

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09688

研究課題名(和文)軸索再生と再髄鞘化をターゲットとした遺伝子治療による視機能回復の検討

研究課題名(英文)Visual function recovery by gene therapy targeting axon regeneration and remyelination

研究代表者

郭 曉麗 (GUO, Xiaoli)

公益財団法人東京都医学総合研究所・疾患制御研究分野・主席研究員

研究者番号：50443114

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)：多発性硬化症のモデルEAEマウスにおいてミクログリアからASK1が特異的に欠損するとその重症度はearly stageから、アストロサイトからASK1が特異的に欠損するとlate stageから症状が軽減することを明らかにした。また多発性硬化症患者の脳切片を用いた解析からASK1の活性化が見られ、アストロサイトのASK1がミクログリアのそれよりも強く活性化することを見出した。さらに、リガンドなしで常に活性化型となるTrkB分子を開発した。それを組み込んだ遺伝子治療ベクター(AAV-F-iTrkB)による緑内障モデルに対する神経保護効果、視神経再生効果及び視機能の回復効果を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ASK1の細胞特異的な機能や既存薬剤による治療研究から網膜および視神経変性疾患など難病の発症メカニズムを解明し、治療法の開発に有用な情報を提供した。特にMSによる視神経変性に対する治療薬の開発に有用である。また緑内障の新たな治療法として常時活性化型TrkB遺伝子治療システムを開発し報告した。このシステムは他の常時活性化型受容体の作製にも活用できており汎用性がある。研究成果はPNASやMolecular therapyなどの学術誌に載せた他、研究所HP、都立病院との共同研究会や産学連携研究会でも紹介し、研究成果を積極的に社会に公開する。

研究成果の概要(英文)：We found that neuroinflammation was reduced in both the early and later stages of EAE in microglia/macrophage-specific ASK1 knockout mice, whereas only the later stage neuroinflammation was ameliorated in astrocyte-specific ASK1 knockout mice. By using post-mortem multiple sclerosis tissue, ASK1 activation was found in active lesions of corpus callosum in both microglia/macrophages and astrocytes. Moreover, ASK1 activation in astrocytes was higher than that in microglia/macrophages, which were in line with our findings in EAE mice. We invented a system (iTrkB) that results in constitutive activation without TrkB's ligands. iTrkB expression enhances neuroprotection in mouse models of glaucoma and stimulates robust axon regeneration after optic nerve injury. In addition, iTrkB expression in the retina was also effective in an optic tract transection model, in which regenerating axons successfully formed pathways to their brain targets, resulting in partial recovery of visual behavior.

研究分野：神経科学

キーワード：多発性硬化症 ASK1 グリア細胞 TrkB 遺伝子治療 軸索再生 神経保護 再髄鞘化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

視機能は網膜内の神経ネットワーク、あるいは網膜から脳への軸索投射のいずれかを妨げられただけで障害を受ける。したがって、たとえ神経細胞が残存している場合でも、樹状突起や軸索の変性、あるいは脱髄によって視機能障害が生じ得る。確かに神経変性疾患において神経保護は重要な課題であるが、同時に樹状突起や軸索などの神経突起の維持・再生およびミエリンの再髄鞘化も、その治療において非常に重要な課題であると考えられる。

網膜は中枢神経系に分類されることから、末梢神経系とは異なり、その再生能力は非常に低いと考えられてきた。ところが最近では、眼球近傍で切断された視神経軸索の一部が、脳の上丘まで再投射可能であることが報告された (Lim et al. Nat Neurosci, 2016)。これは視覚刺激によって網膜神経節細胞 (RGC) の電気活動を増強しながら、AAV を用いた遺伝子治療により mTOR シグナルを同時に増強するという手法であった。AAV による遺伝子発現は一過性ではあるが数ヶ月に渡って持続する。一方でレンチウイルスなどとは異なり、染色体に組み込まれる心配がない。さらに眼球は閉鎖空間であることから、AAV などのウィルスベクター投与が容易であり遺伝子治療の対象組織としては非常に適していると考えられる。

### 2. 研究の目的

独自に作製した活性型 TrkB の AAV ベクターを用いて、緑内障モデルや多発性硬化症モデルにおける視神経軸索および RGC の樹状突起、ミエリンの再髄鞘化に対する遺伝子治療効果を検討する。

