

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462747

研究課題名(和文) 網膜神経節細胞を利用したON型-OFF型光受容システムの構築

研究課題名(英文) Control of ganglion cells for producing the On- and Off response using optogenetic tools.

研究代表者

菅野 江里子 (SUGANO, ERIKO)

岩手大学・工学部・准教授

研究者番号：70375210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)へ改変型ボルボックス由来チャンネルロドプシン1遺伝子(mVChR1)、並びにハロロドプシン遺伝子(NpHR)を挿入し、発現ベクターを作製した。キャプシドタンパク質を改変したAAV2M型は高い発現効率をもたらした。NpHRはタンパク質発現が低いことが分かり、その膜移行配列を改変し機能を調べた。しかし、in vivo, in vitro共に大きな改善は見られなかった。そこでタンパク質の三次元構造のモデリングを行ってきた。その過程において、イオンを細胞膜に透過させる経路にも問題があり、イオン透過率、すなわちチャンネルとしての機能が低いことが分かった。

研究成果の概要(英文)：Modified vorvox derived channelrhodopsin-1 (mVChR1) or halorhodopsin(NpHR) gene was inserted into adeno-associated virus vector (AAV), and capsid modified AAV2 was most efficient vector for retinal ganglion cells. However, NpHR was low expression in mammalian cells by AAV gene transfer. We modified the transmembrane signal of NpHR {m(em)-NpHR}, however, there was not sufficient to improve the expression and function compared to that of ChR2 protein in vivo and vitro. We also studied about the 3-dimensional structural analysis of protein on data base, these analyze indicated that there might be a problem in the pathway of the ion and result in low light sensitivity.

研究分野：眼科学

キーワード：オプトジェネティクス 再生医学 生理学 脳・神経

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性症は近年、多くの原因遺伝子が同定されている。しかしながら、その種類が多く、遺伝子治療のターゲットとしては、開発が困難であった。一方、網膜色素変性症の治療法はなく、経過観察が行われているのみである。本疾患は失明原因の上位に位置し、厚生省特定疾患に指定されている。本疾患により視細胞変性が進行すると失明に至るが、近年の研究で、視細胞変性後も神経節細胞をはじめ多くのニューロンは残存し、視神経が十分機能することが明らかにされている。

我々はこの「残存する神経節細胞に ChR2 遺伝子を発現させ、光受容能を賦与する」という方法で視覚再建に取り組んできた。そして視機能を回復できることを電気生理学的、行動学的に明らかにした。(Tomita et al., IOVS, 2007)

しかし、ChR2 の感受波長域が 460nm をピークとして、540nm 以下であることから、ChR2 を用いた視覚再建では赤色方の視覚情報を得ることができない。そこで、我々は新規に赤方型チャンネルロドプシン(mVChR1)を作製した。(Tomita et al., Mol Ther. 2014)

2. 研究の目的

網膜には従来、光情報を得た時に反応する ON 型網膜神経節細胞、と光情報が消滅した時に反応する OFF 型網膜神経節細胞がある。しかしながら、我々が研究を行っている視覚の再建方法では、チャンネルロドプシン遺伝子が組み込まれた網膜神経節細胞は全て ON 型網膜神経節細胞と同様の機能を持つため、ヒトが持つ高度な視覚機能に比較し劣るものであると推察される。そこで、オプトジェネティクスを用いて、ON 型神経節細胞と共に OFF 型神経節細胞の反応を創出することを目的とした。

3. 研究の方法

網膜神経節細胞に遺伝子を導入するためのベクターとして、アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を用いた。このベクターに更に細胞への透過性を改善する目的でキャプシドタンパク質をコートする遺伝子変異を与え(AAV2M) 網膜神経節細胞へ透過性を高めた。OFF 応答を得るために、光を受容し陰イオンを取り込む NpHR 遺伝子をこのウイルスベクターに組み込み(AAV2M-NpHR) 細胞にこの遺伝子を導入し、パッチクランプ法にて NpHR の光受容機能を調べた。また、NpHR を本来発現すべき細胞膜に局在させるための改変を行った。この m(em)-NpHR についてもパッチクランプ法で機能を調べた。

in vivo 実験では、AAV2M-ChR2 と AAV2M- m(em)-NpHR を混合で硝子体に投与し、その網膜での発現について調べた。

4. 研究成果

AAV2M 型は、正常ラット及び網膜変性ラット(RCS ラット)で従来の AAV2 型に比較し、網膜全域への広い発現が確認できた。また、網膜神経節細胞へも高い親和性が確認された。

