

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19625

研究課題名(和文) Optogeneticsによる神経変性疾患モデルの作製と治療研究

研究課題名(英文) Establishment of animal models of neurodegenerative diseases and development of therapeutic strategies utilizing optogenetics

研究代表者

原田 高幸 (HARADA, Takayuki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野・分野長

研究者番号：90345306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者はグルタミン酸輸送体の1つであるGLASTの欠損マウスが、正常眼圧緑内障の疾患モデルとなることを報告している。そこでGLAST floxマウスを作製し、光照射によって活性化するCreを組み込んだAAVを眼球内に投与した。その結果、光刺激によってGLAST欠損を誘導することに成功した。したがって光の強度や照射部位・時間を制御することでGLASTの部分欠損を誘導し、ヒトと同様の視野障害パターンを持つ疾患モデルの作製が期待できる。また緑内障を自然発症する霊長類(コモンマモセット)を見出して、ヒトとの類似性を報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会の到来とともに緑内障患者数はさらに増加することが予想されている。そこで適切な緑内障疾患モデルを活用した薬剤や治療法の研究が、今後ますます求められる状況にある。これまでマウスでは視野欠損部位を限局させることが困難であったが、本研究ではこの点で進歩が見られた。一方、ヒトと類似した視覚システムを持つマモセットは、今後のトランスレーショナルリサーチにおいて極めて有用と考えられる。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that mice with deletion of the glutamate aspartate transporter (GLAST), one of the glutamate transporters, serve as a good model of normal tension glaucoma (NTG). In this project, we generated GLAST flox/flox mice. We administered light-activatable adeno-associated virus (AAV)-cre into the eye of GLAST flox/flox mice and we successfully induced GLAST deletion by light stimulation. These studies indicated that selective and partial deletion of GLAST is possible by controlling light intensity and exposure areas and time, which will lead to development of a NTG model that mimics visual field defects observed in humans. Furthermore, we reported naturally occurring NTG in non-human primates (common marmosets) and demonstrated similar pathology to human NTG.

研究分野：眼科学、神経科学

キーワード：Optogenetics 緑内障 疾患モデル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) これまでタンパク活性の制御は主に化合物の投与によって行われてきた。しかしこの方法では大きなタイムラグが生じるため、短時間での制御は不可能である。また阻害剤が一旦投与されると、生体内で薬剤が代謝されるまで効果が持続してしまうなど、副作用につながりかねない問題点もある。一方、培養細胞などを用いたこれまでの報告から、光刺激による制御では1秒以内という非常に短い時間で活性を制御可能なことが明らかとなっている。つまり光刺激ではタンパクの活性を厳密に制御できることが大きな利点といえる。

(2) ヒトは外界の情報の約80%を視覚から得ているが、世界の失明者数は2050年までに現在の約3倍に増加すると試算されている。研究代表者は世界でも第2位の失明原因である緑内障について、正常眼圧緑内障モデルを確立した(引用文献①)。

緑内障では高眼圧になることが一般的だが、日本人では約7割の患者が眼圧が正常範囲のまま緑内障が進行する正常眼圧緑内障であることが知られている。研究代表者が使用している疾患モデルは、グルタミン酸輸送体の1つである Glutamate Aspartate Transporter (GLAST) の欠損マウスであり、これを用いて既存薬などによる神経保護研究を進めてきた(引用文献②～⑤)。

(3) しかしマウスなどの小動物では眼球や視神経の構造がヒトとは大きく異なる一方で、マカクザルなどの大動物では緑内障の発症がほとんど確認されていないため、適切なモデルが見つかっておらず、病態解明や根治的な治療の研究開発に限界があった。

### 2. 研究の目的

本研究では複数の光感受性タンパクを活用して、optogenetics による遺伝子発現やタンパク活性の変化を、時間的・空間的に厳密に制御することに挑む。またこの技術を疾患研究に活用するため、我が国で最大の失明原因である緑内障について、ヒトと同様の視野障害パターンを再現した画期的な疾患モデルの開発を行う。さらに霊長類を用いた緑内障の新たな疾患モデルを確立する。

### 3. 研究の方法

(1) ゲノム編集技術によって GLAST flox マウスを作製し、AAV-Cre を投与することにより、GLAST 発現が消失するかを検討した。

(2) 光照射によって活性化する Cre を組み込んだ AAV を作製・投与し、光刺激によって GLAST 発現量が変化するかを調べた。

(3) ヒトに近縁な霊長類でありながら、小型で人獣共通感染症も少ないマーモセットに注目し、合計約2000匹のマーモセットの眼底スクリーニングを行った。視神経乳頭陥凹が観察された個体については眼圧、網膜電図、光干渉断層計による網膜観察、MRI による視覚野の検討、脳脊髄圧の測定、病理解析等を行った(実験動物中央研究所との共同研究)。

