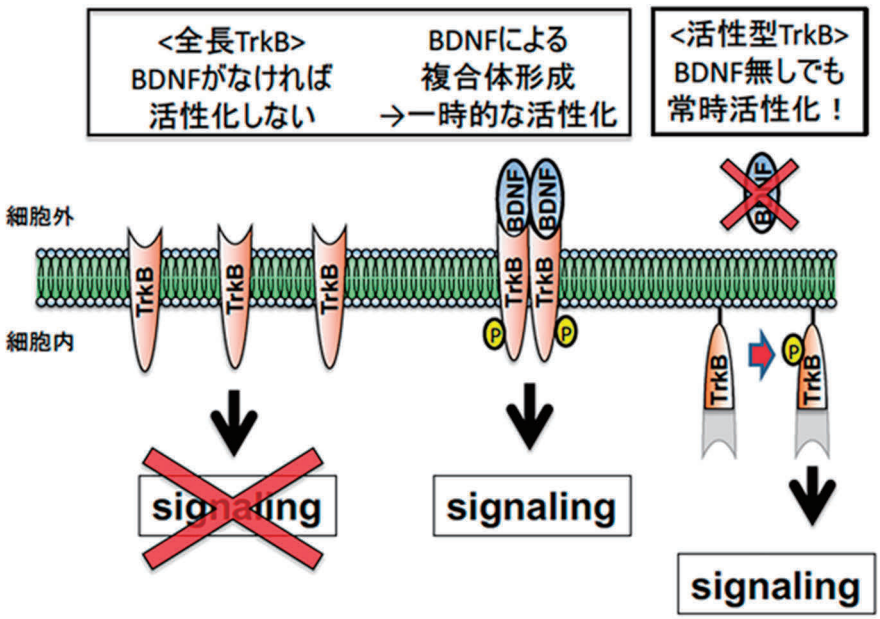
202　視覚経路の再構築と視機能回復を促進する治療法の開発	原田　高幸

【目的】我が国における失明原因の多くは網膜と視神経の変性疾患で占められているが、超高齢社会の到来とともに、さらなる失明者数の増加が危惧されている。中でも最大の要因である緑内障は網膜神経節細胞（Retinal ganglion cell：RGC）の細胞体や、その軸索である視神経が変性し、次第に視野が障害される疾患である。緑内障の治療としては眼圧を低下させる点眼薬や手術が一般的であるが、十分に眼圧を降下させても視野障害が進行するケースが一定の割合で観察されることから、全く新しい治療法の開発が求められる状況にある。そこで本研究では複数の疾患モデルを用いて緑内障に対する遺伝子治療実験を行い、その効果を検討した。また RGC に対する保護効果に加えて、一旦変性した視神経軸索が再生する可能性について、視神経外傷の疾患モデルを利用した検討を合わせて行った。

【方法】脳由来神経栄養因子（brain-derived neurotrophic factor：BDNF）の高親和性受容体である Tropomyosin receptor kinase B（TrkB）の細胞内領域のみを細胞膜に強制発現させるアデノ随伴ウイルス（adeno-associated virus：AAV）ベクターを作製した。これを高眼圧緑内障および正常眼圧緑内障の疾患モデルマウスに眼球内投与して、RGC に対する神経保護効果を調べた。また視神経外傷モデルに対しても同じ AAV ベクターを投与し、視神経軸索の再生効果について検討した。

【結果】今回開発した AAV ベクターは一度だけの眼球内投与により、ligand である BDNF の投与無しに、RGC における細胞内シグナルを活性化することに成功した。また高眼圧緑内障および正常眼圧緑内障のいずれの疾患モデルマウスにおいても RGC 保護効果を促進し、緑内障の進行を抑制した。さらに視神経外傷モデルにおいては視神経軸索の再生効果も確認された。

