

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15730

研究課題名(和文) 神経活動依存的プロモーターを用いた網膜神経節細胞機能のイメージング法の確立

研究課題名(英文) In vivo imaging of retinal ganglion cell function using adeno-associated virus

研究代表者

中澤 徹 (Nakazawa, Toru)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30361075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：緑内障等の多くの眼疾患で網膜神経節細胞(RGC)障害により不可逆的視機能の損失を来す。病態解明のため、RGC機能を高い精度で評価するin vivo実験系の確立を目指した。神経活動依存性に活性化されるE-SAREの下流に蛍光タンパク質遺伝子を組み込んだAAVベクターを作製し、マウスに投与後、暗順応と光暴露を行い、共焦点走査型レーザー検眼鏡で観察、定量した。光暴露後2時間でin vivoで光応答するRGCが可視化された。一方、光暴露後2時間の暗順応で陽性細胞が45%減少した。E-SAREとAAVを組み合わせることにより、光応答するGCをin vivoで可視化する事に成功した。

研究成果の概要(英文)：Glaucoma, a leading cause of blindness worldwide, is characterized by progressive loss of the retinal ganglion cells (RGCs). To study neuronal activity in pathogenesis of RGC death, we developed in vivo imaging for quantitating activities of neuronal activity. E-SARE drives neuronal activity dependent gene expression at high levels. The E-SARE-driven fluorescent protein reporters was packaged into AAV. The temporal activity was monitored using confocal ophthalmoscopy. Dark-adapted animals were kept in dark for 48 hours before use. Light-adapted animals were kept under a constant light for 6 hours after dark-adaptation for 48 hours before use. E-SARE reporter expression was induced by light stimulation, and localized in RGC. Increased reporter activity occurred by 2 hours after light stimuli, and decreased at 2 hours after dark-adaptation showing 44% decreases. This E-SARE reporter in vivo cellular imaging is a useful tool to assess the RGCs function in retinal diseases.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜神経節細胞 緑内障 アデノ随伴ウイルス E-SARE

1. 研究開始当初の背景

現在、精度が高く、有用性のある RGC の in vivo 機能評価法はない。マウスの RGC 研究には、in vitro の細胞電気生理学的測定か、in vivo の評価系である網膜電図測定 (ERG) による positive STR (pSTR) 測定が用いられている。前者は、眼球摘出・網膜の単離など侵襲的なステップを経て培養条件下で行われるため、極めて非生理的条件下で測定が行われることになる。そのため、細胞死の病態を評価する手法としては最適ではない。また、RGC の活動電位とされている pSTR は、その成分の多くは RGC 以外の神経活動に由来するものである。しかも、非常に反応が微弱であるため、検出が難しく、誤差も大きい。さらに、反応の検出には暗所において非常に弱い光を用いる必要があるため、暗所を司る杆体系の RGC 機能しか評価できないという問題もある。実情としては、残存する RGC 数や RGC 特異的遺伝子の発現量の定量など RGC の組織学的評価を介して、RGC 機能を「推測する」のに留まっているケースが多い。この技術的制約が RGC の病態研究を遂行する上で大きな障壁となっている。

Enhanced Synaptic Activity-Responsive Element (E-SARE) は、神経活動依存性に急速に転写が起こる Arc 遺伝子プロモーターの上流にエンハンサー配列を複数配置し、さらにレポーター遺伝子と組み合わせることにより、神経活動を高感度に標識することを可能にした (Kawashima ら、Nat Methods.2013)。本研究では、E-SARE プロモーターにレポーター遺伝子を搭載した AAV2 ベクターをマウスの RGC に感染させ、confocal scanning laser ophthalmoscopy (cSLO) を用いて RGC の神経活動を、in vivo でしかも細胞単位で、可視化する技術の確立を目指す

2. 研究の目的

緑内障や視神経症などの多くの眼疾患で網膜神経節細胞 (RGC) 障害により不可逆的視機能の損失を来す。その病態解明のために、これまでに動物モデルを使った実験が多くなされてきた。しかし、いまだその RGC 死の病態は不明な点が多い。その理由の一つとして、RGC 機能を高い精度で評価しうる in vivo 実験方法がなかったことが挙げられる。本研究では、神経活動依存的に転写が起こる Arc プロモーターをベースに近年開発された Enhanced Synaptic Activity-Responsive Element (E-SARE) と AAV 技術を用いて、RGC 機能の in vivo イメージング法を確立することを目的とする。本研究は、これまで困難であった RGC の in vivo 機能評価を、簡便かつ高感度に細胞単位で行うことを可能にする革新的技術の開発に資するものである。

3. 研究の方法

(1) E-SARE プロモーターを組み込んだ AAV2 の作製。

E-SARE プロモーターは東京大学尾藤研究室より MTA を締結し入手した。AAV2/2 発現ベクターには E-SARE プロモーターの下流にレポーター蛍光タンパク質として dVenus を組み込んだ AAV2/2 レポーターベクターの作製を行った。ウイルスタイターは RT-PCR で決定し、ウイルスカプシド成分である VP1、VP2、VP3 を SDS-PAGE で確認し、これらをウイルスクオリティーの指標とした。

