

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07751

研究課題名(和文) 活性化型TrkBの遺伝子治療による神経再生および失明からの視機能回復

研究課題名(英文) Vision protection and axon regeneration by gene therapy of constitutive active TrkB

研究代表者

行方 和彦 (NAMEKATA, Kazuhiko)

公益財団法人東京都医学総合研究所・疾患制御研究分野・副参事研究員

研究者番号：70392355

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)：本研究では、独自開発した常時活性化型TrkB分子を活用した遺伝子治療によって網膜神経節細胞の保護効果および軸索再生効果を促進させることで、失明したマウスの視機能回復の可能性について検討した。常時活性化型TrkB分子を発現した網膜神経節細胞では、視神経挫滅によって誘導される細胞死を強く抑制した。また、切断された軸索再生効果もあり、再生軸索が視交叉まで到達することを確認した。さらに、緑内障モデルマウスでは、神経保護効果だけでなく視機能低下の抑制効果も確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これらの成果から、常時活性化型TrkB分子は、細胞内のシグナル活性化を介してin vivoにおけるマウス網膜神経節細胞の保護・再生を強力に促進することが判明した。したがってアデノ随伴ウイルスなどの遺伝子治療との併用することで、緑内障などの網膜神経変性に対する新たな治療法となる可能性に期待が持たれる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the possibility of recovering visual function in blind mice by promoting the neuroprotective effect and axonal regeneration of retinal ganglion cells (RGC) by gene therapy using our originally developed constitutive active TrkB. We found that constitutive active TrkB strongly suppressed cell death induced by optic nerve crush. The regenerated axons also reached the optic chiasm. Furthermore, in glaucoma model mice, suppression of visual function decline was observed, as well as neuroprotective effect.

研究分野：神経科学

キーワード：神経再生 TrkB AAV 緑内障

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

緑内障は網膜神経節細胞（RGC）の細胞死を引き起こし、進行性の視野障害が生じる疾患である。2000年以降、現在まで20年近くに渡り視覚障害の原因疾患第一位となっており、年々その割合が増加する一方で、未だ根本的な治療方法がなく、大きな社会問題となっている。緑内障に対する唯一有効性のある治療として、眼圧を下げる薬剤の投与または手術が現在行われているが、根本的な治療には至っていない。さらに日本人では眼圧が正常である正常眼圧緑内障が全体の約7割を占めるといった特徴がある。これらを背景として、眼圧を下げる治療以外の、より病態に直接的に作用する神経保護効果や視神経軸索再生作用を有する治療方法の確立が求められている。

神経栄養因子は神経細胞の生存維持や分化増殖、機能調節に関わる分子であり、NGF、BDNF、CNTF、NT3、NT4などに分類される。そのうちBDNFは高親和性受容体であるTrkBに結合し、様々な細胞内シグナル経路を介してRGCへの高い神経保護作用を示すことが知られており、さらに発生期には軸索伸長への関与も指摘されている。そのため、これまでに外部からのBDNF投与、またはBDNF過剰発現によるRGC保護治療に関する多くの検討がなされてきたが、*in vivo*では神経保護効果は限定的であった。

一方、近年では視神経を利用した軸索再生研究に世界中から多くの注目が集まっている。視神経再生の誘導においては炎症性シグナルの増強が重要であると考えられてきたが、炎症反応は神経変性も引き起こしてしまい、治療応用には不向きであることが以前から指摘されていた。そのような中、今回独自に開発した活性型TrkBは炎症性シグナルを活性化することなく、網膜の形態と機能を保ったまま、強力な視神経再生能を獲得することを見出しており、その活用には大きな治療効果が期待される。

2. 研究の目的

これまで神経細胞の軸索再生は非常に困難であると考えられてきた。しかし近年の成果から、AAVなどを利用した遺伝子導入によって細胞内シグナルを活性化すると、*in vivo*においても軸索再生を誘導できることがわかってきた。特に視神経は網膜神経節細胞（RGC）の軸索の集合体であり、眼球から脳後部まで長く投射していることから、軸索再生研究において最も適した組織の1つと考えられている。また、RGCは樹状突起の形態解析にも適しており、軸索と樹状突起の再生を同一サンプル（組織）で解析することが可能である。さらに、神経細胞の機能回復についてはその評価方法が重要であるが、マウスの視機能については電気生理学的手法も含めた様々な客観的解析法が存在し、複雑な脳と比べてその有用性は非常に高い。そこで本研究ではRGCにおける軸索および樹状突起の再生促進の分子機序を解明し、そこで得られた知見によって、さらに強力な軸索再生効果を獲得するための開発応用に進むことを期待したい。

