

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：11201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15729

研究課題名(和文) 失明後および視覚再生後の視覚野の機能変化

研究課題名(英文) Changes of function in the visual cortex after blindness and regeneration

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) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：失明したラットの視覚野が聴覚を補うために聴覚野の一部として機能していることが示された。また、遺伝盲ラットにmVChR1の遺伝子導入を行い、光刺激による視覚誘発電位測定を行い、視機能の回復を確認した後、この視機能回復ラットと同月齢の遺伝盲ラットの音刺激に対する反応を比較し、失明によって機能変化した視覚野が視機能の回復によって、再び機能変化するかどうかを調べた。この結果、視機能回復によって視覚反応が得られるようになった一方で、音に対する反応は、視覚回復したラットと失明ラットの間に有意な差はみられず、機能変化した視覚野は視覚回復後も聴覚野の一部として機能していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that the visual cortex became to work as a part of the auditory cortex after the blindness. To evaluate the function of visual cortex in blind rats after restoring vision by transducing mVChR1 gene, we recorded the visually evoked potentials with a stimuli of white noise or light. We could still record the auditory response in the visual cortex in rats restored vision, and there is no significance of the recorded responses between in blind and vision-restored rats. These results indicated that the functional change of visual cortex was kept after the vision restoration. We might develop the method to accelerate the brain plasticity.

研究分野：眼科学

キーワード：視覚再生 遺伝子治療 オプトジェネティクス 視覚野

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに、緑藻由来の光活性化陽イオン選択的チャンネルとして機能する、チャンネルロドプシン-2 (ChR2) タンパク質を視神経を構成する神経節細胞に発現させることによって、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 (Tomita H et al, IOVS, 2007; PLOS ONE, 2010; Exp Eye Res, 2011)。また、ChR2 の感受波長が青色に限定されることに対して、ボルボックス由来のチャンネルロドプシンを改変し、可視光全域に波長感受性を持つ改変型ボルボックス由来チャンネルロドプシン-1 (mVChR1) を開発している (特許日米登録済み, Tomita H et al, 2014; Molecular Therapy, 文部科学大臣表彰「研究部門」)。緑藻由来の遺伝子を用いることから、ヒトへの応用では免疫拒絶等の副作用が懸念されるが、ChR2 を導入したラットの長期的観察では、拒絶反応などの免疫応答はほとんど見られず、回復した視機能が長期間維持されることを明らかにしている (Sugano E et al, Gene Therapy, 2010)。我々が独自に開発した多波長感受性の mVChR1 遺伝子も ChR2 と同様に、ラットにおいて長期的に安定して機能することが確認されており (Sugano E et al, Gene Therapy, 2015, in press)、現在は臨床試験を目指し、マ - モセットを用いた安全性試験やその他の GLP 試験を実施中である。

一方、ChR2 を用いた視覚再生法を検討し始めた際、様々な波長光で視覚誘発電位を記録するために、電磁シャッターを用いて記録をしたところ、光刺激がないにも関わらず、シャッター音のみで視覚誘発電位が記録される現象に遭遇した。この反応は、正常な視覚を持つラットでは見られず、盲目ラットに特有な現象である。このように、失明後に生じる視覚野の機能変化や遺伝子導入によって視機能を回復させた場合の脳機能の変化に関する研究は遅れている。

2. 研究の目的

失明後に視覚野が音に対して反応する、聴覚野の一部として機能することが知られている。我々はこれまでにチャンネルロドプシン遺伝子を導入することによって失明ラットの視覚を回復させることに成功しているが、回復後の視覚野の機能については不明である。本研究では、遺伝盲ラットを用いて、失明後の視覚野の機能変化を音に対する視覚野の応答を指標として、視覚野が聴覚野の一部として機能する過程を調べるとともに、遺伝子導入によって視機能を回復させ、聴覚野の一部となった視覚野が、視覚野として機能する過程を調べることを目的とする。

3. 研究の方法

RCS ラットは生後一旦正常に網膜が形成されるものの、生後 25 日頃から視細胞の変性が始まり、生後 3 カ月で失明に至る。このモ

デルを用いてこれまで視覚再生研究を行ってきており、遺伝子導入によって視機能の回復が見られることを電気生理学的、行動学的に示している。また、生後 10 ヶ月では、音-視覚誘発電位が記録されることがこれまでの研究で明らかとなっている。この RCS ラットを用いて、視覚野の音に対する反応を経時的に記録し、視覚野の機能変化を調べた (図 1)。

光-視覚誘発電位測定および光干渉断層計で視機能を確認した後、音-視覚誘発電位を経時的に記録し、失明後の音に対する反応が現れる時期とその経過を明らかにした。

また、我々が開発した遺伝子導入による視覚再生技術を失明したラットに適応し、視機能を回復させた後、音刺激による視覚野の反応性を調べ、視覚野の機能がどのように変化するかを経時的に調べた。

