

グラントNo.: L S I 2 3 1 0 3

ライフサイエンスイノベーションセンター
令和5年度「学内共同研究等研究費助成」

高眼圧モデルによる径瞳孔的ミトコンドリア網膜神経節細胞軸索の ミトコンドリアイメージング

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・教授)、東海彰吾 (工学部門・教授)

概要	緑内障は網膜神経節細胞死とその軸索変性による不可逆的な神経変性疾患であり、視覚障害の主要な原因である。網膜神経節細胞の軸索輸送の停滞がその成因の有力な仮説である。申請者は網膜神経節細胞のミトコンドリア軸索輸送に着目し、生体イメージングにより、緑内障診断や治療薬の開発に有用であると考えた。これまで、生体マウスでミトコンドリアの径瞳孔的なイメージング法を開発し、軸索遮断モデルで軸索内ミトコンドリアの分布密度が増加しやその面積が縮小することを報告した。本研究では他の緑内障モデル(慢性高眼圧モデル、急性高眼圧モデルとグルタミン酸障害モデル)に本知見が応用できるかを検証した。後2者においてはイメージング可能であり、ミトコンドリアの蛍光強度の減少を認めた。一方、本イメージング方法では手振れや動物の体動のためミトコンドリアの軸索輸送を検出することができなかつたため、画像処理により障害となる画像のぶれの改善を試みた。異なる時間で撮影した同一構図・角度の2枚の画像のずれ(ぶれ)はほぼ完全になくなった。
関連キーワード	網膜神経節細胞、ミトコンドリア、眼底イメージング、緑内障、軸索輸送

研究の背景および目的

緑内障は、網膜神経節細胞(以下、RGC)死とその神経線維(RNFL)の変性を伴う神経変性疾患であり、世界の視覚障害の原因の第2位の疾患である。眼圧を下降させることが唯一エビデンスのある進行の遅延を目指す治療方法であるが、一度進行すると回復しない不可逆的な疾患である。その発症メカニズムは、血管性、機械性、生化学的な変化が挙げられる。ヒトでは眼球内のRGCの無髄軸索が篩状板といわれる網目状構造を通過し、眼球外で有髄となり脳内へと投射される。緑内障ではこの篩状板前後での高眼圧や低脳脊髄圧による圧較差により機械的変化を起し、軸索輸送障害を引き起こすというのが発症メカニズムの有力な仮説である。福井大学眼科学教室では遺伝子改変マウス(Thy1-mito-CFP mice)のRGC軸索内ミトコンドリアを経結膜下にin vivoで観察する方法を開発し、高眼圧モデルでミトコンドリアの軸索流が停滞することを報告した(Takahara et al., PNAS, 2015)。この方法は多光子顕微鏡により高解像度の像を取得することができるが、結膜へのダメージのため、繰り返し撮影できない等の問題があった。そこで、申請者らは臨床機器であるCSLO(Confocal scanning laser ophthalmoscope)により径瞳孔的にThy1-YFP-mito miceの眼底撮影によるミトコンドリアの観察系を立ち上げた。本観察方法は、前者より解像度は劣るものの侵襲は低く、繰り返し撮影することが可能であった。同時に、

ミトコンドリアに軸索輸送以外に緑内障診断の指標となるものはないか探るため、ミトコンドリアの分布に着目した。小脳顆粒細胞や固定網膜のRGC軸索ではミトコンドリアは一様な分布をしていることを発見した(Matsumoto et al., MCN, 2022)。次に、緑内障モデルの一つとして視神経軸索遮断モデルを導入し、径瞳孔的にCSLOでミトコンドリアの分布を撮影した。軸索遮断により、ミトコンドリアは、1)その分布は変わらず一様であり、2)その面積は小さくなり、3)その軸索内密度は増加することを発見した(Tsuji et al., IJMS, 2023)。本研究の第一の目的として、径瞳孔的ミトコンドリアイメージングによる本知見が他の緑内障モデルでも応用できるかを検討した。

近年、超解像度(顕微鏡)やAIを使用した画質の鮮明化がオフラインで行われている。CSLOの画像は眼球の球面像の二次元への落とし込み、動物の呼吸による体動、顕微鏡の解像度の限界などの問題がある。顕微鏡の開発やより高性能の顕微鏡の購入は研究費の問題で困難である。そこで得られた画像をオフラインで鮮明化することにより、解析をより容易にできないか検討した。さらに、連続的に撮影することで、これまで不可能であった径瞳孔的なミトコンドリアの網膜神経節細胞軸索輸送を検出できないかと考えた。本研究の第二の目的として、径瞳孔的ミトコンドリアイメージングにより得られた画像の鮮明化を目指した。

