

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 6 月 3 日現在

機関番号：11201

研究種目：若手(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：2379191961

研究課題名（和文） チャネルロドプシンによる網膜変性保護機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of retina degeneration protection mechanism by the Channelrodopsin gene introduction.

研究代表者 砂金ひとみ (Isago Hitomi)

岩手大学・工学部・学術研究員

研究者番号：30400451

研究成果の概要（和文）：

チャネルロドプシン(ChR2)遺伝子導入後の RCS ラットは視覚誘発電位が回復し、神経節細胞の機能が保持されていることが確認出来た。また、免疫組織学的評価により、ChR2 は、神経節細胞の二次変性抑制にも効果的であると考えられた。そこで、マイクロアレイによる解析を行った結果、イオンチャネルに関連する遺伝子群、シグナル伝達に関与する遺伝子群が有意に減少していたことより、ChR2 が網膜内で光活性化イオンチャネルとして機能することによって、イオンチャネルおよびシグナル伝達に関する遺伝子の発現が減少したものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We examined protection effects of ChR2 expression on the retinal ganglion cells of hereditary photoreceptor cell degeneration rats(RCS rats). The RCS rat showed recovery of visual evoked potentials after the gene transfer, that indicated the function of the ganglion cell was held. Moreover, results of the immunohistological evaluation indicated ChR2 was also effective on secondary degeneration of ganglion cells by the ChR2 expression.

Next, mRNAs from the retinas were extracted and performed by a microarray analysis. As a result, we detected 437 increased-genes and 755 decreased-genes in the ChR2 transduced group. The detected genes were relevant to ion channels and signal transductions. It was thought that these changes were caused by ChR2 gene functioned as a photoactivated ion channel within the retina after ChR2 gene transfer.

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：眼生理学、視覚再生

1. 研究開始当初の背景

重度の加齢黄斑変性症、網膜色素変性症患者の網膜において、視細胞が変性している場合でも、網膜内層の神経細胞は残存しており、人工網膜チップを網膜下、あるいは網膜上にインプラントし、網膜を電氣的に刺激するこ

とで、残存する神経細胞を利用して視覚情報を伝達できることが明らかになっている。その一方で視細胞変性後の網膜神経節細胞は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、二次変性による生存の減少が見られるこ

とが報告されている。

当研究室では、以前より緑藻類チャンネルロドプシン遺伝子を使用した、視機能の再生について研究している。この遺伝子の最大の特徴は光受容能に加えて、陽イオンチャンネルを併せ持っていることである。チャンネルロドプシンに光を照射することにより、単一の分子の働きで、光情報を電気信号に変換することが可能である。また、遺伝子を導入した視細胞変性遺伝盲ラットは導入後1年を経過しても視覚誘発電位の波形、反応性について低下が見られなかった。

このことから、チャンネルロドプシンによって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、神経節細胞生存維持に効果があると考えられる。

2. 研究の目的

我々は、チャンネルロドプシンを導入した遺伝盲ラットの神経節細胞の機能の評価を行う為に、視細胞変性進行度の異なる、生後6ヶ月齢と10ヶ月齢の遺伝盲ラットの神経節細胞に遺伝子を導入し、その導入効率と視覚誘発電位の違いから、残存する神経節細胞の機能評価を行った。

その結果、6ヶ月齢のラットは10ヶ月齢より網膜神経節細胞数が多く、視覚誘発電位については、どちらも記録できたが、10ヶ月齢ではその振幅は有意に小さいものであった。そして、6ヶ月齢で遺伝子導入したラットは導入後18ヶ月が経過しても、神経節細胞の導入時からの機能的変化が見られないことから、視細胞変性遺伝盲ラットへのチャンネルロドプシンの早期の導入は神経節細胞の二次変性による細胞死が抑制されていることが予想される。しかしながら、現在までその神経節細胞の生存保持、細胞死抑制の機能のメカニズムは明らかになっていない。そこで、

今回の研究課題として、チャンネルロドプシンを導入した網膜神経節細胞の二次変性抑制の機構を明らかにし、神経節細胞保護機能と生存維持の効果を高めることを目的とする。

3. 研究の方法

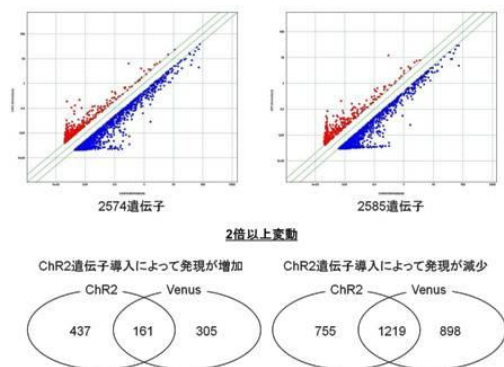
網膜神経節細胞でのチャンネルロドプシンによる神経節細胞の生存保護効果について検討する為、遺伝的視細胞変性ラット（RCSラット）の網膜へアデノアソシエイトウイルスベクターを用いて、チャンネルロドプシン遺伝子を導入した。その後、遺伝子導入ラットの網膜を採取し、免疫組織学的評価、マイクロアレイによる特異的なタンパク質の検出を行い、二次変性抑制因子と共に神経節細胞死抑制の要因となるタンパク質を見出し、細胞死抑制のメカニズムの解明を行うこととした。

