

2018 年 8 月 24 日

国立大学法人 東北大学大学院医学系研究科
国立大学法人 東北大学東北メディカル・メガバンク機構

視神経障害のバイオマーカーを同定

L-アセチルカルニチンの増加が緑内障の病態進行の指標となる可能性

【研究のポイント】

- 緑内障^{注1} モデルマウス（視神経挫滅マウス^{注2}）の網膜を用いてメタボローム解析^{注3}を行った結果、緑内障の進行度に伴って変化する分子を同定した
- 網膜神経節の細胞死に先立って網膜内の核酸塩基^{注4}が減少し、複数種のリン脂質^{注5}が増加することを見出した
- 緑内障の進行度を予測するバイオマーカー^{注6}としてL-アセチルカルニチン^{注7}が有用である可能性を示した

【研究概要】

東北大学大学院医学系研究科 眼科学分野の中澤 徹（なかざわ とおる）教授、佐藤 孝太（さとう こうた）助教、東北大学東北メディカル・メガバンク機構の山本 雅之（やまもと まさゆき）教授、三枝 大輔（さいぐさ だいすけ）講師らのグループは、緑内障モデルの一つである視神経挫滅マウスを用い、網膜に含まれる代謝物のメタボローム解析を行いました。その結果、緑内障の進行度に伴って変化する生体内分子を同定し、これらの分子の量の特徴的なパターンを抽出することに成功しました。本研究によって明らかにされた、視神経障害を原因とした網膜神経節細胞死に関連する可能性の高い生体分子の機能を解析することによって、新たな緑内障治療における創薬あるいは医療技術が開発されると期待されます。さらに、網膜神経節細胞死を予測することで、疾患予防に役立つバイオマーカーの開発と、緑内障の臨床診断への応用も期待されます。本研究の成果は、2018 年 8 月 9 日 Scientific Reports にオンライン版で掲載されました。

【研究内容】

緑内障は、網膜神経節細胞が障害を受けて視野が狭くなる疾患です。2000 年～2001 年に行われた調査（参考文献 1）によると、40 歳以上の緑内障有病率は 5.0%（20 人に 1 人）であることが報告され、中途失明原因 1 位の疾患です。現在、緑内障の治療は点眼薬や手術によって眼圧を下げるのが第一選択となりますが、眼圧コントロールが良好であっても病状が進行する緑内障患者は少なくありません。

そこで我々は、眼圧以外の要因で進行する緑内障の病態解明のため、モデル動物として視神経挫滅マウスを作成し、すでに三枝らが確立した網羅的メタボローム解析手法を用い（参考文献 2）、病態モデルマウスから得られた網膜に含まれる生体分子の解析を行いました。

はじめに、病態モデルマウスから得られた網膜の網羅的メタボローム解析により、未知成分を含む数千種類の成分を検出することに成功しました。つぎに、得られた成分による多変量解析^{注 8}から、病態の進行に伴って有意に変化する成分を抽出し（図 1）、質量分析によって得られた情報から精密な分子同定を実施しました。

さらに、同定された分子の病態変化に伴った増減に着目して階層クラスター解析^{注 9}を実施した結果（図 2）、網膜神経節細胞死に先立って網膜内の核酸塩基が減少し、複数種のリン脂質が増加することを見出しました。さらに、網膜神経節細胞死が進行するにしたがってカルニチン関連代謝物が増加することが示されたことから、我々は網膜神経節細胞が豊富に存在するガングリオン細胞層^{注 10}におけるカルニチン関連代謝物の組織局在を明らかにすべく、組織切片上のメタボローム分布を可視化する質量分析イメージング（MSI）^{注 11}手法を応用しました。その結果、L-アセチルカルニチンがガングリオン細胞層において顕著に増加していること初めて明らかにしました（図 3）。

以上の結果より、核酸塩基およびリン脂質の代謝異常が眼圧非依存的な網膜神経節細胞死に関与している可能性があることが示唆されました。また、網膜神経節細胞死の進行度を予測する代謝物として、L-アセチルカルニチンの測定が有用である可能性が示されました。本研究によって、眼圧非依存的な視神経障害を原因とした網膜神経節細胞死に関連する分子が明らかにされたことから、今後、ヒト臨床検体での詳細な解析やコホート研究^{注 12}におけるオミックス解析等のビッグデータ解析を通じ、緑内障の疾患予防に資する新たなバイオマーカーの開発と臨床診断への応用を目指した研究を進めてまいります。

