

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：11201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861433

研究課題名(和文) 微生物由来イオンチャネル遺伝子導入による網膜変性保護

研究課題名(英文) Gene therapy using microorganism derived ion channel for retinal degeneration

研究代表者

高橋 麻紀 (Takahasi, Maki)

岩手大学・工学部・研究員

研究者番号：70714575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、微生物が持つイオンチャネル遺伝子を用いて、網膜変性疾患を治療することを目的とする。種々の微生物由来イオンチャネル遺伝子を含むプラスミドベクターを作製し、樹立細胞株を用いて、グルタミン酸毒性に対する保護効果を検証した。予想に反して、クロライドチャネル遺伝子では保護効果は認められず、陽イオンチャネル遺伝子を導入した細胞でグルタミン酸毒性に対する保護効果が認められた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to rescue the retina from the oxidative stress by using microbial ion channels. We develop the plasmid vectors including various types of microbial ion channel genes and established the constitutively those gene-expressing cell lines. We tested the protective effect on the glutamate toxicity in those cells. We could observe the protective effect in constitutively expressed cation channel gene but not chloride channel genes in the cells.

研究分野：眼科学

キーワード：眼生理学 視細胞保護 アデノ随伴ウイルスベクター

## 1. 研究開始当初の背景

視覚障害者の数は164万にのぼり、高齢化社会の進行とともに今後ますます増加し、2030年には200万人にもおよぶと推定されている(2009年眼科学会資料)。視覚障害を来す疾患から網膜神経細胞を保護する治療法の確立は、高齢化社会の中で、QOLを確保するために、重要である。中途失明原因の上位に位置する緑内障、網膜色素変性症、加齢黄斑変性症では、障害を受ける網膜神経細胞の種類は異なるものの、各々の疾病によって引き起こされる細胞死の形態はアポトーシスである。当研究室では、緑藻類クラミドモナスより単離した光活性化イオンチャンネル遺伝子「チャンネルロドプシン-2(ChR2)」を用いた視覚再生法を検討してきた。視細胞が変性し、失明した網膜の神経節細胞にChR2を導入することによって、神経節細胞に光受容能を与え、視機能を回復するというものである。この研究は、現在ヒトへの応用を目指している段階である。ChR2の発見以来、数種類の光活性化イオンチャンネル遺伝子が報告され、神経科学分野で、光活性化遺伝子を利用した実験手法は「光遺伝学(オプトジェネティクス)」と呼ばれ、急速に発展してきている。このように微生物が持つ遺伝子群の中には、治療あるいは研究に有用である遺伝子が数多く存在すると思われ、本研究では、微生物由来遺伝子を利用した網膜疾患治療を目指すものである。

重篤な視覚障害を来す疾患として加齢黄斑変性症や緑内障がある。加齢黄斑変性症の原因の1つとして、活性酸素による酸化ストレスが挙げられている。網膜色素変性症では、視サイクルに關与する遺伝子の変異がその原因であり、その視細胞変性の要因の一つとして、変異タンパク質によって引き起こされる小胞体ストレスがある。また、緑内障による神経節細胞死の要因として、グルタミン酸毒性が挙げられている。いずれの場合も、細胞のイオン環境の崩壊が1つの要因であると推察される。人為的にイオン環境を操作することによって、細胞死を制御できる可能性がある。

しかしながら、哺乳類由来のイオンチャンネルは、その分子サイズが大きく、*in vivo*で遺伝子を網膜細胞に導入することが困難であった。哺乳類細胞に比べ、微生物が持つイオンチャンネルはサイズが小さく、ウイルスベクターを用いて遺伝子導入することが充分可能である。

## 2. 研究の目的

緑藻類クラミドモナス由来の「光活性化陽イオン選択的チャンネル(チャンネルロドプシン-2: ChR2)」を導入することによって視機能を回復できることが示されている。また、ラットを用いた安全性研究において、ChR2遺伝子導入によって重篤な副作用が見られないことが明らかとなっている。これらの結果から、

