

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390393

研究課題名(和文)慢性留置型 ECoG 電極を用いた回復視機能の評価

研究課題名(英文) Evaluation of restored visual function by using chronically implantable ECoG electrode array.

研究代表者

富田 浩史 (Tomita, Hiroshi)

岩手大学・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) 14,100,000 円

研究成果の概要(和文)：光活性化陽イオンチャンネル遺伝子(ChR)を遺伝盲ラットの網膜神経細胞に導入することによって視機能を回復できる。失明者の視機能を回復するための遺伝子治療として、この方法を発展させるためには高等動物で回復される視力ならびに安全性を評価する必要がある。しかし、霊長類で視力を客観的に評価する手法は確立されていない。本研究ではカニクイザルでの視力評価法を確立するとともに、慢性留置型ECoG電極を用いた皮質脳波記録による評価を目指して、霊長類網膜および皮質への遺伝子導入法を確立することを試み、カニクイザルで視力評価が可能であること、皮質へのChR2遺伝子導入により光刺激で直接皮質を興奮できることが示した。

研究成果の概要(英文)：We have succeeded to restore their vision in genetically blind rats by transducing ChR2 gene into the retinal neuron with photoreceptor degenerations. To establish the method as a gene therapy for restoring vision, it is needed to evaluate the recovered visual acuity and the adverse effects caused by the gene therapy on a higher mammals close to human but not mice and rats. There is no method to measure the visual acuity in higher mammals such as monkeys. In this study, we tried to establish the method of the visual acuity test in cynomorgus monkeys and to develop a new method to evaluate the visual acuity by using chronically implantable electrode array for electrocorticograms. We also tried to transduce the gene into the retinal neuron and the cerebral cortex by using various serotypes AAV vector including the specific promoters. We established the method to measure the visual acuity test on cynomorgus monkeys and succeeded to record the ECoG from the site ChR2 gene was transduced.

研究分野：視覚科学

キーワード：オプトジェネティクス 遺伝子治療 網膜

### 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。近年の遺伝子解析技術の進歩により、網膜色素変性症(RP)に関与する多くの原因遺伝子が明らかにされているが、その治療法は未だ開発されていない。我々は、緑藻類由来の光受容チャネル遺伝子(チャネルロドプシン-2: ChR2)を残存する神経細胞に導入し光受容能を賦与するという、全く新しい方法で、遺伝盲ラットの視機能を回復させることに成功している。

(1) ChR2は緑藻類由来遺伝子であることから、ヒトへの応用には高等動物での有効性と安全性を調べる必要がある。高等動物で有効性を評価するために、客観的に評価可能な視力検査法を確立する必要がある。

(2) アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの遺伝子導入効率は、動物種依存的であり、上記の評価を行うためには、最適な動物種の選択、導入方法を検討する必要がある。

### 2. 研究の目的

(1) 遺伝子導入によって回復される視力を評価することを目的とし、トレーニングを主体とした視力評価法と皮質電位記録による新しい手法を試みる。

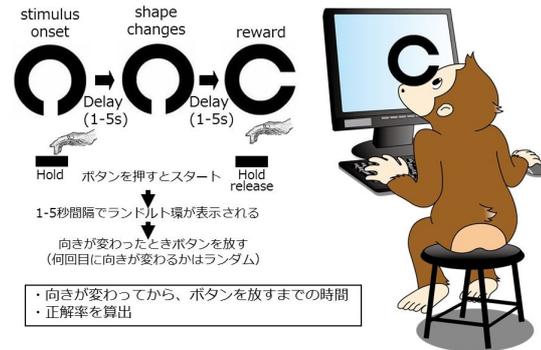
(2) 霊長類で遺伝子導入効率を高めることを目的とし、種々の血清型および特異的プロモーターを持つ AAV ベクターを用いて、網膜あるいは皮質への遺伝子導入を行う。

### 3. 研究の方法

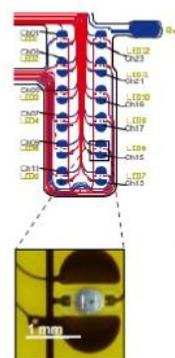
(1) トレーニングを行うことにより、ランドルト環を用いた視力検査をカニクイザルに習得させた。図のように、カニクイザルがボタンを押すと、画面上にランドルト環が表示され、ボタンを押している間、一定の時間毎に、点滅し、向きの異なるランドルト環

