

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09943

研究課題名（和文）既存薬や神経栄養因子シグナルを活用した視神経の保護と再生療法

研究課題名（英文）Optic nerve regeneration by utilizing neurotrophic factor signaling

研究代表者

原田 知加子（HARADA, Chikako）

公益財団法人東京都医学総合研究所・疾患制御研究分野・研究員

研究者番号：20435720

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では緑内障および視神経挫滅モデル動物を用いて、視神経の保護と再生療法の手法を検討した。神経栄養因子受容体であるTrkBの活性型AAVベクターを眼球内に投与したところ、網膜神経節細胞の保護効果だけでなく、大変強い視神経軸索の再生効果が得られることがわかった。さらに軸索に加えて樹状突起についても保護効果が観察され、網膜神経節細胞と双極細胞とのシナプス数についても、治療群で有意に増加することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国における失明原因の多くは網膜および視神経の変性疾患で占められる。特に最大の失明原因である緑内障に対しては、眼圧降下以外の手法による治療法の開発が期待されている。今回の我々の研究結果は視神経外傷に加えて、緑内障や視神経炎などによって低下した視機能を維持・回復させる上で重要な一歩となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed AAV vector with constitutive active form of TrkB, a neurotrophic factor receptor. We found that the vector protects retinal ganglion cells (RGCs) and stimulates optic nerve regeneration in a mouse model of optic nerve injury. In addition, the vector protected the form of RGC dendrites and increased the number of synapses between RGCs and bipolar cells.

研究分野：眼科学

キーワード：緑内障 視神経保護 視神経再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国における失明原因の多くは網膜と視神経の変性疾患で占められており、現在のように技術的に進化した治療や手術でも回復困難な症例が多いのが実態である。例えば失明原因の第1位である緑内障は網膜神経節細胞 (Retinal ganglion cell; RGC) の細胞体や、その軸索である視神経が変性し、しだいに視野が障害される疾患であり、超高齢社会の到来とともに、さらなる患者数の増加が危惧されている。緑内障の治療としては眼圧を低下させる点眼薬や手術が一般的であるが、十分に眼圧を降下させても視野障害が進行するケースが一定の割合で観察されることから、全く新しい治療法の開発が求められる状況にある。

2. 研究の目的

眼科領域では網膜変性疾患に対する遺伝子治療が国内外で進められており、海外ではすでに承認されている事例もある。そこで本研究では遺伝子治療による視神経治療の可能性を検討した。具体的には緑内障モデル動物や視神経挫滅モデル動物を用いて、遺伝子治療などによる視神経の保護と再生療法の効果を確認した。

3. 研究の方法

(1) 神経保護作用を持つことが知られている脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor; BDNF) の高親和性受容体である Tropomyosin receptor kinase B (TrkB) に注目した。そして TrkB の中でも tyrosine kinase 活性のある細胞内領域 (intracellular region of TrkB; iTrkB) を細胞膜に過剰発現させる常時活性型 TrkB 分子 (F-iTrkB) を開発した。Neuro2A 細胞に iTrkB または F-iTrkB を transfection 後に、下流のシグナル分子である ERK および AKT の活性化を Western blot によって調べた。

(2) 次に F-iTrkB を用いたアデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus; AAV) ベクターを作製した。これを高眼圧緑内障および正常眼圧緑内障の疾患モデルマウスに眼球内投与して、RGC に対する神経保護効果を調べた。

(3) また視神経外傷モデルマウスに対しても同じ AAV ベクターを投与し、RGC 保護に加えて、視神経軸索の再生効果について検討した。視神経外傷モデルは眼球の約 1 mm 後方でピンセットを用いて視神経軸索を挫滅することで作製した [引用文献 1]。視神経外傷モデルマウスには AAV-GFP または AAV-F-iTrkB を一回だけ眼球内投与して、同時に tracer の注入を行い、視神経切片を作製して観察した。