異種タンパク質を眼内で発現させたとしても、必ずしも免疫学的な副作用を惹起するとは限らないと考えられる。高等動物と異なり、微生物が持つイオンチャンネルは、分子サイズが小さいものが存在し、これらを利用することにより、哺乳類細胞のイオン環境を人為的に制御することが可能になる。電位依存性ナトリウムチャンネルや電位依存性カルシウムチャンネルは、これまで様々な手法を用いて研究が行われてきたが、神経系におけるクロライドチャンネルの機能については陽イオンチャンネルに比べて、活発に研究されていない。現在、我々は微生物が持つ3つのクロライドイオンチャンネル遺伝子に着目し、すでにクローニング済みである。光感受性のクロライドチャンネル(mVChR1)、薬剤感受性のクロライドチャンネル(is-Cl)、グルタミン酸感受性のクロライドチャンネル(GluCl)は、それぞれ、黄色光、薬剤添加、グルタミン酸刺激で活性化され、クロライドイオンを細胞内に取り込む。これらの微生物の特徴的なクロライドイオンチャンネル遺伝子をラットの網膜細胞にAAVを用いて導入することで、光や薬剤など、各方法によって導入したクロライドイオンチャンネルを活性化することが可能となる。人為的に、イオンチャンネルの活性化のタイミングを制御する技術は、前述したChR2などの光活性化のイオンチャンネル遺伝子を利用して、近年、光遺伝学(オプトジェネティクス)として発展してきている。これと同様に、光、薬剤などの刺激で活性化するクロライドチャンネルは、神経ネットワークを調べるための有用なツールになる可能性がある。

今回、高度高塩菌から単離した光活性化クロライドチャンネルの改変体(mNpHR)、微生物から単離した薬剤感受性のクロライドチャンネル(is-Cl)、グルタミン酸感受性のクロライドチャンネル(GluCl)、mVChR1を視細胞あるいは神経節細胞に導入し、視細胞変性保護または神経節細胞死保護に機能するかどうかを調べることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝子導入用ベクターの作製

ラット網膜では、80%以上の網膜神経節細胞でCaMKIIサブユニットが発現していることが知られており、CaMKIIプロモーターを利用することにより、神経節細胞に特異的に目的遺伝子を発現させることができる。そこで、神経節細胞特異的に遺伝子導入を行うために、カルモジュリンキナーゼIIサブユニット(CaMKII)のプロモーターを持つウイルスベクターを作製した。

また、視細胞特異的ベクターとして、Phosphodiesterase(PDE)のプロモーターの一部とinterphotoreceptor retinoid-binding protein(IRBP)のプロモーターを組み合わせたハイブリッドベクターを作製した。

(2) 培養細胞を用いたイオンチャネル遺伝子の効果検証

GluCl 遺伝子をプラスミドベクターを用いて PC12 細胞に導入し、恒常的に GluCl 遺伝子を発現する細胞株を樹立した。NGF 添加によって PC12 細胞を神経細胞用に分化させ、GluCl のグルタミン酸毒性に対する保護効果を調べた。また、光感受性クロライドチャンネルとして機能する mNpHR 遺伝子をマウス海馬由来神経細胞株 (HT22) に導入し mNpHR-HT22 細胞株を作製し、同様にグルタミン酸毒性に対する保護効果を調べた。

(3) 緑内障モデルの作製

持続的な眼圧上昇を引き起こす緑内障モデルはなく、今回、新しい緑内障モデル作製について検討した。デキサメタゾン誘発緑内障モデルは、高眼圧を維持するため、前房内に頻回投与する必要がある。そこで、デキサメタゾン投与と同時に細胞塊を前房内に投与し、眼圧上昇を維持させることを試みた。

4. 研究成果

(1) 遺伝子導入用ベクターの作製

CaMKII プロモーターを AAV 用に短縮したものを作製し、0.4, 1.2, 1.6 kbp の 3 つの異なる長さのプロモーターを作製し、網膜神経節細胞への導入および発現効率を調べたところ、1.2kbp の長さのプロモーターで充分機能することが確認できた。しかし、その発現量は、強力なプロモーターである CAG に比べ弱いものであった。

視細胞特異的なプロモーターの IRBP-PDE は、網膜下投与で視細胞に特異的に発現が見られたものの、硝子体内投与では発現はみられなかった。しかし、血清型を変異型にすることによって、硝子体内投与においても、視細胞で発現が確認された。

(2) 培養細胞を用いたイオンチャネル遺伝子の効果検証

分化した PC12 細胞はグルタミン酸毒性を示すとの報告があったものの、今回、グルタミン酸毒性は認められなかった。そこで、血清除去による細胞死に対する GluCl 遺伝子の効果を調べた。しかし、保護効果は認められなかった。そこで、GluCl の機能を調べるために、脱分極刺激による膜電流を測定し、GluCl の機能を調べた。イオン電流がほとんど観察されなかった。