がランダムに表示される。向きが変わった時にボタンを離せば正解となり、報酬(水)が与えられる仕組みである。このトレーニングにより視力検査を習得させた。

#### カニクイザル視力検査



従来、脳活動記録用に使用されてきた電極は、剣山状の高密度電極がほとんどで、剣山状電極を脳内部(実質)に刺入し、神経細胞活動を記録していたが、電極そのものが異物であるため、異物を排除しようとする脳内の免疫反応が発生し、長期間記録することは困難であった。研究分担者の藤井が開発した ECoG 電極は、半年以上の安定使用が可能である。この慢性留置型 ECoG 電極の記録用電極に LED 光源を内蔵した新しい ECoG 用電極を製作し、埋め込みを行い、皮質電位の記録を行った。



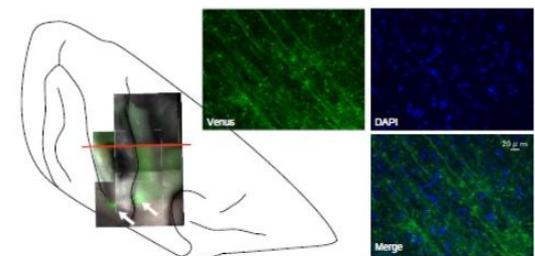
ECoG array with micro LEDs  
 ・24ch ECoG electrodes  
 ・12 micro LED chips  
 -blue light (470 nm)  
 (Komatsu M et al, Society for Neuroscience, 2014)

(2) カニクイザルの硝子体内に強力な発現を誘導する CAG プロモーターを持つ AAV2 型ベクターを投与し、遺伝子導入を行った。また、カニクイザルの樹立細胞株を用いて、遺伝子導入効率を高める手法を検討した。神経細胞への導入に適したプロモーターおよび

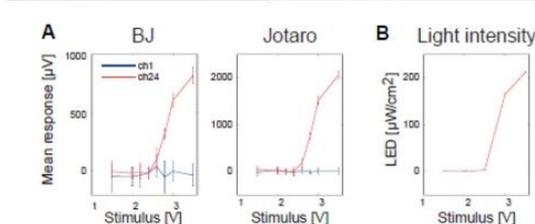
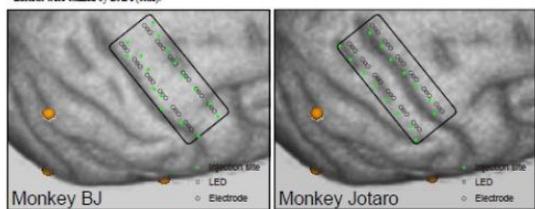
血清型を調べるために、大脳皮質に AAV を注入し、上記の LED 内臓 ECoG 電極を注入箇所に移植し、LED 刺激によって大脳皮質ニューロンの活動が見られるかを調べた。

#### 4. 研究成果

(1) 約 1 ヶ月間のトレーニングで、カニクイザルは視力検査を習得し、視力 0.2 のランドルト環で 80% 以上の正解率となった。薬剤を用いて視細胞変性を誘導 (Isago H, 2013) することによって、視力検査が実施不能となった。アデノ随伴ウイルスベクターを用いて ChR2 遺伝子を導入したものの、遺伝子発現が見られなかったため、その原因を調べた結果、カニクイザル特有の硝子体粘度にあることが判明した。他の霊長類 (マーマセット) へ遺伝子導入を行ったところ、ラットとほぼ同等の遺伝子導入効率を得られた。一方、皮質への遺伝子導入で、光刺激で直接皮質を刺激できるかについて、遺伝子導入後、LED 内臓 ECoG 電極を埋め込み、皮質電位を測定した (Komatu M, NSF 2014)。



Fluorescence images of the right hemisphere of monkey Jotaro. (A) ChR2-Venus expression was observed at the injection site at green spots (the white arrow). (B) The fluorescence images were obtained from a section (the red line in A). Cell nucleus were stained by DAPI (blue).

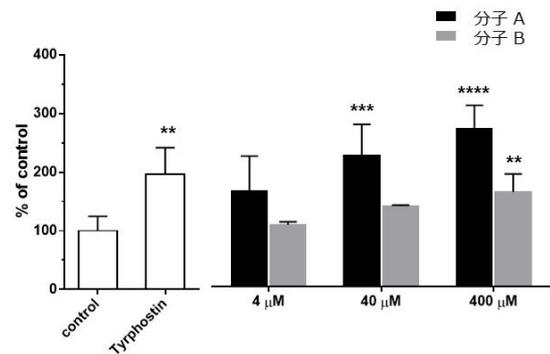


Intensity of stimulation. (A) In neural activity of ch24 (red), with increasing stimulus intensities, the ECoG responses also increased, while activity of ch1 (blue) didn't change. (B) The light intensity corresponding stimulus voltage.