3. 研究の方法

ヒトTrkB分子の細胞内領域を細胞膜へ人工的に局在化させるために、ファルネシル化シグナルを付与したF-iTrkB分子を作製した。細胞内局在の確認についてはNeuro2a細胞へtransfectionした後に免疫細胞染色によって解析を行った。また、細胞内シグナルの活性化の測定についてはCos7細胞へtransfectionした後にウェスタンブロット解析により、リン酸化ERKやリン酸化AKTなどについてTrkB下流分子の活性を定量することでTrkBシグナルの活性を評価した。さらにF-iTrkBの2量体形成についてはpull down assayにより明らかにした。

*In vivo*での治療効果を検討するためにF-iTrkBをアデノ随伴ウイルス（AAV）へ組み込み、マウス眼球へ投与し、網膜神経節細胞の保護効果や軸索再生効果などへの影響について解析を行った。神経保護効果については、網膜flat mountのRBPMS抗体を用いた免疫組織染色により残存する網膜神経節細胞の数を計測し評価を行った。さらに光干渉断層系による生体網膜の形態変化の観察、および多局所網膜電図により視機能の保護効果の有無などについても解析を行った。これらの解析を緑内障モデルマウス（GLAST KO）および視神経挫滅モデルマウスで行った。

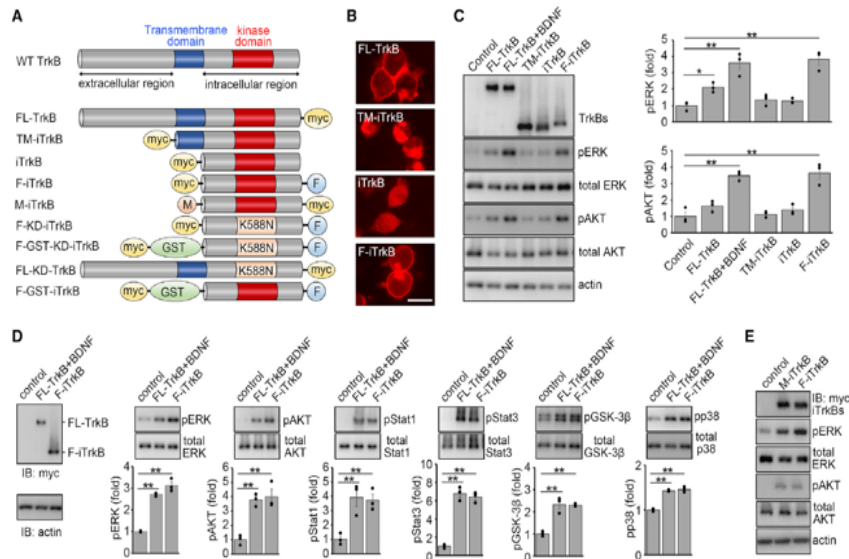


Figure 1. Farnesylated intracellular domain of TrkB activates downstream signaling without ligands

(A) Schematic diagram of TrkB constructs used in this study. TM, transmembrane domain; myc, myc-tag; F, farnesylation signal; GST, glutathione S-transferase; K588N, substitution of lysine with asparagine at position 588, to generate a kinase-dead form. (B) Cellular localization of TrkB mutants. Immunostaining of myc-tagged TrkB mutants in Neuro2A cells transfected with the indicated plasmids. Full-length (FL) TrkB and farnesylated intracellular domain of TrkB (F-iTrkB) were localized at the peripheral region. Scale bar, 25 μ m. (C) Activation of ERK and AKT by TrkB mutants. Immunoblot analysis of ERK and AKT phosphorylation in Cos-7 cells transfected with the indicated plasmids. Representative immunoblot images (left) and quantification of the relative levels of phosphorylated ERK (pERK) and AKT (pAKT) (right). The one-way ANOVA with Tukey-Kramer *post hoc* test was used. $n = 3$ per experimental condition. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (D) Comparison of ligand-stimulated FL-TrkB and F-iTrkB in activation of downstream signaling. Immunoblot analysis of several signal proteins in Cos-7 cells transfected with FL-TrkB with BDNF stimulation for 20 min (FL-TrkB + BDNF) or F-iTrkB. TrkB and actin expression is shown (left). pERK, pAKT, pStat1, pStat3, pGSK-3 β , and pp38 were detected in both groups. Representative immunoblot images are shown (top), and the relative levels of phosphorylated proteins were quantified (bottom). The one-way ANOVA with Tukey-Kramer *post hoc* test was used. $n = 3$ per experimental condition. ** $p < 0.01$. (E) The effect of myristoylation and farnesylation on the activity of iTrkB. Cos-7 cells were transfected with myristoylated iTrkB (M-iTrkB) or F-iTrkB. pERK and pAKT were detected from both mutants.