### 3. 研究の方法

活性型 TrkB 分子を作製し、これを組み込んだ遺伝子治療ベクター (AAV-F-iTrkB) を、緑内障モデル動物の眼内に注射した。さらに視神経損傷の外傷モデルマウスにおいても同様の遺伝子治療を行い、一旦傷んだ視神経軸索を再生できるかどうかを調べた。また軸索の再生距離が短くても視機能が改善しやすいモデルとして、視覚中枢である上丘において視覚経路を切断したマウスを作製した。このマウスの眼球内に遺伝子治療ベクターを投与し軸索を再生できるかどうかを調べた。

中枢神経系に遺伝子導入可能なベクター AAV-PHP.eB-MAG2.2-iTrkB、PHP.eB-MAG2.2-iSH2、PHP.eB-MAG2.2-ERK ベクターを作製した。これらのベクターをそれぞれ多発性硬化症モデル EAE マウスへ静脈投与し、その治療効果を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 遺伝子治療による視神経再生 (*Molecular Therapy*, 2023)

神経栄養因子受容体である TrkB の細胞内領域を切り出し、人工的に細胞膜に結合させることによって、常に活性型となる TrkB 分子を開発した。同分子を組み込んだ遺伝子治療ベクターを眼球内に投与すると、緑内障モデルにおいて進行が抑制された。視神経損傷モデルにおいては、多くの再生線維が視交叉まで到達した (図 1)。さらに視覚野付近で視覚路を切断したマウスでは、軸索の再生と共に、視機能が部分的に回復した。以上から改変型 TrkB を用いた遺伝子治療が、緑内障の進行抑制や視機能回復に寄与する可能性が示された。

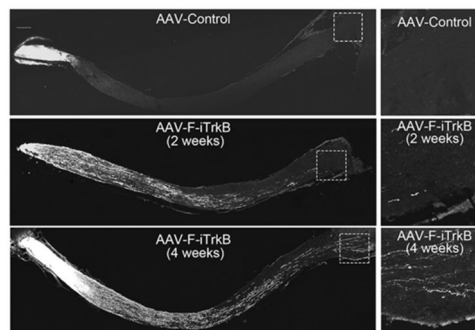


図 1 視神経損傷モデルに対する遺伝子治療の視神経再生効果。遺伝子治療の 2 週間後と 4 週間後に多くの再生した視神経軸索が観察された。

#### (2) 遺伝子治療による EAE 脱髄症状の軽減

EAE を惹起する前に PHP.eB-MAG2.2-iTrkB、PHP.eB-MAG2.2-iSH2、PHP.eB-MAG2.2-ERK ベクターを投与すると PHP.eB-MAG2.2-iTrkB 投与マウスの脊髄炎のみが軽症化し、脱髄が緩和すること

が判明した。しかしEAEマウスが発症した後にPHP.eB-MAG2.2-iTrkBベクターを投与した場合、治療効果は認められなかった。これは成熟したオリゴデントロサイトの再髄鞘化はほぼ不可能であることを示唆している。

(3) 視神経炎におけるミクログリア及びアストロサイトの機能解明 (PNAS, 2022; NEUP, 2024) MAP3K の1つである ASK1 は多発性硬化症モデルの重症化に関与する。新規に細胞種特異的ASK1 欠損マウスを作製した結果、ミクログリアに発現する ASK1 は発症早期に、アストロサイトの ASK1 は後期に、他方の細胞種に働きかけて炎症を増悪させていた。つまり ASK1 はミクログリア-アストロサイト間の相互作用を病期特異的に制御するため、有用な治療標的となる可能性が示された (図2)。

この発見の臨床的な意義を探るため、多発性硬化症患者の脳切片を用いてASK1の活性化を検討した。その結果、脱髄が顕著な脳梁部位においてASK1の活性化が見られた。また二重染色によりアストロサイトのASK1がミクログリアのより強く活性化することを見出した。

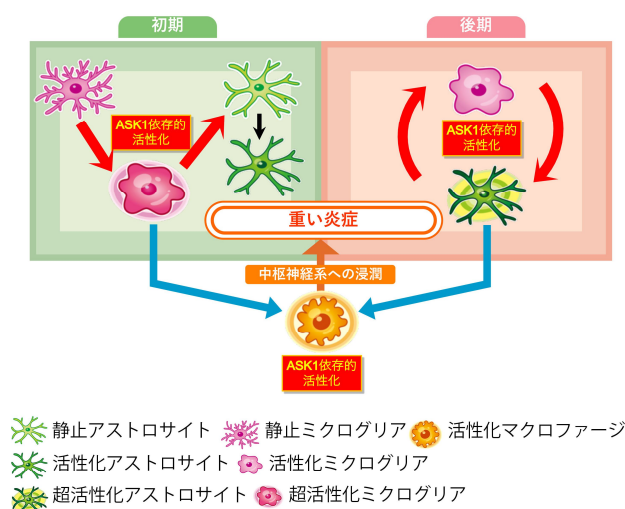


図2 EAEにおけるミクログリア-アストロサイト間の相互作用のまとめ。ASK1 は病期によってミクログリア-アストロサイト間の相互作用を変化させている。初期はミクログリア アストロサイト、後期はアストロサイト ミクログリアの順に活性化し、神経炎症の悪化や維持に関わっている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4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 該当する