ウイルス注入箇所に限局して遺伝子の発現

が確認され、光強度に依存した活動が記録された。

(2) カニクイザル網膜への遺伝子導入効率が極端に低かったことから、カニクイザルの樹立細胞株を用いて導入効率を改善する手法を検討した。AAV ゲノムの核への移行には EGF 受容体シグナル伝達系が関与していることが知られている。そこでシグナル伝達を阻害する分子を合成し、導入効率に与える影響を調べた。



新規に合成した分子 A を添加することにより、導入効率は control に比べ、約 2.5 倍上昇した (特許出願済み)。精製した AAV 溶液に添加するのみで、導入効率を上昇させることが可能で、今後、培養細胞だけでなく、動物実験で検証していく予定である。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件中 10 件記載)

Ozaki T, Nakazawa M, Yamashita T, Sorimachi H, Hata S, Tomita H, Isago H, Baba A, Ishiguro SI, Intravitreal injection or topical eye-drop application of a  $\mu$ -calpain C2L domain peptide protects against photoreceptor cell death in Royal College of Surgeons' rats, a model of retinitis pigmentosa. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1822(11), 1783-95 (2012), 査読有  
doi: 10.1016/j.bbadis.2012.07.018.

Nagasaka Y, Chao ZC, Hasegawa N, Notoya T, Fujii N, Spontaneous synchronization of arm motion between Japanese macaques. *Sci Rep*, 3: 1151, (2013), 査読有  
doi: 10.1038/srep01151.

Osawa S, Iwasaki M, Hosaka R, Matsuzaka M, Tomita H, Ishizuka T, Sugano E, Okumura E, Yawo H, Nakasato N, Tominaga T, Mushiake H, Optogenetically Induced Seizure and the Longitudinal Hippocampal Network Dynamics, *PLOS ONE*, 8(4):e60928, (2013), 査読有  
doi: 10.1371/journal.pone.0060928.

Kigure C, Naganuma H, Sasaki Y, Kino H, Tomita H, Tanaka T, Fabrication and In vivo Evaluation of Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) Stimulus Electrodes for Fully Implantable Retinal Prosthesis. *Jpn J Appl Phys*, 52, 04CL03-1-04CL03-5, (2013), 査読有

Isago H, Sugano E, Murayama N, Tamai M, Tomita H, Establishment of monocular-limited photoreceptor degeneration models in rabbits, *BMC Ophthalmol*, 17, 13-19, (2013), 査読有  
doi: 10.1186/1471-2415-13-19.

Sugano E, Isago H, Murayama N, Tamai M, Tomita H, Different anti-oxidant effects of thioredoxin 1 and thioredoxin 2 in retinal epithelial cells. *Cell Struct Funct*, 38(1), 81-88 (2013), 査読有  
doi: 10.1155/2013/185825.

Sugano E, Murayama N, Takahashi M, Tabata K, Tamai M, Tomita H, Essential Role of Thioredoxin 2 in Mitigating

Oxidative Stress in Retinal Epithelial Cells, *J Ophthalmol*, 2013:185825, (2013), 査読有  
doi: 10.1155/2013/185825.

Komatsu M, Namikawa J, Chao ZC, Nagasaka Y, Fujii N, Nakamura K, Tani J, An artificial network model for estimating the network structure underlying partially observed neuronal signals. *Neurosci Res*, 81-82:69-77, (2014), 査読有  
doi: 10.1016/j.neures.2014.02.005.

Fukushima M, Saunders RC, Mullarkey M, Doyle AM, Mishkin M, Fujii N, An electrocorticographic electrode array for simultaneous recording from medial, lateral, and intrasulcal surface of the cortex in macaque monkeys. *J Neurosci Methods*, 233:155-65, (2014), 査読有  
doi: 10.1016/j.jneumeth.2014.06.022.

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), 1434-1440, (2014), 査読有  
doi: 10.1038/mt.2014.81.

[学会発表](計20件)  
一般(計9件中5件記載)

Sugano E, Isago H, Murayama N, Saitoh T, Tamai M, Tomita H, Restore vision covering visible light by using single gene, modified volvox channel rhodopsin-1, Annual meeting Association for Research in Vision and Ophthalmology, (Convention Center, Ft. Lauderdale, FL, U. S.), 2012/05/07