常時活性型 TrkB の構造



202. 視覚経路の再構築と視機能回復を促進する治療法の開発

原田　高幸

東京都医学総合研究所 病院等連携支援センター 疾患制御研究分野

Key words：視神経再生，神経保護，軸索再生，遺伝子治療，緑内障

緒　言

我が国における失明原因の多くは網膜と視神経の変性疾患で占められており、現在のように技術的に進化した治療や手術でも回復困難な症例が多いのが実態である。例えば失明原因の第 1 位である緑内障は網膜神経節細胞（Retinal ganglion cell : RGC）の細胞体や、その軸索である視神経が変性し、しだいに視野が障害される疾患であり、超高齢社会の到来とともに、さらなる患者数の増加が危惧されている。緑内障の治療としては眼圧を低下させる点眼薬や手術が一般的であるが、十分に眼圧を降下させても視野障害が進行するケースが一定の割合で観察されることから、全く新しい治療法の開発が求められる状況にある。一方、眼科領域では遺伝性網膜ジストロフィーなど、視細胞変性疾患に対する遺伝子治療が国内外で進められており、海外ではすでに承認されている事例もある。そこで本研究では神経栄養因子受容体である Tropomyosin receptor kinase B（TrkB）に注目し、ligand である脳由来神経栄養因子（brain-derived neurotrophic factor : BDNF）非存在下でも細胞内シグナルの活性化が可能な改変型 TrkB を用いた遺伝子治療ベクターを作製した。同ベクターの眼球内投与により、複数の緑内障疾患モデルにおいて神経保護効果が確認された。また視神経外傷モデルにおいては、一旦切断された視神経軸索の再生が確認された。

方法および結果

1. 常時活性型 TrkB 分子の開発

TrkB の中でも tyrosine kinase 活性のある細胞内領域（intracellular region of TrkB : iTrkB）をファルネシル化することにより、細胞膜に局在化させた常時活性型 TrkB 分子（F-iTrkB）を開発した（図 1）。Neuro2A 細胞に iTrkB を transfection すると細胞質全体に発現が見られ、下流のシグナル分子である ERK および AKT の活性化は起きなかった。しかし F-iTrkB を transfection すると主に細胞膜に局在し、BDNF の添加無しに、下流のシグナル分子が強く活性化することが確認された。F-iTrkB を発現させた場合の ERK および AKT の活性化は、全長 TrkB のみを発現させた時よりも有意に強く、全長 TrkB の発現後に高濃度の BDNF（50 ng/ml）を投与した場合と同レベルであった。

そこで次に F-iTrkB を用いたアデノ随伴ウイルス（adeno-associated virus : AAV）遺伝子発現ベクターを作製し、眼球内投与による発現確認を行った。今回は AAV2 に搭載することにより、RGC への特異的な発現を目標にした。iTrkB は全長よりも分子量が小さいため、最も活性の強い全長 CAG promoter を使用可能であった。コントロールとして GFP 搭載ベクター（AAV-GFP）を眼球内投与したところ、ほぼ網膜全体におよぶ発現が確認された。また AAV-F-iTrkB 投与後網膜の Western blot では、F-iTrkB の発現が確認できた。さらに AAV-F-iTrkB を投与後の網膜の免疫染色では、RGC 内における ERK および AKT の活性化が確認された。以上から AAV-F-iTrkB は RGC に対する遺伝子治療研究に十分なポテンシャルを持つことが確認できた。

2. 常時活性型 TrkB を用いた遺伝子治療による緑内障の抑制効果

次に *in vivo* における実験として、前房中にシリコンオイルを入れて作製した眼圧上昇モデルマウスを用いて、AAV-F-iTrkB による遺伝子治療実験を行った。同モデルではシリコンオイル注入後の 4 週間目の段階で、すでに多くの RGC が変性・脱落していた。シリコンオイル注入の 2 週間前に AAV-GFP を眼球内投与したコントロール群では、RGC 数は正常個体の 3 分の 1 程度にまで低下していたが、AAV-F-iTrkB による治療群では生存 RGC 数が約 2 倍と、有意に増加していた。

