

機関番号：11301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791664

研究課題名 (和文) チャネルロドプシン2をON型双極細胞に発現させた遺伝盲ラットの視覚機能

研究課題名 (英文) Restore vision by transgene of Channelrhodopsin2 on ON-type bipolar cells in genetically blind rat.

研究代表者 菅野 江里子 (SUGANO ERIKO)

東北大学・国際高等研究教育機構・助教

研究者番号：70375210

研究成果の概要 (和文)： チャネルロドプシン 2(ChR2)を ON 型双極細胞に特異的に発現させる為、代謝型グルタミン酸レセプター 6 (Glu6) プロモーターを用いたアデノ随伴ウイルスベクター (pAAV-Glu6-ChR2) を作成している。本年度は濃縮する方法の開発を行い、精製法を確立した。AAV2 型の他に 5 型ウイルスを作成しそれぞれ濃縮を行い、硝子体内と網膜下の 2 種類のルートから投与を行い、遺伝子導入効率を調べた。この結果、いずれの方法でも遺伝子導入効率は同等であった。

研究成果の概要 (英文)： I constructed pAAV-Glu6-ChR2 vector that induce ChR2 gene by the metabotropic glutamate receptor (mGlu6) promoter into the on-type bipolar cells. I established the protocol to purify AAV by HPLC. These results showed the same induction efficiency between injection routes and serotypes of AAV.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	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：神経再生、網膜、遺伝子導入、ウイルス、プロモーター

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性症は近年、遺伝子解析技術の進歩により、多くの原因遺伝子が同定されているにもかかわらず、その治療法はなく、経過観察が行われているのみである。**加齢性黄斑変性症**もまた高齢化社会の進行とともに急増傾向にあるが、有効な治療法は確立されていない。これらの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。更に重篤な網膜はく離や増加の一途をたどる増殖糖尿病網膜症を加えると今後失明者が増加することは明らかである。

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。現状では、幹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難しい点や、それが可能であったとしても、生来の神経ネットワークを再構成できるかなどの問題がある。

一方、上述の疾患による失明者のほとんど(緑内障を除く)は**視細胞の変性にその原因があり、神経節細胞をはじめ多くのニューロンは残存**し、視神経が充分機能することは最近の研究で明らかにされている。今回提案する視覚再建方法は、**「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で、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。光受容チャネル遺伝子を用いた視覚再生法は昨年頃から注目されはじめ、世界の研究者がこの方法を用いた視覚再生法について研究をスタートしたが、我々はいち早く（2005年）この方法による視覚再生研究をスタートさせていたことから、この方法による視覚再生の問題点などをすでに明らかにしている。また、その改善に取り組んできており、すでに光感受性の増大や緑方変異型チャネルロドプシンの開発に成功している。

2. 研究の目的

臨床試験の実績のあるアデノ随伴ウイルスベクター(AAV2)を用いて、脳への出力を行っている網膜神経節細胞(RGCs)に ChR2 遺伝子を導入することにより、遺伝盲ラットの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ている (Tomita et al., IOVS, 2007)。しかし、RGCs には、On-cell, OFF-cell, ON-OFF-cell のように光受容に対して異なった応答を持つ細胞が存在するとされているにも関わらず、現在の遺伝子導入方法では RGCs に高和性をもって導入されるもの、RGC のタイプ別に遺伝子を導入する事ができない。そこで、本研究では、細胞特異的なプロモーターを利用することで、On 型双極細胞に特異的に発現させ、RGC の On-cell のみを視覚再生に利用する事を目的とする。また、全ての RGCs に遺伝子が導入された場合と比較し、どちらが視覚再生に有用であるか、検討を行いたい。

3. 研究の方法

前年度の研究で ChR2 を On 型双極細胞に特異的に発現させるために、On 型双極細胞に特異的なプロモーターである代謝型グルタミン酸レセプター 6 (Glu6) プロモーターを用いたアデノ随伴ウイルスベクターを作製した (pAAV-Glu6-ChR2)。Glu6 のプロモーター領域は、通常、塩基配列が長くウイルスベクターに組み込むことができない。そこで、SV40 プロモーターの下に Glu6 のエンハンサー領域を繋げ、アデノ随伴ウイルスベクターに組み込み、アデノ随伴ウイルスを作製した。

このウイルス (AAV-Glu6-ChR2) を視細胞変性ラット (RCS ラット) の硝子体内に投与した場合、導入効率が低いことが前年確認されたので、本年度はウイルスベクターの濃縮を行った後、これを投与し発現効率を調べた。これまで、臨床報告のあるウイルス血清型 2 型を用いてきたが、これに加えて網膜内層の細

胞に親和性の高い 5 型のウイルスも作製した。これらウイルスを 2 つの導入ルート、硝子体内および網膜下から投与し、この時のウイルス導入効率について検討した。

4. 研究成果

AAV-Glu6-ChR2 の濃縮を行い、硝子体内投与と網膜下投与を行い、遺伝子導入効率を調べた。また AAV2 型その他、AAV5 型についても各遺伝子導入ルートによる導入効率の違いを検討した。この結果、2 型、5 型の各投与ルートにおいて導入効率の改善は認められなかった (図 1)。特に網膜下に AAV-Glu6-ChR2 を投与した場合は局所にしか遺伝子が導入されなかった。しかし、このことから、臨床応用を考慮した場合には、この局所にしか導入されない性質を生かし、黄斑部にのみ遺伝子を導入したい場合には Glu6 プロモーターのウイルスを網膜下に投与し、広範囲に導入したい場合には CAG プロモーターのウイルスを硝子体内投与する、使い分けが可能になるのではないかと考えられた。

