

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18404

研究課題名（和文）アデノ随伴ウイルスベクターを用いた緑内障に対する遺伝子治療の開発

研究課題名（英文）The neuroprotective effects of gene therapy on glaucoma model mouse.

研究代表者

北村 裕太（KITAMURA, Yuta）

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：90868259

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではBDNF-TrkBシグナルが網膜神経節細胞の生存に与える影響を検討した。TrkB floxマウスにAAV-Creを眼球内投与して、網膜組織中の細胞から内在性のBDNF-TrkBシグナルを消失させたところ、主に網膜神経節細胞の細胞死が誘導されることがわかった。さらに、網膜神経節細胞の多くのサブタイプで細胞死が生じていたが、ipRGCでは比較的細胞死が抑制されていることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これらの結果から、BDNF-TrkBシグナルは平常時においてもRGCでは特に重要な働きを持っており、このシグナルが消失することにより、多くのRGC細胞は生存できなくなることが判明した。したがってTrkBの遺伝子治療などにより、緑内障などにおけるRGC変性の進行を抑制できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the effects of BDNF-TrkB signaling on retinal ganglion cell (RGC) survival. After deletion of TrkB molecules in the retina, we detected severe RGC degeneration. Cell death was observed in many RGC subtypes except ipRGCs. These results suggest the possibility that gene therapy enhancing BDNF-TrkB signaling may be useful for RGC protection.

研究分野：神経科学

キーワード：緑内障 TrkB AAV 細胞死

1. 研究開始当初の背景

緑内障は軸索障害に起因する網膜神経節細胞 (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。しかしながら、以下の点で不十分である。

(1) 軸索は一度障害を受けると再生することが非常に困難であり、最終的に進行性の RGC 細胞死を伴うことから、病態の進行は不可逆的である。変性をきたした軸索や RGC を再生させ、視覚障害を回復させる効果は眼圧降下治療にはなく、病態の進行を緩和させるに留まる。

(2) 緑内障は多因子疾患として認識されつつあり、眼圧以外にもグルタミン酸毒性、酸化ストレス、血流障害、加齢、神経栄養因子の低下など、多くの要因が関与することが示唆されている。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 割を占めるという特徴がある。

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。原因として 1) 受容体である TrkB の発現低下、2) BDNF に対する中和抗体の産生、3) 分泌型 BDNF の不足、4) pro-BDNF による競合などが指摘されている。そこでは、BDNF-TrkB の下流のシグナルが重要だと考え、TrkB flox マウスを活用して、RGC 生存への影響を検討した。

2. 研究の目的

内在性の BDNF-TrkB シグナルが RGC の生存や変性に与える影響について、TrkB の細胞種特異的欠損 (conditional knockout; CKO) マウスを用いて明らかにする。

3. 研究の方法

生後 3 ヶ月以降の TrkB flox マウスへ AAV-DJ-Cre の眼球内投与を行うことにより、網膜全体から TrkB を欠失させた。同様に AAV2-Cre を投与することによって、RGC における TrkB の欠損を誘導した。また網膜グリア細胞から欠失させる際には AAV-Shh10-Cre の投与を行った。AAV 投与後から 3、5、7 週間飼育した後に 4%PFA で灌流固定を行い網膜を採取した。

