

45. グリア細胞を活用した緑内障に対する遺伝子治療研究

公益財団法人東京都医学総合研究所視覚病態プロジェクト プロジェクトリーダー

原田 高幸

概要

我が国で最大の失明原因である緑内障では、点眼薬の使用や手術によって眼圧を低下させることが唯一の治療法であり、失った視力や視野を取り戻すことはできていない。緑内障の進行を抑制するには網膜神経節細胞(RGC)の保護が必要だが、近年では周囲のアストロサイトやミクログリア等の機能異常が、病態の悪化に関与する可能性が指摘されている。

そこで我々はRGCに対する遺伝子治療や、網膜へのグリア細胞移植による新しい治療法の開発を試みた。その結果、これらの手法により、モデルマウスにおける緑内障の進行抑制、あるいは一部の視機能の回復に成功した。今後は霊長類による検討を進め、臨床応用を目指していきたい。

三菱財団様には本研究に必要な遺伝子治療ベクターの作製費用、動物の飼育費、投与後の治療効果の解析等に要する経費をご提供頂き、心より感謝申し上げます。

背景および目的

緑内障の病態には不明な点が多く、一度失った視野の回復は困難である。現在の緑内障治療においては、最大のリスク因子である眼圧を十分に低下させても、なお視野障害が進行する症例が多数存在する。

緑内障の進行を抑制するためにはRGCの細胞体、軸索（視神経）、樹状突起の全てを維持する必要があるが、近年では細胞体よりも先に、軸索やシナプスが失われることが注目されている。このことは、幹細胞移植などを行わなくても、残存するRGCの軸索や樹状突起再生によって、視機能回復が誘導される可能性を示している。

また、神経細胞そのものに加えて、周囲のアストロサイトやミクログリア等のグリア細胞の細胞老化、食食不全、炎症応答などの機能異常により、視神経変性が進行することも明らかとなりつつある。したがって、神経細胞に加えてグリア細胞において、病的変化からの改善を促進することが、病態の進行を抑制する治療戦略として有望な可能性がある。

本研究では、神経細胞やグリア細胞など複数の標的に対する治療技術を駆使することによって、緑内障の進行抑制に留まらず、視機能が回復する治療技術の開発に挑むことを目的とする。

方法

アデノ随伴ウイルスベクターに搭載した常時活性型インスリン受容体(AAV2-iIR)を、生後12週齢の正常眼圧緑内障モデルであるGLAST欠損マウス(引用文献1)の硝子体内に投与し、4週間後に治療効果の評価を行った。解剖学的評価は網膜展開標本を用いて行い、興奮性シナプス数の変化はvGlut1およびPSD95、RGC数の変化はRbpmsに対する免疫染色により定量解析を行った。樹状突起についてはGFP標識したRGCの形状から突起の退縮・再生を定量化した。網膜応答は多局所網膜電位の測定、視機能は視運動反応試験や視覚断崖試験により行動学的に評価した。遺伝子治療によるRGCの変化については、RiboTagマウスを用いて検討を行った。本マ

ウスでは RGC 特異的にリボソームにタグが付加されるため、これにより RGC の RNA 精製が可能となる。得られた RNA を用いて RNA sequence を行い、発現変化を DAVID bioinformatics analysis tool により解析した。

また、新たな遺伝子治療技術としてインスリン様成長因子-1 受容体 (IGF1R) に着目して開発を行った。IGF1R はインスリン受容体と同様に、細胞膜に局在するチロシンキナーゼである。IGF1R の細胞内領域をコードする DNA 配列 (iIGF1R) を GenBank のデータから入手して DNA 断片の合成を行い、CAG プロモーターで発現制御するプラスミドに組み込んだ。N 末端には Myc tag を付与し、C 末端には膜局在化のためのファルネシル化シグナル (CAAX) を含む K-Ras 由来の 20 アミノ酸を付加した (F-iIGF1R)。

老化アストロサイトに対する治療として、Senolytics 薬である Dasatinib および Quercetin (D+Q)、または細胞老化誘導因子である Stimulator of interferon genes (STING) に対する阻害薬 H-151 を、生後 8 週齢の正常眼圧緑内障モデルマウスである ABCA1 欠損マウス (引用文献 2) に投与した。1 週間のうち 5 日間腹腔内投与と 2 日間の休薬を行い、これを 3 か月間行った後に視機能評価を行った。

神経組織へのミクログリア移植は、生後 8 週齢の高眼圧緑内障モデルマウスである P2Y₆ 受容体欠損マウス (引用文献 3) を用いて行った。内在性のミクログリアを除去するために Colony stimulating factor 1 (CSF1R) 拮抗薬を餌に混合して 7 日間投与後、1 日間の休薬後に移植を行った。この時、培養ミクログリアを経鼻投与すると非侵襲的に脳へと送達できる (引用文献 4)。本手法を用いて、野生型マウスより調製した初代培養ミクログリアを緑内障モデルマウスに経鼻移植し、3 ヶ月後に視機能評価を行った。

