

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16961

研究課題名（和文）網膜神経節細胞の樹状突起再生による新規治療法の開発

研究課題名（英文）Developing a Novel Therapy through Retinal Ganglion Cell Dendrite Regeneration

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） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者らはTrkBシグナルを常時活性化する分子を独自に開発し、AAVを用いた遺伝子治療により、視神経障害モデルおよび正常眼圧緑内障モデルにおいて網膜神経節細胞（RGC）の神経保護および軸索再生を誘導することに成功し、その成果を国際科学雑誌であるmolecular therapyに報告した。また、成熟個体のRGC特異的にTrkBを欠損させると、比較的急速にRGC細胞死が誘導されることを見出した。RGC細胞死に先行して、RGC樹状突起の退縮や網膜機能低下、軸索変性を示唆する所見を得た。さらに、RGCが最もTrkB欠損による細胞死を引き起こすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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RGCの細胞死が誘導されることがわかった。さらに、RGC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。緑内障マウスの早期作成ができることが示唆され、今後の緑内障の研究に活用することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：We developed a molecule F-iTrkB that can constantly activate TrkB signaling, which successfully induced neuroprotection and axonal regeneration of retinal ganglion cells (RGCs) in optic neuropathy and normal tension glaucoma models by gene therapy using AAV2-F-iTrkB (Nishijima et al., Molecular Therapy, 2023). We also found that RGC-specific TrkB deficiency in adult mice induced relatively rapid RGC cell death, which was preceded by RGC dendrite regression, retinal function impairment and axonal degeneration. Furthermore, we found that RGC, a subtype of RGC, most likely causes cell death due to TrkB deficiency. In addition, in order to visualize the distribution of mitochondria inside RGC dendrites with 3D images, we expressed a fluorescent protein that binds to mitochondria using AAV-vector. We found that the number of mitochondria inside dendrites was significantly reduced before RGC cell death.

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。原因として 受容体である TrkB の発現低下、BDNF に対する中和抗体の産生、分泌型 BDNF の不足、pro-BDNF による競合などが指摘されている。ここでは、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 シグナルが網膜神経節細胞の生存や変性に与える影響について TrkB CKO マウスを用いて明らかにする。

3. 研究の方法

Adult の TrkB flox マウス眼球へ AAV-Cre を投与することによって、RGC における TrkB 遺伝子の欠損を誘導する。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。残存する RGC 細胞数は、網膜 flat mount を RGC の各サブタイプマーカー抗体 (RBPM5 抗体: pan-RGC, OPN 抗体: α RGC, FoxP2 抗体: F-RGC, melanopsin 抗体: ipRGC) で免疫染色することで算出した。細胞数の計測は、乳頭部から近傍 (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 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。

(2) TrkB flox マウスへ AAV2-Cre を投与することで、RGC に選択的に Cre を発現させ TrkB を欠損させた。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。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 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。また、WT マウスの眼球へに AAV 2 -Cre を投与しても、RGC の減少は確認されない。

(3) (2)と同様に TrkB flox マウスへ AAV2-Cre を投与することで、RGC に選択的に Cre を発現させ TrkB を欠損させた。残存する各種 RGC サブタイプ細胞数は、網膜 flat mount を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 RGC 数の減少が認められた。

(4) RGC 細胞死が誘導されるメカニズムとして、ミトコンドリアの動態に着目し、ミトコンドリアに結合する蛍光タンパクの AAV ベクターを活用して、RGC 樹状突起内部のミトコンドリア分布を 3D イメージで可視化したところ、RGC 細胞死が誘導される前に樹状突起内部のミトコンドリア数が有意に減少することを見出した (図 1)。

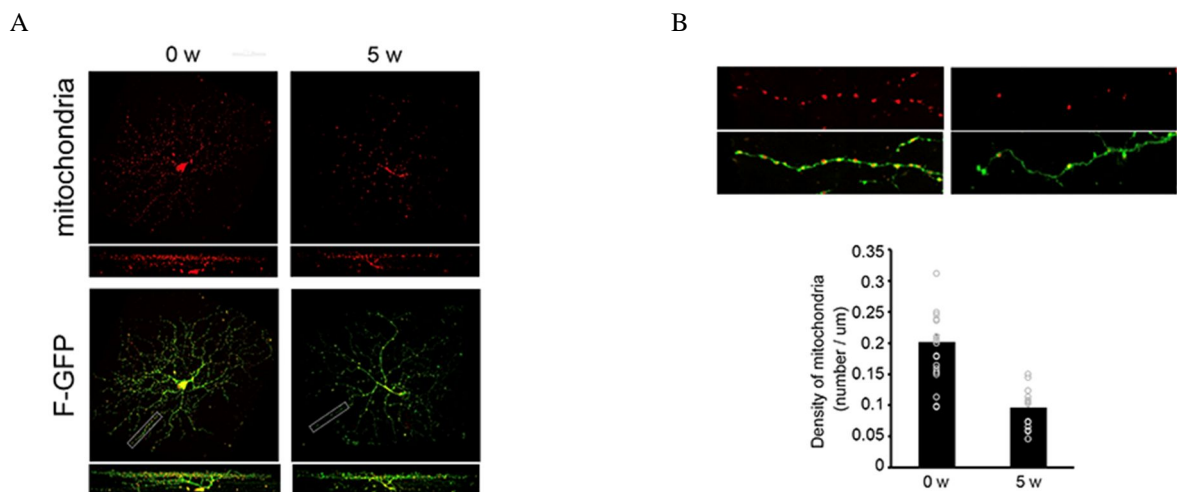


図 1 (A) RGC 樹状突起及びミトコンドリアの可視化. (B)ミトコンドリアの定量グラフ.

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。さらにこの TrkB 消失による細胞死は RGC に選択的に起きることから、緑内障発症のメカニズムと深い関連があると推測できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nishijima Euido, Honda Sari, Kitamura Yuta, Namekata Kazuhiko, Kimura Atsuko, Guo Xiaoli, Azuchi Yuriko, Harada Chikako, Murakami Akira, Matsuda Akira, Nakano Tadashi, Parada Luis F., Harada Takayuki	4. 巻 31
2. 論文標題 Vision protection and robust axon regeneration in glaucoma models by membrane-associated Trk receptors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Therapy	6. 最初と最後の頁 810 ~ 824
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymthe.2022.11.018	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, Tsuji Naoki, Guo Xiaoli, Nishijima Euido, Honda Sari, Kitamura Yuta, Yamasaki Atsushi, Kishida Masamichi, Takeyama Jun, Ishikawa Hirokazu, Shinozaki Youichi, Kimura Atsuko, Harada Chikako, Harada Takayuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Neuroprotection and axon regeneration by novel low-molecular-weight compounds through the modification of DOCK3 conformation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Death Discovery	6. 最初と最後の頁 166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41420-023-01460-8	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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のホームページ 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
---------	---------