

氏名	きよた なおき 清田 直樹
学位の種類	博士(医学)
学位授与年月日	2022年9月26日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科(博士課程)医科学専攻
学位論文題目	視神経挫滅後の神経保護と軸索再生に対する恒常的活性化型 K-Ras の効果
論文審査委員	主査 教授 中澤 徹 教授 阿部 俊明 教授 布施 昇男

## 論文内容要旨

氏名：清田 直樹

本文：

### 【背景と目的】

緑内障は本邦第一位の中途失明原因であり、眼圧上昇を含む様々な危険因子により視神経を損傷してしまうと、不可逆的な視力・視野障害を呈する疾患である。現在可能な治療は、眼圧下降により残存視機能を温存することであり、一度失った視機能を回復することは出来ない。こうした現状を踏まえ、これまで網膜神経節細胞 (retinal ganglion cell: RGC) が持つ軸索再生能力を高める試みがなされており、PI3K/Akt や RAF/MEK/ERK シグナル活性化の重要性が報告されている。これらのシグナルは発癌におけるシグナルカスケードと共通している。そこで本研究では、メジャーな癌遺伝子である K-Ras の恒常的活性化型である K-RasV12 に着目し、この分子の過剰発現により軸索再生を促進出来るかどうか検討した。

### 【方法】

Cos-7 細胞に GFP(コントロール)、K-RasN17(ドミナントネガティブ変異型)、K-RasWT(野生型)、K-RasV12(恒常的活性化型)を過剰発現した場合の ERK、Akt のリン酸化を比較した。次に、アデノ随伴ウイルス血清型 II (AAV2) ベクターに K-RasV12 を組み込み、マウスの硝子体に注射した。注射後 1 週間で視神経挫滅を施行し、さらに 1 週間後に網膜における生存 RGC 数および、コレラ毒素サブユニット B (CTB) でラベルされた視神経再生繊維の本数を、コントロールベクター (AAV2-GFP) を投与した場合と比較した。また、視神経挫滅後 8 週間後における再生繊維の伸長の程度を観察し、さらに再生繊維の性状を観察するため電子顕微鏡も冠状断にて撮像した。

### 【結果】

K-RasV12 が Akt および ERK をリン酸化することが *in vitro* で確認され、K-RasV12 が PI3K/Akt および RAF/MEK/ERK 経路を活性化することが示唆された (Akt: GFP  $1.00 \pm 0.06$ , K-RasN17  $1.14 \pm 0.12$ , K-RasWT  $1.47 \pm 0.12$ , K-RasV12  $4.56 \pm 0.27$ ; ERK: GFP  $1.00 \pm 0.13$ , K-RasN17  $0.51 \pm 0.05$ , K-RasWT  $3.21 \pm 0.39$ , K-RasV12  $5.98 \pm 0.63$  相対比,  $P < 0.05$ )。AAV2-K-RasV12 の硝子体内投与は、視神経挫滅後 1 週間における生存 RGC 数を増加させ (AAV2-GFP:  $70.5 \pm 4.3$ , AAV2-K-RasV12:  $124.0 \pm 20.9$  細胞/網膜切片,  $P < 0.05$ )、軸索再生を  $\sim 1.5\text{mm}$  促進した。さらに、AAV2-K-RasV12 は、8 週間で一部の再生軸索が視交叉に到達する強力な RGC 軸索再生を誘導した。しかしながら、AAV2-K-RasV12 で再生された軸索は髄鞘化されていないことがわかった。

### 【結論】

視神経挫滅と AAV2-K-RasV12 の硝子体注射は、*in vivo* で軸索再生のメカニズムを迅速かつ効率

(書式 1 2)

的に解析するための優れたモデルである。また、髄鞘化などの限界点をクリアできれば、将来的に視神経軸索損傷に対する治療候補となり、臨床応用の可能性も示唆している。

## 審査結果の要旨

博士論文題目 .....視神経挫滅後の神経保護と軸索再生に対する恒常的活性化型 K-Ras の効果.....

