

令和元年6月14日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05485

研究課題名(和文) 波長感受性の異なるチャンネルロドプシンを利用した失明ラットへの色覚賦与

研究課題名(英文) Regeneration of color vision in blind rats using channelrhodopsin genes having different wavelength properties

研究代表者

富田 浩史 (Tomita, Hiroshi)

岩手大学・理工学部・教授

研究者番号：40302088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,820,000円

研究成果の概要(和文)：当研究室で開発した多波長に感受性を持つチャンネルロドプシン遺伝子を用いた遺伝子治療による視覚再生法を検討している。しかしながら、単一のタンパク質で、全ての波長を感受するため色覚は無いと考えられる。本研究では波長感受性の異なるチャンネルロドプシン遺伝子を導入し、色覚および光感受性を高め、より生来の視覚に近づけようとするものである。今回、多重遺伝子導入により色覚を創出できる可能性を示すとともに、新たにステップ関数型ロドプシン(SFO)の開発に成功し、光感受性をより高めた視覚を創出できる可能性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オプトジェネティクスを利用した失明者の視覚を再建する研究が世界的に行われるようになり、そのひとつは、臨床試験が始められている。しかしながら、現在行われている遺伝子を用いた遺伝子治療によって得られる視機能は、生来の機能に比べ限定的である。それを補う方法として、多重遺伝子導入が挙げられ、今回、多重遺伝子導入によって副作用なく、機能を向上できることが示された点は、学術的意義が大きく、また、失明者の視覚再建の面からも社会的意義は大きい。さらに、多波長に感受性を持つSFOの開発に成功し特許出願を行い、SFOを用いた視覚再建の遺伝子治療はより高度な視機能を作り出せる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We have been researching about the restoring vision by gene therapy using originally developed channelrhodopsin gene. However patients who received the gene therapy would not get a color vision because the channelrhodopsin protein encoded our developed gene had a multi-wavelength sensitivity by itself. Our purpose in this study is to get a color vision and higher light sensitivities by transducing multiple genes of different character of channelrhodopsins. We showed the possibility of getting a color vision by a multiple gene transduction and succeeded to develop a new type of a step-function opsin (SFO) having a multi-wave sensitivity. By transducing the SFO gene into an appropriate retinal cells, it could possibly enhance the light sensitivity.

研究分野：眼科学

キーワード：眼生理学 網膜色素変性症 遺伝子治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性症患者は、人口4000~8000人に1人と推定されている。重篤な場合は失明に至り、中途失明原因の上位に位置する疾患である。我々は視神経を構成する神経節細胞に ChR2 を導入することによって遺伝盲ラットの視覚機能を回復できることを明らかにしている。しかしながら、ChR2 が応答できる波長は青色領域に限定されるため、視覚が回復したとしてもその他の色の物体を見ることができない。我々はこの問題を解決するために、緑藻類ボルボックス由来のチャンネルロドプシン遺伝子を改変し、**多波長にตอบสนองする遺伝子(mVChR1)の開発に成功している**。mVChR1 の感受波長ピークは 550nm であるが、青から赤色まで幅広い反応性を持つ。網膜色素変性症モデルラットを用いた研究で、mVChR1 遺伝子を盲目ラットに導入することによって幅広い波長光にตอบสนองできるようになり、青・黒、緑・黒、黄・黒、赤・黒の縞模様の回転に反応できることが明らかとなっている。

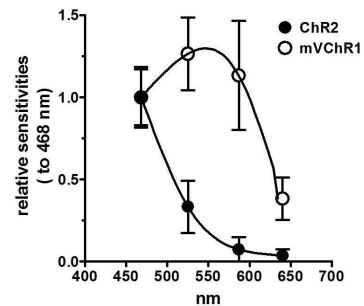


図1 色別の視覚誘発電位

2. 研究の目的

現状では特定の神経節細胞に遺伝子を導入することができないため、各色を識別することはできず、**ラットは映像をグレースケール画像として認識している**と予想される。mVChR1 を用いた遺伝子治療が実用化に向けて着実に進みつつあり、次なる目標は、より生来の視覚機能に近づけることである。

