

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：11201
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791960
 研究課題名（和文） 視細胞変性保護を目的とした Replacement Gene Therapy
 研究課題名（英文） Replacement Gene Therapy for photoreceptor survival.
 研究代表者
 菅野 江里子（SUGANO ERIKO）
 岩手大学・工学部・特任准教授
 研究者番号：70375210

研究成果の概要（和文）：本研究では、遺伝子異常を修正する「Replacement Therapy」について検討した。視細胞に特異的にタンパク質を発現させる為、ロドプシンプロモーターを用いて遺伝子導入を行ったが、プロモーター活性が極めて低かった。これに対し、IRBPプロモーターとPDEプロモーターの組み合わせを用いる事で、網膜視細胞に特異的に遺伝子導入を行える事が分かったが、その発現は投与部に限られていた。

研究成果の概要（英文）：In this study, appropriate vectors for “Replacement Therapy” were investigated. To express a target gene to photoreceptors, rhodopsin promoter was tested. But the target gene expression induced by the promoter was extremely low. The regulator element of IRBP in conjunction with PDE promoter improve the expression, which was restricted to photoreceptors. But the region of the trans-gene expressed cells was limited to the injected area.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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：網膜色素変性症、視覚誘発電位、遺伝子導入、プロモーター

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性症は、視細胞変性を来す遺伝性疾患である。4000-8000人に1人の割合で発症する。網膜色素変性症に起因する遺伝子は、40以上も報告されており(Retinal Information Network database)、この遺伝子変異の多様性が遺伝子治療及び、治療法の確立を

難しくしている。例えば、ヒトロドプシン遺伝子の変異は常染色体優性に100箇所以上が見つかっている。これら個々の遺伝子変異を治癒する事は技術的にも難しく、また経済的ではない。この事から、変異の多様性を回避する治療法が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、網膜色素変性症の遺伝子変異

に関わらず、遺伝子異常を修正する「Replacement Therapy」について、検討を行う。この方法は、異常を起こす変異と対立遺伝子の両遺伝子を抑制する。両遺伝子を抑制するために、変異に依存しない部位に siRNA を選定し、転写を抑制する。そして、この siRNA によって、抑制がかからない「modified gene (正しいアミノ酸配列)」を発現させる。この方法で重要な点は、変異と野生型対立遺伝子の両者を抑制した上で、その抑制を免れる「modified gene」を導入し置き換えることである。これにより、網膜色素変性症の多様な遺伝子変異に関わらず遺伝子異常を修正する治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

視細胞特異的に遺伝子導入を行う為、プロモーターの検討を行った。ロドプシンプロモーターを用いて発現系を作製した。さらに、視細胞への親和性の高いアデノ随伴ウイルス(AAV-Type5)を作製した。このウイルスをSDラットの網膜下から投与し、発現を調べた。また、IRBP-PDEをプロモーターとした AAV-Type5の作製を行い、発現について調べた。

遺伝子導入の範囲を拡大する為に、投与ニードルを研究室で新たに作製し、硝子体側からの網膜下投与を試みた。さらに、細胞へのウイルス親和性、安定性を高めるため、ウイルスキャプシドタンパク質のアミノ酸を改変した。このキャプシド改変ウイルスを用いて、網膜下より投与を行った。また、視細胞保護を目的として、光異性化酵素を視細胞へ発現させ、保護効果を調べた。

4. 研究成果

H23年度及びH24年度の研究を通して、以下の結果が得られた。

(H23年度) 視細胞に特異的に発現させる為、ロドプシンプロモーターを用いて遺伝子導入を行ったが、プロモーター活性が極めて低

かった。これに対し、Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein(IRBP)プロモーターと phosphodiesterase (PDE) プロモーターの組み合わせを用いる事で、網膜視細胞に特異的に遺伝子導入を行える事が分かった。実験では、IRBP-PDEをプロモーターとしたアデノ随伴ウイルス(AAV-Type5)を作製し、網膜下から投与した。この結果、視細胞特異的に遺伝子発現を起せたが、網膜の一部のみに発現が限られた(図1)。そこで、細胞へのウイルス親和性、安定性を高めるため、ウイルスキャプシドタンパク質のアミノ酸を改変した。