所属専攻・分野名 .....医科学専攻 ..... 眼科学分野.....

学籍番号.....B8MD5511.....氏名.....清田 直樹.....

緑内障は本邦第一位の中途失明原因であり、眼圧上昇を含む様々な危険因子により視神経を損傷してしまうと、不可逆的な視力・視野障害を呈する疾患である。現在可能な治療は、眼圧下降により残存視機能を温存することであり、一度失った視機能を回復することは出来ない。こうした現状を踏まえ、これまで網膜神経節細胞 (retinal ganglion cell: RGC) が持つ軸索再生能力を高める試みがなされており、PI3K/Akt や RAF/MEK/ERK シグナル活性化の重要性が報告されている。これらのシグナルは発癌におけるシグナルカスケードと共通している。そこで本研究では、メジャーな癌遺伝子である K-Ras の恒常的活性化型である K-Ras<sup>V12</sup>に着目し、この分子の過剰発現により軸索再生を促進出来るかどうか検討した。

我々はまず、Cos-7 細胞に GFP (コントロール)、K-Ras<sup>N17</sup> (ドミナントネガティブ変異型)、K-Ras<sup>WT</sup> (野生型)、K-Ras<sup>V12</sup> (恒常的活性化型) を過剰発現した場合の ERK、Akt のリン酸化を比較した。次に、アデノ随伴ウイルス血清型 II (AAV2) ベクターに K-Ras<sup>V12</sup> を組み込み、マウスの硝子体に注射した。注射後 1 週間で視神経挫滅を施行し、さらに 1 週間後に網膜における生存 RGC 数および、コレラ毒素サブユニット B (CTB) でラベルされた視神経再生繊維の本数を、コントロールベクター (AAV2-GFP) を投与した場合と比較した。また、視神経挫滅後 8 週間後における再生繊維の伸長の程度を観察し、さらに再生繊維の性状を観察するため電子顕微鏡も冠状断にて撮像した。

結果であるが、K-Ras<sup>V12</sup> が Akt および ERK をリン酸化することが *in vitro* で確認され、K-Ras<sup>V12</sup> が PI3K/Akt および RAF/MEK/ERK 経路を活性化することが示唆された (Akt: GFP  $1.00 \pm 0.06$ , K-Ras<sup>N17</sup>  $1.14 \pm 0.12$ , K-Ras<sup>WT</sup>  $1.47 \pm 0.12$ , K-Ras<sup>V12</sup>  $4.56 \pm 0.27$ ; ERK: GFP  $1.00 \pm 0.13$ , K-Ras<sup>N17</sup>  $0.51 \pm 0.05$ , K-Ras<sup>WT</sup>  $3.21 \pm 0.39$ , K-Ras<sup>V12</sup>  $5.98 \pm 0.63$  相対比,  $P < 0.05$ )。AAV2-K-Ras<sup>V12</sup> の硝子体内投与は、視神経挫滅後 1 週間における生存 RGC 数を増加させ (AAV2-GFP:  $70.5 \pm 4.3$ , AAV2-K-Ras<sup>V12</sup>:  $124.0 \pm 20.9$  細胞/網膜切片,  $P < 0.05$ )、軸索再生を $\sim 1.5$ mm 促進した。さらに、AAV2-K-Ras<sup>V12</sup> は、8 週間で一部の再生軸索が視交叉に到達する強力な RGC 軸索再生を誘導した。しかしながら、AAV2-K-Ras<sup>V12</sup> で再生された軸索は髄鞘化されていないことがわかった。

視神経挫滅と AAV2-K-Ras<sup>V12</sup> の硝子体注射は、*in vivo* で軸索再生のメカニズムを迅速かつ効率的に解析するための優れたモデルである。また、髄鞘化などの限界点をクリアできれば、将来的に視神経軸索損傷に対する治療候補となり、臨床応用の可能性も示唆している。よって、本論文は博士 (医学) の学位論文として合格と認める。