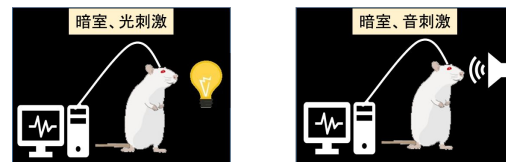


図 1 光または音刺激における視覚野の応答

4. 研究成果

失明後の視覚野の応答を経時的に記録した。RCS ラットは、生後約 3 カ月で視細胞がほぼ消失し失明に至ることが知られている。生後 3 カ月において、光刺激による視覚野の応答は見られず、また、光干渉断層計による網膜層構造の観察においても視細胞が観察されないことから、この時点で失明に至っていることが確認された。生後 3 カ月の音刺激による視覚野の応答を記録した結果、正常な視覚を有する野生型の RCS ラットと比較して、失明に至った RCS ラットの音に対する反応は有意に高いことが示された (図 2)。

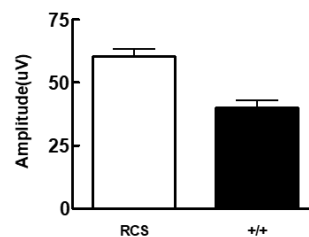


図 2 生後 3 カ月の音に対する視覚野の応答 RCS:失明ラット、+/+: 正常ラット

この視覚野の音に対する反応の増加は、生後 9 カ月まで減少傾向を示したものの、正常な視覚を有するラットに比較し、2 年の観察期間、有意に高い反応を維持した (図 3)。

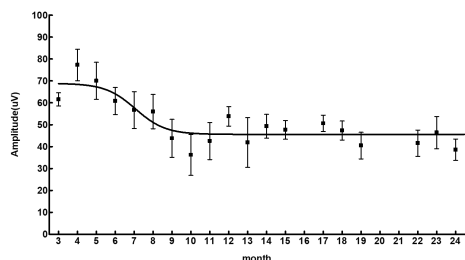


図3 失明ラットの音に対する視覚野の応答の経時的変化(2年間)

以上の結果から、失明後に視覚野は聴覚野の一部として機能していることが示された(図4)

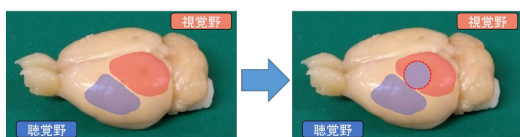


図4 視覚野の機能変化のイメージ図

現在、遺伝子導入によって視覚を回復させた場合、聴覚野の一部となった視覚野が、再び、視覚野として機能するかどうかを観察中である。遺伝子導入後2カ月で光反応の回復が見られたラットで音に対する反応を記録したが、音に対する反応は失明ラットと同等であることが明らかとなっている。今後、さらに経過観察を行う予定である。

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10件)

1. 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*, 査読有, 496(3), 2018, 814-819, DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.01.149
2. 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*, 査読有, 42(5), 2018, 608-614, DOI: 10.1002/cbin.10942
3. Misako Komatsu, Eriko Sugano, Hiroshi Tomita, Naotaka Fujii, A Chronically Implantable Bidirectional Neural Interface for Non-human Primates, *Front Neurosci*, 査読有, 11, 2017, 514, DOI: 10.3389/fnins.2017.00514
4. Hong Li, Changqing Xu, Quanfeng Li, Xiuxiang Gao, Erkio Sugano, Hiroshi Tomita, Liming Yang, Sa Shi, Thioredoxin 2 offers protection against mitochondrial oxidative stress and hypertrophy induced by hyperglycemia in H9c2, *Int. J. Mol. Sci*, 査読有, 18, 2017, 1958, DOI: 10.3390/ijms18091958
5. You M, Yamane T, Tomita H, Sugano E, Akashi T, A novel rat head gaze determination system based on optomotor responses, *PLoS One*, 査読有, 12(4), 2017, e0176633, DOI: 10.1371/journal.pone.0176633
6. Masatoshi Sato, Eriko Sugano, Kitako Tabata, Kei Sannohe, Yoshito Watanabe, Taku Ozaki, Makoto Tamai, Hiroshi Tomita, Visual Responses of Photoreceptor-Degenerated Rats Expressing Two Different Types of Channelrhodopsin Genes, *Scientific Reports*, 査読有, 7, 2017, 41210, DOI: 10.1038/srep41210
7. Kitako Tabata, Eriko Sugano, Fumika Murakami, Tetsuro Yamashita, Taku Ozaki, Hiroshi Tomita, Improved transduction efficiencies of adeno-associated virus vectors by synthetic cell-permeable peptides, *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 478(4), 2016, 1732-1738, DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.09.014
8. Taku Ozaki, Tetsuro Yamashita, Hiroshi Tomita, Eriko Sugano, Sei-ichi Ishiguro, The protection of rat retinal ganglion cells from ischemia/reperfusion injury by the inhibitory peptide of mitochondrial μ -calpain, *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 478(4), 2016, 1700-1705, DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.09.006
9. Yusuke Tomiyama, Kosuke Fujita, Koji M. Nishiguchi, Naoyuki Tokashiki, Reiko Daigaku, Kitako Tabata, Eriko Sugano, Hiroshi Tomita, Toru Nakazawa, Measurement of Electroretinograms and Visually Evoked Potentials in Awake Moving Mice, *PLoS One*, 査読有, 11(6), 2016, e0156927, DOI: 10.1371/journal.pone.0156927
10. Hiroshi Tomita, Kitako Tabata, Maki Takahashi, Fumiaki, Nishiyama, Eriko Sugano, Light induces translocation of NF- κ B p65 to the mitochondria and suppresses expression of cytochrome c oxidase subunit III (COX III) in the rat retina, *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 473(4), 2016, 1013-1018,