結果および考察

1. RGC を標的とした改変型インスリン受容体 (iIR) を用いた遺伝子治療

生後 12 週齢の GLAST 欠損マウスに AAV2-iIR を用いた遺伝子治療を行うと、RGC のシナプス再結合、多局所網膜電位測定による網膜機能の改善に加えて、視運動反応や視覚断崖試験による視機能の回復が認められた。AAV2-iIR による RGC の遺伝子発現変化を RNA sequence によって解析したところ、細胞外マトリックスや細胞骨格のほか、シナプスに関連する遺伝子群の発現上昇が認められた。本緑内障モデルマウスは 12 週齢では既に RGC 傷害や視機能低下が進行し、それ以上は顕著な変化が生じない慢性期にあるため、今回の治療効果は視機能低下の抑制ではなく、回復を誘導したと推定される。また、新たに作製した F-iIGF1R を Cos7 および Neuro2A 細胞にトランスフェクションすると、リガンド非依存的な膜局在と、ERK や AKT など下流シグナルの顕著な活性化が観察された (図 1、発表論文 1)。したがってインスリン受容体だけでなく、IGF1R も緑内障の遺伝子治療技術として有用な可能性があり、今後の検討を予定している。

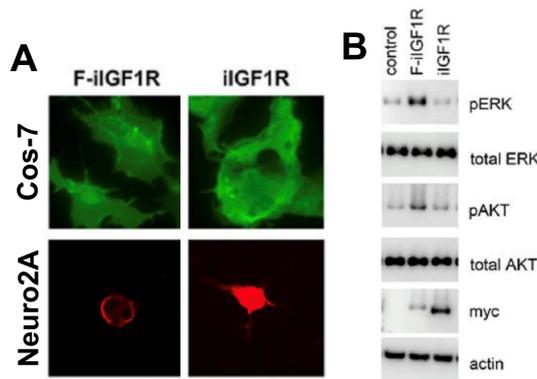


図 1. F-iIGF1R の膜局在と AKT/ERK 活性化.

(A) Cos-7 または Neuro2A 細胞における F-iIGF1R 発現.

(B) F-iIGF1R 発現はリガンド非依存的に ERK や AKT のリン酸化を誘導する.

2. アストロサイトを標的とした細胞老化制御による治療研究

ABCA1 欠損マウスにおいて、アストロサイトの変化を解析したところ、病態早期に細胞老化が生じることを見出した。細胞老化は炎症を惹起して神経傷害を引き起こす可能性があるため、Senolytics 薬 (D+Q) または STING 阻害薬 (H-151) の慢性投与を行った。視運動反応試験や視覚断崖試験を用いて視機能への影響を評価したところ、緑内障モデルマウスにおける視機能低下が、これらの薬剤投与により抑制されることがわかった。以上の結果から、早期に生じたアストロサイトの細胞老化が緑内障病態の発症や進行に関わる可能性があること、ならびにアストロサイトの細胞老化抑制が緑内障の新規治療標的となり得ることが示唆された。

3. ミクログリアを標的としたグリア移植法による治療研究

ミクログリアの P2Y₆ 受容体欠損は、オートファジー機能異常やそれに伴う炎症を惹起するなど、神経傷害に寄与する可能性がある。この可能性を検証するため、高眼圧型緑内障モデルマウスである P2Y₆ 受容体欠損マウスに対して、野生型ミクログリアを移植することにより、ミクログリア選択的に P2Y₆ 受容体を回復させた。移植した野生型ミクログリアは少なくとも 3 ヶ月間は網膜に安定して定着しており、移植後のマウスにおいては、視覚断崖試験における視機能応答が顕著に回復していた。以上の結果から、ミクログリアにおける P2Y₆ 受容体欠損が緑内障の病態を増悪させること、ならびにミクログリアの機能を正常化することが視機能回復につながる可能性が示された。

本研究では、神経細胞に対する遺伝子治療およびグリア細胞移植など、複数の技術を駆使して緑内障モデルマウスに対する治療を試みた。遺伝子治療では慢性期における視機能回復に成功したほか、グリア細胞の老化制御や移植によっても、病態進行の抑制が認められた。今後は更に技術を発展させ、より強力に視機能を回復させる治療技術の開発に挑んでいきたい。

(完)

発表論文

- 1) Sotozono A, Namekata K, Guo X, Shinozaki Y, Harada C, Noro T, Nakano T, Harada T. Membrane-anchored intracellular insulin receptor or insulin-like growth factor-1 receptor elicits ligand-independent downstream signaling. *Biochemistry and Biophysics Reports* 39, 101799, 2024.
- 2) Harada C, Guo X, Harada T. Monogenic gene therapy for glaucoma and optic nerve injury. *Neural Regeneration Research* 20, 815-816, 2025.

引用文献

- 1) Harada T, Harada C, Nakamura K, Quah HA, 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. *Journal of Clinical Investigation* 117, 1763-1770, 2007.
- 2) Shinozaki Y, Leung A, Namekata K, Saitoh S, Nguyen HB, Takeda A, Danjo Y, Morizawa YM, Shigetomi E, Sano F, Yoshioka N, Takebayashi H, Ohno N, Segawa T, Miyake K, Kashiwagi K, Harada T, Ohnuma SI, Koizumi S. Astrocytic dysfunction induced by ABCA1 deficiency causes optic neuropathy. *Science Advances* 8, eabq1081, 2022.
- 3) Shinozaki Y, Kashiwagi K, Namekata K, Takeda A, Ohno N, Robaye B, Harada T, Iwata T, Koizumi S. Purinergic dysregulation causes hypertensive glaucoma-like optic neuropathy. *JCI Insight* 2, e93456, 2017.

- 4) Parajuli B, Saito H, Shinozaki Y, Shigetomi E, Miwa H, Yoneda S, Tanimura M, Omachi S, Asaki T, Takahashi K, Fujita M, Nakashima K, Koizumi S. Transnasal transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived microglia to the brain of immunocompetent mice. *Glia* 69, 2332-2348, 2021.