3. 研究の方法

Thy1 プロモーターによって恒常的に ChR2 遺伝子 (青感受性) を発現するトランスジェニック (Thy1-ChR2 TG) ラット (Tomita H, PLoS ONE, 2009) の腹腔内に視細胞変性を誘導する薬剤 (MNU:メチルニトロソ尿素) 投与し、視細胞変性を誘導した。MNU 投与後、OCT ならびに ERG 記録を行い、視細胞が消失していることを確認した。その後、mVChR1 (多波長感受性) 遺伝子を含むアデノ随伴ウイルス (2 型) ベクターを硝子体内に投与し遺伝子導入を行った。投与後 2 ヶ月から視覚誘発電位測定を測定した。視覚誘発電位 (VEP) 測定後、眼球を摘出し、遺伝子導入効率を調べた。パッチクランプ法により、波長感受性の異なる 2 つのチャンネルロドプシン遺伝子が 1 つの細胞に発現した場合の光感受性ならびに波長感受性の変化を調べた。この研究には遺伝子導入が容易であるヒト胎児腎細胞 293 細胞 (HEK293 細胞) を用いた。ChR2 遺伝子とピユーロマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドベクターをエレクトロポレーション法により HEK293 細胞に導入した。遺伝子導入後、抗生物質ピユーロマイシンを含む培地で培養し、恒常的に ChR2 を発現する細胞株を樹立した (HEK-ChR2)。HEK-ChR2 株を樹立後、この細胞に mVChR1 遺伝子に蛍光タンパク質 Venus 遺伝子を融合させた遺伝子を導入し、Venus を指標に mVChR1 を発現する細胞をセルソーターを用い分離し、HEK-ChR2-mVChR1 細胞株を樹立した。同様の方法で、HEK 細胞に mVChR1 を導入した細胞株を樹立し (HEK-mVChR1) コントロールとして用いた。

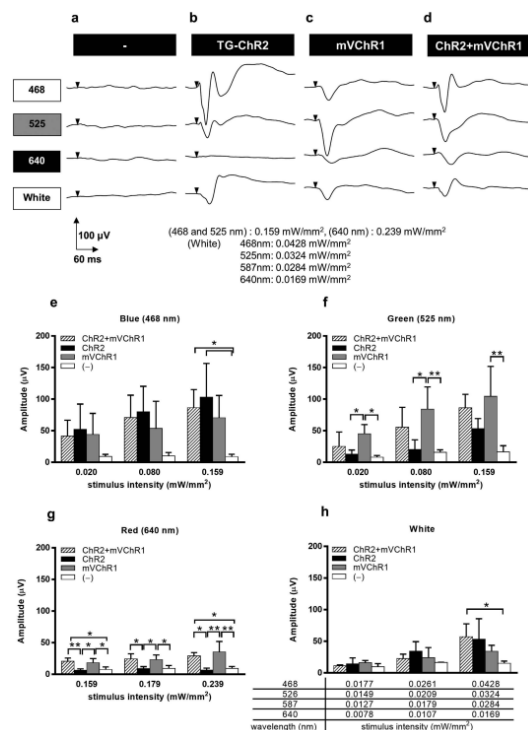


図2 mVChR1 遺伝子導入前後の degenerated Thy-I ChR2 TG ラットの VEP

細胞特異的遺伝子発現を誘導するために、ON 型双極細胞を標的とし、代謝調節型グルタミン酸受容体 6 のプロモーターを含むアデノ随伴ウイルスベクターを作製した。加えて、局所への遺伝子導入法を検討した。

4. 研究成果

Thy1-ChR2 TG ラットの網膜の組織構造は、野生型ラット同様であった。MNU 投与前に ERG を記録したところ、光強度に依存して、その反応は増大し、野生型と同等の反応を示した。MNU 投与 1 週間で、視細胞はほぼ消失し、ERG の応答も消失した。