4. 研究成果

(1) ファルネシル化した TrkB 細胞内領域分子である F-iTrkB による細胞内シグナル活性化について、Cos 7 細胞を用いて検討を行った。F-iTrkB を transfection した n2a 細胞では細胞膜に局在することが免疫染色解析によって明らかとなった (Fig.1B)。また、Cos7 細胞に transfection すると、下流シグナル分子の ERK や AKT 分子を活性化することがリン酸化抗体を用いたウェスタンブロット解析により明らかとなった(Fig.1C)。さらに、F-iTrkB による活性化は ERK と AKT だけではなく、Stat1、Stat3、GSK3- β 、p38 などの分子も活性化することが判明した (Fig.1D)。これは full length TrkB を transfection した Cos7 細胞に BDNF を添加した時にも同様の活性化レベルであった。また、ファルネシル化に限らずミリスチル化によっても同様に下流シグナルの活性化が確認された (Fig.1E)。

(2) さらに F-iTrkB 分子の性質について解析を進めた。F-iTrkB 分子内の ATP 結合部位に変異を導入すると ERK/AKT を活性化できないこと (Fig.2A)、F-iTrkB は 2 量体を形成してお互いをリン酸化すること (Fig.2B and C)、活性化した F-iTrkB は結合分子である GRB、Shc、PLC とともに複合体を形成する (Fig.2E) ことなどを明らかとした。一方、TrkA についても、細胞内領域のファルネシル化により細胞膜に局在させると F-iTrkB と同様に、ERK/AKT の活性化が認められた。しかし、kinase ドメインを持たない細胞膜受容体である LIF 受容体や gp130 受容体では細胞内領域をファルネシル化しても、ERK/AKT の活性化は認められなかった (Fig.2F-H)。

(3) F-iTrkB を AAV に組み込み緑内障モデルマウス (GLAST KO) に硝子体注射することで緑内障症状の進行を抑制できるか検討を行った。AAV-F-iTrkB を投与された緑内障モデルマウスでは、網膜神経節細胞の細胞死が抑制されており、視機能低下も軽症化することが判明した(Fig.3)。

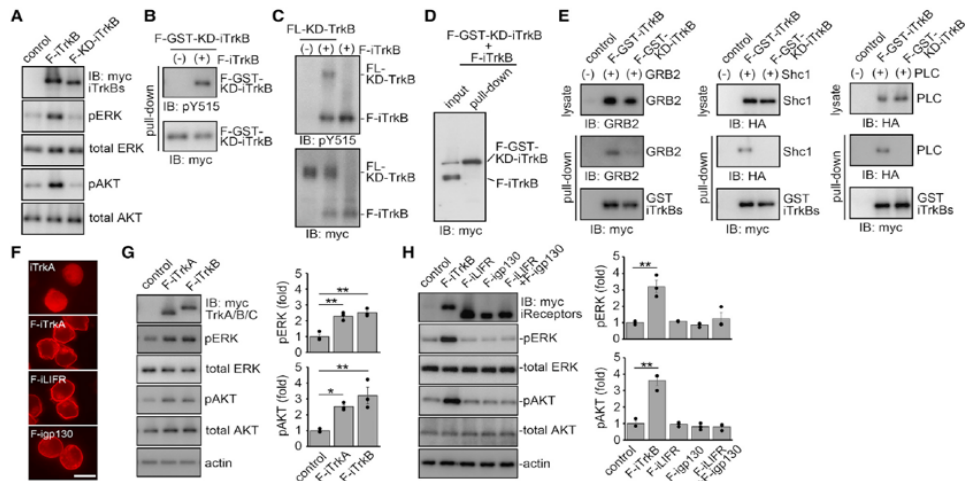


Figure 2. Characterization of F-iTrkB and farnesylated receptors of other trophic factors