網膜についてはシナプスマーカーである PSD95 および VGlut1 による二重染色を行い、内網状層における定量解析を行った。

4. 研究成果

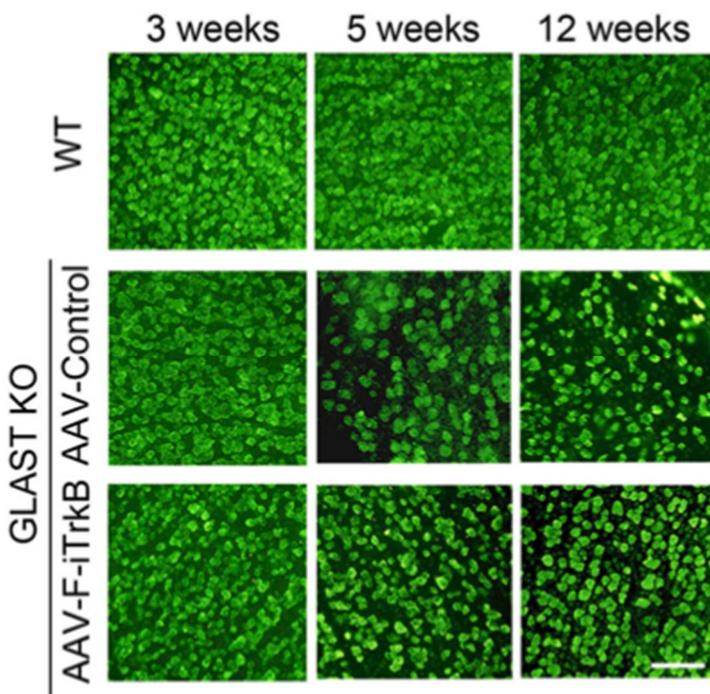
(1) Neuro2A 細胞に iTrkB を transfection すると細胞質全体に発現が見られ、下流のシグナル分子である ERK および AKT の活性化は起きなかった。しかし F-iTrkB を transfection すると主に細胞膜に局在し、BDNF の添加無しに、下流のシグナル分子が強く活性化することが確認された。F-iTrkB を発現させた場合の ERK および AKT の活性化は、全長 TrkB のみを発現させた時よりも有意に強く、全長 TrkB の発現後に高濃度の BDNF (50 ng/ml) を投与した場合と同レベルであった。

(2) そこで次に F-iTrkB を用いた AAV 遺伝子ベクターを作製し、眼球内投与による発現確認を行った。今回は AAV2 に搭載することにより、RGC への特異的な発現を目標にした。iTrkB は全長よりも分子量が小さいため、最も活性の強い全長 CAG promoter を使用可能であった。コントロールとして GFP 搭載ベクター (AAV-GFP) を眼球内投与したところ、ほぼ網膜全体におよぶ発現が確認された。また AAV-F-iTrkB 投与後網膜の Western blot では、F-iTrkB の発現が確認できた。さらに AAV-F-iTrkB を投与後の網膜の免疫染色では、RGC 内における ERK および AKT の活性化が確認された。以上から AAV-F-iTrkB は RGC に対する遺伝子治療研究に十分なポテンシャルを持つことが確認できた。

(3) 次に *in vivo* における実験として、前房中にシリコンオイルを入れて作製した眼圧上昇モデルマウスを用いて、AAV-F-iTrkB による遺伝子治療実験を行った [引用文献 2]。同モデルではシリコンオイル注入後の 4 週間目の段階で、すでに多くの RGC が変性・脱落していた。シリコンオイル注入の 2 週間前に AAV-GFP を眼球内投与したコントロール群では、RGC 数は正常個体の 3 分の 1 程度にまで低下していたが、AAV-F-iTrkB による治療群では生存 RGC 数が約 2 倍と、有意に増加していた。

