

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18365

研究課題名（和文）コモン・マーモセット視神経挫滅モデルと転写活性因子を用いた視神経再生治療

研究課題名（英文）Regenerative therapy with transcriptional activators using the common marmoset optic nerve crush model.

研究代表者

野呂 隆彦（NORO, Takahiko）

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：00349606

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）：緑内障は我が国で最大の失明原因であり様々な研究が行われているが、現状を改善する画期的な治療法は未だ確立されていない。今回研究代表者は、細胞の生存に重要な転写活性因子に注目し、よりヒトに近い霊長類であるコモン・マーモセット（以下マーモセット）を用いて、正常眼圧緑内障に対する再生治療法を確立することを目指した。結果、網膜神経節細胞の再生に重要なたんぱく質を同定し、マウスでは遺伝子治療により強い再生治療に成功した。また、マーモセットの視神経挫滅モデルを確立し同様な遺伝子治療を行うことにも成功したが、マウスと同様な再生効果が得られず、より効率的な遺伝子治療の検討が今後の課題として明確になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会の到来とともに、緑内障患者数はさらに増加することが予想されている。そこで適切な緑内障疾患モデルを活用した薬剤や治療法の研究が今後ますます求められる状況である。今回の研究では、齧歯類と霊長類を用いた遺伝子治療研究を比較しながら行っており、本研究成果が緑内障のあたらしい治療法の開発促進に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Glaucoma is the leading cause of blindness in Japan, and although various studies have been conducted, no breakthrough treatment has yet been established to improve the current situation. In this study, we aimed to establish a regenerative therapy for normal tension glaucoma by using common marmosets, focusing on transcription activating factors that are important for cell survival. As a result, we identified transcription factors that are important for the regeneration of retinal ganglion cells and succeeded in strong regenerative therapy in mice. We also succeeded in establishing optic nerve crush model in marmosets and performing similar gene therapy. However, the regenerative effect was not the same in marmosets as in mice, and the development of more efficient gene therapy is a future subject.

研究分野：眼科学

キーワード：コモン・マーモセット 網膜神経節細胞 視神経挫滅モデル 転写活性因子 正常眼圧緑内障

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 緑内障は40歳以上の約6%に発症し、潜在患者数は500万人とも推定され、我が国における最大の失明原因である。本邦の緑内障は眼圧が正常範囲内である正常眼圧緑内障(以下 NTG: Normal Tension Glaucoma)が全体の約7割を占めるが¹⁾、十分な眼圧降下を行っても進行する症例が散見され²⁾、こうした難症例に対する対応が極めて困難な状況にある。また、その眼圧降下治療の最大の効果は視機能の現状維持であり、一度失われた視機能を回復させる治療は存在しないため、直接的な神経保護薬や再生治療などの根本的な治療法の開発が急務である。

(2) 眼の研究用実験動物として遺伝子改変マウスなどが主に使用されてきたが、マウスの視神経乳頭には篩状板が存在せず、解剖学的、生理学的な違いが問題として指摘されている。一方、古くから研究に用いられているマカク属のサル類は大型で、広い飼育スペースが必要なだけでなく、人獣共通感染症や倫理的な多くの問題点が指摘されていた。更に、ヒト以外の霊長類ではNTGを自然発症しないとされており、病態解明や治療法の開発に大きな障害となっていた。そこで研究代表者は、このような問題を解決する実験動物として、ヒトに近縁な霊長類でありながら小型で人獣共通感染症も少ないコモン・マーモセット(以下マーモセット)に注目し、約1000匹のマーモセットの眼底スクリーニングを行ったところ、高齢個体の約10%にNTGが自然発症することを見出し報告した³⁾。

(3) DNAに特異的に結合するたんぱく質の一群である転写因子が癌細胞などの増殖調節・制御機構で重要な役割を担うことが知られているが、緑内障を含む眼疾患や神経変性疾患との関連は詳しく解明されていなかった。そこで研究代表者は、E26 transformation-specific (ETS) ファミリーに属する転写活性因子の中で、鬱病の画期的な治療薬として報告されたELK-1に関する研究を開始した⁴⁾。

2. 研究の目的

本研究では、転写活性因子であるELK-1に注目し、マーモセットの視神経挫滅モデルを用いて、NTGに対する再生治療法の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) 視神経障害後に軸索再生に関与する転写活性因子をRNAシーケンスを用いて網羅的に検索。

