

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22991

研究課題名(和文) 網膜神経節細胞障害を高感度に検出するウイルスベクターの作成と薬剤スクリーニング

研究課題名(英文) Creation of viral vectors for sensitive detection of retinal ganglion cell damage and drug screening

研究代表者

矢花 武史 (Yabana, Takeshi)

東北大学・大学病院・特任助手

研究者番号：30725213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子データベースよりデザインされたプライマーを用いて、ヒトDNA上のEcel1遺伝子のプロモーター配列をPCRで増幅し、過去の研究で蛍光タンパクを導入している大腸菌プラスミドと結合させた。そのプラスミドを大腸菌に導入し培養することで増幅させ、シークエンサーで目的配列が導入されたことを確認した。さらに、AAV2ウイルスにパッケージングを行い目的のウイルスベクターを作製した。その一方で、新規に導入したSLOカメラの調整目的に、硝子体注射で網膜神経節細胞(RGC)にAAV2-CAG-EGFPを導入したratを用意し、新規SLOでRGCのimagingが可能であることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑内障は、眼圧下降治療以外にエビデンスによって確立された治療法は未だ存在しない。その理由として緑内障は多因子疾患であり、眼圧非依存的な病因因子が複数存在すると推測される。これまでの基礎および臨床研究から、酸化ストレス、血流障害、軸索障害などで緑内障病態の主体である網膜神経節細胞が障害を受けることが示されている。

そこで、我々は網膜神経節細胞が軸索障害を受けた際に蛍光性を示す動物モデルを作成し、それを利用することで網膜神経節細胞の細胞死のメカニズムを解明し、さらには新しい緑内障治療の可能性を追究する。

研究成果の概要(英文)：Using primers designed from the gene database, the promoter sequence of the Ecel1 gene on human DNA was amplified by PCR and ligated with an E. coli plasmid that has introduced the fluorescent protein in our previous studies. The plasmid was amplified by introducing it into E. coli and culturing, and the target sequence was confirmed by sequencing. Furthermore, the produced plasmid was packaged into AAV2 virus as the target viral vector. On the other hand, in order to adjust the newly introduced SLO camera, we prepared rats in which AAV2-CAG-EGFP was introduced into retinal ganglion cells (RGCs) by vitreous injection and confirmed that imaging of RGCs was possible by the device.

研究分野：緑内障

キーワード：In vivo imaging Ecel1 Retinal ganglion cell Glaucoma

1. 研究開始当初の背景

緑内障は網膜神経節細胞 (RGC) 障害とそれに伴う視野障害を呈する慢性進行性の眼科疾患である。主要なリスクファクターは眼圧であり、唯一エビデンスのある治療法は眼圧下降治療である。しかし、本邦において緑内障患者の多くは眼圧が正常範囲内であり、眼圧下降治療が十分に行われているにもかかわらず視野障害の進行をきたす症例が数多く存在する。そのため緑内障はその発症や進行に近視、遺伝的素因、眼血流循環、酸化ストレス、軸索障害などが関与する多因子疾患であると多く報告されている。しかし、その詳細は未だ不明な点が多く、眼圧下降以外の有効な治療方法が未だに確立されていないのが現状である。緑内障性視神経障害の要因の一つとして軸索障害が示唆されている。緑内障の病態の主体となる RGC は、網膜で電気信号に変換された視覚情報を眼内で受け取り、自身の長い軸索を介して脳内へ伝導・伝達する。その軸索が眼内から眼外へ移行する際に強膜を貫通する構造 (篩状板) を取っており、緑内障はこの篩状板が変形し、RGC が絞扼され細胞死に至るのが病因の一つである (Omodaka et al. 2015)。そのため、RGC の軸索障害を評価することは緑内障の病態解明に重要と言える。実際、緑内障研究において広く使われるモデル動物は、視神経を切断あるいは挫滅し人工的な軸索障害を引き起こすことで再現される (Kawakami et al. 2000)。また、我々は過去にマウスを用いて、神経挫滅あるいは切断後に RGC で特異的に発現する endothelin-converting enzyme-like 1 (Ecel1) 遺伝子を同定した (Yasuda et al. 2014)。さらに、この遺伝子は軸索障害時に高発現 (数 100 倍) し、障害後一定期間安定して発現していることを報告した (Sato et al. 2018)。その現象を利用し、Ecel1 遺伝子を蛍光タンパクでラベルすることができれば、軸索障害が生じている RGC を鋭敏に高感度で同定することが可能といえる。既存の実験では軸索障害後の各測定点で侵襲的な評価が必要で、簡便さに欠け、生物資源の浪費が問題点であったが、本研究はその解決の一助になる。Ecel1 遺伝子の特性とベクターウイルスを用いた遺伝子導入技術を組み合わせ、モデル動物の RGC を軸索障害後に SLO で可視化することで、生体内での障害後の変化をリアルタイムで追跡することが可能となる。さらに、この技術は薬剤スクリーニングに対しても応用可能である。