NpHR は光に対する応答性が弱く、また、細胞での発現が弱く、タンパク質の局在にも問題が認められた。そこで本来の発現すべき領域である細胞膜に発現させるため、膜移行配列を組み込んだ。その結果、細胞内での発現を高めることができた。しかしながら、その発現改善は十分ではなく、発現量は、ChR2 等の膜タンパク質を発現させた場合と比較し、低いことが認められた。

AAV2M-ChR2 と AAV2M-m(em)-NpHR を混合で硝子体内に投与し、発現を調べた結果、m(em)NpHR は ChR2 に比較し顕著に低い発現であった。また、視覚誘発電位測定においては AAV2M-ChR2 単独投与群と比較し、AAV2M-ChR2 と AAV2M-m(em)-NpHR 混合投与群において変化が見られなかった。

パッチクランプ法で解析した結果でも、AAV2M-m(em)-NpHR は光応答性が ChR2 と比較し顕著に低いことが認められた。

NpHR はバクテリア由来の遺伝子であり、哺乳類で発現させることが困難であった。遺伝子改変により、細胞膜での発現を高めることができたが、そのタンパク質発現も ChR2 と比べ、低いものであった。そこで NpHR の局在を更に改善させるため、タンパク質の三次元構造のモデリングを行ってきた。その過程において、イオンを細胞膜に透過させる経路にも問題があり、イオン透過率、すなわちチャンネルとしての機能が低いことが分かった。

NpHR は、神経細胞に光に対して OFF 応答を起こすタンパク質として重要である。本遺伝子を改変できればオプトジェネティクスとして、重要なツールとなり得る。今後は、タンパク質としての立体構造検討から、光応答性を高める検討も行いたい。

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 9 件)

Tomiyama Y, Fujita K, Nishiguchi KM, Tokashiki N, Daigaku R, Tabata K, **Sugano E**, Tomita H, Nakazawa T. Measurement of Electretinograms and Visually Evoked Potentials in Awake Moving Mice. PLoS One. 査読有, 2016, 3;11(6):e0156927. doi: 10.1371/journal.pone.0156927.

Tomita H, Tabata K, Takahashi M, Nishiyama F, **Sugano E**. Light induces translocation of NF- κ B p65 to the mitochondria and suppresses expression of cytochrome c oxidase subunit III (COX

III) in the rat retina. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有, 2016, 13; 473(4): 1013-1018.
doi: 10.1016/j.bbrc.2016.04.008.

Hososhima S, Yuasa H, Ishizuka T, Hoque MR, Yamashita T, Yamanaka A, **Sugano E**, Tomita H, Yawo H. Near-infrared (NIR) up-conversion optogenetics. *Scientific Reports*, 査読有, 2015, Article number: 16533.
doi:10.1038/srep16533

Sugano E, Tabata K, Takahashi M, Nishiyama F, Shimizu H, Sato M, Tamai M, Tomita H. Local and systemic responses following intravitreal injection of AAV2-encoded modified Volvox channelrhodopsin-1 in a genetically blind rat model. *Gene Ther.* 査読有, 23(2), 2016, 158-66.
2015;158-166. doi: 10.1038/gt.2015.99.

Tomita H, **Sugano E**, Murayama N, Ozaki T, Nishiyama F, Tabata K, Takahashi M, Saito T, Tamai M. Restoration of the majority of the visual spectrum by using modified Volvox channelrhodopsin-1. *Mol Ther.* 査読有, 22(8), 2014, 1434-1440.
doi: 10.1038/mt.2014.81.

Sugano E, Muayama N, Takahashi M, Tabata K, Tamai M, Tomita H. Essential Role of Thioredoxin 2 in Mitigating Oxidative Stress in Retinal Epithelial Cells. *Journal of Ophthalmology.* 査読有, vol. 2013, 2013, Article ID 185825, 7 pages.
doi:10.1155/2013/185825.

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.* 査読有, 38(1), 2013, 81-8.
<http://doi.org/10.1247/csf.12025>

Isago H, **Sugano E**, Murayama N, Tamai M, Tomita H. Establishment of monocular-limited photoreceptor degeneration models in rabbits. *BMC Ophthalmol.* 査読有, 17, 2013, 13-19. doi:10.1186/1471-2415-13-19.

Osawa S, Iwasaki M, Hosaka R, Matsuzaka Y, Tomita H, Ishizuka T, **Sugano E**, Okumura E, Yawo H, Nakasato N, Tominaga T, Mushiake H. Optogenetically induced seizure and the longitudinal hippocampal network dynamics. *PLoS One.* 査読有, 10:8(4), 2013,

e60928. doi: 10.1371/journal.pone.0060928.