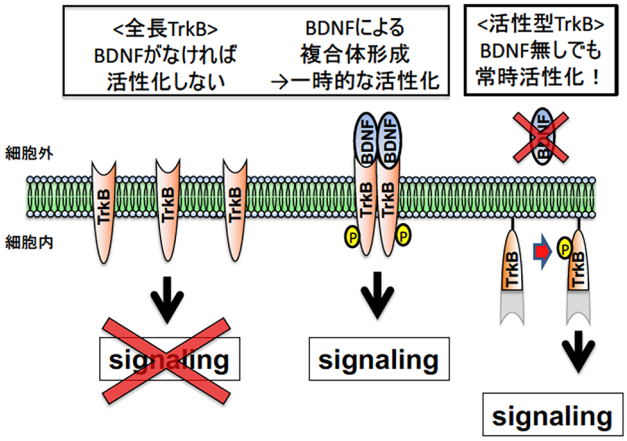


図 1. 常時活性型 TrkB の構造

Tyrosine kinase 活性のある細胞内領域をファルネシル化することにより、BDNF 濃度とは無関係に常時活性化される活性型 TrkB 分子を開発した。

欧米では高眼圧による緑内障が一般的だが、日本では緑内障全体の約 7 割が、眼圧が正常範囲に分布する正常眼圧緑内障で占められるという特徴がある。我々のグループでは世界初の正常眼圧緑内障モデルである *GLAST* 欠損マウス［1, 2］を報告しているので、このモデルに対しても AAV-F-iTrkB による遺伝子治療実験を行った。*GLAST* 欠損マウスにおいては生後 3 週から 5 週頃にかけて RGC の変性が観察される。そこで生後 10 日目に AAV-GFP または AAV-F-iTrkB を 1 回だけ眼球内投与して、生後 3、5、12 週目で効果の判定を行った（図 2）。生後 3 週の段階では既報通り、まだ RGC 数の減少は起きていなかった。しかし生後 5 週齢または 12 週齢になると、AAV-GFP を眼球内投与したコントロール群では、RGC 数は正常個体の半分程度にまで低下していた。一方、AAV-F-iTrkB による治療群では生存 RGC 数がコントロール群よりも有意に多かった。

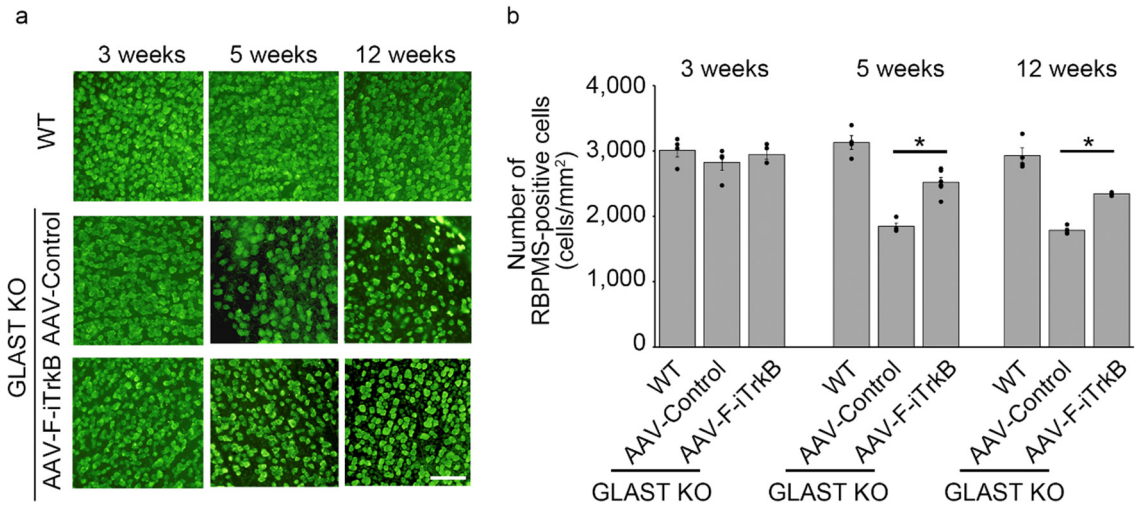


図 2. 正常眼圧緑内障モデルに対する F-iTrkB を用いた遺伝子治療の効果

a） RBPMS 抗体による RGC 染色像。*GLAST* 欠損マウスでは RGC 数の減少が見られるが（中段）、治療群ではより多くの RGC が観察された（下段）。
スケールバー：100 μm。