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 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 ~ 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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 郭 暁麗、木村敦子、行方和彦、原田知加子、新井信隆、武田弘資、一條秀憲、原田高幸	4. 巻 126
2. 論文標題 ASK1シグナルは神経炎症におけるグリア間相互作用を病期特異的に制御する	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本眼科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 610
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 西島義道、行方和彦、木村敦子、郭 暎麗、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 Kiyota Naoki, Namekata Kazuhiko, Nishijima Euido, Guo Xiaoli, Kimura Atsuko, Harada Chikako, Nakazawa Toru, Harada Takayuki	4. 巻 799
2. 論文標題 Effects of constitutively active K-Ras on axon regeneration after optic nerve injury	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 137124 ~ 137124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2023.137124	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 Shinozaki Youichi, Namekata Kazuhiko, Guo Xiaoli, Harada Takayuki	4. 巻 3
2. 論文標題 Glial cells as a promising therapeutic target of glaucoma: beyond the IOP	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fopht.2023.1310226	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 166-166
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15件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 10件）

1. 発表者名 Harada T, Namekata K, Sotozono A, Shinozaki Y, Guo X, Harada C
2. 発表標題 Neuroprotection and axon regeneration in glaucoma models by gene therapy using modified tyrosine kinase receptors
3. 学会等名 26th EVER CONGRESS (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 外園晶子、行方和彦、郭 曉麗、篠崎陽一、野呂隆彦、中野匡、原田高幸
2. 発表標題 改変型インスリン受容体の遺伝子治療による網膜神経保護と視神経再生
3. 学会等名 第34回日本緑内障学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sotozono A, Namekata K, Guo X, Noro T, Nakano T, Harada T
2. 発表標題 Dendrite regeneration of retinal ganglion cells by gene therapy using a constitutive active form of insulin receptor
3. 学会等名 WGC2023 meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 外園晶子、郭 曉麗、行方和彦、野呂隆彦、中野 匡、原田 高幸
2. 発表標題 インスリン受容体の遺伝子治療による網膜神経節細胞の樹状突起再生
3. 学会等名 第127回日本眼科学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Xiaoli Guo
2. 発表標題 Oxidative stress-responsive gene ASK1 in retinal and optic nerve degeneration.
3. 学会等名 ARVO2022 meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kiyota N., Namekata K., Guo X., Kimura A., Nakazawa T. and Harada T.
2. 発表標題 Constitutively active Ras promotes protection and axon regeneration in retinal ganglion cells after optic nerve injury
3. 学会等名 ARVO2022 meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Xiaoli Guo, 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) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Xiaoli Guo, Kimura A, Namekata K, Harada C, Harada T.
2. 発表標題 Pathogenic roles of glial ASK1 signaling in neuroinflammation
3. 学会等名 ARVO2021 meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Atsuko Kimura, 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 Chicago (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Atsuko Kimura, 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 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Atsuko Kimura, 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44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

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 北村裕太、行方和彦、木村敦子、郭 暁麗、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

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 (国際学会)
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 ARV02021 meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>1. ASK1シグナルは神経炎症におけるグリア間相互作用を病期特異的に制御する。  <a href="https://www.igakuken.or.jp/topics/2022/0201.html">https://www.igakuken.or.jp/topics/2022/0201.html</a></p> <p>2. 第16回資生堂女性研究者サイエンスグラントを獲得した。</p> <p>3. 東京都医学総合研究所「所内研究発表会（第1部会）」（2023年11月22日開催）で優秀発表者に選出された。</p> <p>4. 2023年3月に、PNAS (2022)の筆頭著者論文に関して、理事長表彰を受賞した。</p> <p>5. 東京大学医科学研究所元所長の「新井先生を偲んで」の日本語翻訳を担当した (Maoyen Chi. 実験医学 40(11): 1763-1769, 2022; 正井所長先生が補訳)。</p>
---

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