

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10001

研究課題名(和文) 緑内障における脳由来神経栄養因子(BDNF)の役割の解明と遺伝子治療法の開発

研究課題名(英文) The role of brain-derived neurotrophic factor and development of gene therapy in glaucoma

研究代表者

五十嵐 勉 (Igarashi, Tsutomu)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10421190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)： BDNFプロセッシング障害マウス(BDNFpro/pro) 現在、投稿準備中のため、ここに研究成果を公表できないが、今後発表・報告を行っていく予定である。

AAV-BDNF及びAAV-BDNF-IRES-TrkB AAVの場合、搭載出来る遺伝子の長さが4.7Kbと限られている。今回、AAV-BDNF-IRES-TrkBの場合、4.7Kbよりも長くなってしまったため、短いプロモーターや他の配列を考慮してプラスミドを各種作製した。しかしながら、AAVベクターの力価が上がらず、現在もプラスミドを再構築しており、今後も検討を重ねていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

眼圧の低い緑内障患者では、眼圧が高い場合のような視神経へのダメージは少なくなる傾向がありますが、緑内障の進行や視野の損失が進むことがある。このため、眼圧の低い緑内障患者には、眼圧を下げるだけでなく、視神経を保護する治療法が期待される。BDNFは期待される神経保護因子であり、今後遺伝子治療と組み合わせた治療法が期待される。そのBDNFのプロセッシング障害マウスによる解析結果は、今後の緑内障におけるBDNF研究にとって重要な研究だと考えられる。

研究成果の概要(英文)： BDNF processing-impaired mice (BDNFpro/pro) We are currently preparing for submission, so we cannot publish the research results here, but we plan to make presentations and reports in the future.

AAV-BDNF and AAV-BDNF-IRES-TrkB In the case of AAV, the length of the gene that can be loaded is limited to 4.7Kb. In the case of AAV-BDNF-IRES-TrkB this time, since it was longer than 4.7Kb, various plasmids were constructed considering short promoters and other sequences. However, the titer of the AAV vector did not increase, and the plasmid is currently being reconstructed, and we will continue to investigate.

研究分野：眼科

キーワード：眼科 緑内障 BDNF マウス

1. 研究開始当初の学術的背景

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) は主要な神経保護因子である。眼科分野でも網膜の神経保護効果について数多くの報告がある。しかしながら BDNF の研究における問題点として、(1) BDNF ノックアウトマウスは脳や感覚神経の発達障害を起こし、通常は出生して間もなく死亡するため網膜における解析ができなかった。また、(2) BDNF を投与すると長期的にはレセプターである TrkB のダウンレギュレーションが生じるため神経保護が出来なくなると報告されているが、多くの治療実験では単回かつ過剰の BDNF 投与を行うため、持続的な遺伝子発現による BDNF の神経保護効果については検討されていなかった。

2. 研究の目的

- (1) BDNF ノックアウトマウスの代わりに BDNF プロセッシング障害マウス (BDNF^{pro/pro}) を用いて解析を行う。
- (2) AAV-BDNF 及び AAV-BDNF-IRES-TrkB を用いて、長期の神経保護効果について比較検討を行う。

3. 研究の方法

- (1) BDNF プロセッシング障害マウス (BDNF^{pro/pro})

電気生理学的、病理学的、分子生物学的解析を行い、緑内障変化を示すか検討を行う。

BDNF は細胞内外のプロセッシングにより proBDNF から BDNF となり、TrkB レセプターに結合することで、神経細胞の生存、分化、シナプス形成に関与する。一方、proBDNF は p75 レセプターを経由して、アポトーシスや神経突起伸張抑制を引き起こす。BDNF^{pro/pro} マウスは proBDNF から BDNF の反応効率が著しく低下しており、脳におけるセロトニン神経線維密度は顕著に減少し、難治性うつ症状を引き起こす。

緑内障は軸索流の低下により、BDNF 量が減っていることから、このマウスにおいて、緑内障変化が生じていることが期待される。

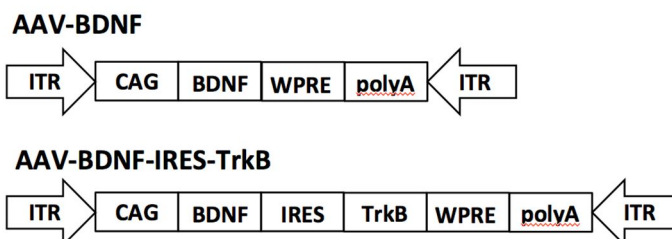
検査としては、

- OCT; 今回マウス用に人用の光干渉断層像 (OCT) に前置レンズを組み込んだアダプターを作製した。経時的に網膜内層厚を計測することが可能となった。神経節細胞を含む網膜内層厚を比較検討する。
- 電気生理学的には、通常の網膜電図 (ERG) と網膜神経節細胞の機能 (STR 波) を選択的に計測する全視野刺激装置で経時的に計測を行う。
- 病理; HE 染色にて網膜内層厚を比較検討する。また網膜神経節細胞の特異的抗体である Brn-3a にて染色を行い、細胞数の変化について検討を行う。