2. 研究の目的

ウイルスベクターを用いた遺伝子操作により Ecel1 遺伝子と共に蛍光タンパクを発現した rat の RGC を可視化させ、緑内障モデル rat における in vivo imaging 技術を確立し、RGC 障害のメカニズムについて検討する。

3. 研究の方法

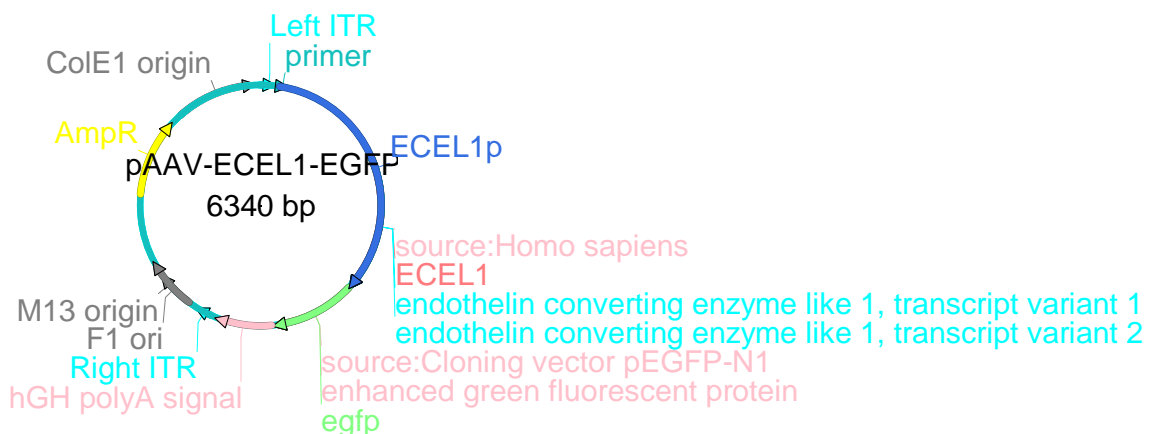
遺伝子データベース (NCBI) で Ecel1 遺伝子およびプロモーター配列 (約 2200 塩基長) を確認し、その領域を増幅するためのプライマーを設計した。設計したプライマー条件 (フォワード、リバース) は、フォワードはプロモーター配列上の CpG island から約 1000 塩基上流、リバースは Ecel1 遺伝子の開始コドンの直前、サイズは 33 と 23 塩基、Tm 70 と 63、GC 含量 60% と 63%、Xho 制限酵素領域と Nco 制限酵素領域を付加することとした。この設計したプライマーとヒト DNA とを用いて、PCR にて目的領域を増幅を行った。その一部を

用いて電気泳動にて PCR 産物のサイズを確認したのち、PCR clean-up kit にて PCR 産物を精製した。精製した PCR 産物と以前の研究で作製した蛍光タンパク EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) およびアンピシリン耐性遺伝子が導入されたプラスミドベクターを Xho および Nco 制限酵素で切断し、DNA リガーゼによるライゲーションを行った。さらにライゲーションで得られたプラスミドを大腸菌に導入しアンピシリン下での培養で増幅した後、プラスミドの抽出を行った。この際に、作製したプラスミドの一部をシーケンスし、目的の配列が導入されたことを確認した。さらに、作製したプラスミドを AAV2 ウイルスにパッケージングした。一方で、当初予定していた SLO カメラ (F10) を他社の SLO カメラ (マイクロン) に変更したため、その調整目的に以下を行った。rat の硝子体に AAV2-CAG-EGFP を注入し、1 ヶ月後に網膜細胞が蛍光性を獲得していること、その蛍光性が 2 ヶ月後も維持されたことを確認した。そのことから、新規 SLO が RGC の in vivo imaging に適していることを示した。

4 . 研究成果

rat に導入するウイルスベクター (AAV2 ウイルス) の作製を目標として、遺伝子データベースで Ecel1 遺伝子およびプロモーター配列を確認し、プライマーを設計した。デザインされたプライマー (23~33 塩基、 T_m 63~70、GC 含量 60~63%) を用いて、PCR でヒト DNA 上の標的領域を増幅し、過去の研究で蛍光タンパク (EGFP) とアンピシリン耐性遺伝子を導入している大腸菌プラスミドとライゲーションさせ、目的のプラスミドを作製した (図)。作製したプラスミドを導入した大腸菌をアンピシリン下で培養することでプラスミドを増幅し、シーケンサーで Ecel1 遺伝子のプロモーター領域が導入されたことを確認した。さらに、作製したプラスミドを AAV2 ウイルスにパッケージングを行い目的のウイルスベクターを作製した。その一方で、使用する SLO カメラの変更に伴い、in vivo imaging の調整目的に、硝子体注射にて RGC に AAV2-CAG-EGFP を導入した rat を用意した。その rat の網膜を新規 SLO (マイクロン) で撮影し、網膜細胞が蛍光性を有することを確認した。そのことより、新規 SLO が網膜の in vivo imaging に適していることを示した。

図



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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