(4) 欧米では高眼圧による緑内障が一般的だが、日本では緑内障全体の約7割が、眼圧が正常範囲に分布する正常眼圧緑内障で占められるという特徴がある。我々のグループでは世界初の正常眼圧緑内障モデルである GLAST 欠損マウス [引用文献 3, 4] を報告しているため、このモデルに対しても AAV-F-iTrkB による遺伝子治療実験を行った。GLAST 欠損マウスにおいては生後3週から5週頃にかけて RGC の変性が観察される。そこで生後10日目に AAV-GFP または AAV-F-iTrkB を1回だけ眼球内投与して、生後3、5、12週目で効果の判定を行った。生後3週の段階では既報通り、まだ RGC 数の減少は起きていなかった。しかし生後5、12週齢になると、AAV-GFP を眼球内投与したコントロール群では、RGC 数は正常個体の半分程度にまで低下していた。一方、AAV-F-iTrkB による治療群では生存 RGC 数がコントロール群よりも有意に多かった(下図)。

以上から、AAV-F-iTrkB による遺伝子治療は、高眼圧および正常眼圧のいずれのタイプの緑内障においても RGC 保護に有効であり、またその効果は1回の投与で長期間に渡る可能性が示された。



<図の説明>

(上段) 生後3、5、12週齢の野生型マウス網膜を RGC 特異的抗体 (RBPMS) で染色した図。RGC 数に変化は見られない。

(中段) GLAST 欠損マウス (GLAST KO) の眼球にコントロールベクターを投与し、網膜の RBPMS 染色を行った。生後5週以降では RGC の減少が確認される。

(下段) GLAST KO マウスの眼球に AAV-F-iTrkB を投与し、網膜の RBPMS 染色を行った。生後5週以降では RGC が保護されていることが確認できる。

(5) 引き続き視神経外傷モデルを用いて、一旦退縮した視神経軸索を、遺伝子治療によって再生することができるかを検討した。AAV-GFP を投与してから2週間後のマウス視神経では再生線維が全く観察されなかった。しかし AAV-F-iTrkB による治療群では2週間、4週間と時間が経過するにつれて再生線維が中枢側に伸展していき、4週間後では一部の線維が視交叉に到達することが確認された。

(6) 網膜の PSD95 および VGlut1 による二重染色を行ったところ、AAV-GFP を眼球内投与したコントロール群では、シナプス接合部と考えられる二重陽性部位が大きく減少していたが、AAV-F-iTrkB による治療群ではコントロール群よりも有意に多く、シナプスに対する保護作用もあることが確認された。

(7) 以上をまとめると、神経栄養因子受容体の細胞内活性領域だけを細胞膜に強制的に発現させることにより、ligand 非依存的かつ強力な細胞内シグナルの活性化に成功した。本手法は TrkB 以外の受容体等にも応用できる可能性がある。また改変型 TrkB を用いた遺伝子治療は緑内障や視神経外傷だけでなく、様々な神経変性疾患にも有効な可能性があることから、今後はさらなる効果の増強と実臨床への応用を目指していきたいと考えている。

<引用文献>

- 1) Zhang J, et al. Silicone oil-induced ocular hypertension and glaucomatous neurodegeneration in mouse. *Elife* 8: e45881. DOI: 10.7554/eLife.45881.
- 2) Namekata K, et al. Dock3 induces axonal outgrowth by stimulating membrane recruitment of the WAVE complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(16): 7586-7591, 2010. DOI: 10.1073/pnas.0914514107
- 3) Sano H, et al. Differential effects of N-acetylcysteine on retinal degeneration in two mouse models of normal tension glaucoma. *Cell Death Dis.* 10(2): 75, 2019. DOI:

10.1038/s41419-019-1365-z

- 4) Harada T, et al. The potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma. *J Clin Invest.* 117(7): 1763-1770, 2007. DOI: 10.1172/JCI30178