- 分子生物学的解析としては、網膜の BDNF および TrkB の発現を RNA レベルでは real time PCR にて、タンパクレベルでは ELISA にて検討する。

(2) AAV-BDNF 及び AAV-BDNF-IRES-TrkB

- AAV ベクターの作製; AAV-BDNF 及び AAV-BDNF-IRES-TrkB の作製を行う。AAV-BDNF-IRES-TrkB は BDNF とそのレセプターである TrkB を同時に発現させることができるベクターである。ベクターを大量に作製し、濃縮を行う。1 X 10¹³ vector genome/ml に調整を行う。



- 8 週齢の野生型 C57BL6 マウスに AAV-BDNF 及び AAV-BDNF-IRES-TrkB の硝子体投与を行う。投与後、1, 2, 4, 8, 12 週後に安楽死処置を行う。
- RT-PCR にて BDNF および TrkB の発現を検討する。AAV-BDNF の投与群では、BDNF が安定して発現するか、また期間が延びるに従って、TrkB が減少するのか検討を行う。
- BDNF^{pro/pro} マウスがどのような網膜構造変化を生じるか不明のため時期に関して検討を行いながら、緑内障症状すなわち網膜内層厚の菲薄化が生じた際に AAV-BDNF 及び AAV-BDNF-IRES-TrkB の硝子体投与を行う。長期に検討を行った際は、AAV-BDNF 投与において TrkB の発現低下が生じて緑内障変化を示すのか検討する。AAV-BDNF-IRES-TrkB 投与では TrkB を強制発現させるため、神経保護を示すことができるのか検討を行う。

4 . 研究成果

(1) BDNF プロセッシング障害マウス(BDNF^{pro/pro})