(2) アデノ随伴2型ウイルス(以下 AAV-2)ベクターを作製し、その効果をまずマウスの視神経挫滅モデルで確認。ELK-1を網膜神経節細胞(以下 RGC)でノックダウン・過剰発現させ、RGCの細胞体への効果と軸索への効果を確認した。

(3) マーモセット視神経挫滅モデルとその評価方法を構築。挫滅刺激後のRGCの変性や薬剤の保護効果を確認する為、網膜のフラットマウント作製と、免疫染色による細胞数を測定。蛍光標識コレラトキシンBサブユニット(CTB)の眼球内投与による視神経軸索の逆行性ラベリングをマーモセットで行った。

(4) マーモセットへ AAV-2 ベクターを投与し、挫滅モデルへの効果を判定した。

4. 研究成果

(1) 再生因子のカクテル治療とコントロール注射のいずれかで網膜を処理し、視神経損傷の1日・5日後に組織を採取しRGCのRNA配列を決定した。並行して、E18マウスまたはP5マウスからRGCをイムノパニングにより精製しRNA配列を決定した。トランスクリプトームをGene Set Enrichment Analysis法で評価し、上流の陽的な転写因子を同定した(図1)⁵⁾。

(2) マウス視神経挫滅モデルにおいてELK-1過剰発現AAV-2の効果を確認したところ、著明な軸索再生効果とRGCの保護効果を認めた(図2)。また、ELK-1を抑制するAAV-2を硝子体注射したところ、RGCの細胞死が認め

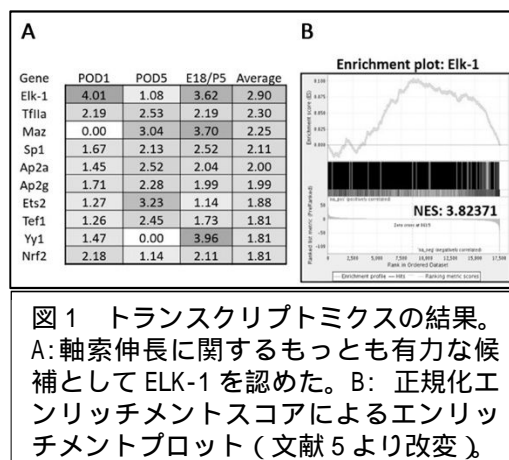


図1 トランスクリプトミクスの結果。A: 軸索伸長に関するもっとも有力な候補としてELK-1を認めた。B: 正規化エンリッチメントスコアによるエンリッチメントプロット(文献5より改変)

られた。このことから、ELK-1 は RGC の生存に必須であることが確認され、今回作製されたベクターが RGC に確実に作用することが確認できた。

(3) 若齢のマーマセットを用いて、視神経挫滅モデルを作製した。視神経挫滅法は、マウスでは一般的なモデル作製方法として知られているが、霊長類での作製の報告は無く、今回が初めての試みとなった。ヒト眼窩腫瘍の摘出術を参考に、マーマセットの側頭部から側頭骨を開放することで眼窩へ直接アプローチすることが可能となった(図3)。挫滅刺激はマウスに準じて鑷子によるものとした。次に、再生軸索の評価として用いられる CTB の硝子体投与の量とタイミングを検討し、最適な条件を見出した。

(4) 作製した AAV-2 ベクターをマーマセット挫滅モデルに硝子体投与し、CTB による再生軸索の評価を行った。結果、投与眼の視神経にわずかな再生繊維を認めたと、マウスモデルの時と比べ、再生された繊維は大変限られていた(図4)。ベクター濃度や投与タイミング、感染効率などの改善が必要で、より強い再生効果を得られる様な条件検討が今後の課題として明確になった。

