

平成22年 5月20日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20791241  
 研究課題名(和文)  
 チャンネルロドプシン-2 遺伝子を用いた神経細胞保護に関する研究  
 研究課題名(英文)  
 Protective effects of Channelrhodopsin-2 gene transfer on neuronal cell death  
 研究代表者  
 砂金 ひとみ (ISAGO HITOMI)  
 東北大学・国際高等研究教育機構・技術補佐員  
 研究者番号：30400451

## 研究成果の概要(和文)：

光感受性遺伝子チャンネルロドプシン-2 (ChR2) を導入することによって、RCS ラットの視細胞変性に伴う神経節細胞死を保護できるかどうかについて調べた。ChR2 遺伝子の導入後、視覚誘発電位が減弱すること無く長期間記録され、神経節細胞の機能が保持されていることが確認された。神経細胞の生存維持に重要な役割を持つことが知られている p65 の発現を調べたところ、ChR2 を導入した網膜では、p65 が神経節細胞層に強く認められた。以上の結果から、p65 の発現が ChR2 による保護効果に何らかの役割を持つことが示唆された。

## 研究成果の概要(英文)：

We examined whether the transfer of ChR2 gene rescue the death of ganglion cells induced by the photoreceptor degeneration. We could clearly record the visually evoked potentials in both age of the ChR2 transferred-RCS rats though the amplitudes. These data showed that the function of retinal ganglion cells was kept after the photoreceptor degeneration.

In the ChR2-expressing retina, the immunoreactivity (IM) of the p65-IM was observed in the retinal ganglion cell layer. It is known that the expression of p65 has a critical role in keeping the neuronal cell activities. These results indicated that the transfer of ChR2 gene could give some protective effect on the cell death of retinal ganglion cells following the photoreceptor degeneration.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2009年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：眼生理学、神経科学、生理学、免疫組織化学

## 1. 研究開始当初の背景

網膜への微弱な電気刺激は神経節細胞の生存促進を行い、細胞死の抑制効果があると報告されている(Takeshi M, et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007)。

緑藻類より単離されたチャネルロドプシン-2 (ChR2)は、ヒトの光受容タンパク質ロドプシンと類似した構造を持つ光感受性遺伝子で、その最大の特徴は光受容能に加えて陽イオンチャネルを併せ持つことである。光受容 + 陽イオンチャネルという特性から、単一の分子の働きで光情報を電気信号に変換し、興奮を脳視覚野へ送ることが可能である。このことから、投与された ChR2 は網膜神経節細胞に発現し、光に応じて神経節細胞に興奮を起し、視覚情報を脳へ伝達している事が明らかである。

神経節細胞については、視細胞変性後、視細胞からの情報が消失し、興奮の伝達を行わなくなると、神経節細胞自身の機能が低下し、生存率の減少が見られるとしている(Santos A, et al., *Arch Ophthalmol.* 1997)。

以上から、ChR2 により神経節細胞を興奮させる事が、視細胞変性後の神経節細胞の保護、機能の保持に有用であり、神経節細胞の生存維持に効果があると考察している。

## 2. 研究の目的

ChR2 による刺激が神経節細胞の生存の保護や機能の保持、または細胞死の抑制という点において、有用である事が明らかとなれば、視神経の損傷が起こる緑内障や虚血性視神経症等の失明の可能性がある視神経疾患に対して新たな治療法になりえると考えられる。

さらに、遺伝子導入神経細胞へ光刺激を与えることにより神経細胞の生存維持を行う、という観点からは、他器官の虚血性神経細胞死や神経損傷疾患での治療研究へつながるものと期待される。

## 3. 研究の方法

細胞変性後神経節細胞自身の機能が低下し生存率の減少が見られるとされていることから、ChR2 遺伝子を導入した神経節細胞の生存、維持について視細胞変性進行度の違う先天性遺伝盲ラット使用して神経節細胞生存率を観察した。

方法は生後3週間で視細胞の変性が始まり、3ヶ月で完全に視細胞が消失してしまう遺伝盲ラットの6ヶ月齢と10ヶ月齢を使用し、ChR2 遺伝子の神経節細胞導入率を調べた。