現在、投稿準備中のため、ここに研究成果を公表できないが、今後発表・報告を行っていく予定である。

(2) AAV-BDNF 及び AAV-BDNF-IRES-TrkB

AAV の場合、搭載出来る遺伝子の長さが 4.7Kb と限られている。今回、AAV-BDNF-IRES-TrkB の場合、4.7Kb よりも長くなってしまったため、短いプロモーターや他の配列を考慮してプラスミドを各種作製した。しかしながら、AAV ベクターの力価が上がらず、現在もプラスミドを再構築しており、今後も検討を重ねていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Igarashi Tsutomu, Ohsawa Ikuroh, Kobayashi Maika, Miyazaki Kai, Igarashi Toru, Kameya Shuhei, Shiozawa Asaka Lee, Ikeda Yasuhiro, Miyagawa Yoshitaka, Sakai Mashito, Okada Takashi, Sakane Iwao, Takahashi Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Drinking hydrogen water improves photoreceptor structure and function in retinal degeneration 6 mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-17903-8	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 Shiratori Naka, Nakamoto Kenji, Nishio Yusuke, Takano Yasuko, Arima Takeshi, Kunishige Tomoyuki, Suzuki Hisaharu, Igarashi Tsutomu, Takahashi Hiroshi	4. 巻 Volume 16
2. 論文標題 Statistical Analysis of Factors Affecting Surgically Induced Astigmatism Following Trabeculectomy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 3833 ~ 3839
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/OPHTH.S389480	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 Suzuki Hisaharu, Igarashi Tsutomu, Takahashi Hiroshi	4. 巻 49
2. 論文標題 Effect of a new phacoemulsification and aspiration handpiece on anterior chamber stability	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Cataract and Refractive Surgery	6. 最初と最後の頁 91 ~ 96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/j.jcrs.0000000000001071	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 Igarashi Tsutomu, Nakamoto Kenji, Kobayashi Maika, Suzuki Hisaharu, Tobita Yutaro, Igarashi Toru, Okuda Takahisa, Okada Takashi, Takahashi Hiroshi	4. 巻 87
2. 論文標題 Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor in Glaucoma Patients in Japan: An Observational Study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Nippon Medical School	6. 最初と最後の頁 339 ~ 345
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1272/jnms.JNMS.2020_87-605	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 Oishi Noriko, Kubota Daiki, Nakamoto Kenji, Takeda Yukito, Hayashi Mika, Gocho Kiyoko, Yamaki Kunihiko, Igarashi Tsutomu, Takahashi Hiroshi, Kameya Shuhei	4. 巻 42
2. 論文標題 Multimodal imaging analysis of macular dystrophy in patient with maternally inherited diabetes and deafness (MIDD) with m.3243A>G mutation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ophthalmic Genetics	6. 最初と最後の頁 304 ~ 311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/13816810.2021.1881978	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 Nakamoto Kenji, Shiratori Naka, Nishio Yusuke, Sugimoto Shio, Takano Yasuko, Yamazaki Masashi, Tobita Yutaro, Igarashi Tsutomu, Takahashi Hiroshi	4. 巻 88
2. 論文標題 A Patient with Primary Open-Angle Glaucoma with Re-Elevated Nocturnal Sitting Intraocular Pressure after Restarting Medical Therapy due to a Bleb Failure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Nippon Medical School	6. 最初と最後の頁 509 ~ 511
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1272/jnms.JNMS.2021_88-521	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 Ikebukuro Toyo, Igarashi Tsutomu, Kameya Shuhei, Arima Takeshi, Kunishige Tomoyuki, Takahashi Hiroshi	4. 巻 2021
2. 論文標題 Optical Coherence Tomography Angiography of Nonarteritic Cilioretinal Artery Occlusion Alone	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Case Reports in Ophthalmological Medicine	6. 最初と最後の頁 1 ~ 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2021/8845972	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 Umemoto Yusuke, Igarashi Tsutomu, Nakamoto Kenji, Arima Takeshi, Kobayashi Maika, Tobita Yutaro, Takahashi Hiroshi	4. 巻 88
2. 論文標題 Changes in the Ganglion Cell Complex after Inner Limiting Membrane Peeling for Epiretinal Membrane in Glaucoma Patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Nippon Medical School	6. 最初と最後の頁 97 ~ 102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1272/jnms.JNMS.2021_88-202	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 Takahashi Kazuhisa, Igarashi Tsutomu, Miyake Koichi, Kobayashi Maika, Katakai Yuko, Hayashita-Kinoh Hiromi, Fujimoto Chiaki, Kameya Shuhei, Takahashi Hiroshi, Okada Takashi	4. 巻 88
2. 論文標題 Amount of Green Fluorescent Protein in the Anterior Chamber after Intravitreal Injection of Triple-Mutated Self-Complementary AAV2 Vectors is Not Affected by Previous Vitrectomy Surgery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Nippon Medical School	6. 最初と最後の頁 103 ~ 108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1272/jnms.JNMS.2021_88-203	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 Igarashi Tsutomu, Nakamoto Kenji, Kobayashi Maika, Suzuki Hisaharu, Arima Takeshi, Tobita Yutaro, Takao Kazuhiro, Igarashi Toru, Okuda Takahisa, Okada Takashi, Takahashi Hiroshi	4. 巻 88
2. 論文標題 Brain-derived Neurotrophic Factor in the Aqueous Humor of Glaucoma Patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Nippon Medical School	6. 最初と最後の頁 128 ~ 132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1272/jnms.JNMS.2021_88-305	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 Igarashi Tsutomu, Takahashi Hisatomo, Kobayashi Maika, Kunishige Tomoyuki, Arima Takeshi, Fujimoto Chiaki, Suzuki Hisaharu, Okuda Takahisa, Takahashi Hiroshi	4. 巻 88
2. 論文標題 Changes in Tear Osmolarity after Cataract Surgery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Nippon Medical School	6. 最初と最後の頁 204 ~ 208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1272/jnms.JNMS.2021_88-405	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 Takeda Yukito, Kubota Daiki, Oishi Noriko, Maruyama Kaori, Gocho Kiyoko, Yamaki Kunihiro, Igarashi Tsutomu, Takahashi Hiroshi, Kameya Shuhei	4. 巻 87
2. 論文標題 Novel GUCY2D mutation (E843Q) at mutation hotspot associated with macular dystrophy in Japanese patient	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Nippon Medical School	6. 最初と最後の頁 92 ~ 99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1272/jnms.JNMS.2020_87-207	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 Asaka Lee Shiozawa, Tsutomu Igarashi, Maika Kobayashi, Kenji Nakamoto, Shuhei Kameya, Shigeto Fujishita, Hiroshi Takahashi, Takashi Okada	4. 巻 26
2. 論文標題 Tyrosine triple mutated AAV2-BDNF gene therapy in an inner retinal injury model induced by intravitreal injection of N-methyl-D-aspartate (NMDA)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Vision	6. 最初と最後の頁 409-422
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 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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 五十嵐勉、中元兼二、小林舞香、飛田悠太郎、岡田尚巳、高橋浩
2. 発表標題 緑内障患者の血清脳由来神経栄養因子 (BDNF) の検討
3. 学会等名 日本緑内障学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takao K, Igarashi T, Takahashi K, Kobayashi M, Okada T, Takahashi H.
2. 発表標題 Change of neutralizing antibodies against AAV after AAV intravitreal injection in cynomolgus monkeys.
3. 学会等名 34th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Igarashi T, Nakamoto K, Kobayashi M, Tobita Y, Takao K, Takahashi H, Okada T.
2. 発表標題 Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in glaucoma patients.
3. 学会等名 Japanese society of gene and cell therapy.
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担 者	高橋 浩 (Takahashi Hiroshi) (00188046)	日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授 (32666)	

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