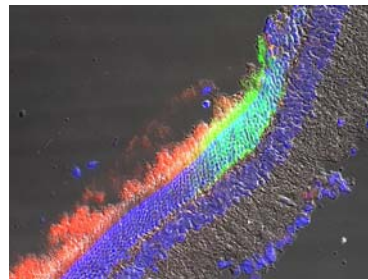


図 1. IRBP-PDE をプロモーターとした AAV5 を網膜下から投与した。導入遺伝子の発現は投与部のみに限られている。
Green; 遺伝子導入した Venus
Blue; DAPI 染色した核

(H24年度) ウイルスキャプシドタンパク質のアミノ酸を改変したウイルス (RC Modified) を用い、網膜下より投与した。その結果、投与範囲を中心に遺伝子導入範囲の拡大が見られた(図2)。

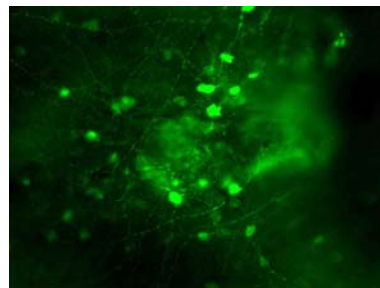


図 2. IRBP-PDE をプロモーターとした AAV(RC Modified) を網膜下から投与した。導入遺伝子の発現範囲が投与部を中心に拡大した。
Green; 遺伝子導入した Venus

このベクターを用い、視細胞でのall-trans

retinal から11-cis retinalの合成をもたらす光異性化酵素opsin5遺伝子をゼブラフィッシュから得て、S334Terラットへ遺伝子導入を行った。しかし、顕著な保護効果を確認できなかった。視細胞保護効果を示すには、さらに広範囲の遺伝子導入を行う必要があると考えられる。

今後は、網膜下への投与ではなく、硝子体側から投与し広範囲に視細胞へ遺伝子導入を行うベクターを作製したい。

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 4 件)

① Sugano E, Isago H, Murayama N, Tamai M, Tomita H. "Different anti-oxidant effects of thioredoxin 1 and thioredoxin 2 in retinal epithelial cells."

Cell Struct Funct. 38, 81~88. 2013, 査読有

② Wang Z, Sugano E, Isago H, Murayama N, Tamai M, Tomita H. "Notch signaling pathway regulates proliferation and differentiation of immortalized Müller cells under hypoxic conditions in vitro."

Neuroscience. 214, 171-180. 2012, 査読有

③ Isago H, Sugano E, Wang Z, Murayama N, Koyanagi E, Tamai M, Tomita H. Age-Dependent Differences in Recovered Visual Responses in Royal College of Surgeons Rats

Transduced with the Channelrhodopsin-2 Gene.

J Mol Neurosci. 46(2), 393-400. 2011, 査読有

④ Wang Z, Sugano E, Isago H, Hiroi T, Tamai M, Tomita H. Differentiation of neuronal cells from NIH/3T3 fibroblasts under defined conditions.

Dev Growth Differ. 53(3), 357-365. 2011, 査読有

[学会発表] (計 16 件)

① 菅野江里子

「チャンネルロドプシンによる遺伝子治療の研究」

日本臨床視覚電気生理学会 (招待講演), 2012年10月06日, ミッドランドホール(名古屋)

② 砂金ひとみ, 菅野江里子, 村山奈美枝, 原富雄,

萩森一郎, 玉井信, 富田浩史

「カニクイザルの片眼視細胞変性モデルの確立」

日本動物学会, 2012年09月13日, 大阪大学(大阪府)

③ 村山奈美枝, 菅野江里子, 砂金ひとみ, 斎藤建彦, 玉井信, 富田浩史

「変異型チャンネルロドプシンのパッチクランプ法による評価」日本動物学会, 2012年09月13日, 大阪大学(大阪府)

④ Hiroshi Tomita, Hitomi Isago, Eiji Iwata, Namie Murayama, Yuri Shinomoto, Masami Watanabe,

Makoto Tamai, Eriko Sugano

"Establishment of a method for the visual acuity test on cynomolgus monkey." The Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2012年5月9日, Convention Center (Fortlauderdale, FL)