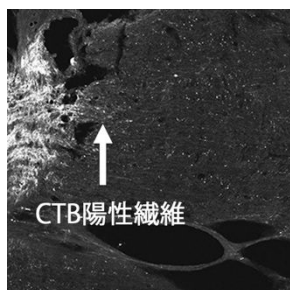


図4 マーマセット視神経。挫滅創とわずかな CTB 陽性繊維を認めた。

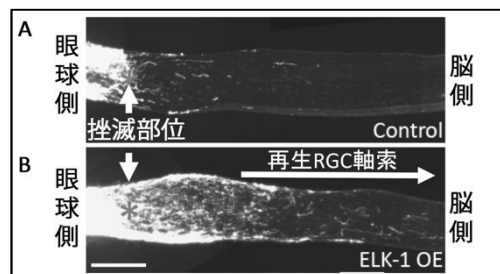


図2 ELK-1 過剰発現ウイルスベクターによるマウス RGC 軸索への再生効果。A: コントロールベクター。B: ELK-1 の過剰発現により RGC の軸索再生を認めた(文献5より改変)。

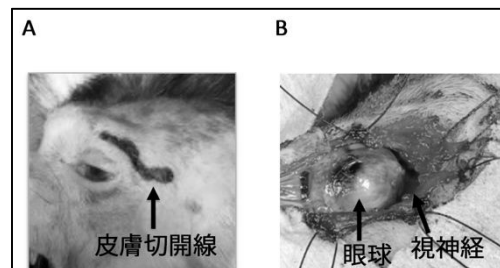


図3 マーマセット挫滅モデルの作製。A: 皮膚切開後に側頭骨を露出。B: 目視下で視神経を鈍的に傷害。

< 引用文献 >

- 1) Iwase A., Suzuki Y., Araie M. ほか: The prevalence of primary open-angle glaucoma in Japanese: the Tajimi Study. *Ophthalmology* **111** : 1641-1648, 2004
- 2) : Comparison of glaucomatous progression between untreated patients with normal-tension glaucoma and patients with therapeutically reduced intraocular pressures. Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study Group. *Am J Ophthalmol* **126** : 487-497, 1998
- 3) Noro T., Namekata K., Kimura A. ほか: Normal tension glaucoma-like degeneration of the visual system in aged marmosets. *Sci Rep* **9** : 14852, 2019
- 4) Apazoglou K., Farley S., Gorgievski V. ほか: Antidepressive effects of targeting ELK-1 signal transduction. *Nat Med* **24** : 591-597, 2018
- 5) Noro T., Shah S. H., Yin Y. ほか: Elk-1 regulates retinal ganglion cell axon regeneration after injury. *Sci Rep* **12** : 17446, 2022

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

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 -

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 1-10
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 Chang Kun-Che, Bian Minjuan, Xia Xin, Madaan Ankush, Sun Catalina, Wang Qizhao, Li Liang, Nahmou Michael, Noro Takahiko, Yokota Satoshi, Galvao Joana, Kreymerman Alexander, Tanasa Bogdan, Hu Yang, Goldberg Jeffrey L.	4. 巻 8
2. 論文標題 Posttranslational Modification of Sox11 Regulates RGC Survival and Axon Regeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eNeuro	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/ENEURO.0358-20.2020	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 該当する

1. 著者名 Kimura Atsuko, Noro Takahiko, Harada Takayuki	4. 巻 15
2. 論文標題 Role of animal models in glaucoma research	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neural Regeneration Research	6. 最初と最後の頁 1257-1257
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4103/1673-5374.272578	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 Noro Takahiko, Shah Sahil H., Yin Yuqin, Kawaguchi Riki, Yokota Satoshi, Chang Kun-Che, Madaan Ankush, Sun Catalina, Coppola Giovanni, Geschwind Daniel, Benowitz Larry I., Goldberg Jeffrey L.	4. 巻 12
2. 論文標題 Elk-1 regulates retinal ganglion cell axon regeneration after injury	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-21767-3	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 該当する