次に、mNpHR-HT22 を用いてグルタミン酸毒性に対する保護効果を調べた。その結果 mNpHR もまた、保護効果を示さないことが明らかとなった。一方、実験のコントロールとして用いた mVChR1 遺伝子を恒常的に発現する HEK293 細胞では、グルタミン酸毒性に対する保護効果が観察された。

(3) 緑内障モデルの作製

デキサメタゾンと細胞塊を前房内に投与す

ることによって、1 回の投与で、4 週間の眼圧上昇が認められた。再度、4 週間目の投与でさらに 4 週間持続的な眼圧上昇が見られたが 3 度目の投与 (8 週間目に投与) では、効果が持続しなかった。上丘より蛍光色素を注入し神経節細胞を逆行性標識し、神経節細胞数を計測した結果、極わずかに減少傾向が見られたものの、有意な減少は観察されなかった。

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 2 件)

1. 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.* 23(2):158-66. 2016
2. 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.* 22(8):1434-40. 2014

[学会発表](計 16 件)

1. 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、2015.08.08、日本動物学会東北支部大会 (仙台)
2. 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、2015.08.08、日本動物学会東北支部大会 (仙台)
3. 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、2015.08.08、日本動物学会東北支部大会 (仙台)
4. 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、2015.08.08、日本動物学会東北支部大会 (仙台)
5. 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、2015.08.08、日本動物学会東北支部大会 (仙台)
6. 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, 2015.02.16, Asia-ARVO(Tokyo)
7. 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. 2015.02.16, Asia-ARVO(Tokyo)
  8. 富田浩史、菅野江里子、村山奈美枝、高橋麻紀、田端希多子、西山史朗、齋藤建彦、玉井信、オプトジェネティクスの視覚への応用、2014.11.30、第35回日本レーザー医学学会総会（東京）
  9. Tomita H, Sugano E, Murayama N, Tabata K, Takahashi M, Saito T, Tamai M, 光を用いた神経工学 2A2-5 Application of optogenetic technologies to restore vision in genetically blind rats, 2014.09.18, LE2014 ライフエンジニアリング部門シンポジウム 2014（金沢）
  10. Tomita H, Sugano E, Murayama N, Tabata K, Takahashi M, Saito T, Tamai M, 'Sensory-input dependent refinement of neural circuits' Gene therapy using channelrhodopsins for restoring vision, 2014.09.12, 第37回日本神経科学学会（横浜）
  11. Tomita H, Sugano E, Murayama N, Tabata K, Takahashi M, Saito T, Tamai M, RESTORATION OF THE MAJORITY OF THE VISUAL SPECTRUM IN RCS RATS USING AAV-MEDIATED MODIFIED VOLVOX CHANNELRHODOPSIN-1 GENE TRANSFER, 2014.07.24, ISER2014 招待講演 "RN10 - Road to Cure II: Gene Replacement, Optogenetics and Other Therapies for Retinal Diseases."(San Francisco)
  12. 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, 2014.07.24, ISER2014(San Francisco)
  13. 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、齋藤建彦、行動解析による視覚機能評価法の確立、2014.07.13、日本動物学会東北支部大会(仙台)
  14. 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、2014.07.12、日本動物学会東北支部大会(仙台)
  15. Tomita H, Sugano E, Murayama N, Tabata K, Takahashi M, Saito T, Tamai M, Application of optogenetic technologies to vision -Restoring vision to patients with blindness-,

- 2014.4.5, WOC2014 JRPS (Tokyo)
16. 富田浩史、菅野江里子、村山奈美枝、田端希多子、高橋麻紀、齋藤健彦、西山史郎、玉井信、シンポジウム 10 網膜の再生治療・人工視覚「チャンネルロドプシン遺伝子導入による視覚機能再建」、2014.4.4、第118回日本眼科学会（東京都）

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://web.cc.iwate-u.ac.jp/~htomita/vi-s-neurosci/>

## 6. 研究組織

- (1)研究代表者  
高橋 麻紀 (TAKAHASHI Maki)  
岩手大学・工学部・学術研究員  
研究者番号：70714575