⑤ Eriko Sugano, Hitomi Isago, Namie Murayama, Takehiko Saito, Yuri Shinomoto, Makoto Tamai and Hiroshi Tomita. "Restore vision covering visible light by using single gene, modified volvox

channelrhodopsin-1." The Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2012年5月7日, Convention Center (Fortlauderdale, FL)

⑥ 砂金ひとみ, 菅野江里子, 村山奈美枝, 玉井信, 富田浩史 「チャンネルロドプシン2を導入した週齢の異なるRCSラットの視覚反応の違い」第82回 動物学会, 2011年9月21日, 旭川市大雪クリスタルホール

⑦ 富田浩史, 菅野江里子, 砂金ひとみ, 村山奈美枝, 玉井信 「視細胞変性モデルの確立」

第82回 動物学会, 2011年9月21日, 旭川市大雪クリスタルホール

⑧ 菅野江里子, 砂金ひとみ, 村山奈美枝, 玉井信, 富田浩史 「ボルボックス由来チャンネルロドプシン1遺伝子改変による感受波長の改善」

第82回 動物学会, 2011年9月21日, 旭川市大雪クリスタルホール

⑨ Tomita H, Sugano E, Isago H, Murayama N

"Gene therapy in opjtjalmology `Visual properties of

genetically blind rats transduced with channelrhodopsin-2 gene."

The Fourth Global Chinese Ophthalmic conference (招待講演), 2011年9月8日, Guangzhou Baiyun International Convention Center (広州、中国)

⑩ 富田浩史、菅野江里子、砂金ひとみ
「視機能再建のための遺伝子治療～実現に向けて」 JRPS三重県支部医療講演会 (招待講演), 2011年6月26日, 松阪市福祉会館

⑪ 菅野江里子、砂金ひとみ、富田浩史
「藻類チャンネルロドプシン遺伝子を用いた視覚再生」 JRPS大阪支部医療講演会 (招待講演), 2011年6月11日, 大阪市天王寺区民センター

⑫ 富田浩史、菅野江里子、砂金ひとみ
「視機能再生に向けた遺伝子治療研究の現状」 第12回網膜色素変性症患者のつどい (招待講演), 2011年6月5日, 福岡市市民福祉プラザ

⑬ 菅野江里子、砂金ひとみ、玉井信、富田浩史
「チャンネルロドプシン2を用いた視覚の再生について」 JRPS (網膜色素変性症協会) 新潟支部医療講演会(招待講演), 2011年5月22日, 新潟市福祉会館

⑭ 富田浩史、菅野江里子、砂金ひとみ
「視覚再生研究の新たな展開」 日本眼科学会総会 (招待講演), 2011年5月12日, 東京国際フォーラム

⑮ Tomita H, Sugano E, Isago H, Tamai M
"Improvement Of Wavelength Sensitivities By The Modification Of Volvox Channelrhodopsin-1 Gene." ARVO Annual meeting, 2011年5月1日, Convention Center (Fortlauderdale, FL)

⑯ Sugano E, Isago H, Tomita H "Effective Time Point For Channelrhodopsin-2 mediated Gene Therapy After Photoreceptor Degeneration In Rcs Rats." ARVO Annual meeting, 2011年5月1日, Convention Center (Fortlauderdale, FL)

〔図書〕 (計3件)

① 菅野江里子, 富田浩史
エヌ・ティー・エス出版

オプトジェネティクス(光遺伝学) 「チャンネルロドプシンによる遺伝子治療の研究」

p.248-257, 2013年4月

② Tomita H, Sugano E, Isago H, Murayama N, and Tamai M. Publisher: INTECH, Title: Gene Therapy tools and potential applications, "Gene Therapy for retinitis pigmentosa", Chapter20: pp.493-510, <http://dx.doi.org/10.5772/52987>, 2013年2月

③ 富田浩史、菅野江里子
社団法人 日本眼科医会
日本の眼科「チャンネルロドプシンを用いた視覚再生」 82:12, p.1602-1607, 2011

〔その他〕

ホームページ等
東北大学融合領域研究所特別研究員紹介
<http://www.iiare.tohoku.ac.jp/crossover/vol2/researcher.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅野 江里子 (SUGANO ERIKO)
岩手大学・工学部・特任准教授
研究者番号：70375210