

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：20K09820

研究課題名(和文) 遺伝子治療による神経保護・再生を活用した緑内障の治療研究

研究課題名(英文) Gene therapy for glaucoma by stimulating neuroprotection and regeneration

研究代表者

木村 敦子(KIMURA, Atsuko)

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：60569143

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)：脳由来神経栄養因子(BDNF)の受容体であるTrkBの常時活性型(F-iTrkB)を独自に作製し、アデノ随伴ウイルス(AAV)によって網膜神経節細胞(RGC)に発現させると強力な神経保護および神経突起再生効果を示すことを発見した。しかし今のところ、その詳しいメカニズムはわかっていない。そこで、本研究では遺伝子治療を活用して、TrkBシグナル増強が遺伝子発現に与える影響について検討した。RGCにおける遺伝子発現パターンについて、RNA-seqを活用して比較したところ神経変性疾患に関連する遺伝子の発現変動が確認された。また、高眼圧緑内障モデルマウスに対する遺伝子治療では神経保護効果を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

F-iTrkBのウイルスベクターによる神経保護・再生の際に、変動する遺伝子群をRNA-seqによって網羅的に解析することで、細胞内におけるシグナル応答についてより深い知見を得ることができた。得られたデータを活用して、今後はより効果的な遺伝治療の開発につながることを期待したい。

研究成果の概要(英文)：We have made a constitutive-active TrkB molecule, which is artificially modified receptor for BDNF. Gene therapy of constitutive-active TrkB using adeno associated virus induced neuroprotection and axon regeneration in mice after optic nerve crush. However, the molecular mechanism is unknown. In this study, we have investigated gene expression pattern in RGC using RNA-seq after overexpression of constitutive-active TrkB. We found that constitutive-active TrkB changed the expression levels in many genes compared with control. In addition, neuroprotective effect was found in hypertension glaucoma model mice by gene therapy of constitutive-active TrkB.

研究分野：神経科学

キーワード：緑内障 TrkB 神経保護 AAV RGC 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

これまで非常に困難と考えられていた中枢神経の再生が、最近の研究の発展により、一部可能になりつつある。特に注目されているのが「神経細胞の内在性の再生能力を高める」ことである。これまでに複数の因子 (mTOR など) の活性化が軸索および樹状突起の再生に重要という報告があるが、それらのシグナルの下流因子が実際にどのように神経再生に関っているかはわかっていない。一方、BDNF は神経細胞に対する強力な保護作用があり、発生過程の軸索伸長にも重要であるが、成体に対する BDNF 投与だけでは、十分な軸索再生が得られていない (Pernet & Di Polo, 2006, Brain 他)。しかし、研究代表者はリガンドの BDNF がない状況下でも、常に活性を示す活性型 TrkB 受容体分子 (F-iTrkB) を独自に開発した。

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。しかし、遺伝子治療やノックアウトマウスを用いて複数の因子を操作する方法が主であり、本研究のように一つの分子 (TrkB) のみに着目した研究は少数である。この理由としては、これまで機能回復を伴う強力な神経再生を実現するには、一つの分子のみの操作では不可能であったことが考えられる。また、癌遺伝子や炎症を惹起する薬物等を扱っている研究が多く、眼球が変形するなどの副作用がみられることから、現実的な治療法としての応用は困難であった。研究代表者は AAV2-F-iTrkB が部分的な視機能回復を引き起こすことを確認しているが、長期における経過観察でも副作用は見られていない。また現在ではヒト RGM 抗体を用いた臨床試験が開始されているが、このような神経再生阻害因子を抑制する治療法との相乗効果も予想される。したがって F-iTrkB による遺伝子治療は視神経損傷や緑内障などにとどまらず、脊髄損傷、視神経脊髄炎 (NMO) やアルツハイマー病などへの治療応用も期待される。

2. 研究の目的

緑内障は視神経軸索が障害を受け、その細胞体である網膜神経節細胞が死に至ることで、視野障害が起きる神経変性疾患である。近年では RGC 死よりも前に、軸索終末や樹状突起の退縮が起り、神経回路が切断されることが発症原因とも考えられている。そこで研究代表者は軸索と樹状突起を再生させ、神経回路を再構築すれば、一度低下した視機能が回復する可能性を考慮している。研究代表者はこれまでに、脳由来神経栄養因子 (BDNF) の受容体である TrkB の常時活性型ウイルスベクター (AAV2-F-iTrkB) を独自に作製し、RGC に発現させると強力な神経保護および軸索再生効果があることを確認している。しかし、この詳しいメカニズムはわかっていない。そこで、本研究では視神経挫滅モデルを用いて TrkB シグナル増強による軸索および樹状突起の保護・再生のメカニズムを追求し、AAV2-F-iTrkB による遺伝子治療の有効性を検証する。

