p> <p>一方、当教室では、径強膜的にマウス網膜神経節細胞のミトコンドリアの動態を観察する実験系 (MIMIR 法) を開発し、実際に高眼圧モデルではミトコンドリアが停滞することが観察できた (PNAS,2015)。申請者はマウス低脊髄圧モデルの作成し、MIMIR 法により撮像した。ミトコンドリア動態について解析しているところである。</p> <p>ミトコンドリア動態以外の要素について検討するため、網膜フラットマウント切片での網膜神経節細胞のミトコンドリア分布について解析した。その結果、もミトコンドリアの分布は約 5 μm 単位の等分布を示すことがわかった。病態モデルでの分布が変化するか検討中である。</p>
関連キーワード	緑内障、網膜神経節細胞、篩状板、脊髄圧、眼圧、ミトコンドリア

研究の背景および目的

緑内障は網膜神経節細胞 (Retinal ganglion cell: 以下 RGC) 及びその軸索が消失する視神経症である。(図 1)。本邦の中途失明の原因の第一位を占め、40 歳以上の成人の 5%が緑内障を罹患していると報告されている (図 2)。眼圧下降が唯一の治療法であるが、手術や薬剤により十分な眼圧下降をおこしても進行する症例がある。また、アジアでは眼圧が正常である正常眼圧緑内障が多く、本邦では緑内障の 70%以上が正常眼圧緑内障である。このことから、緑内障の発症・進展には眼圧以外の要素があると考えられている。そのうちの 하나가低脊髄圧であり、現在、注目されている要因の一つである。実際に、緑内障の患者では脳脊髄圧が減少している (Ophthalmology, 2008)。動物実験でもこのことは証明されており、サルの慢性低脊髄圧モデルでは網膜神経節細胞とその神経線維の菲薄化がおこり (IOVS, 2014)、ラットの急性低脊髄圧

モデルでは細胞死は起こらなかったものの軸索輸送タンパクの減少が認められた (IOVS, 2015)。さらに、緑内障患者では眼圧と脳脊髄圧を隔てる篩状板の変形があることから、これらの圧力較差が重要である蓋然性が高い。

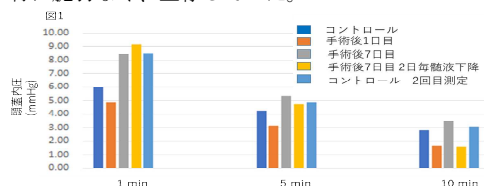
一方、高眼圧の動物モデルでは軸索流が停滞し、特に眼球・脳移行部の視神経乳頭部にミトコンドリアが蓄積される。当教室では緑内障の発症にはミトコンドリア軸索流の停滞が重要であると考え、研究を行ってきており (PNAS, 2015 他)、脳脊髄圧と眼圧の圧較差がミトコンドリアの軸索流を停滞させ、網膜神経節細胞のアポトーシスを引き起こすのではないかと仮説を立てた。そこで、マウス高眼圧・低脊髄圧モデルを確立させ、**in vivo** ミトコンドリアイメージングにより、圧較差の軸索流への効果を解析し、この仮説を証明する。さらに、小西らがこれまで **in vitro** で研究してきたミトコンドリアの分布についての研究をもとに、ここで得られた **in vivo** データを再利用し、**in vitro** のデータと比較・解析する。

研究の内容および成果

1) 低脊髄圧マウスモデルの作成
背部より大槽にアプローチし、大槽を切開することで低髄圧低下モデルを作成した。マウス脳脊髄圧は 3 種

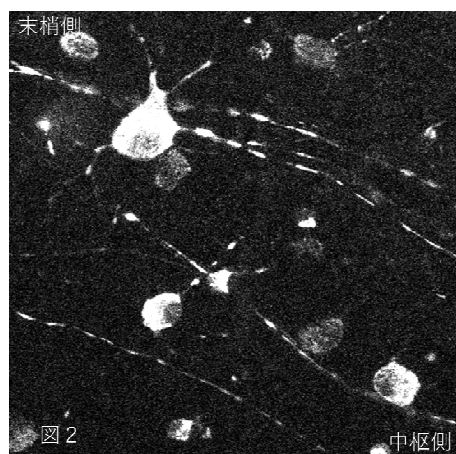
混合麻酔後、側脳室 (1.0 lateral, 0.2 anterior, 2.0 deep) にカテーテル (1.6F Pressure Catheter (4.8-mm tube length below the skull; Scisense, Inc., London,