視細胞変性後 (**degenerated**) の野生型ラットの **VEP** を測定したところ、全ての波長光刺激に対して反応は認められなかったのに対し (図 2 a)、**degenerated Thy-I ChR2 TG**

ラットでは、**468nm**、**525nm** および白色光刺激で応答が見られた(図2**b**)。しかし、**640nm**の刺激では応答は認められなかった。一方、**mVChR1**のみを発現する **degenerated**ラットでは、全ての刺激光に応答した(図2**c**)。また、**degenerated Thy-I Chr2 TG**ラットに **mVChR1**を導入することによって、**640nm**の刺激に対して応答するようになった(図2**d**)。それぞれの **VEP**の振幅を比較した結果、**degenerated Thy-I Chr2 TG**ラットに **mVChR1**を導入することによって、**degenerated Thy-I Chr2 TG**ラットでは応答しない **640nm**の刺激に応答するようになり、**mVChR1**の導入によって新たに機能を付加できることが判明した。しかしながら、その応答性は、**mVChR1**を単独で導入したラットより低い傾向にあった(図2**g**)。同様に、**mVChR1**導入前の **degenerated Thy-I Chr2 TG**ラットの **468nm**刺激の振幅についてみると、**mVChR1**の導入によって減少傾向にあった(図2**e**)。

網膜伸展標本を作製し、遺伝子導入効率を調べた結果、**mVChR1**のみを発現する神経節細胞は約17%で、**Chr2**を共発現する細胞は約12%であった。このことから、AAVを用いた遺伝子導入によって導入された **mVChR1**のほとんど(約80%)が、**Chr2**を発現する細胞であることが判明した。

我々は、同一細胞に2つのチャンネルロドプシンが発現する場合の光誘発電流に与える影響を調べるために、2つの遺伝子を発現する細胞株を作製した。単一のチャンネルロドプシンが発現する細胞では、レチナールの添加により光誘発イオン電流にほとんど影響が見られなかったのに対し、両チャンネルロドプシンを発現する細胞では、レチナールの添加によって光誘発イオン電流の増加が見られた(図3)。このことから、2つのチャンネルロドプシンの発現によってレチナールの競合が起こっている可能性が示唆された。

以上の結果から、特性の異なるチャンネルロドプシンを網膜細胞に発現させる場合には、異なる細胞にそれぞれを導入する必要があることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13 件)

1. Sugano E#, Edwards G, Saha S, Wilmott LA, Grambergs RC, Mondal K, Qi H, Stiles M, Tomita H#, Manda N, (#: equal contribution), Overexpression of acid-Ceramidase (ASAH1) Protects Retinal Cells (ARPE19) from Oxidative Stress, *J Lipid Res*, 60(1):30-43, 2019 [査読有] DOI: 10.1194/jlr.M082198
2. Sakajiri Y, Sugano E, Watanabe Y, Sakajiri T, Tabata K, Kikuchi T, Tomita H*, *Natronomonas pharaonis* halorhodopsin Ser81 plays a role in maintaining chloride ions near the Schiff base, *Biochem Biophys Res Commun*, 503(4), 2326-2332, 2018 [査読有] DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.06.156
3. Watanabe Y, Sugano E, Tabata K, Ozaki T, Saito T, Tamai M, Tomita H*, Kinetic profiles of photocurrents in cells expressing two types of channelrhodopsin genes, *Biochem Biophys Res Commun*, 496(3), 814-819, 2018 [査読有] DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.01.149
4. Fukuda T, Ishizawa Y, Donai K, Sugano E, Tomita H*, The poly-cistronic expression of four transcriptional factors (CRX, RAX, NEURO-D, OTX2) in fibroblasts via retro-or lentivirus causes partial reprogramming into photoreceptor cells, *Cell Biol Int*, 42(5), 608-614, 2018 [査読有] DOI: 10.1002/cbin.10942
5. Komatsu M, Sugano E, Tomita H, Fujii N, A Chronically Implantable Bidirectional Neural Interface for Non-Human Primates, *Front Neurosci*, 11, Article514, 2017 [査読有] DOI: 10.3389/fnins.2017.00514
6. Li H, Xu C, Li Q, Gao X, Sugano E, Tomita H, Yang L, Shi S, Thioredoxin 2 offers