b） RGC 数の定量解析。*P＜0.05（one-way ANOVA with Tukey-Kramer HSD test）。

以上から、AAV-F-iTrkB による遺伝子治療は、高眼圧および正常眼圧のいずれのタイプの緑内障においても RGC 保護に有効であり、またその効果は 1 回の投与で長期間に渡る可能性が示された。

3. 常時活性型 TrkB を用いた遺伝子治療による視神経軸索の再生効果

引き続き視神経外傷モデルを用いて、一旦退縮した視神経軸索を、遺伝子治療によって再生することができるかを検討した。視神経外傷モデルは眼球の約 1 mm 後方でピンセットを用いて視神経軸索を挫滅することで作製した［3］。同マウスに AAV-GFP または AAV-F-iTrkB を一回だけ眼球内投与して、再生軸索を検出するための tracer の注入も行った。AAV-GFP を投与してから 2 週間後のマウス視神経では再生線維が全く観察されなかった（図 3a 上段）。しかし AAV-F-iTrkB による治療群では 2 週間（図 3a 中段）、4 週間（図 3a 下段）と時間が経過するにつれて再生線維が中枢側に伸展していき、4 週間後では一部の線維が視交叉に到達することが確認された（図 3b 下段）。

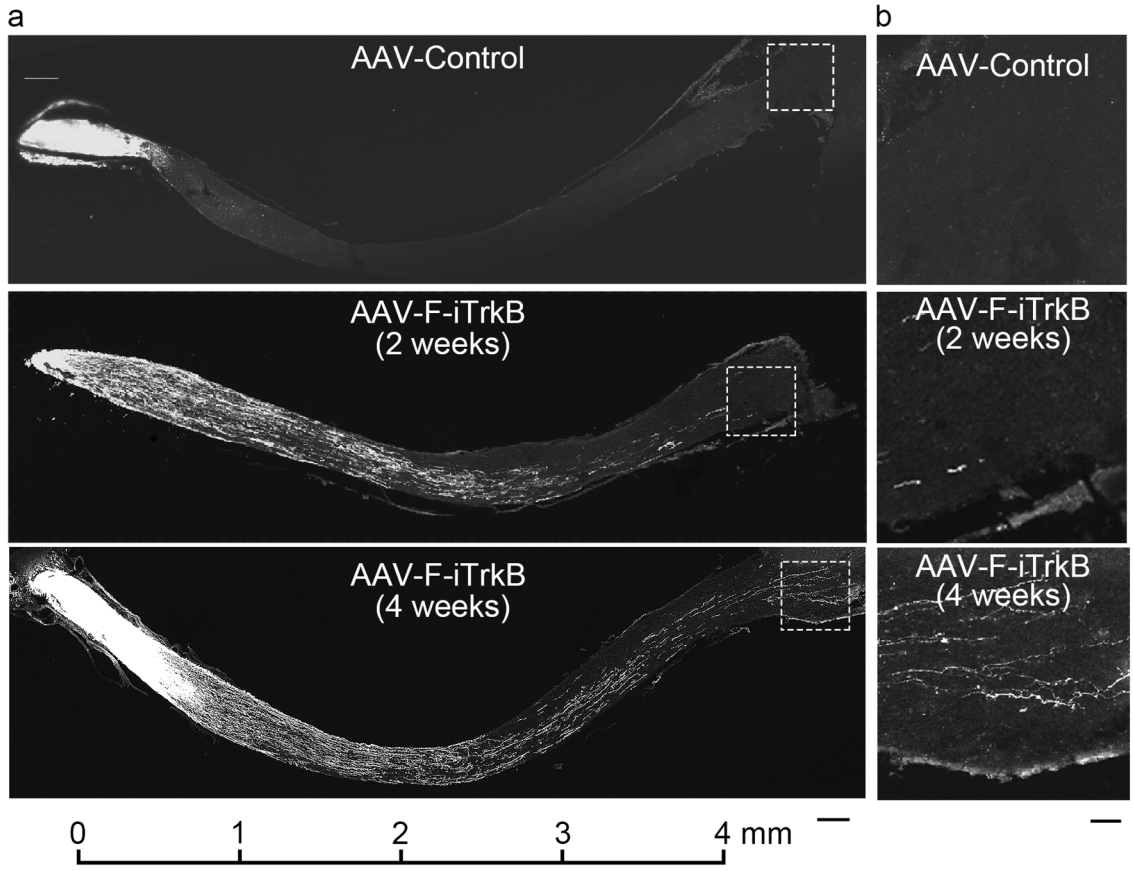


図 3. 視神経外傷モデルに対する F-iTrkB を用いた遺伝子治療の効果

a）AAV-GFP を投与した 2 週間後（AAV-Control、上段）、AAV-F-iTrkB 投与の 2 週間後（中段）、AAV-F-iTrkB 投与の 4 週間後（下段）における再生した視神経軸索。スケールバー：200 μ m。

b）a）の四角部分（視交叉付近）の拡大図。AAV-F-iTrkB による遺伝子治療の 4 週間後には多くの再生軸索が視交叉に到達していることが確認できる。スケールバー：50 μ m。

考　察

神経栄養因子が神経細胞の保護や軸索伸長を促進することは以前から知られているが、半減期が短いことから、繰り返し投与の必要性が懸念される。また仮に反復投与できたとしても、受容体の発現量が低下するなどして、持続的な効果を得ることは難しいとされてきた。今回我々は TrkB の細胞内活性領域を細胞膜に発現させることにより、ligand 非依存的かつ強力な細胞内シグナルの活性化に成功した［4］。この方法では一回の眼球内投与で数ヶ月間の持続効果があり、かつ癌化などの副作用は見られなかった。ヒトと実験動物では眼球の大きさや構造だけでなく、寿命なども大きく異なることから直接的な比較はできないものの、将来的な臨床応用にも期待がもたれる結果となった。緑内障や視神経外傷には根本的な治療法がないことから、今後は霊長類モデルにおける検討も予定している。また本手法は TrkB 以外の受容体に応用できるだけでなく、様々な神経変性疾患にも有効な可能性があることから、今後はさらなる効果の増強や他疾患への応用を目指していきたいと考えている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、Memorial Sloan Kettering Cancer Center の Luis F. Parada である。