(2) E-SARE レポーターと ARC タンパク質の発現比較解析。

生後 1~2 か月の C57BL6 マウスを暗順応 (48 時間) 後に光暴露した (180 cd/m²)。光暴露前後で眼を回収し、組織学的に Arc の発現を調べた。次に E-SARE レポーター AAV ベクターをマウスに投与し、1 か月後に暗順応 (48 時間) と光暴露 (6 時間) を行い、光暴露前後で眼を回収し、組織学的にレポーター蛍光タンパク質の発現を調べた。

(3) in vivo イメージングの応答性の評価。

E-SARE レポーター AAV ベクターをマウスに投与し、1 か月後に暗順応 (48 時間) 光暴露 (6 時間) 暗順応 (48 時間) を繰り返した。その間、共焦点走査型レーザー検眼鏡で眼底を観察し、dVenus 陽性細胞を定量した。

(4) 網膜障害モデルを用いた技術の精度評価。

マウスの RGC 障害モデルを用いて、「in vivo で RGC 機能を可視化する」技術の精度評価を行った。RGC 障害モデルは、マウスの視神経を機械的に挫滅する視神経挫滅モデルを用いた。マウスの上方結膜を切開し、球後を展開し視神経を露出させ、球後より後 1mm 程度にある視神経を鑷子で圧迫することで、RGC 軸索を障害し、RGC 死を誘導した。なお、非処置眼をコントロールとした。障害誘導後に VEP (視覚誘発電位) と、RGC の組織学的評価を行い、E-SARE レポーターのイメージング結果と対比した。

4. 研究成果

E-SARE レポーターを用いた in vivo 可視化技術の確立のために以下の実験を行った。

(1) E-SARE プロモーターを組み込んだ AAV2 の作製。

高純度の AAV2/2E-SARE レポーターベクター (1×10¹² gc/ml) に成功し、以下の各実験に用いた。

(2) E-SARE レポーターと ARC タンパク質の発現比較解析。

Arc は網膜では RGC で発現していた (図 1)。AAV-E-SARE-Venus を網膜に感染させると、in vivo で光応答する細胞が可視化された。光応答する細胞の多くは Rbpmns などのマーカーを発現する RGC であった (図 2)。

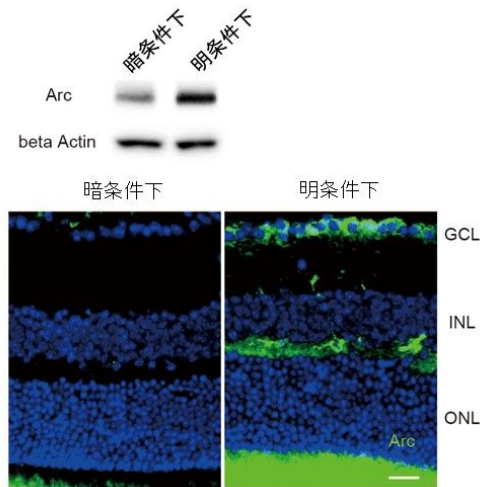


図1 . Arc タンパク質の発現解析
(藤田ら 2018 投稿準備中)

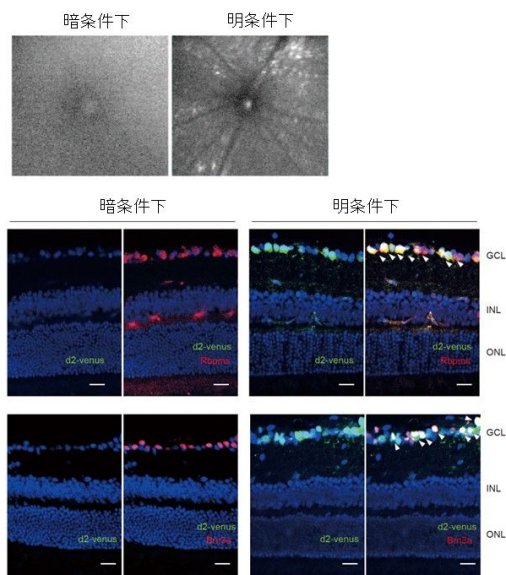


図2 . dVenus レポーターの発現解析。
in vivo イメージングでの dVenus 陽性細胞の観察 (上)。免疫染色組織像 (下) RGC マーカーと共局在している。
(藤田ら 2018 投稿準備中)