(A) The effect of kinase activity of F-iTrkB on signal activation. Immunoblot analysis of pERK and pAKT in Cos-7 cells transfected with F-iTrkB or F-KD-iTrkB. Representative images are shown. (B) Transphosphorylation of F-iTrkB. Cos-7 cells were cotransfected with a kinase-dead (KD) form of GST-tagged F-iTrkB (F-GST-KD-iTrkB) and F-iTrkB, followed by a GST pull-down assay. The pull-down sample was subjected to immunoblot analysis using an anti-phospho-TrkB (pY515) antibody. (C) F-iTrkB-mediated phosphorylation of FL-TrkB. Cos-7 cells were transfected with a KD form of the FL-TrkB (FL-KD-TrkB), alone or cotransfected with F-iTrkB. Total cell lysates were analyzed by immunoblotting. (D) No detection of F-iTrkB dimers. Cos-7 cells were cotransfected with a KD form of GST-tagged F-iTrkB (F-GST-KD-iTrkB) and F-iTrkB, followed by a GST pull-down assay. The pull-down sample was subjected to immunoblot analysis. (E) Interaction of F-iTrkB with GRB2, Shc, and PLC. Cos-7 cells were cotransfected with F-GST-iTrkB and GRB2 (left), HA-tagged Shc1 (middle), or HA-tagged PLC (right), followed by a GST pull-down assay. The pull-down sample was subjected to immunoblot analysis. (F) Cellular localization of iTrkA, F-iTrkA, F-igp130, and F-iLIFR. Immunostaining of myc-tagged proteins in Neuro2A cells transfected with the indicated plasmids. Farnesylated proteins were localized at the peripheral region. Scale bar, 25 μ m. (G) F-iTrkA-mediated activation of ERK and AKT. Immunoblot analysis of ERK and AKT phosphorylation in Cos-7 cells transfected with F-iTrkA or F-iTrkB. Representative images (left) and quantification of the relative levels of pERK and pAKT (right). The one-way ANOVA with Tukey-Kramer *post hoc* test was used. $n = 3$ per experimental condition. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (H) Absence of signal activation by farnesylated intracellular domain of cytokine receptors. Immunoblot analysis of ERK and AKT phosphorylation in Cos-7 cells transfected with F-iLIFR and F-igp130 and a mixture of the two plasmids. Representative images (left) and quantification of the relative levels of pERK and pAKT (right). The one-way ANOVA with Tukey-Kramer *post hoc* test was used. $n = 3$ per experimental condition. * $p < 0.01$.

以上の結果から、独自に開発した F-iTrkB 分子の遺伝子治療は網膜神経節細胞に対して強い神経保護作用を示し、遺伝子治療による新たな治療法開発の基盤となる可能性があると推察された。今後は視細胞など網膜組織にある他の神経細胞に対する保護効果や、脳や脊髄の神経細胞に対する保護作用の有無についても明らかにする必要がある。

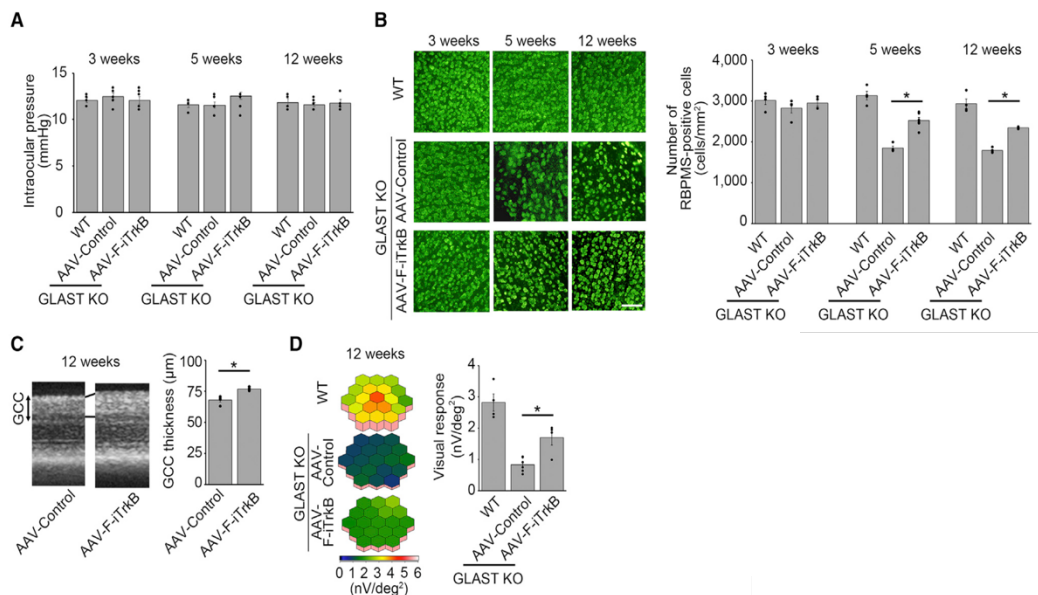


Figure 3. AAV-F-iTrkB prevents RGC degeneration in experimental models of glaucoma