### 4. 研究成果

(1) GLAST flox マウスの眼球内に AAV-Cre を投与すると、GLAST 発現が消失することを確認した。

(2) 光照射によって活性化する Cre を組み込んだ AAV を作製し、GLAST flox マウスに眼球内投与したところ、光刺激によって GLAST 欠損を誘導することに成功した。また光の強度や照射部位・時間を制御することにより、GLAST の欠損部位を、ある程度意図した領域に局限させることに成功した。以上から、網膜の特定部位に視野欠損を持つモデルマウスの作製が実現可能であることが判明した。

(3) 小型のサルであるマーモセットに注目して、眼底写真、眼圧、光干渉断層計、網膜電図などを測定したところ、老齢マーモセットの約10%に正常眼圧緑内障が発症していることを発見した(図)。

マーモセットにはヒトと同じ篩状板という構造が存在するが(マウスにはない)、ヒトと同様に、緑内障マーモセットでは篩状板が薄くなる傾向も確認された。篩状板は眼球から視神経が出たすぐの場所にある網目状のコラーゲン組織で、視神経を支えるための構造と考えられている。しかし高眼圧などで篩状板が変形すると、逆にその部分で視神経が障害されて、緑内障が進行する可能性もあることから、研究上非常に重要な部位である。したがって篩状板があり、かつ緑内障を発症するマーモセットは大変有用な疾患モデルと言える。

また頭部 MRI を撮影して脳の視覚中枢を調べたところ、一次視覚野も萎縮していた。しかしヒトで緑内障に関係すると考えられている遺伝子(ミオシリン、オプチニューリン、WDR36)の変異は見られなかった。

さらに検査を進めたところ、緑内障マームセットでは脳脊髄圧の低下、脳脊髄液中の神経栄養因子の濃度低下、網膜における酸化ストレスマーカーの上昇に加えて、脳の視覚野が萎縮するなど、緑内障患者との共通点が多数見つかった。

高齢化社会の到来とともに緑内障患者数はさらに増加することが予想されている。そこで適切な緑内障疾患モデルを活用した薬剤や治療法の研究が、今後ますます求められる状況にある。ヒトと類似した視覚システムを持つマームセットは、今後のトランスレーショナルリサーチにおいて極めて有用と考えられており、現在は遺伝子改変による緑内障マームセットの確立を目指した研究を継続中である。