〔学会発表〕(計 32 件)

1. 菅野江里子、田端希多子、富田浩史、チャネルロドプシンを用いた遺伝子治療、「細胞ダイバース」 第一回若手ワークショップ, 2018年3月6日, ニューウェルシティー湯河原(静岡県熱海市)
2. 菅井晶久、菅野江里子、富田浩史, 神経細胞の酸化ストレスに対する保護経路, 「細胞ダイバース」 第一回若手ワークショップ, 2018年3月6日, ニューウェルシティー湯河原
3. 富田浩史、菅野江里子、田端希多子, 遺伝子治療による視覚再建/改変型チャネルロドプシンの構造, 「細胞ダイバース」 第一回公開シンポジウム, 2018年2月18日, 大阪大学(大阪府吹田市)
4. 富田浩史、菅野江里子, オプトジェネティクスを利用した視覚再生研究, Retina Research Meeting (招待), 2017年12月9日, JPタワーホール&カンファレンス(東京都千代田区)
5. 菅井晶久、富田浩史、菅野江里子, GGAによるマウス海馬由来神経細胞株のグルタミン酸毒性に対する保護効果, 第88回日本動物学会, 2017年9月22日, 富山県民会館
6. 佐藤亮、菅野江里子、田端希多子、竹沢翼、富田浩史, 失明後および視覚回復後の視覚野の機能変化に関する研究, 第88回日本動物学会, 2017年9月22日, 富山県民会館(富山県富山市)
7. 山根峻維、田端希多子、菅野江里子、富田浩史, 多局所網膜電図検査(mfERG)による網膜局所変性ラットの視機能評価, 平成29年度東北支部大会 動物学会, 2017年7月29日, 東北大附属浅虫研究センター
8. 白取 洲、田端希多子、菅野江里子、竹沢 翼、富田浩史, 新規認知症モデルの確立と保護薬の検討, 平成29年度東北支部大会 動物学会, 2017年7月29日, 東北大附属浅虫研究センター(青森県青森市)
9. 富田浩史、菅野江里子、田端希多子, 遺伝子治療研究の現状, 日本網膜変性症協会(JRPS) 岩手県医療講演会(招待), 2017年6月18日, アイーナ(岩手県盛岡市)
10. 富田浩史、菅野江里子、田端希多子, 遺伝子治療研究の現状, 日本網膜変性症協会(JRPS) 長野県医療講演会(招待), 2017年6月4日, 佐久平交流センター(長野県佐久平市)
11. 富田浩史、菅野江里子、田端希多子, 遺伝子治療-臨床応用へ向けた取り組み, 日本網膜変性症協会(JRPS) 新潟県医療講演会(招待), 2017年5月28日, 新潟市福祉会館(新潟県新潟市)
12. 富田浩史、菅野江里子、田端希多子, チャネルロドプシンを用いた網膜再生研究, 日本網膜変性症協会(JRPS) 鹿児島県医療講演会(招待), 2017年5月14日, 鹿児島市勤労者交流センター(鹿児島県鹿児島市)
13. Tomita H, Sugano E, Tabata K, Watanabe Y, Ozaki T, Tamai M, Ion Channel Properties of Cells Expressing Two Different Types of Channelrhodopsin Genes, ARVO (国際学会), 2017年5月11日, Baltimore, MD.
14. Sugano E, Nawajes AM, Tabata K, Tamai M, Tomita H, Protective effect of N-Acylsphingosine Amidohydrolase 1 (acid Ceramidase) in RPE cells against oxidative stress, ARVO (国際学会), 2017年5月11日, Baltimore, MD.
15. 三瀧茉由、菅野江里子、田端希多子、日時友美、鈴木香、中沢満、富田浩史, 神経細胞死への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年03月02日, 盛岡市アイーナ(岩手県盛岡市)
16. 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年03月02日, 盛岡市アイーナ(岩手県盛岡市)
17. 村上史夏、菅野江里子、田端希多子、渡邊義人、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年03月02日, 盛岡市アイーナ(岩手県盛岡市)
18. 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(招待), 2017年03月01日, エスポワールいわて(岩手県盛岡市)
19. 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)(招待), 2017年02月17日, インテックス大阪(大阪府住之江区)
20. 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(招待), 2017年01月17日, 盛岡市アイーナ(岩手県盛岡市)
21. Yuko Sakajiri, Kanako Hara, Yoshito Watanabe, Eriko Sugano, Hiroshi Tomita, Computational study for red-shifted absorption spectrum mechanism of a lightdriven Na⁺ channelrhodopsins, 1st UGAS, iwate university international symposium 2016(国際学会), 2016年12月18日, 岩手大学(岩手県盛岡市)
22. Yuko Sakajiri, Kanako Hara, Yoshito Watanabe, Eriko Sugano, Hiroshi

