

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861432

研究課題名(和文) 網膜スライスパッチクランプ法によるChR発現神経節細胞の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of the ChR expression ganglion cell by the retina slice patch clamp method

研究代表者

村山 奈美枝 (Murayama, Namie)

東北大学・大学病院・産学官連携研究員

研究者番号：60597516

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：チャネルロドプシンは、視機能再建のツールとして研究されているが、網膜神経伝達機構に関する研究はまだ少ない。本研究は、ラットの網膜の個々の細胞の反応についてスライス標本を用いて電気生理学的に検討することを目的とした。

スライス標本作製プロトコルを決定し、細胞直視下で行うスライスパッチクランプ実験系を確立した。ON型双極細胞に特異的に発現するアデノ随伴ウイルスベクター(AAV-mGluR6-ChR2V)を作製し、ON型双極細胞への発現を確認することができたが、導入効率が低く、スライス標本でのパッチクランプは困難であった。今後は、網膜伸展標本用いた手法により検討する必要があると考えている。

研究成果の概要(英文)：Channelrhodopsin, a molecular of light gated ion channel, is a promising therapeutic tool for vision restoration. Nonetheless, there are still few studies on the channelrhodopsin-mediated retinal neurotransmission. The purpose in this study is to investigate the response of the individual cell on the retinal slice by a patch clamp recordings.

We set up the method of the slice preparation and the slice patch clamp system. We made a construction of an adeno-associated virus vector (AAV-mGluR6-ChR2V) which specifically the target gene transduced into On-bipolar cells and could observe the gene expression in the On-bipolar cells on the cryo-sections. However, the transduction efficiencies into the On-bipolar cells was quite low, and it was difficult to find ChR2-expressing cells on the slice patch clamp recordings. We will try the patch clamp recordings on the retinal whole mount specimen.

研究分野：電気生理学

キーワード：眼生理 パッチクランプ

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性症は失明原因の上位に位置する疾患の一つである。多くの原因遺伝子が同定されているものの、視細胞の編成を抑制するなど、有効な治療法は確立されていない。さらに重篤な網膜剥離や年々増加している糖尿病網膜症などを含めると今後失明者が増加することは明らかである。これらの疾患のほとんど(緑内障を除く)は、視細胞の変性に原因があり、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は最近の研究で明らかにされている。

失明に対する唯一の式の再建法として、光受容を光学的技術によって代用し、残存する網膜神経細胞を電気的に刺激する「人工網膜」が世界的に研究されている。この方法は映像情報を人工網膜 chip でとらえ、電気的な信号に変換し、残存する網膜神経節細胞を刺激し、疑似的な光覚を得ようとするものである。アメリカやドイツで臨床試験が始められているものの、様々な問題点が明らかになってきている。また、研究段階にある視覚再生法として、幹細胞移植が挙げられる。近年では、iPS 細胞から特定の神経細胞へ分化をコントロールすることが可能になりつつあるが、生来のネットワークを再構成できるかなどの問題がある。我々は、光受容を機械によって代用するのではなく、「残存する神経細胞に光受容能を賦与する」という全く新しい方法を用いての視覚再建を目指している。この方法では残存する神経細胞に光受容能が賦与されるため、既存の神経ネットワークをそのまま利用することができる。富田らの研究室ではすでに、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて、網膜神経節細胞に緑藻類クラミドモナス由来のチャンネルロドプシン-2 (ChR2) 遺伝子を導入することにより、遺伝盲ラットの視覚を取り戻すことに成功している。また、ラットの首振り運動による行動解析で、行動学的にも視機能の回復を確認している(Tomita H et al, IOVS, 2007; PLOS ONE, 2010; Exp Eye Res, 2011)。また、近年はボルボックス由来チャンネルロドプシン-1(mVChR1)を開発し、この研究で世界をリードしている。

ChR2 の陽イオン選択的チャンネルとして機能するという特徴を利用することによって、神経細胞を特定の波長で人工的興奮させることが可能である。すなわち、神経細胞が存在しない網膜の特定の細胞に ChR2 を発現させることによって、その細胞以降の神経伝達機構を調べることができる。ChR2 を用いた視覚再生という点からみると、ChR2 を網膜のどの神経細胞に発現させることが失明者に効果的な視覚を生み出すことができるかを知ることができる。