研究の内容および成果

結果

(1) 緑内障モデルの作成

1、慢性高眼圧モデル

慢性高眼圧モデルはマイクロビーズの前房内注入、隅角へのレーザー照射や焼却、眼球の縫合糸での全周結紮、強膜静脈への生理食塩水の注入する方法が報告されている。最後の方法はマウスでは導入が困難であったため、それ以外の方法による眼圧上昇を検討した。いずれの方法においても一過性の眼圧上昇を認めたが、角膜の透明性を保つことができずイメージングはできなかった(図1)。

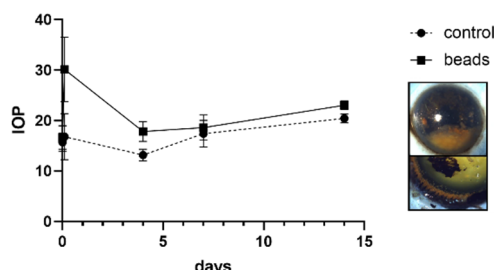


図1 慢性高眼圧モデル (マイクロビーズ)

2、急性高眼圧モデル (虚血再灌流モデル)

前房内に30Gの針を留置し、点滴の高さを163cmにすることで眼圧を100mmHgに90分間維持し、4日後に撮影した(図2)。全体の蛍光強度が注入前と比べ低下していた。針の留置部位(inj)は角膜混濁のため映らず軸索内ミトコンドリアの粒子解析をするのに十分なサンプルが得られていない。

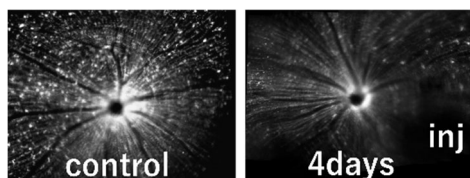


図2 急性高眼圧 (虚血再灌流) モデル

3、NMDA 硝子体内注入モデル

グルタミン酸は網膜内の主要な(興奮性)神経伝達物質であり、過剰に存在すると神経細胞死を誘因し、日本人の約7割を占める正常眼圧緑内障の原因の一つと考えられている。その受容体アゴニストの一つであるNMDAを硝子体内へ投与することにより緑内障モデルを作成することができる。NMDAの投与により細胞体の残存と軸索内のミトコンドリアの消失を認めた(図3)。

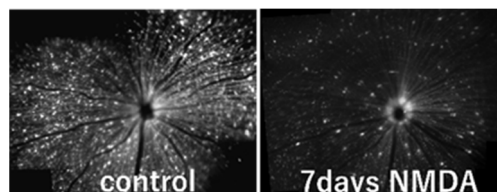


図3 NMDA 投与モデル

4、GLAST ノックアウトマウスの導入

3では(硝子体)出血や網膜損傷によりイメージングに適した動物数の確保が困難である。そこで、過剰グルタミン酸によりRGCの細胞死を起こすグルタミン酸トランスポーターのGLASTをノックアウトしたマウスを東京都医学総合研究所の原田高幸先生のところから導入した(JCI, 2007)。現在、本学動物施設で本マウスをSPF化し交配中である。

(2) 画像処理

本研究に使用したCSLOは最大20枚まで連続写真の撮影が可能であり、シャッタースピードは、画質毎に異なり、それぞれ640×480/26Hz、800×600/20Hz、1280×960/12Hz、1600×1200/10Hzである。このスピードでも体動やカメラの微細な動きにより写真の粒子のずれやぼやけが生じる。そこで、複数枚の画像間の特徴点を抽出して類似性に基づいて対応づけ、それらが最も重なる画像の幾何変換によって、画像間の不動な粒子に位置ずれがおこらないように処理した。その結果、加工前と比較して、加工後の画像のずれは減少した(図4)。細胞体(250.0 ± 65 μm²)は不動であるが、ミトコンドリアの(4.3 ± 3.4 μm²)粒子の動きが検出できるか画像間の比較により検討したが、十分な枚数の静止画を撮影できず、軸索内を移動するミトコンドリアは検出できなかった。

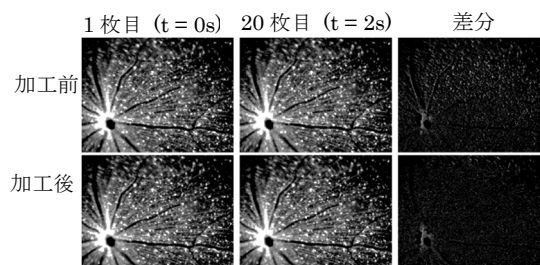


図4 画像処理前後の画像

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」

ONC and mitochondrial distribution. 16th Joint Meeting of Korea-China-Japan Ophthalmologists. Oral supplementation of L-carnosine attenuates acute-stress-induced cortisol release into

blood and mitigate anxious behavior in CD157K0 mice. Nutrients in submission.

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

科研費 C (R6 年度、新規採択「社会脳形成における発達期オキシトシンシグナルの機能の解明」) 分担者