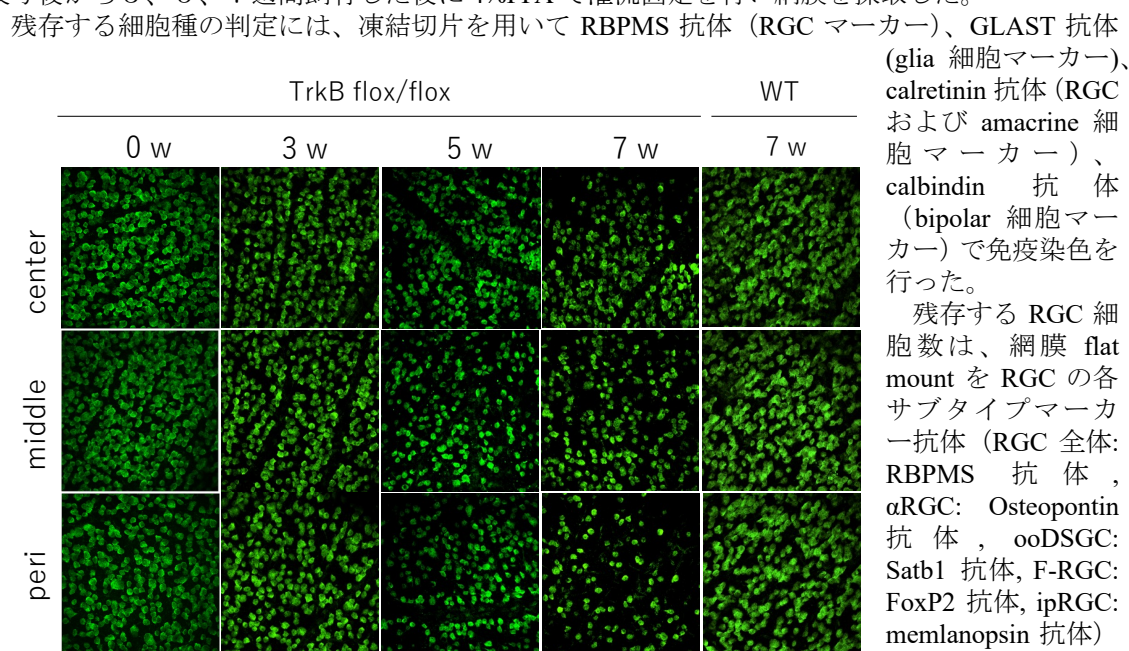


図1 AVV-DJ-Cre を感染させた網膜 flat mount の RBPMS 抗体による免疫染色。

から近傍 (center)、中間 (middle)、遠方 (peri) の3部位について行った。

4. 研究成果

(1) TrkB flox マウスへ AAV-DJ-Cre を眼球内投与することで、網膜の全ての細胞に Cre を発現させ TrkB を欠損させた。AAV-DJ は神経細胞およびグリア細胞の両方に感染し、且つ神経細胞に対しても選択性がなく、網膜全体に Cre を発現させることが可能である。AAV-DJ-Cre の投与から3、5、7週間飼育した後に4%PFAで灌流固定を行い網膜を採取した。残存する RGC 細胞数は、網膜 flat mount を RBPMS 抗体で免疫染色することで算出した。いずれの部位でも AAV-DJ-Cre を投与して5週目以降から RGC 細胞の有意な減少が確認された (図1)。一方、WT マウスの眼球に AAV 2-Cre を投与しても、RGC の減少は確認されなかった。以上の結果は、網膜全体から TrkB が消失することで、RGC 細胞死が誘導されたことを示す。さらに、網膜凍結切片を RBPMS 抗体、GLAST 抗体、calretinin 抗体、calbindin 抗体で免疫染色したところ、RGC 以外の細胞での顕著な細胞死は検出されなかったことから、TrkB の消失によって細胞死が誘導されるのは主に RGC であると考えられた。

(2) 先述の RGC 細胞死の主な原因は、RGC に発現する TrkB の消失であることを明確にするため、次に AAC2-Cre を使用した。AAV2-Cre は網膜において、主に RGC に感染することが知られている。TrkB flox マウスへ AAV2-Cre を投与することで、RGC から選択的に TrkB を欠損させた。AAV2-Cre 投与後から3、5、7週間飼育した後に4%PFAで灌流固定を行い網膜を採取した。残存する RGC 細胞数は、網膜 flat mount を RBPMS 抗体で免疫染色すること