〔学会発表〕(計 22 件)

Hososhima S, Yuasa H, **Sugano E**, Tomita H, Ishizuka T, Yawo H. Near-infrared (NIR) up-conversion optogenetics for neural manipulation. 第 93 回日本生理学会大会、2016.3.24、札幌コンベンションセンター

高橋麻紀, **菅野江里子**, 田端希多子, 富田浩史、酸化ストレス誘導性アポトーシスに対する酸性セラミダーゼの細胞保護効果、日本動物学会東北支部大会、2015.8.9、東北大学

野崎示穂, 清水宏也, **菅野江里子**, 高橋麻紀, 富田浩史、マルチビタミンを用いた細胞死抑制効果の検討、日本動物学会東北支部大会、2015.8.9、東北大学

清水宏也, **菅野江里子**, 田端希多子, 高橋麻紀, 富田浩史、亜硝酸ナトリウム誘導性の新規認知症様モデルの作製と脳機能評価、日本動物学会東北支部大会、2015.8.8、東北大学

三戸啓, **菅野江里子**, 田端希多子, 高橋麻紀, 斎藤建彦, 富田浩史、2つの光受容タンパク質を発現する細胞の光特性解析、日本動物学会東北支部大会、2015.8.8、東北大学

佐藤雅俊, **菅野江里子**, 田端希多子, 高橋麻紀, 西山史朗, 富田浩史、感受波長の異なる2つの光受容タンパク質が作り出す視覚機能、日本動物学会東北支部大会、2015.8.8、東北大学

八尾 寛, 細島頌子, 阿部健太, 湯浅英哉, **菅野江里子**, 富田浩史, 石塚 徹、ランタニドナノ粒子アップコンバージョン効果による近赤外オプトジェネティクス、ナノ学会第 13 回大会、2015.5.11、東北大学

Sugano E, Tabata K, Nishiyama F, Takahashi M, Shimizu H, Sato M, Tamai M, Tomita H. Systematic and local responses of modified volvox Channelrhodopsin-1 gene therapy. *Asia-ARVO*, 2015.2.16, パシフィコ横浜

Tomita H, **Sugano E**, Tabata K, Sato M, Takahashi M, Sannohe K, Murayama N, Nishiyama F, Saito T, Tamai M. Visual properties of photoreceptor degenerated rat with dual channelrhodopsin genes. *Asia-ARVO*, 2015.2.16, パシフィコ横浜

富田浩史, **菅野江里子**, 村山奈美枝, 高橋麻紀, 田端喜多子, 西山史朗, 斎藤建彦, 玉井信、オプトジェネティクスの視覚への応用、

第 35 回 日本レーザー医学学会総会、
2014.11.30, 京王プラザホテル(東京)

Komatsu M, **Sugano E**, Tomita H, Fujii N. Physiological Methods
Title: Multi-focal photostimulations with light emitting diodes on a multi-channel electrocorticographic array in non-human primates.SFN 2014, 2014.11.16, Washington, DC

苫米地一駿、**菅野江里子**、村山奈美枝、高橋麻紀、田端喜多子、富田浩史、アデノ随伴ウイルスの感染効率を左右する因子の検索、日本動物学会第 85 回大会、2014.9.13、東北大学

西山史朗、富田浩史、**菅野江里子**、村山奈美枝、尾崎拓、田端喜多子、高橋麻紀、齋藤建彦、玉井信、改変型チャンネルロドプシン遺伝子を導入したラットの視機能評価、日本動物学会第 85 回大会、2014.9.13、東北大学

Tomita H, **Sugano E**, Murayama N, Takahashi M, Nishiyama F, Tabata K, Saito T, Tamai M. Application of optogenetic technologies to restore vision in genetically blind rats. LE2014 ライフエンジニアリング部門シンポジウム、2014.9.18、金沢大学

Tomita H, **Sugano E**, Kitako T, Nishiyama F, Murayama N, Takahashi M, Saito T, Tamai M. Gene therapy using channelrhodopsins for restoring vision. 第 37 回日本神経科学学会、2014.9.12、パシフィコ横浜

Iwasaki M, Osawa S, Hosaka R, Matsuzaka Y, Tomita H, Ishizuka T, **Sugano E**, Okumura E, Yawo H, Nakasato N, Tominaga T, Mushiaki H, Hippocampal network dynamics in optogenetically induced seizure model. 第 37 回日本神経科学学会、2014.9.11、パシフィコ横浜