Ontario, Canada)を挿入し、インターフェイス (BIOPAC Systems MP150 workstation (BIOPAC Systems Co., Gleeeta, CA, USA))に接続し、圧信号を電気信号に変換することで測定した。挿入直後は、脊髄圧が安定せず、10分以降になってから脊髄圧が安定してくる。Sham surgeryのマウスでは約4 mmHgの脊髄圧を示すが、低髄圧手術施行1日では1-2mmHgを示す。術後1週間で正常髄圧に回復する。また、毎日髄圧を下降させると、髄圧は1-2mmHgに維持できる (図1)。手術後、少なくとも1カ月間、マウスは特に脆弱なく、生存していた。



2) in vivo imagingによるミトコンドリア動態の解析

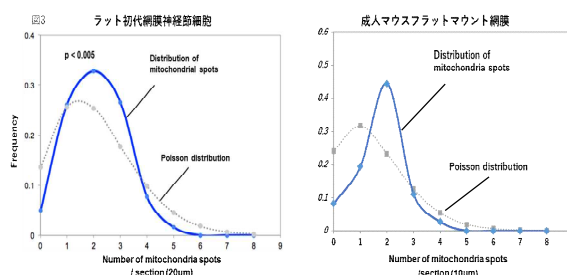
上記モデルを網膜神経節細胞特異的にミトコンドリアに CFP (cyan fluorescent protein) を発現した CFP-mito (Thy1-CFP/COX8A) mice を 3 種混合麻酔下に既報 (PNAS, 2015) にしたがって、多光子顕微鏡



(FV1000MPE2, Olympus) にレーザー発振装置 (Maitai deep see, Spectra-Physics、福井大学高次脳機能講座所有) により 860nm の多光子励起現象を起こし、径結膜的に網膜神経節細胞の軸索上のミトコンドリアに局在する CFP シグナルを検出した。3 秒毎に 1 フレームで撮像し、タイムラプスイメージを獲得した (図2)。Image j でキモグラフを描き、運動するミトコンドリア数、方向性や速さなどを解析しているところである。

3) whole mount section 上でのミトコンドリア分布について

共同研究者の小西慶幸とともに、これまで、ラット胎児の初代培養網膜神経節細胞で特徴的な分布パターンを見出した。停滞したミトコンドリアは 10 μm 毎に配置していることがわかった。しかしながら、この分布パターンがどのような生理的意義を持つのかについては不明であった。はじめに、網膜組織でのミトコンドリアの分布パターンを知るために、CFP-mito mice あるいは YFP-mito mice の網膜の whole mount section を作成し、FV1200 (olympus, ライフサイエンス支援センター所有) にて撮像し、image j を用いて解析した。その結果、マウス網膜組織では 5 μm 毎に配置していることがわかった (図3)。現在、軸索切断モデルや一過性高眼圧モデルなどにより網膜組織でのパターンがどのように変化するかを解析しているところである。動態検出は解析に時間もかかるし、解析可能なイメージ取得は容易ではない。より容易な分布パターン解析が緑内障などの神経変性疾患のあらたな指標となる可能性がある。



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

「主な発表論文等」

1. Kogami Y, Tsuji T, Tsuji C, Yokoyama S, Furuwara K, Lopatina O, Shabalova A, Salmina AB, Watanabe Y, Hattori T, Nishimori K, Kodama K, Higashida H. A monoclonal antibody raised against a synthetic oxytocin peptide stains mouse hypothalamic neurons. *J Neuroendocrinol.* Nov 26:e12815, 2019.
2. Tsuji T, Tsuji C, Lozic M, Ludwig M, Leng G. Coding of odors in the anterior olfactory nucleus. *Physiol Rep.* Nov;7(22):e14284, 2019 10.14814/phy2.14284.
3. Tsuji T, Inatani M, Tsuji C, Cherepanov S, Kadonosono K. Oxytocin induced epithelium-mesenchymal transition through Rho-Rock pathway in ARPE-19 cells, a human retinal pigmented cell line. *Tissue and Cell.* 64, 101328, 2020

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

- (1) 科研費 (基盤 C)、H31~R3 年度、「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」、代表、3600 千円、
- (2) 科研費 (基盤 C)、H30~R2 年度、「社会性ホルモンバソプレシンの嗅覚系神経回路の解明」、分担、900 千円、
- (3) 東海物産との共同研究締結、H31~R2 年度、「自閉症モデルマウスに対するアンセリン・カルノシン投与試験」、分担、1000 千円
- (4) 平成 31 年度北陸地区国立大学学術研究連携支援 H31 年度、「新規バソプレシン受容体特異的拮抗剤による眼圧下降効果の検討」、代表、180 千円