文　献

1) Sano H, Namekata K, Kimura A, Shitara H, Guo X, Harada C, Mitamura Y, Harada T. Differential effects of *N*-acetylcysteine on retinal degeneration in two mouse models of normal tension glaucoma. Cell Death Dis. 2019 Jan 28;10(2):75. PMID: 30692515 DOI: 10.1038/s41419-019-1365-z

2) Harada T, Harada C, Nakamura K, Quah HM, Okumura A, Namekata K, Saeki T, Aihara M, Yoshida H, Mitani A, Tanaka K. The potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma. J Clin Invest. 2007 Jul;117(7):1763-70. PMID: 17607354 DOI: 10.1172/JCI30178

3) Namekata K, Harada C, Taya C, Guo X, Kimura H, Parada LF, Harada T. Dock3 induces axonal outgrowth by stimulating membrane recruitment of the WAVE complex. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Apr 20;107(16):7586-91. Epub 2010 Apr 5. PMID: 20368433 DOI: 10.1073/pnas.0914514107

4) Nishijima E, Honda S, Kitamura Y, Namekata K, Kimura A, Guo X, Azuchi Y, Harada C, Murakami A, Matsuda A, Nakano T, Parada LF, Harada T. Vision protection and robust axon regeneration in glaucoma models by membrane-associated Trk receptors. Mol Ther. 2022 Dec 5:S1525-0016(22)00676-1. doi: 10.1016/j.ymthe.2022.11.018. Epub ahead of print. PMID: 36463402.