本研究は文部科学省科学研究費補助金の支援を受けて行われました。また、国立研究開発法人日本医療研究開発機構革新的先端研究開発支援事業インキュベートタイプ（LEAP）研究開発課題「リゾリン脂質メディエーター研究の医療応用」（研究開発代表者：青木 淳賢）の一環で行われました。

【用語説明】

- 注1. 緑内障：眼圧が上昇して視神経を圧迫し、視野欠損が出現・進行する疾患。ただし、日本の場合眼圧が正常範囲の正常眼圧緑内障が多い。
- 注2. 視神経挫滅マウス：視神経を機械的に圧迫した緑内障の病態モデルマウス。
- 注3. メタボローム解析：生体内に含まれる代謝物の集団の網羅的解析。生体で産生される分子のみに限らず、食品摂取、環境要因あるいは腸内細菌が産生する分子を含み、ヒトの表現型を理解するために重要な情報が得られる。本研究では、網羅的にメタボロームを検出することを目的として、質量分析計による解析を実施した。
- 注4. 核酸塩基：遺伝情報を担う核酸を構成する塩基成分。
- 注5. リン脂質：構造中にリン酸エステルを持つ脂質の総称。細胞膜の主要な構成成分である。
- 注6. バイオマーカー：疾患の発症や進行を反映する生体内分子。
- 注7. L-アセチルカルニチン：アミノ酸から生合成される誘導体であり、生体の脂質代謝に関与する。
- 注8. 多変量解析：多くの変数情報（今回は質量分析計で得られた代謝物の値）から目的や仮説に基づいて変数間の関連性を明らかにする統計的手法。
- 注9. 階層クラスター解析：検体から得られた多数のメタボローム情報から、変化が似ている群毎をまとめることで、各群の特徴を明らかにする多変量解析手法の一種。
- 注10. ガングリオン細胞層：網膜細胞は外顆粒層、内顆粒層、ガングリオン細胞層の3層の細胞群から構成される。視神経を構成する網膜神経節細胞層はガングリオン細胞層に局限して存在する。
- 注11. 質量分析イメージング：試料表面から脱離したイオンの m/z (質量電化比) と得られた位置情報から分子の分布状態を画像化し可視化する分析手法。
- 注12. コホート研究：人々の集団のご健康状態の変化について時間を追って調査する研究の方法。コホート研究におけるメタボローム解析とは、これらの人々から得られた検体に含まれるメタボロームを解析し、健康状態との関連性を明らかにする研究のこと。

【参考文献】

- 参考文献 1 : The prevalence of primary open-angle glaucoma in Japanese - The Tajimi study.
Ophthalmology 2004;111:1641-1648.
doi: 10.1016/j.ophtha.2004.03.029
- 参考文献 2: Establishment of Protocols for Global Metabolomics by LC-MS for Biomarker Discovery
PLoS One. 2016 Aug 31;11(8):e0160555.
doi: 10.1371/journal.pone.0160555.