3. 研究の方法

AAV2 は主に網膜神経節細胞に感染することから、AAV2-Cre を Ribo-Tag マウスの眼球内へ投与することにより、網膜神経節細胞に特異的なリボソーム複合体を免疫沈降によって精製することが可能となる。これにより、網膜神経節細胞の発現している mRNA だけが精製される。その後、精製した RNA により RNA sequencing を行い、TrkB シグナルが増強した網膜神経節細胞における遺伝子発現パターンを明らかにした。

一方、AAV2-F-iTrkB を高眼圧の緑内障モデルマウスへ投与して、網膜神経節細胞の保護効果について解析を行う。保護効果の評価を行うため、網膜 flat mount を用いた RBPMS 抗体による免疫染色によって網膜神経節細胞を特異的に検出し、残存した網膜神経節細胞の数を計測した。1つの網膜に対して 12 箇所測定領域を指定することで、領域による計測の変動を抑制した。

4. 研究成果

(1) F-iTrkB による遺伝子発現変動

Ribo-Tag マウスを活用して、網膜神経節細胞に特異的な RNA の精製を行った。コントロール AAV を投与した網膜および AAV2-F-iTrkB を投与した網膜のそれぞれから精製した RNA を用いて RNA sequencing 解析を行ったところ、F-iTrkB によって発現が増強された遺伝子が 2,871 個あることが判明した (Fig. 1 B)。反対に発現が低下した遺伝子は 2,553 個であった。また統計的に有意な変動がないと判定された遺伝子は 10,801 個であった。Gene Ontology 解析を行った結果から、様々な遺伝子群の変化が確認された (Fig. 1 C)。Mitochondrion、Mitochondrial part、Cellular

metabolic process、Metabolic process などの項目に関連する遺伝子の増大が認められたことから、細胞のエネルギー代謝関連の遺伝子が増大していることが示唆された。さらに Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome enrichment 解析からは、パーキンソン病、ハンチントン病やアルツハイマー病などの神経変疾患に関連する遺伝子の変動が認められた (Fig.1D)。

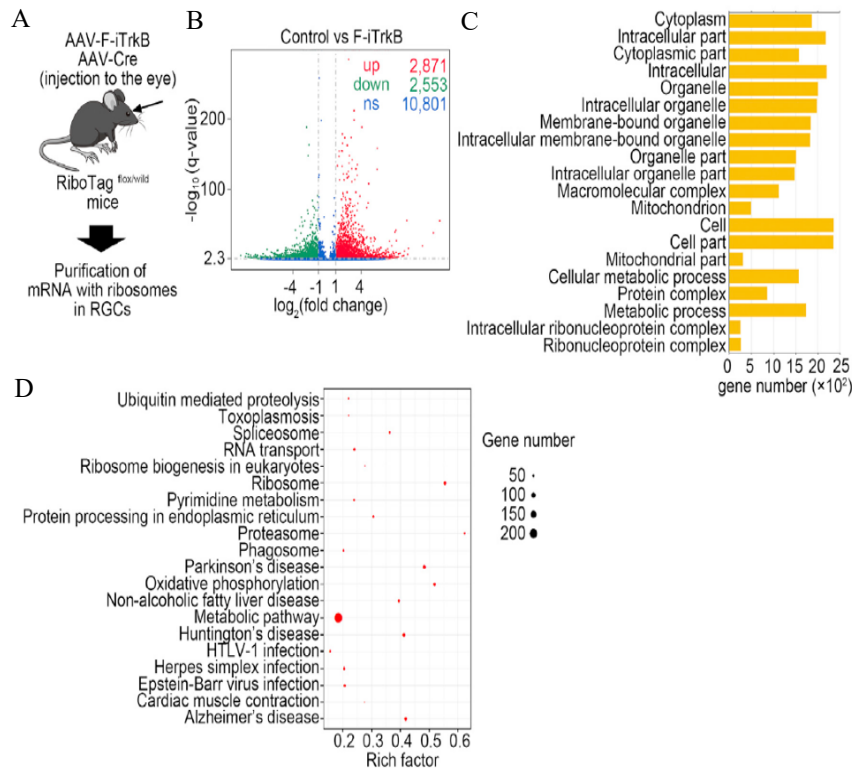


Figure 1. Intravitreal injection of AAV-F-iTrkB alters gene expression in RGCs
 (A) Schematic diagram of the protocol for purification of RGC-specific RNA. (B) Volcano plot of gene expression in RGCs infected with AAV-F-iTrkB. The red dots represent significantly upregulated genes, the green dots represent significantly downregulated genes ($|\log_2(\text{fold change})| > 1$ and $q < 0.005$), and the blue dots represent gene expression with no significant difference between the treatment group (AAV-F-iTrkB) and the control group (AAV-Control). (C) Gene Ontology (GO) analysis of differentially expressed genes between AAV-Control and AAV-F-iTrkB-treated RGCs. The most enriched 20 GO terms among the upregulated genes are shown. (D) Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis of differentially expressed genes between AAV-Control and AAV-F-iTrkB-treated RGCs. The top 20 most significantly enriched KEGG pathways are shown.