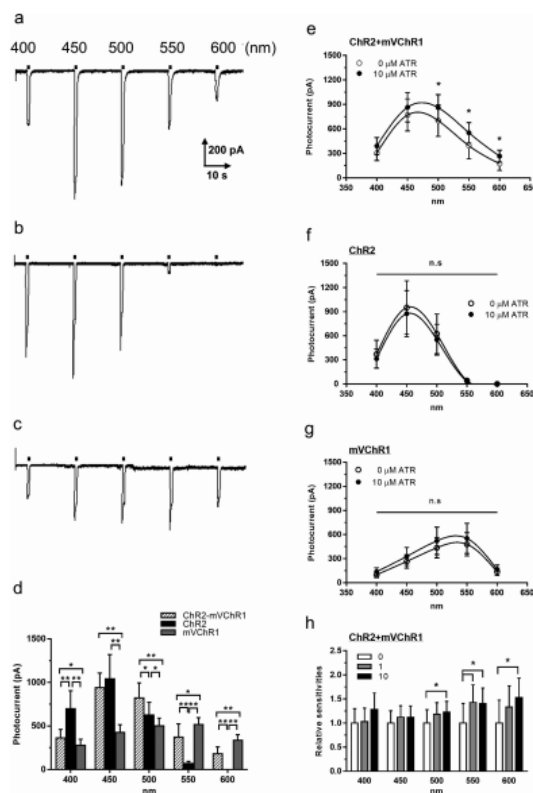


図3 レチナール添加による光誘発イオン電流に与える影響

protection against mitochondrial oxidative stress and hypertrophy induced by hyperglycemia in H9c2, *Int J Mol Sci*, 18(9), E1958, 2017 [査読有] DOI: 10.3390/ijms18091958

7. You M, Yamane T, Tomita H, Sugano E, Akashi T, A novel rat head gaze determination system based on optomotor responses, *PLoS One*, 12(4), e0176633, 2017 [査読有]
8. Sato M, Sugano E, Tabata K, Sannohe K, Watanabe Y, Ozaki T, Tamai M Tomita H^{*}, Visual Responses of Photoreceptor-Degenerated Rats Expressing Two Different Types of Channelrhodopsin Genes, *Sci Rep*, 7, 41210, 2017 [査読有] DOI: 10.1371/journal.pone.0176633
9. Ozaki T, Yamashita T, Tomita H, Sugano E, Ishiguro SI, The protection of rat retinal ganglion cells from ischemia/reperfusion injury by the inhibitory peptide of mitochondrial μ -calpain, *Biochem Biophys Res Commun*, 478(4), 1700-5, 2016 [査読有] DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.09.006
10. Tabata K, Sugano E, Murakami F, Yamashita T, Ozaki T, Tomita H^{*}, Improved transduction efficiencies of adeno-associated virus vectors by synthetic cell-permeable peptides, *Biochem Biophys Res Commun*, 478(4), 1732-8, 2016 [査読有] DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.09.014
11. 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 [査読有] DOI: 10.1038/gt.2015.99
12. Tomita H, Tabata K, Takahashi M, Nishiyama F, Sugano E, Light induces translocation of NF-kappaB p65 to the mitochondria and suppresses expression of cytochrome c oxidase subunit III (COX III) in the rat retina, *Biochem Biophys Res Commun*, 473(4), 1013-8, 2016 [査読有] DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.04.008
13. Tomiyama Y, Fujita K, Nishiguchi Km, Tokashiki N, Daigaku R, Tabata K, Sugano E, Tomita H, Nakazawa T, Measurement of Electroretinograms and Visually Evoked Potentials in Awake Moving Mice, *PLoS One*, 11(6), e0156927, 2016 [査読有] DOI: 10.1371/journal.pone.0156927