Tomita H, Isago H, Iwata E, Murayama N, Shinomoto Y, Watanabe M, Tamai M, Sugano E, Establishment of a method for the visual acuity test on cynomolgus monkey, Annual meeting Association for Research in Vision and Ophthalmology, (Convention Center, Ft. Lauderdale, FL, U. S), 2012/05/09  
苫米地一駿、菅野江里子、村山奈美枝、高橋麻紀、田端喜多子、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, 日本動物学会, (東北大学川内キャンパス, 仙台), 2014/09/13  
Komatsu M, Sugano E, Tomita H, Fujii N, Multi-focal photostimulations with light emitting diodes on a multi-channel electrocorticographic array in non-human primates Society for Neuroscience (Walter E. Washington Convention Center, Washington, DC, U.S), 2014/11/15-19  
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, Asia Association for Research in Vision and Ophthalmology, (Paciffico Yokohama, Yokohama), 2015/02/16-19

#### 招待・シンポジウム

(計11件中7件記載)

菅野江里子, チャンネルロドプシンを利用した遺伝子治療研究, 日本臨床視覚電気生理学学会, (ミッドランドホール, 名古屋), 2012/10/06

富田浩史、菅野江里子、西山史朗、村山奈美枝、田端希多子、高橋麻紀、齋藤建彦、玉井信網膜から脳へのシグナル：光

による修飾、行動との相関、視覚の再建  
「オプトジェネティクスの視覚への応用-失明者の視覚再建に向けて-」第91回日本生理学会大会(鹿児島大学郡元キャンパス, 鹿児島), 2014/03/15-18  
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、チャンネルロドプシン遺伝子導入による視覚機能再建、第118回日本眼科学会, (東京国際フォーラム, 東京), 2014/04/02-06

Tomita H, Sugano E, Murayama N, Nishiyama F, Tabata K, Takahashi M, Saito T, Tamai M, Application of optogenetic technologies to restore vision in genetically blind rats, World Ophthalmology Congress, (東京国際フォーラム, 東京), 2014/04/02-06

Tomita H, Sugano E, Murayama N, Nishiyama F, 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, International Society for Eye Research, (Hyatt Regency San Francisco, San Francisco, U.S), 2014/07/20-24

Tomita H, Sugano E, Murayama N, Nishiyama F, Tabata K, Takahashi M, Saito T, Tamai M, Application of optogenetic technologies to vision -Restoring vision to patients with blindness- 第37回日本神経科学学会 (Paciffico Yokohama, Yokohama), 2014/09/11-13

Tomita H, Use of optogenetics technologies to retinal gene therapy, International Symposium on Hybrid Organs of the future, (Senri-Hankyu

hotel, Osaka), 2015/03/03

〔図書〕(計4件)

菅野江里子、富田浩史、オプトジェネティクス(光遺伝学)～光操作による行動制御技術～, (株)エヌ・ティー・エス出版, 248-257 (2013)

Tomita H, Sugano E, Isago H, Tamai M, Gene Therapy / Book 2" INTECH, 493-510 (2012)

富田浩史、菅野江里子、視覚再生、脳2 1、17(4)、479-495, 2014

Sugano E, Tomita H, Establishment of gene therapy using channel rhodopsin-2 to treat blindness, Optogenetics: Light-Sensing Proteins and Their Applications, Hiromu Yawo, Hideki Kandori, Amane Koizumi, eds, 12 pages, Springer

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 哺乳動物細胞に対する外来遺伝子の導入効率の向上剤

発明者: 富田浩史、菅野江里子

権利者: 岩手大学

種類: 特許

番号: 特願 2015-024849

出願年月日: 平成 27 年 02 月 12 日

国内外の別: 国内

取得状況(計2件)

名称: 発現効率が改善された光受容チャンネルロドプシン

発明者: 富田浩史、菅野江里子

権利者: 東北大学

種類: 特許

番号: 第 5322067 号

出願年月日: 平成 22 年 8 月 10 日

取得年月日: 平成 25 年 7 月 26 日

国内外の別: 国内

名称: Light-receiving channel rhodopsin having improved expression efficiency

発明者: Hiroshi Tomita, Eriko Sugano

権利者: Tohoku University

種類: Patent

番号: US8,754,048 B2

出願年月日: Aug. 10, 2010

取得年月日: Jun. 17, 2014

国内外の別: 国外

〔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

富田 浩史 (TOMITA, Hiroshi)

岩手大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号: 4 0 3 0 2 0 8 8

(2) 研究分担者

藤井 直敬 (FUJII, Naotaka)

理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー

研究者番号: 2 0 3 9 2 0 9 5

田中 徹 (TANAKA Tetsu)

東北大学・大学院医工学研究科・教授

研究者番号: 4 0 4 1 7 3 8 2

菅野 江里子 (SUGANO, Eriko)

岩手大学・大学院工学研究科・特任准教授

研究者番号: 7 0 3 7 5 2 1 0

(3) 連携研究者

なし