Sugano E, Nishiyama F, Tabata K, Murayama N, Takahashi M, Saito T, Tamai M, Tomita H. Visual properties of RCS rats transduced with modified Volvox channelrhodopsin-1. ISER2014, 2014.7.24, Hyatt Regency (San Francisco)

Tomita H, **Sugano E**, Murayama N, Tabata K, Takahashi M, Saito T, Nishiyama F, Tamai M. Restoration OF the majority of the visual spectrum in RCS Rats using AAV - mediated modified Volvox channelrhodopsin - 1 gene transfer. ISER2014, 2014.7.24, Hyatt Regency (San Francisco)

西山史朗、富田浩史、**菅野江里子**、村山奈美枝、尾崎拓、田端喜多子、高橋麻紀、齋藤建彦、富田浩史、行動解析による視覚機能評価法の確立、日本動物学会東北支部大会、2014.7.13、岩手大学

苫米地一駿、**菅野江里子**、村山奈美枝、高橋麻紀、田端喜多子、富田浩史、アデノ随伴ウイルスの感染効率を左右する因子の検索、日本動物学会東北支部大会、2014.7.12、岩手大学

② Hiroshi T, **Sugano E**, Murayama N, Tabata, K, Takahashi M, Saito T, Tamai M. Application of optogenetic technologies to vision -Restoring vision to patients with blindness-, WOC2014 JRPS, 2014.4.5, 東京国際フォーラム

②富田浩史、**菅野江里子**、村山奈美枝、田端喜多子、高橋麻紀、齋藤健彦、西山史郎、玉井信、チャンネルロドプシン遺伝子導入による視覚機能再建、第 118 回 日本眼科学会、2014.4.4、帝国ホテル(東京)

〔図書〕(計 7 件)

富田浩史、**菅野江里子**、オプトジェネティクスの視覚への応用・チャンネルロドプシン遺伝子の導入による失明者の視覚再建、日本工業出版「光アライアンス」27(1)、2016、p.51-55

富田浩史、**菅野江里子**、網膜神経節細胞の光活性化を用いた視覚再建の取り組み、日本光学会「光学」44、2015、p.433-439

菅野江里子、富田浩史、特集・未来を支えるライフサイエンス「視覚障害治療のための可視光に感受性を持つ光活性陽イオンチャンネルタンパク質」、科学工業社月刊「化学工業」66(11)、2015、p.13-19

Sugano E, Tomita H, Chapter24: Establishment of gene therapy using channelrhodopsin-2 to treat blindness, Springer "Optogenetics: Light-Sensing Proteins and Their Applications", 2015、p.341-352,

富田浩史、**菅野江里子**、特集 2 視覚を用いた脳科学研究 視覚再生、金芳堂「脳 21」67(17):4、2014、p.479-485

菅野江里子、富田浩史、チャンネルロドプシンによる遺伝子治療の研究、エヌ・ティー・エス「オプトジェネティクス(光遺伝学)～光操作による行動制御技術～」、2013、p.248-257

Tomita H, **Sugano E**, Isago H, Murayama

N, Tamai M. Chapter20; Gene Therapy for retinitis pigmentosa. INTECH “Gene Therapy, tools and potential applications”2013, p.493-510

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：哺乳動物細胞に対する外来遺伝子の導入発現効率の向上剤

発明者：富田浩史、菅野江里子

権利者：国立大学法人岩手大学

種類：PCT 出願

番号：特願 2015-024849

出願年月日：平成 27 年 2 月 12 日

国内外の別：国外

取得状況(計 1件)

名称：Light-receiving channel rhodopsin having improved expression efficiency

発明者：Hiroshi Tomita, **Eriko Sugano**

権利者：Tohoku University

種類：PCT

番号：US 8,754,048B2

取得年月日：Jun.17, 2014

国内外の別：国外

〔その他〕

視覚神経科学研究室

<http://web.cc.iwate-u.ac.jp/~htomita/vis-neurosci/member.html>

平成 27 年度科学技術分野の文部科学大臣表彰科学技術賞研究部門

http://www.iwate-u.ac.jp/oshirase/file/2392_0.pdf

6. 研究組織

(1)研究代表者

菅野 江里子 (SUGANO, Eriko)

岩手大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：70375021

(2)研究分担者

砂金 ひとみ (ISAGO Hitomi)

東北大学・大学病院・助手

研究者番号：30400451