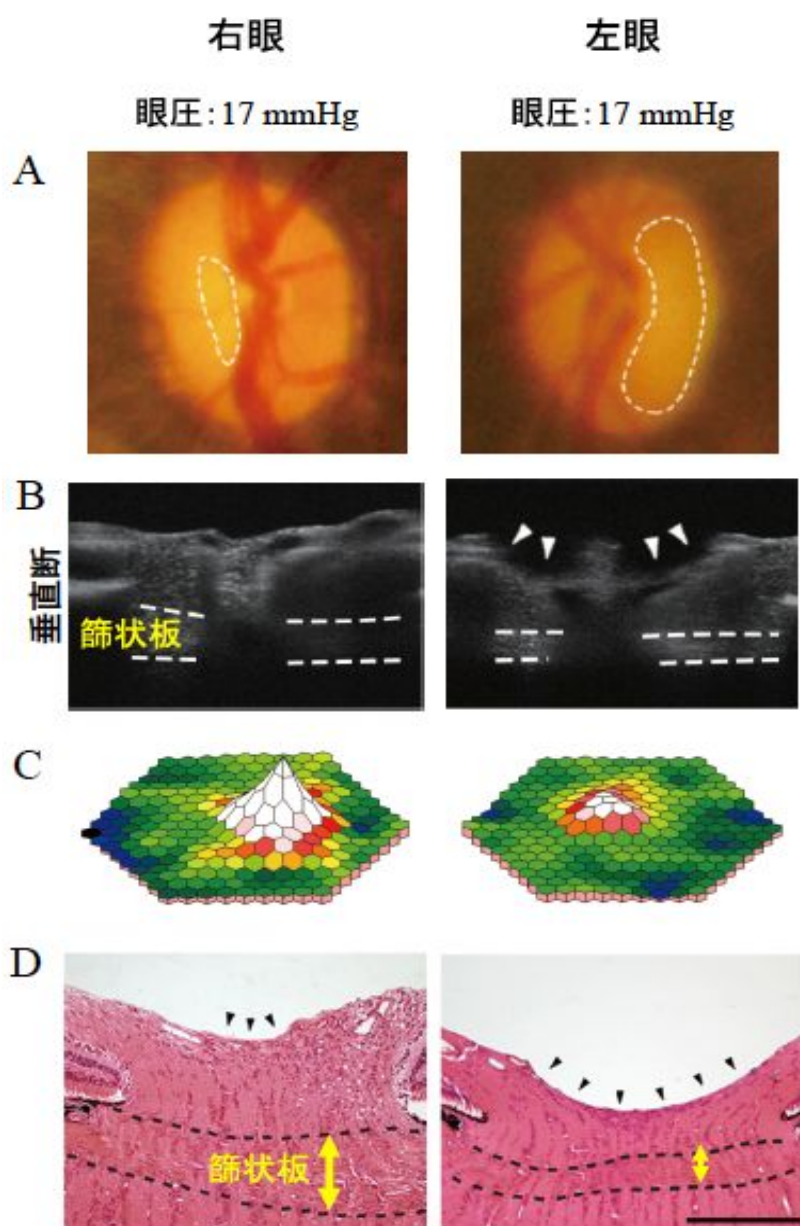


図 左眼だけ緑内障を発症したマームセットの一例。

A:眼底写真, B: 光干渉断層計, C: 多局所網膜電図の3Dイメージ, D: 視神経乳頭部の組織切片。

両眼とも正常範囲の眼圧だが、左眼では拡大した視神経乳頭陥凹 (A の点線, B と D の矢頭) と菲薄化した篩状板 (B と D の点線) など、緑内障患者と同様の変化が観察された。また視機能の低下も確認された (C)。

#### <引用文献>

- Harada, T. et al. The potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma. *Journal of Clinical Investigation* 117, 1763-1770, 2007.
- Sano H, Namekata K, Kimura A, Shitara H, Guo X, Harada C, Mitamura Y, Harada T. Differential effects of *N*-acetylcysteine on retinal degeneration in two mouse models of normal tension glaucoma. *Cell Death and Disease* 10(2), 75, 2019.
- Harada C, Kimura A, Guo X, Namekata K, Harada T. Recent advances in genetically modified animal models of glaucoma and their roles in drug repositioning. *British Journal of Ophthalmology* 103(2), 161-166, 2019.
- Kimura A, Noro T, Harada T. Role of animal models in glaucoma research. *Neural Regeneration Research* 15(7), 1257-1258, 2020.
- Noro T, Namekata K, Kimura A, Azuchi Y, Hashimoto N, Moriya-Ito K, Komaki Y, Lee