従来、網膜神経伝達機構の解析には正常な網膜が用いられてきたが、正常な網膜では光刺激によって同時に多くの神経細胞が刺激され、その反応は複雑なものとなり、個々の

細胞の反応を調べることは容易ではなかった。そこで今回、視細胞が変性した(光刺激によって何ら反応を示さない)ラットを用いて、網膜の個々の細胞の反応を調べることを目的とする。

通常、視細胞が変性すると、光に対する視細胞の出力が消失するために光刺激に対する神経節細胞の反応を記録することができない。そのため、視細胞変性後の神経節細胞の機能を電気生理学的に解析することは不可能であった。また、視細胞変性後、双極細胞以降のシナプス構造が変化することが、免疫染色法により確認されているが、機能的にどのような変化が起こっているかを調べることは困難である。しかし、神経節細胞、あるいは他の残存する網膜細胞に ChR2 遺伝子を導入することによって、ChR2 遺伝子が導入された細胞は光感受性細胞となるため、その細胞以降の神経伝達経路を調べることが可能になる。

スライスパッチクランプ法は、神経ネットワークが分断された培養細胞と異なり、シナプス状態が正常状態に近い状態で応答を記録することが可能である。視細胞が変性した網膜に ChR2 遺伝子を導入し、新たに網膜に光感受性を賦与した網膜のスライス標本を用いてパッチクランプを行うことによって、シナプス伝達をはじめとする網膜の神経ネットワークを詳しく解析することが可能と考えられる。

視細胞変性後の網膜神経ネットワークが、正常な網膜と同等かどうか、さらには ChR2 の遺伝子導入によって得られる視覚は正常な網膜とどのような点で異なるかをスライスパッチクランプ法によって調べることが可能と考えられる。

2. 研究の目的

緑藻類クラミドモナス由来のチャンネルロドプシン-2 (ChR2) は、発色団レチナールを有し、530nm 以下(青色)の光に応答し、細胞内に陽イオンを透過させる光受容陽イオン選択的チャンネルとして機能することが知られている。このような特性から、神経細胞に発現させた場合、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。光感受性遺伝子チャンネルロドプシンでは、培養細胞レベルでの検討は多くなってきたが、神経伝達機構に関する研究は少ない。

視細胞が存在しない網膜の特定細胞に ChR2 を発現させることによって、その細胞以降の神経伝達機構を調べることができる。ChR2 を用いた視覚再生という点からみると、ChR2 を網膜のどの神経細胞に発現させるかということが失明者に効果的な視覚を生み出すことにできるかを知ることができると思われる。従来、網膜神経伝達機構の解析には正常な網膜が用いられてきたが、正常な網膜では光刺激によって多くの神経細胞が刺

激され、その反応は複雑なものとなり、個々の細胞の反応を調べることは容易ではなかった。本研究ではラットの網膜の神経節細胞の反応について、視細胞が変性したラットの網膜を用いて、網膜の個々の細胞の反応をスライスパッチクランプによって調べることを目的とする。そして、網膜光受容システムにおける神経ネットワークについての解析を目的としている。

3. 研究の方法

(1)モデル動物への遺伝子導入、導入後の光応答解析

変異型アデノ随伴ウイルス(AAV-)を作製し、ラットの眼球へ投与する。目的の細胞によって網膜下、硝子体など投与部位を変えることにより、遺伝子導入する標的細胞を決める。投与2ヶ月後に、眼球を摘出し、網膜標本を作製し発現を確認した。

(2)スライスパッチクランプシステム実験系の確立

スライスパッチクランプ法の細胞直視下で行う可視化法を選択した。可視化法では、薄いスライス標本を用いるため、より良いスライド標本の作製が重要であることから、作製過程においての様々な条件の検討を行った。そしてスライス標本作製プロトコルを決定した。

正常なラットの網膜を用いてのスライス標本作製およびパッチクランプ技術の習得

(3)遺伝盲ラットへの遺伝子導入

ON型双極細胞のみにChRを導入し発現させた。神経節細胞での応答を正常なラットの網膜を用いた場合と比較する。

神経節細胞にChRを導入し発現させた。光刺激を細胞体にあてた場合と軸索のみにあてた場合で応答の違いについて検討する。

4. 研究成果

変異型アデノ随伴ウイルス(AAV-)を作製した。On型双極細胞に特異的に発現する変異型アデノ随伴ウイルス(AAV-mGluR6-ChR2V)を作製した。

ラットの眼球へ投与し、投与2ヶ月後に、眼球を摘出し、網膜標本にし、遺伝子の発現を確認した。

スライスパッチクランプシステム実験系の確立。本研究で用いた細胞直視下で行う可視化法では、薄いスライス標本を用いるため、より良いスライド標本の作製が重要であることから、作製過程においての様々な条件の検討を行った。