[学会発表](計29件)

1. Sugano E, Tabata K, Sakajiri Y, Watanabe Y, Tamai M, Tomita H, Protein structural prediction of modified Volvox channelrhodopsin-1 and the verification by amino acid sequence, *The Association for Research in Vision and Ophthalmology*, 2018
2. Tomita H, Sugano E, Tabata K, Yamane T, Nagasaka E, Kudo H, Yoshikawa D, Yoshikawa M, Nakazawa F, Kitauro N, Tamai M, Induction of local photoreceptor degeneration by a subretinal injection of N-Methyl-N-nitrosourea in rats, *The Association for Research in Vision and Ophthalmology*, 2018
3. 菅野江里子、目時友美、工藤朝香、中澤満、富田浩史, 虚血性中枢神経障害に対する抗酸化物質による神経細胞保護, *北東北女性研究者 研究・交流フェア*, 2018
4. 村里湧人、佐藤亮、菅野江里子、富田浩史, 失明後の視覚野の可塑性, *眼薬理学会*, 2018
5. 田端希多子、菅野江里子、富田浩史, 光感受性遺伝子を導入した遺伝性網膜変性ラット網膜への光障害の影響, *眼薬理学会*, 2018
6. 山根峻維、田端希多子、菅野江里子、富田浩史, 網膜局所障害ラットの視機能評価, *眼薬理学会*, 2018
7. 三瀧菜由、菅野江里子、田端希多子、目時友美、鈴木香、中沢満、富田浩史, 神経細胞死に保護効果を示す新規化合物の探索, *北東北女性研究者 研究・交流フェア* 2017
8. 菅野江里子、田端希多子、富田浩史, 新規チャネルロドプシンによる視覚再生のための遺伝子治療, *北東北女性研究者 研究・交流フェア*, 2017
9. 村上史夏、菅野江里子、田端希多子、富田浩史, オプトジェネティクス遺伝子を含むウイルス製剤の品質評価法の確立, *北東北女性研究者 研究・交流フェア* 2017
10. Sakajiri Y, Hara K, Watanabe Y, Sugano E, Tomita H, N-terminal region of modified Volvox channelrhodopsin-1 (mVchR1) enhances Na⁺ influx by constructing new transmembrane helix, *1st UGAS, Iwate University International Symposium*, 2016
11. Sakajiri Y, Hara K, Watanabe Y, Sugano E, Tomita H, Computational study for red-shifted absorption spectrum mechanism of a light-driven Na⁺ channelrhodopsins, *1st UGAS, Iwate University International Symposium*, 2016
12. Nagashima T, Yamashita T, Tomita H, Sugano E, Ozaki T, A regulatory mechanism of

- mitochondrial calpains, 1st UGAS, Iwate University International Symposium, 2016
13. Sakajiri Y, Hara K, Watanabe Y, Sakajiri T, Sugano E, Tomita H, Pos237 N-terminal region of modified Volvox channelrhodopsin-1(mVChR1) enhances Na⁺ Influx by drowing hydrogen ion, 生物物理学会, 2016
 14. Watanabe Y, Sannohe K, Murakami F, Tabata K, Sugano E, Tomita H, Usefulness of all trans-retinal on HEK293 cells coexpressed light-gated cation channel gene, The 87th meeting of zoological society of Japan, 2016
 15. Kikuchi K, Sannohe K, Shiratori S, Yamane T, Tabata K, Sugano E, Tomita H, Comparative study of N-methyl-N-nitrosourea- and light-induced photoreceptor degeneration in rats, The 87th meeting of zoological society of Japan, 2016
 16. Nagashima T, Yamashita T, Tomita H, Sugano E, Ozaki T, Characterization of a novel calpain activator in the mitochondrial intermembrane space, The 13th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine, 2016
 17. 菅野江里子, 田端希多子, 佐藤雅俊, 菊池彩花, 玉井信, 富田浩史, 改变型チャンネルロドプシンの遺伝子導入に対する全身的な影響について, 第120回日本眼科学会総会, 2016