CY, Okahara N, Guo X, Harada C, Kim E, Nakano T, Tsuneoka H, Inoue T, Sasaki E, Tokuno H, Harada T. Normal tension glaucoma-like degeneration of the visual system in aged marmosets. *Scientific Reports* 9, 14852, 2019.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sano Hiroki, Namekata Kazuhiko, Kimura Atsuko, Shitara Hiroshi, Guo Xiaoli, Harada Chikako, Mitamura Yoshinori, Harada Takayuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Differential effects of N-acetylcysteine on retinal degeneration in two mouse models of normal tension glaucoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1038/s41419-019-1365-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Harada Chikako, Kimura Atsuko, Guo Xiaoli, Namekata Kazuhiko, Harada Takayuki	4. 巻 103
2. 論文標題 Recent advances in genetically modified animal models of glaucoma and their roles in drug repositioning	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 British Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 161 ~ 166
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1136/bjophthalmol-2018-312724	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Wilttrout Kimberly, Ferrer Alejandro, van de Laar Ingrid, Namekata Kazuhiko, Harada Takayuki, Klee Eric W., Zimmerman Michael T., Cousin Margot A., Kempainen Jennifer L., Babovic-Vuksanovic Dusica, van Slegtenhorst Marjon A., Aarts-Tesselaar Coranne D., Schnur Rhonda E., Andrews Marisa, Shinawi Marwan	4. 巻 27
2. 論文標題 Variants in DOCK3 cause developmental delay and hypotonia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 1225 ~ 1234
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1038/s41431-019-0397-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 原田高幸	4. 巻 32
2. 論文標題 網膜神経保護と軸索再生研究	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 眼薬理	6. 最初と最後の頁 40 ~ 42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 野呂隆彦、原田高幸	4. 巻 91
2. 論文標題 視神経と再生医療	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本の眼科	6. 最初と最後の頁 24 ~ 28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kimura Atsuko, Noro Takahiko, Harada Takayuki	4. 巻 15
2. 論文標題 Role of animal models in glaucoma research	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neural Regeneration Research	6. 最初と最後の頁 1257 ~ 1258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.4103/1673-5374.272578	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Noro Takahiko, Namekata Kazuhiko, Kimura Atsuko, Azuchi Yuriko, Hashimoto Nanako, Moriya-Ito Keiko, Komaki Yuji, Lee Chia-Ying, Okahara Norio, Guo Xiaoli, Harada Chikako, Kim Euido, Nakano Tadashi, Tsuneoka Hiroshi, Inoue Takashi, Sasaki Erika, Tokuno Hironobu, Harada Takayuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Normal tension glaucoma-like degeneration of the visual system in aged marmosets	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14852
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/s41598-019-51281-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Namekata Kazuhiko, Guo Xiaoli, Kimura Atsuko, Arai Nobutaka, Harada Chikako, Harada Takayuki	4. 巻 294
2. 論文標題 DOCK8 is expressed in microglia, and it regulates microglial activity during neurodegeneration in murine disease models	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 13421 ~ 13433
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1074/jbc.RA119.007645	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Honda Sari, Namekata Kazuhiko, Kimura Atsuko, Guo Xiaoli, Harada Chikako, Murakami Akira, Matsuda Akira, Harada Takayuki	4. 巻 60
2. 論文標題 Survival of Alpha and Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells in NMDA-Induced Neurotoxicity and a Mouse Model of Normal Tension Glaucoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 3696 ~ 3707
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.1167/iovs.19-27145	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Takayuki Harada, Takahiko Noro, Kazuhiko Namekata, Atsuko Kimura, Nanako Hashimoto, Keiko Moriya-Ito, Xiaoli Guo, Chikako Harada, Tadashi Nakano, Takashi Inoue, Erika Sasaki.
2. 発表標題 Spontaneous normal tension glaucoma in aged marmosets.
3. 学会等名 8th World Glaucoma Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takayuki Harada, Kei Akaiwa, Kazuhiko Namekata, Yuriiko Azuchi, Xiaoli Guo, Atsuko Kimura, Chikako Harada, Yoshinori Mitamura.
2. 発表標題 Topical ripasudil prevents retinal ganglion cell death in a mouse model of normal tension glaucoma.
3. 学会等名 13th European Glaucoma Society Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuriiko Azuchi, Kazuhiko Namekata, Tadayuki Shimada, Xiaoli Guo, Atsuko Kimura, Chikako Harada, Atsuko Nishigaki, Kanato Yamagata, Takayuki Harada.
2. 発表標題 Loss of neuritin accelerates RGC loss and retinal degeneration in adult mice following optic nerve injury.
3. 学会等名 48th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Atsuko Kimura, Kazuhiko Namekata, Xiaoli Guo, Yuriko Azuchi, Chikako Harada, Takayuki Harada.
2. 発表標題 Can valproic acid treat neurodegenerative diseases?
3. 学会等名 International Conference on Neurovascular and Neurodegenerative Diseases (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原田高幸
2. 発表標題 緑内障治療への新たなアプローチ
3. 学会等名 第39回 日本眼薬理学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>未来を話そう！プロジェクト研究の紹介  <a href="http://www.igakuken.or.jp/project/to-tomin/to-pro26.html">http://www.igakuken.or.jp/project/to-tomin/to-pro26.html</a>          プロジェクト研究等 医学研で行われている研究活動  <a href="http://www.igakuken.or.jp/project/detail/retina.html">http://www.igakuken.or.jp/project/detail/retina.html</a>          網膜・視神経変性疾患の病態解明と治療法  <a href="http://www.igakuken.or.jp/retina/index.html">http://www.igakuken.or.jp/retina/index.html</a></p>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	佐藤 守俊  (SATO Moritoshi)  (00323501)	東京大学・総合文化研究科・教授    (12601)	



## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	佐々木 えりか  (SASAKI Erika)  (70390739)	公益財団法人実験動物中央研究所・マーモセット研究部 応用 発生学研究センター・センター長    (72611)	
連携研究者	行方 和彦  (NAMEKATA Kazuhiko)  (70392355)	公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研 究分野・副参事研究員    (82609)	