- Tomita, N-terminal region of modified Volvox channelrhodopsin-1 (mVchR1) enhances Na⁺ influx by constructing new transmembrane helix, 1st UGAS, iwate university international symposium 2016 (国際学会), 2016年12月18日, 岩手大学(岩手県盛岡市)
23. Takashi Nagashima, Tetsuro Yamashita, Hiroshi Tomita, Eriko Sugano, Taku Ozaki, A regulatory mechanism of mitochondrial calpains, 1st UGAS, iwate university international symposium 2016 (国際学会), 2016年12月18日, 岩手大学(岩手県盛岡市)
24. 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(招待), 2016年12月04日, 神戸市勤労会館(兵庫県神戸市)
25. Yuko Sakajiri, Kanako Hara, Yoshito Watanabe, Tetsuya Sakajiri, Eriko Sugano, Hiroshi Tomita, 2Pos237 N-terminal region of modified Volvox channelrhodopsin-1(mVChR1) enhances Na⁺ Influx by drowing hydrogen ion, 生物物理学学会, 2016年11月27日, つくば国際会議場(茨城県つくば市)
26. Eriko Sugano, 10th International Conference CLINICAL& EXPERIMENTAL OPHTHALMOLOGY(招待)(国際学会), 2016年11月23日, Jw marriott Dubai(Dubai)
27. Yoshito Watanabe, Kei Sannohe, Fumika murakami, Kitako Tabata, Eriko Sugano, Hiroshi Tomita, Usefulness of all trans-retinal on HEK293 cells coexpressed light-gated cation channel gene, the 87th meeting of zoological society of Japan, 2016年11月18日, 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)
28. Ayaka Kikuchi, Kei Sannohe, Shu Shiratori, Toshiyuki Yamane, Kitako Tabata, Eriko Sugano, Hiroshi Tomita, Comparative study of N methy N-nitrosourea and light-induced photoreceptor degeneration in rats, the 87th meeting of zoological society of Japan, 2016年11月18日, 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)
29. Takashi Nagashima, Tetsuro Yamashita, Hiroshi Tomita, Eriko Sugano, Taku Ozaki, Characterization of a novel calpain activator in the mitochondrial intermembrane space, The 13th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine, 2016年10月30日, TKP GardenCity SHINAGAWA(東京都港区)
30. Hiroshi Tomita, Gene Therapy for Retinitis Pigmentosa, RIWC 2016 第

19回世界網膜大会(招待)(国際学会), 2016年07月09日, Taipei International Convention Center(Taipei)

31. 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(招待), 2016年06月05日, 大阪市立天王寺区民センター(大阪市天王寺区)
32. 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, 改変型チャ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年04月07日, 京都国際会議場(京都市左京区)

〔図書〕(計1件)

Hiroshi Tomita, Eriko Sugano, Cambridge University Press, Optogenetics; From Neuronal Function to Mapping and Disease Biology, 2017, 382-392

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

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: J I G - S A W株式会社

種類: 特許

番号: 特許第6181278号

出願年月日: 2016年12月22日

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/vi>

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

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

菅野 江里子 (SUGANO ERIKO)

岩手大学・理工学部・准教授

研究者番号: 70375210

田端 希多子 (TABATA KITAKO)

岩手大学・理工学部・特任研究員

研究者番号: 70375210

(3) 連携研究者 無