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Guo Xiaoli, Kimura Atsuko, Namekata Kazuhiko, Harada Chikako, Arai Nobutaka, Takeda Kohsuke, Ichijo Hidenori, Harada Takayuki	4. 巻 119
2. 論文標題 ASK1 signaling regulates phase-specific glial interactions during neuroinflammation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2103812119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2103812119	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 Ohashi Tsutomu, Namekata Kazuhiko, Guo Xiaoli, Kimura Atsuko, Harada Chikako, Harada Takayuki	4. 巻 29
2. 論文標題 Effects of lighting environment on the degeneration of retinal ganglion cells in glutamate/aspartate transporter deficient mice, a mouse model of normal tension glaucoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2021.101197	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, Noro Takahiko, Kimura Atsuko, Guo Xiaoli, Namekata Kazuhiko, Nakano Tadashi, Harada Takayuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Suppression of Oxidative Stress as Potential Therapeutic Approach for Normal Tension Glaucoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 874
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox9090874	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 Nishijima Euido, Namekata Kazuhiko, Kimura Atsuko, Guo Xiaoli, Harada Chikako, Noro Takahiko, Nakano Tadashi, Harada Takayuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Topical ripasudil stimulates neuroprotection and axon regeneration in adult mice following optic nerve injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15709
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-72748-3	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, Azuchi Yuriko, Kitamura Yuta, Harada Chikako, Harada Takayuki	4. 巻 295
2. 論文標題 Roles of the DOCK-D family proteins in a mouse model of neuroinflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 6710 ~ 6720
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.010438	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 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) 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) 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) 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 -

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) 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) 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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Kimura A, Nishijima E, Kitamura Y, Honda S, Guo X, Harada C, Namekata K, Harada T.
2. 発表標題 AAV-mediated delivery of constitutively active TrkB promotes CNS axon regeneration and neuroprotection.
3. 学会等名 Neuroscience Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 行方和彦、西島義道、北村裕太、本田紗里、郭曉麗、木村敦子、原田知加子、原田高幸.
2. 発表標題 活性型TrkBを活用した遺伝子治療による神経保護と軸索再生.
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kimura A, Namekata K, Guo X, Arai N, Harada C, Harada T.
2. 発表標題 Microglial DOCK8 and neurodegeneration.
3. 学会等名 The 4th International Conference on Applied Biochemistry and Biotechnology (ABB 2021) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Guo X, Namekata K, Kimura A, Harada C, Harada T.
2. 発表標題 The renin-angiotensin system regulates neurodegeneration in a mouse model of optic neuritis.
3. 学会等名 Annual Global Conference on Neuroscience and Neurology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kimura A, Nishijima E, Kitamura Y, Honda S, Guo X, Harada C, Namekata K, Harada T.
2. 発表標題 Gene therapy with modified TrkB induces neuroprotection and axon regeneration.
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nishijima E, Honda S, Namekata K, Kimura A, Guo X, Harada C, Nakano T, Harada T.
2. 発表標題 Gene therapy with mutant TrkB receptor protects retinal ganglion cell and retinal function in a mouse model of normal tension glaucoma.
3. 学会等名 World Glaucoma Congress 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nishijima E, Namekata K, Kimura A, Kitamura Y, Honda S, Guo X, Harada C, Nakano T, Harada T.
2. 発表標題 Gene therapy with mutant TrkB receptors protects retinal neurons and promotes optic nerve regeneration without ligands.
3. 学会等名 ARVO 2021 meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Guo X, Kimura A, Namekata K, Harada C, Harada T.
2. 発表標題 Pathogenic roles of glial ASK1 signaling in neuroinflammation.
3. 学会等名 ARVO 2021 meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

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 佐埜弘樹、行方和彦、木村敦子、郭曉麗、原田知加子、三田村佳典、原田高幸
2. 発表標題 2種類の緑内障モデルマウスにおけるN-acetylcysteineの異なる神経保護効果
3. 学会等名 第123回 日本眼科学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Visual Research Project
<https://www.igakuken.or.jp/english/project/detail/retina.html>
未来を話そう！ プロジェクト研究の紹介
<https://www.igakuken.or.jp/project/to-tomin/to-pro26.html>
視覚病態プロジェクト
<https://www.igakuken.or.jp/project/detail/retina.html>
網膜・視神経変性疾患の病態解明と治療法
<https://www.igakuken.or.jp/retina/index.html>
TOPICS「ASK1シグナルは神経炎症におけるグリア間相互作用を病期特異的に制御する」
<https://www.igakuken.or.jp/topics/2022/0201.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	Memorial Sloan Kettering Cancer Center			