また、神経節細胞保護のメカニズムについては網膜神経細胞の生存、細胞死に関するタンパク質の発現変化を免疫組織化学により調べた。生後6ヶ月齢の遺伝盲(RCS)ラットへ遺伝子導入後、20ヶ月後に眼球を摘出し、凍結切片を作製し、Glutamine synthetase (GS)、glial fibrillary acidic protein (GFAP)、NF-kB (p65)の局在を調べた。

## 4. 研究成果

神経節細胞へのChR2遺伝子の導入効率はどちらもほぼ同効率だった。また、機能保持の検討として、光反応による視覚誘発電位を測定した結果、変性進行度の違うどちらのRCSラットでも視覚誘発電位の記録がされたことから神経節細胞の刺激伝達の機能は

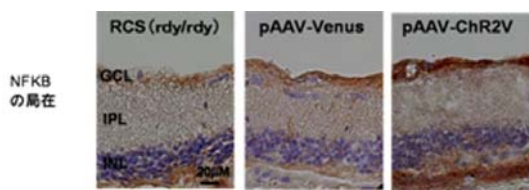
保持されていると考えられる。

これらのことより、ChR2 を用いることにより今まで確認することができなかった視細胞変性後の神経節細胞の生存率と残存する細胞の機能の評価を可能にすることができた。

その結果 Venus 蛍光タンパク質をのみを導入した網膜、および無処置の網膜では、GFAP および GS の免疫反応性は網膜全層に強く認められ、NF- $\kappa$ B (p65)の発現は神経節細胞層にわずかに観察された。

一方、ChR2 を導入した網膜では、GFAP および GS の免疫反応性は内境界膜に限局し、p65 は神経節細胞層に強く発現が認められた。GFAP および GS はストレス環境下で発現が亢進する事が知られており、RCS ラット網膜では、視細胞の変性に伴い、増強されたものと思われる。

p65 の発現は神経細胞の生存維持に重要な役割を持つことが知られており、ChR2 を導入した網膜での発現亢進は、神経節細胞が光受容細胞として機能することによって、生存維持効果がもたらされた結果と思われた。



これらのことより、ChR2 を用いることにより今まで確認することができなかった視細胞変性後の神経節細胞の生存率と残存する細胞の機能の評価を可能にすることができた。

以上で述べた神経細胞の生存と残存する機能を知るということは、他器官の神経損傷疾患においても神経細胞の保護、腑活効果の可能性という点により、今後重要な情報と成

り得ると考える。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Tomita H, Sugano E, Isago H, Hiroi T, Wang Z, Ohta E, Tamai M, Channelrhodopsin-2 gene transduced into retinal ganglion cells restores functional vision in genetically blind rats. *Experimental Eye Research* 90 (2010) 429-436 査読有

2. Tomita H, Sugano E, Isago H, Tamai M. Channelrhodopsins provide a breakthrough insight into strategies for curing blindness. *J. Genet.* 88 (2009) 409-415 査読無

[学会発表] (計 4 件)

1. Tomita H, Sugano E, Isago H, Hiroi T, Yawo H, Tamai M. Properties of recovered visual function in the Channelrhodopsin-2 transferred Royal College of Surgeons Rat. ARVO, 2009 年 5 月 3-7 日 Florida, USA,

2. Tomita H, Sugano E, Isago H, Hiroi T, Tamai M. Restore vision using Channelrhodopsin-2: Character of recovered visual responses in Channelrhodopsin-2 Transferred Royal College of Surgeons rats. Asia ARVO, 2009 年 1 月 15-18 日, Hyderabad, India,

3. 菅野 江里子, 富田 浩史, 砂金 ひとみ, 玉井 信, Channelrodopsin-2 による遺伝盲ラットの視機能再建—免疫学的検討—日本動物学会第 79 回大会 2008 年 9 月 7 日 福岡大学

4. 砂金 ひとみ, 富田 浩史, 菅野 江里子, 廣井 照, 玉井 信 チャネルロドプシン-2 遺伝子を導入した老齢と若齢RCSラットの視覚誘発電位の違いについて 日本動物学会第 79 回大会 2008 年 9 月 7 日 福岡大学

[その他]

ホームページ等

<http://www.visual-neuroscience.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

砂金 ひとみ (ISAGO HITOMI)

東北大学・国際高等研究教育機構・技術補佐員

研究者番号：30400451

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：