(3) in vivo イメージングの応答性の評価。
暗順応したマウスを、光暴露後、暗順応させ、その間の dVenus 蛍光レポーターの発現を in vivo イメージングで経時的に観察したところ、光暴露後 2 時間で dVenus 陽性細胞が出現する一方、光暴露後 2 時間の暗順応で陽性細胞が 45% 減少した (図3)。
(4) 網膜障害モデルを用いた技術の精度評価。
マウスの RGC 障害モデルを用いて、「in

vivo で RGC 機能を可視化する」技術の精度評価を行った。視神経挫滅による障害誘導後 28 日において、dVenus 陽性細胞と生存 RGC 死との関連を調査したところ、in vivo イメージングでの陽性細胞数と VEP の値が有意に相関を示した (相関係数 0.6946)。このことは E-SARE によりイメージングにより障害下での RGC の機能評価が可能であることを意味している。

E-SARE と AAV を組み合わせることにより、光応答するマウス RGC を in vivo で可視化する事に成功した。これは、眼特有の透明であるという光学的特性を最大限に利用し、非侵襲的で簡便なイメージング技術を用いて、「in vivo で RGC 機能の可視化」を成し遂げたものである。E-SARE プロモーターは、最近東京大学尾藤研究室で開発されたものであり、最初の報告以降、同ツールを応用した研究報告はほとんどない。その点において、本研究は、本邦発の新しい原理の発展に資するものであり、RGC 研究の長年の未解決の最重要課題に対して最先端の技術を駆使して解決を与えるものである。また、開発した技術は、簡便かつ非侵襲的に RGC 機能をイメージングできるため、治療前後など同一マウス個体において RGC 機能の経時的变化を捉えることができるという点で汎用性がある。

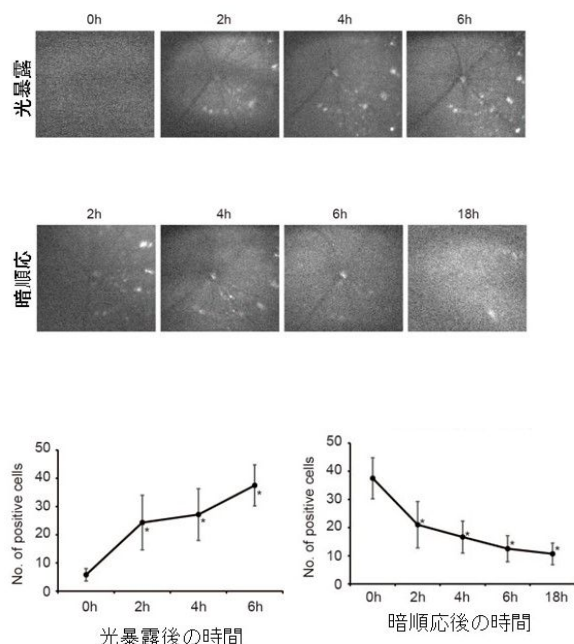


図3 . 光暴露・暗順応下での発現変動
(藤田ら 2018 投稿準備中)

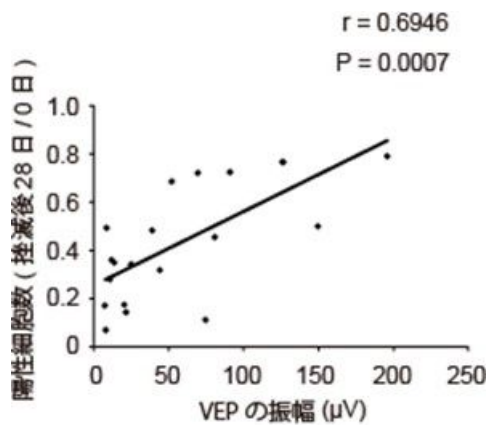


図4 .in vivo イメージングでの陽性細胞数とVEPとの相関
(藤田ら2018 投稿準備中)

引用文献

Kawashima T, Kitamura K, Suzuki K, Nonaka M, Kamijo S, Takemoto-Kimura S, Kano M, Okuno H, Ohki K & Bito H. "Functional labeling of neurons and their projections using the synthetic activity-dependent promoter E-SARE" *Nature Methods* 2013. 10:889. Doi: 10.1038/nmeth.2559

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 0 件)
海外誌に投稿準備中

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 西口康二、藤田幸輔、中澤徹「アデノ随伴ウイルスを用いた網膜神経節細胞機能のin vivo イメージング法の開発」日本眼科学会総会 2018.4

6. 研究組織

(1)研究代表者

中澤 徹 (NAKAZAWA, Toru)
東北大学・医学系研究科・教授
研究者番号：30361075

(2)研究分担者

西口 康二 (NISHIGUCHI, Koji)
東北大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：30447825

藤田 幸輔 (FUJITA, Kosuke)
東北大学・医学系研究科・助教
研究者番号：80708115

佐藤 孝太 (SATO, Kota)
東北大学・医学系研究科・助教
研究者番号：50732327

横山 悠 (YOKOYAMA, Yu)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号：00597312

村山 奈美枝 (MURAYAMA, Namie)
東北大学・大学病院・研究員
研究者番号：60597516