(2) 高眼圧緑内障モデルマウスにおける神経保護効果

AAV2-F-iTrkBにより、様々な遺伝子発現の変化が確認されたので、これらの遺伝子発現変動が網膜神経節細胞に対する保護効果を示すかどうか検討を行った。野生型マウスに対して AAV2-F-iTrkB を硝子体注射で眼球へ投与した2週間後に、マイクロビーズを用いて高眼圧緑内障モデルを作製した (Fig. 2A)。眼圧は正常な状態と比べて約2倍に増大していることを眼圧計を用いて確認した。網膜神経節細胞の保護効果については、RBPM5抗体による網膜 Flat mount の免疫染色にて行った (Fig. 2B)。網膜の残存細胞数を計測した結果、コントロールに対して約2倍の数の網膜神経節細胞が検出された (Fig. 2B)。

これらの成果から、F-iTrkBの遺伝子治療における神経保護効果は、高眼圧緑内障モデルマウスに対して有効な治療法となることが推測される。

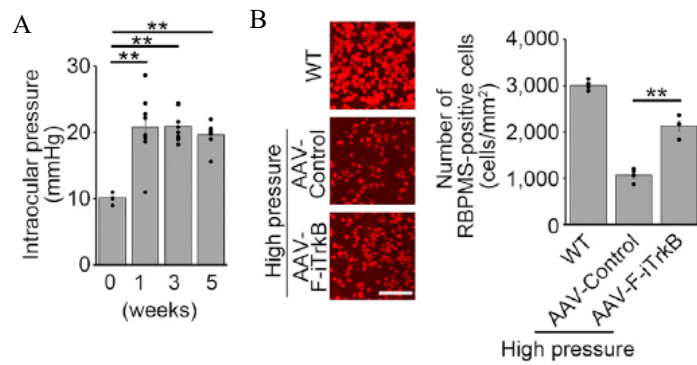


Figure 2. F-iTrkB suppressed RGC loss in glaucoma model mice. (A) IOP in WT mice with silicone oil-induced ocular hypertension. IOP is elevated by 1 week after the injection of silicone oil into the anterior chamber of the mouse eye. The one-way ANOVA with Tukey-Kramer post hoc test was used. $n = 8$ mice per group. $**p < 0.01$. (B) AAV-F-iTrkB-mediated RGC protection in mice with high IOP. RGCs were detected by immunostaining of RBPMS in WT mice at 4 weeks after silicone oil injection. Representative images (left) and quantification of RGCs (right) are shown. The one-way ANOVA with Tukey-Kramer post hoc test was used. $n = 4$ mice per group. $**p < 0.01$. Scale bar, 100 μ m.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3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 西島義道、行方和彦、木村敦子、郭 暁麗、原田知加子、野呂隆彦、中野 匡、原田高幸	4. 巻 125
2. 論文標題 リバスジル点眼は視神経損傷後の成体マウスにおいて神経保護と軸索再生を促進する	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本眼科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 82
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 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 -

[学会発表] 計9件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Atsuko Kimura, Euido Nishijima, Yuta Kitamura, Sari Honda, Xiaoli Guo, Chikako Harada, Kazuhiko Namekata, Takayuki Harada
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 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Atsuko Kimura, Kazuhiko Namekata, Xiaoli Guo, Nobutaka Arai, Chikako Harada, Takayuki Harada
2. 発表標題 Microglial DOCK8 and neurodegeneration
3. 学会等名 The 4th International Conference on Applied Biochemistry and Biotechnology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Atsuko Kimura, Euido Nishijima, Yuta Kitamura, Sari Honda, Xiaoli Guo, Chikako Harada, Kazuhiko Namekata, Takayuki Harada
2. 発表標題 AAV-mediated delivery of constitutively active TrkB promotes CNS axon regeneration and neuroprotection
3. 学会等名 Neuroscience 2021 (国際学会)
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124回日本眼科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本田紗里、金義道、北村裕太、郭曉麗、木村敦子、行方和彦、松田彰、村上晶、原田高幸
2. 発表標題 活性型TrkBを用いた遺伝子治療は上丘における網膜神経節細胞の軸索再生を促進する
3. 学会等名 第124回日本眼科学会総会
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124回日本眼科学会総会
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、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 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〕

東京都医学総合研究所 視覚病態プロジェクトHP 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
---------	---------