招待講演

18. 富田浩史, オプトジェネティクス技術を用いた視覚再建のための遺伝子治療, 国立障害リハビリセンター研究所 講演会, 2018
19. 富田浩史, 見えるしくみと眼の再生医療, 森眼科クリニック親睦会, 2018
20. 富田浩史, 「視機能再建への挑戦」 緑藻由来遺伝子を用いた視覚再生のための遺伝子治療研究, 日本ロービジョン学会, 2018
21. Tomita H, Possibilities of optogenetic mediated retinal gene therapies, RikenProfes, 2018
22. Tomita H, Optogenetic gene therapy for retinal degenerative diseases, 日仏視覚再建研究セミナー Regenerative medicine for vision restoration, 2018
23. 富田浩史, 失明者の視覚を再建するための遺伝子治療研究, 第161回アルゴリズム研究会, 2017
24. 富田浩史, 失明者の視覚を回復する遺伝子治療, 岩手大学農学部 FAMS 成果発表会並びに動物医科学系講演会 2017
25. 富田浩史, 萎縮型加齢黄斑変性症の治療法開発, メディカル ジャパン 2017 大阪(第2回日本医療総合展), 2017
26. 富田浩史, 遺伝子治療の概要と臨床試験に向けた取り組み, JRPS兵庫県支部 神戸市難連医療相談会, 2016
27. Sugano E, Analysis of adverse effect caused by AAV-2 encoded modified Volvox channelrhodopsin-1 gene therapy, 10th International Conference CLINICAL& EXPERIMENTAL OPHTHALMOLOGY, 2016
28. Tomita H, Gene Therapy for Retinitis Pigmentosa, RIWC 2016 第19回世界網膜大会, 2016
29. 富田浩史, 「この目に確かな治療法を！」 網膜色素変性症の最先端研究～神経保護と遺伝子治療～ 「視覚再生のための遺伝子治療-臨床に向けた取り組み」, 網膜色素変性症・医療講演会 JRPS 大阪, 2016

〔図書〕(計1件)

1. 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. 光アライアンス, 27(1): 51-55. 2016 ISSN 0917-026X

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称: 視機能検査システム

発明者: 富田浩史, 菅野江里子, 山根峻維, 明石卓也, 游梦博

権利者: 国立大学法人岩手大学

種類: 特許

番号: 特願 2016-154087

出願年: 2016

国内外の別: 国内

名称: 改变チャンネルロドプシン

発明者：富田浩史、菅野江里子、田端希多子、渡邊義人

権利者：国立大学法人岩手大学

種類：特許

番号：特願 2018-176671

出願年：2018

国内外の別：国内

取得状況（計 1. 件）

名称：可視光波長変換部を有する頭部装着型映像提示装置

発明者：富田浩史、菅野江里子、藤井剛

権利者：JIG-SAW 株式会社

種類：特許

番号：第 6181278 号

取得年：2017

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

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

<https://www.newvision-prj.com/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：片山 統裕

ローマ字氏名：**Norihiro Katayama**

所属研究機関名：東北大学

部局名：情報科学研究科

職名：准教授

研究者番号（8桁）：**20282030**

研究分担者氏名：福田 智一

ローマ字氏名：**Tomokazu Fukuda**

所属研究機関名：岩手大学

部局名：理工学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：**40321640**

研究分担者氏名：菅野 江里子

ローマ字氏名：**Eriko Sugano**

所属研究機関名：岩手大学

部局名：理工学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：**70375210**

研究分担者氏名：田端 希多子

ローマ字氏名：**Kitako Tabata**

所属研究機関名：岩手大学

部局名：理工学部

職名：特任准教授

研究者番号（8桁）：**80714576**

研究分担者氏名：金子 武人

ローマ字氏名：**Takehito Kaneko**

所属研究機関名：岩手大学

部局名：理工学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：**30332878**