(A) Intraocular pressure (IOP) of WT or GLAST KO mice at 3, 5, and 12 weeks of age. AAV-F-iTrkB was intravitreally injected into GLAST KO mice at 10 days of age. $n = 4-6$ mice per group. (B) AAV-F-iTrkB-mediated RGC protection in GLAST KO mice. RGCs were detected by immunostaining of RBPMs. AAV-Control or AAV-F-iTrkB was intravitreally injected into GLAST KO mice at 10 days of age. Representative images (left) and quantification of RGCs (right) are shown. The one-way ANOVA with Tukey-Kramer *post hoc* test was used. $n = 4-6$ mice per group. * $p < 0.05$. Scale bar, 100 μ m. (C) Optical coherence tomography (OCT) of GLAST KO mouse retinas treated with AAV-Control or AAV-F-iTrkB. Cross-sectional images of the retinas at 12 weeks of age (left) and quantification of the ganglion cell complex (GCC) thickness (right) are shown. Two-tailed unpaired Student's *t* test was used. $n = 4-6$ mice per group. * $p < 0.05$. (D) Multifocal electroretinography (mERG) of WT or GLAST KO mice treated with AAV-Control or AAV-F-iTrkB. Retinal responses of second-order kernel at 12 weeks of age are presented with 3D plot images (left) and quantitative analyses of the retinal response amplitude (right). The one-way ANOVA with Tukey-Kramer *post hoc* test was used. $n = 4-6$ mice per group. * $p < 0.05$.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Xiaoli Guo, Atsuko Kimura, Kazuhiko Namekata, Chikako Harada, Nobutaka Arai, Kohsuke Takeda, Hidenori Ichijo and Takayuki Harada.	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 of the U.S.A.	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 Tsutomu Ohashi, Kazuhiko Namekata, Xiaoli Guo, Atsuko Kimura, Chikako Harada and Takayuki Harada	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 Hiroki Sano, Kazuhiko Namekata, Masanori Niki, Kentaro Semba, Fumiko Murao, Takayuki Harada, Yoshinori Mitamura	4. 巻 13
2. 論文標題 Ocular expression of cyclin-dependent kinase 5 in patients with proliferative diabetic retinopathy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 628
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdi.13702	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 Kentaro Hamada, Youichi Shinozaki, Kazuhiko Namekata, Mami Matsumoto, Nobuhiko Ohno, Takahiro Segawa, Kenji Kashiwagi, Takayuki Harada, Schuichi Koizumi.	4. 巻 178
2. 論文標題 Loss of P2Y1 receptor triggers glaucoma-like pathology in mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 British Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 4552
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bph.15637	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 Namekata, K., Guo, X., Kimura, A., Azuchi, Y., Kitamura, Y., Harada, C. and Harada, T.	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 Yanagisawa Michiko, Namekata Kazuhiko, Aida Tomomi, Katou Sayaka, Takeda Takuya, Harada Takayuki, Fuse Nobuo, the Glaucoma Gene Research Group, Tanaka Kohichi	4. 巻 529
2. 論文標題 EAAT1 variants associated with glaucoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 943-949
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.06.099	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 874-874
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 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

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, 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
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)
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 3rd Annual Global Conference on Neuroscience and Neurology. (招待講演)
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 4 4 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
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
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金義道、本田紗里、北村裕太、郭曉麗、木村敦子、行方和彦、中野匡、原田高幸
2. 発表標題 活性型Rasの遺伝子治療による視神経保護と再生への影響.
3. 学会等名 第 1 2 4 回日本眼科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shinozaki, Y., Namekata, K., Kashiwagi, K., Ohno, N., Segawa, T., Harada, T., Koizumi, S.
2. 発表標題 Loss of astrocytic ABCA1 induces normal tension glaucoma.
3. 学会等名 FENS 2020 Virtual Forum (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北村裕太、行方和彦、木村敦子、郭曉麗、山本修一、原田高幸.
2. 発表標題 GLAST欠損マウスによる網膜神経節細胞樹状突起の解析.
3. 学会等名 第31回日本緑内障学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金義道、行方和彦、本田紗里、木村敦子、北村裕太、中野匡、原田高幸.
2. 発表標題 失明からの視機能回復に向けた新規遺伝子治療ベクターの開発.
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北村裕太、安土ゆり子、行方和彦、木村敦子、郭曉麗、山本修一、原田高幸.
2. 発表標題 TrkB欠損マウスにおける網膜神経節細胞の変性過程の検討.
3. 学会等名 第74回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

公益財団法人東京都医学総合研究所 視覚病態プロジェクト
<https://www.igakuken.or.jp/retina/>

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