4. 研究成果

遺伝子導入を行った RCS ラットは視覚誘発電位の回復を示し、神経節細胞の機能が保持されていることが確認できた為、凍結切片を作製し免疫組織化学的に検討を行った。その結果、神経節細胞の生存維持に対して重要な役割をもつ p65 の発現が神経節細胞層に強く見られた。その一方でチャンネルロドプシンを導入していないラットでは、GFAP および GS の反応が網膜全層に見られた。GFAP は網膜のアストロサイトやミュラー細胞のストレス状態の指標とされており、RCS ラットの視細胞変性過程において発現が亢進することが報告されている。これらのことから、網膜神経節細胞のチャンネルロドプシンを導入することにより保護効果に関連する因子が発現し、またそれらは神経節細胞保護に伴う視細胞の二次変性抑制にも効果的であり、神経節細胞保護機能と生存維持の効果を高めることが出来ると考える。

また、マイクロアレイの結果より、ChR2 と Venus の融合遺伝子と Venus 遺伝子を導

入した網膜を比較した結果、発現遺伝子パターンは類似していたが、ChR2 遺伝子導入群のみで増加した遺伝子は 437 個、減少した遺伝子は 755 個であった。また、増減した遺伝子の特徴は Venus 遺伝子を導入した網膜では免疫に關与する遺伝子の発現増加が認められたのに対し、ChR2 と Venus 遺伝子導入群では、イオンチャンネルに關連する遺伝子群、シグナル伝達に關与する遺伝子群の発現が有意に減少していた。



これらの結果をまとめると我々がすでに報告している、「ChR2 遺伝子導入によって免疫学的な副作用は見られない (Sugano E., et al Gene Therapy)」という結果が、マイクロアレイの解析によって得られた。また、ChR2 が網膜内で光活性化イオンチャンネルとして機能することにより、イオンチャンネルおよびシグナル伝達に關係する遺伝子の発現が減少したものと考えられた。

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 5 件)

1. Isago H., Sugano E, Murayama N, Tamai M, Tomita H. Establishment of monocular-limited photoreceptor degeneration models in rabbits, BMC Ophthalmology, 2013, in press. 査読有
2. 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 structure and Function, 2013 18;38(1) 81-88 査読有

3. Ozaki T, Nakazawa M, Yamashita T, Sorimachi H, Hata S, Tomita H, Isago H., Baba A, Ishiguro SI, Intravitreal injection or topical eye-drop application of a μ -calpain C2L domain peptide protects against photoreceptor cell death in Royal College of Surgeons rats, a model of retinal pigmentosa. Biochemica et Biophysica Acta, 2012 1822(11) 1783-1795 査読有

4. 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, 2012 46(2)393-400 査読有

5. 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, 2011 53(3)357-365 査読有

[学会発表] (計 10 件)

1. 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 日本動物学会第 83 回大会 2012 年 9 月 13 日 大阪大学 (大阪府)
2. 村山奈美枝、菅野江里子、砂金ひとみ、齊藤建、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 日本動物学会第 83 回大会 2012 年 9 月 13 日 大阪大学 (大阪府)
3. Sugano E, Isago H., Murayama N, Saitoh T, Tamai M, Tomita H. Restore vision covering visible light by using single gene, modified volvox channelrhodopsin-1. ARVO Annual meeting 2012 年 5 月 6 日 Fortlauderdale,US
4. Tomita H, Isago H., Iwata E, Murayama N, Shinomoto Y, Watanabe M, Tamai M, Sugano E, Establishment of a method for the visual acuity test on cynomolgus monkey. ARVO Annual meeting (招待講演) 2012 年 5 月 6 日 Fortlauderdale,US
5. 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 日本動物学会第 82 回大会 2011 年 9 月
21 日 旭川市大雪クリスタルホール（北海道）

6. 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ネ
ルロドプシン 1 遺伝子改変による感受波長
の改善 日本動物学会第 82 回大会 2011 年 9
月 21 日 旭川市大雪クリスタルホール（北
海道）

7. 砂金ひとみ、菅野江里子、村山奈美枝、
玉井信、富田浩史、チャネルロドプシン 2 を
導入した週齢の異なる RCS ラットの視覚反
応の違い 日本動物学会第 82 回大会 2011
年 9 月 21 日 旭川市大雪クリスタルホール
（北海道）

8. 富田浩史、菅野江理子、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（東京都）

9. Tomita H, Sugano E, Isago H.
Murayama N, Wang Z, Tamai M.
Improvement Of Wavelength Sensitivities
By The Modification Of Volvox
Channnelrhodopsin-1 Gene. ARVO Annual
meeting, 2011 年 5 月 1 日 ,
Fortlauderdale,US

10. Sugano E, Isago H. Wang Z, Murayama
N, Tamai M, Tomita H. Effective Time
Point For Channnelrhodopsin-2 mediated
Gene Therapy After Photoreceptor
Degeneration In Rcs Rats. ARVO Annual
meeting. 2011 年 5 月 1 日 ,
Fortlauderdale,US

〔図書〕（計 1 件）

1. Tomita H , Sugano E, Isago H. Tamai
M.. Gene Therapy for Retinitis
pigmentosa, Gene Therapy / Book 2",
493-509, ISBN 980-953-307-690-9. 2012

6. 研究組織

(1) 研究代表者

砂金 ひとみ (Isago Hitomi)
岩手大学 工学部 学術研究員
研究者番号：3040451