作製にかかる時間やサンプル標本の厚さ等の様々な条件検討を行い、スライス標本作製

のプロトコルを決定した。

その条件の下、正常なラットの網膜を用いてスライス標本の作製を作製し、光刺激に対する反応を記録した。

スライスパッチクランプ法を用いての細胞応答の記録

視細胞が変性するとOn型双極細胞以降のシナプス構造が変化することが確認されている。しかし、硝子体投与では神経節細胞ではなく、双極細胞に選択的に遺伝子を導入することは困難だった。作製したOn型双極細胞に特異的に発現する変異型アデノ随伴ウイルス(AAV-mGluR6-ChR2V)ベクターを用いて遺伝子導入を行った結果、On型双極細胞への遺伝子発現が見られたものの導入効率が高かった。遺伝子導入した網膜のスライス標本でのパッチクランプを試みた。しかしながら、発現効率が低いため、遺伝子が導入された細胞を見つけるのが困難で、現状では記録するに至っていない。可視化法ではスライス標本の鮮度も重要な要素であるので、発現量が少ないと細胞を探すのに時間を費やしてしま、残念ながら効率的で質の良い実験ができないという結果になった。

今後は、引き続き、遺伝子導入効率の高い変異型アデノ随伴ウイルスの作製を試みる。とともに、網膜進展標本やラット以外の下等動物でのパッチクランプ法も検討し、失明網膜の光受容機構を調べていきたい。

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1件)

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

[学会発表](計10件)

Tomita H, Sugano E, Murayama N, Nishiyama F, Tabata K, Takahashi M, Saito T, Tamai M. Application of optogenetic technologies to restore vision in genetically blind rats, ライフエンジニアリングシンポジウム2014, 2014/9/18-19, 金沢大学鶴間キャンパス(石川)

西山史朗、富田浩史、菅野江里子、村山奈美枝、尾崎拓、田端希多子、高橋麻紀、斎藤建彦、玉井信、改変型チャ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、東北大学川内キャンパス(宮城)

苫米地一駿、菅野江里子、村山奈美枝、高橋麻紀、田端希多子、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、東北大学川内キャンパス(宮城)

Tomita H , Sugano E , Murayama N , Nishiyama F , Tabata K , 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(神奈川)

Tomita H , Sugano E , Murayama N , Nishiyama F , Tabata K , Takahashi M , Saito T , Tamai M . RESTRICTION OF THE MAJORITY OF THE VISUAL SPECTRUM IN RCS RATS USING AAV-MEDIATED MODIFIED VOLVOX CHANNELRHODOPSIN-1 GENE TRANSFER , International Society for EyeResearch , 2014/7/20-24, Hyatt Regency San Francisco(U,S)

Sugano E , Murayama N , Nishiyama F , Tabata K , Takahashi M , Saito T , Tamai M , Tomita H , VISUAL PROPERTIES OF RCS RATS TRANSDUCED WITH MODIFIED VOLVOX CHANNELRHODOPSIN-1 , International Society for EyeResearch , 2014/7/20-24, Hyatt Regency San Francisco(U,S)

西山史朗、富田浩史、菅野江里子、村山奈美枝、尾崎拓、田端希多子、高橋麻紀、斎藤建彦、玉井信、行動解析による視覚機能評価法の確立、平成 26 年度日本動物学会東北支部大会、2014/7/13、岩手大学(岩手)

苫米地一駿、菅野江里子、村山奈美枝、高橋麻紀、田端希多子、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、平成 26 年度日本動物学会東北支部大会、2014/7/12、岩手大学(岩手)

富田浩史、菅野江里子、村山奈美枝、田端希多子、高橋麻紀、斎藤建彦、西山史朗、玉井信、チャンネルロドプシン遺伝子導入による視機能再建、第 118 回日本眼科学会、2014/4/2-4、東京国際フォーラム(東京)

Tomita H , Sugano E , Murayama N , Nishiyama F , Tabata K , Takahashi M , Saito T , Tamai M . Application of optogenetic technologies to vision -Restoring vision to patients with blindness- , World Ophthalmology Congress , 2014/4/2-4、東京国際フォーラム(東京)

東北大学・大学病院・産学官連携研究員
研究者番号：60597516

6. 研究組織

(1)研究代表者

村山 奈美枝 (MURAYAMA , NAMIE)