また、本研究を通してウイルス濃縮方法について検討を行い、HPLC を用いた濃縮方法を確立した (図 2)。しかしながら、ウイルス作製には細胞から細胞断片を取り除いた後、ウイルス粗抽出液を作成する工程に時間を要す為、今後スケールアップする場合には、工程の短縮化とカラム前にウイルスを濃縮しておく必要があると考えられた。



図 1. 網膜伸展標本における遺伝子導入細胞の観察

pAAV-Glu6-ChR2、type 2 型の網膜下投与を行った。投与後、網膜伸展標本を作製し、導入遺伝子の発現観察を行った。ChR2 の発現を可視化する為融合させたタンパク質、mcherry を指標に観察した。

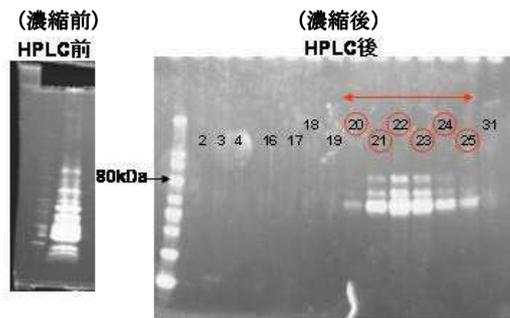


図 2. ウイルスタンパク質の電気泳動

回収したウイルス粗抽出液を用いて、HPLC によるカラム精製を行った。精製後濃縮し、SDS-PAGE 電気泳動を行い、タンパク質を分離した後、SYPRO Ruby で染色を行った。上記番号は主要フラクション番号。

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 3 件)

- ① Wang Z, Sugano E, Isago H, Hiroi T, Tmai M, Tomita H. Differentiation of neuronal cells from NIH/3T3 fibroblasts under defined conditions. Development Growth and Differentiation, 2011, In press, 査読有
- ② Sugano E, Isago H, Wang Z, Murayama N, Tamai M, Tomita H. Immune responses to adeno-associated virus type 2 encoding channelrhodopsin-2 in a genetically blind rat model for gene therapy. Gene Therapy, 2011, 18(3) 266-74, 査読有
- ③ Semo M, Gias C, Ahmado A, Sugano E, Allen AE, Lawrence JM, Tomita H, Coffey PJ, Vugler AA. Dissecting a role for melanopsin in behavioural light aversion reveals a response independent of conventional photoreception. PLoS One, 2010, 29;5(11) e15009, 査読有

[学会発表] (計 14 件)

- ① 富田浩史, 菅野江里子, 砂金ひとみ, 王卓, 村山なみえ, 玉井信 「チャンネルロドプシンを用いた視覚再生により得られる視覚の特性と予想される視覚情報について」、日本視覚学会、2011年1月20日、工学院大学(東京都)
- ② 富田浩史, 菅野江里子, 砂金ひとみ, 王卓, 村山なみえ, 玉井信 「緑藻類由来遺伝子を用いた視覚再生技術」、日本人工

臓器学会、2010年11月20日、国際センター(仙台)

- ③ 菅野江里子 「チャンネルロドプシン-2 を用いた視覚再生の可能性」第6回網脈絡膜変性フォーラム、2010年10月10日、いわて県民情報交流センター(盛岡)
- ④ 砂金ひとみ, 菅野江里子, 廣井照, 王卓, 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 2 を導入した遺伝盲ラットの光反応性」日本動物学会、2010年9月23日、東京大学(東京)
- ⑤ 王卓, 菅野江里子, 砂金ひとみ, 廣井照, 玉井信, 富田浩史 「NIH 3T3 線維芽細胞からの神経細胞の誘導」日本動物学会、2010年9月25日、東京大学(東京)
- ⑥ 菅野江里子, 砂金ひとみ, 王紅霞, 王卓, 廣井照, 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-2 の網膜における光特性解析」平成 22 年度「包括脳ネットワーク」夏のワークショップ、2010年7月27日、旧北海道厚生年金会館(札幌)
- ⑦ Sugano, E., Tomita, H., Isago, H., Hiroi, T., Wang, Z. and Tamai, M. Optimization of volvox-derived channelrhodopsin-1 to express in mammalian cells. XIVth International Symposium on Retinal Degeneration. 2010年7月14-16日, Mont-Tremblant (Quebec, Canada)
- ⑧ 富田浩史, 菅野江里子 「視機能再建のための遺伝子治療：現状と課題」JRPS 群馬県支部 第 11 回定期総会、2010年6月19日、群馬県社会福祉総合センター(前橋市)
- ⑨ Sugano, E., Tomita, H., Isago, H., Hiroi, T., Wang, Z. and Tamai, M. Visual Responses of Royal College of Surgeons Rats Transferred Modified Volvox Channelrhodopsin-2 Gene. Annual meeting Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2010年5月4日, Convention Center (Fortlauderdale, FL, US)

[産業財産権]

○ 出願状況 (計 1 件)

発明者：富田浩史、菅野江里子

権利者：同上

種類：PCT

番号：JP2010/063786

出願年月日：平成 22 年 7 月 10 日

国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.visual-neuroscience.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅野 江里子 (SUGANO ERIKO)

東北大学・国際高等研究教育機構・助教
研究者番号：70375210

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：