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 野呂隆彦
2. 発表標題 高齢マーマセットと緑内障
3. 学会等名 Tokyo Ophthalmology Summit 2021 東京眼科サミット2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野呂隆彦
2. 発表標題 留学経験とあたらしい緑内障治療の探索
3. 学会等名 第1回 APOLLON CLUB (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐野 圭、小川俊平、野呂隆彦
2. 発表標題 線維柱帯切開術を契機に黄斑円孔再発を認めた一例
3. 学会等名 第21回 Tokyo Glaucoma Retina Joint Conference
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nanami Kishimoto, Takahiko Noro, Fumitoshi Kodaka, Mei Kurosawa, Yoshinori Itoh, Shumpei Ogawa, Tomoyuki Watanabe, Masaomi Kubota, Kanako Hirayama, Masahiro Shigeta, Tadashi Nakano.
2. 発表標題 Association of side effects of prostaglandins with patient intentions and personality traits.
3. 学会等名 第9回 World Glaucoma E-Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Koki Honzawa, Shunpei Ogawa, Ryo Ohira, Sachiyo Okude, Yoshiko Yamawaki, Mei Kurosawa, Tomoyuki Watanabe, Takahiko Noro, Tadashi Nakano.
2. 発表標題 valuation of glaucoma screening using microperimeter 3 (MP-3).
3. 学会等名 第9回 World Glaucoma E-Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野呂隆彦
2. 発表標題 正常眼圧緑内障と脳脊髄圧
3. 学会等名 第32回日本緑内障学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野呂隆彦
2. 発表標題 24-2C SITA Faster による緑内障スクリーニング
3. 学会等名 第32回日本緑内障学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大平亮、小川俊平、本澤孝樹、江田愛夢、奥出祥代、西島義道、山脇佳子、渡辺友之、野呂隆彦、中野匡
2. 発表標題 マイクロペリメータを用いた緑内障スクリーニングプログラムの評価；眼球回旋への対応
3. 学会等名 第32回日本緑内障学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長與里沙、野呂隆彦、小川俊平、大平亮、江田愛夢、奥出祥代、外園晶子、山脇佳子、西島義道、渡邊友之、中野匡
2. 発表標題 緑内障におけるHumphrey視野計24-2C SITA Fasterの10°内追加点の評価
3. 学会等名 第32回日本緑内障学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西島麗美、吉川啓司、小川俊平、西島義道、野呂隆彦、中野匡
2. 発表標題 中心視野障害のない緑内障眼におけるGCL、IPL厚
3. 学会等名 第32回日本緑内障学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大平亮、小川俊平、江田愛夢、奥出祥代、野呂隆彦、中野匡
2. 発表標題 網膜対応視野計MP-3を用いた緑内障スクリーニングプログラムの評価
3. 学会等名 第806回東京眼科集談会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐野 圭、寺内 稜、小川俊平、野呂隆彦、新井香太、立道昌幸、中野 匡
2. 発表標題 リバズジルの遅発性眼圧下降効果とその影響因子
3. 学会等名 第75回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野呂隆彦
2. 発表標題 コモン・マーモセットと緑内障治療薬の探索
3. 学会等名 第50回 宮城眼科先進医療研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野呂隆彦
2. 発表標題 正常眼圧緑内障と脳脊髄圧
3. 学会等名 第557回慈眼会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野呂隆彦
2. 発表標題 「濾過手術の基本手技」 / (プレート付) チューブシャント手術
3. 学会等名 第45回日本眼科手術学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野呂隆彦
2. 発表標題 緑内障の細胞機能異常と治療 緑内障と視覚中枢の変化
3. 学会等名 第31回日本緑内障学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野呂隆彦
2. 発表標題 緑内障診療における脳脊髄圧
3. 学会等名 第76回日本臨床眼科学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計5件

1. 著者名 野呂隆彦、林孝彰	4. 発行年 2021年
2. 出版社 総合医学社	5. 総ページ数 3
3. 書名 眼と全身病アトラス（中隔視神経異形成）	

1. 著者名 野呂隆彦	4. 発行年 2021年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 6
3. 書名 膠原病ハンドブック（眼科との連携）	

1. 著者名 野呂隆彦	4. 発行年 2021年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 2
3. 書名 新篇眼科プラクティス 1 スッキリわかる緑内障の検査と診断 (網膜疾患の視野)	

1. 著者名 野呂隆彦	4. 発行年 2020年
2. 出版社 マキノ出版	5. 総ページ数 2
3. 書名 世界中から期待を集める長寿物質スベルミジン	

1. 著者名 野呂隆彦	4. 発行年 2022年
2. 出版社 金原出版	5. 総ページ数 6
3. 書名 【正常眼圧緑内障と眼圧】脳脊髄圧と眼圧	

〔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
---------	---------

米国	Stanford University	Byers Eye Institute	Spencer Center for Vision Research	他2機関
----	---------------------	---------------------	------------------------------------	------