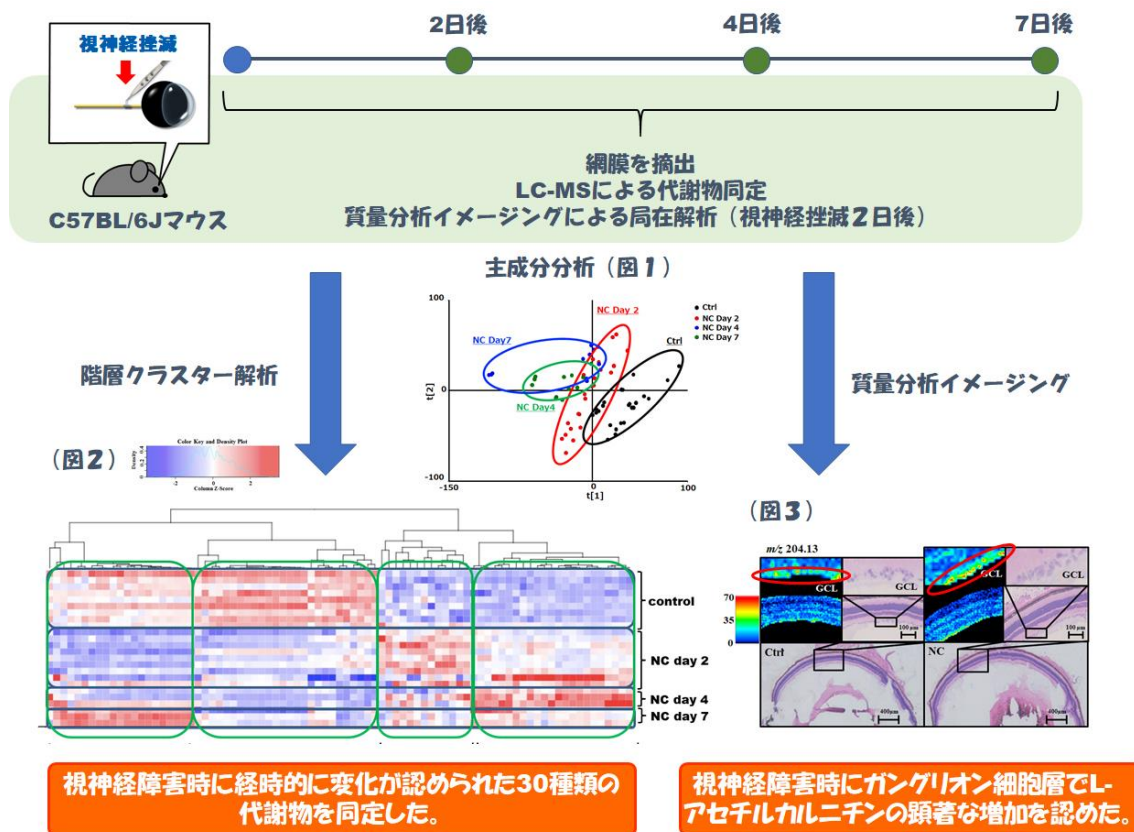


図1. 多変量解析（主成分分析、Score plot）の結果。コントロール（黒）、視神経挫滅2日後（赤）、視神経挫滅4日後（緑）および視神経挫滅7日後（青）の各群の特徴を示した分布が観察された。

図2. 階層クラスター解析の結果。コントロール群と各視神経挫滅群において有意に変動する代謝物を抽出し、特徴成分ごとに横に並べた。

図3. 質量分析イメージングの結果。コントロール検体と視神経挫滅2日後検体の眼組織切片のH&E染色図と拡大図。代謝物の検出強度を示しており、ガングリアン細胞層（赤線囲い部）で変化が観察された。

【論文題目】

Title : Metabolomic changes in the mouse retina after optic nerve injury

Authors : Kota Sato*, Daisuke Saigusa*, Ritsumi Saito, Amane Fujioka, Yurika Nakagawa, Koji M Nishiguchi, Taiki Kokubun, Ikuko N. Motoike, Kazuichi Maruyama, Kazuko Omodaka, Yukihiro Shiga, Akira Uruno, Seizo Koshiba, Masayuki Yamamoto, Toru Nakazawa

* Co-first Author

タイトル：視神経軸索障害後のマウス網膜内における代謝物変動

著者名：佐藤孝太、三枝大輔、齋藤律水、藤岡周、中川優梨花、西口康二、國分太貴、元池育子、丸山和一、面高宗子、志賀由己浩、宇留野晃、小柴生造、山本雅之、中澤徹

掲載誌名：Scientific Reports 8, Article number: 11930 (2018)

doi: 10.1038/s41598-018-30464-z.

【お問い合わせ先】

（研究に関すること）

東北大学大学院医学系研究科眼科学分野
教授 中澤 徹（なかざわ とおる）

電話番号：022-717-7294

E メール：ntoru@oph.med.tohoku.ac.jp.

（報道に関すること）

東北大学大学院医学系研究科・医学部広報室

電話番号：022-717-7891

FAX 番号：022-717-8187

E メール：pr-office@med.tohoku.ac.jp