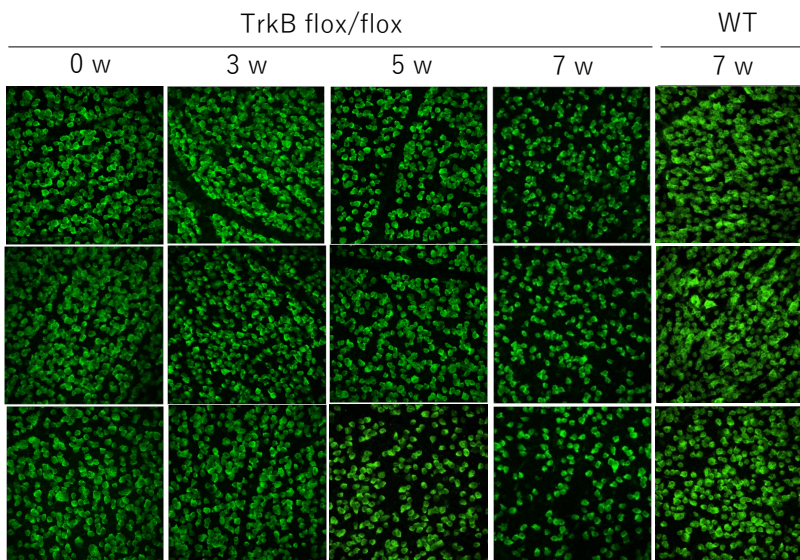


図2 AAV2-Cre を感染させた網膜 flat mount の RBPMS 抗体による免疫染色。

で算出した。いずれの部位でも AAV を投与して5週目以降から RGC 細胞の有意な減少が確認された (図2)。また、WT マウスの眼球に AAV 2-Cre を投与しても、RGC の減少は確認されなかった。さらに、AAV-Shh10-Cre を用いて、網膜グリア細胞特異的に TrkB の欠損を誘導したところ、RGC 細胞死は全く誘導されなかった。

(1) の結果と比較すると、RGC の変性はわずかに軽度であったが、TrkB は RGC から欠損するだけでも細胞死が誘導されることが確認された。

(3) (2) と同様に TrkB flox マウスへ AAV2-Cre を投与することで、RGC から選択的に TrkB を欠損させた。残存する各種 RGC サブタイプ (αRGC, ooDSGC, F-RGC, ipRGC) の細胞数は、網膜 flat mount をそれぞれのサブタイプのマーカー抗体で免疫染色することで算出した。その結果、ipRGC 以外はいずれも細胞数の顕著な減少が確認された (図3)。

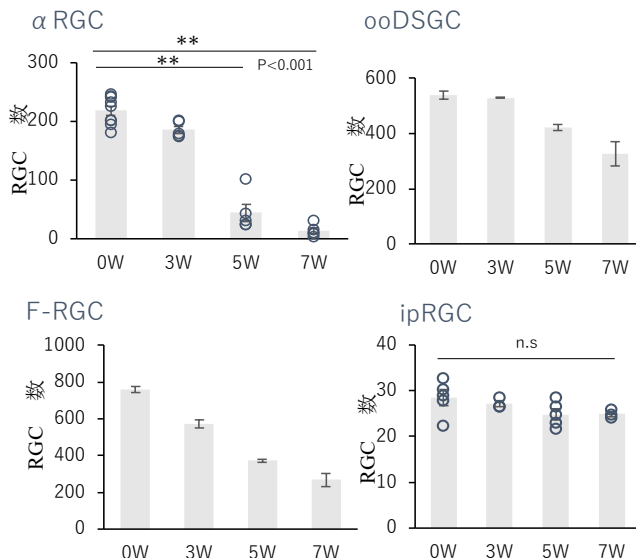


図3 サブタイプ別の残存 RGC 定量グラフ。

(4) 以上の結果から、**BDNF-TrkB** シグナルは平常時においても **RGC** では特に重要な働きを持っており、このシグナルが消失することにより、多くの **RGC** 細胞は生存できなくなることが判明した。したがって **TrkB** の遺伝子治療などにより、緑内障などにおける **RGC** 変性の進行を抑制できる可能性がある。

また今後は **ipRGC** のように、耐性の高い細胞種の遺伝子発現検討などを行うことにより、将来的な神経保護療法等に繋げることが重要と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

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

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 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 網膜TrkB受容体が成熟個体における網膜神経節細胞の生存に与える影響.
3. 学会等名 第125回日本眼科学会総会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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