

令和元年6月5日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11315

研究課題名(和文) 錐体系視覚と杆体系視覚の可塑性の比較

研究課題名(英文) Comparison of plasticity between rod and cone visual pathways

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：先天的に錐体機能・杆体機能の両方が欠落しているPde6c、Gnat1両欠損マウスは生まれつきほぼ全盲である。様々な月齢のマウスに対してGNAT1遺伝子治療を施行して、杆体視細胞の治療を行い、その視覚回復に対する影響を検討した。その結果、生後1、3、9か月でGNAT1遺伝子治療を施行したマウスで、回復した網膜機能と視覚領野レベルの視覚に差がなかった。しかも、視覚領野レベルの遺伝子治療後の視機能は、Pde6c欠損マウスの視機能と有意差がなかった。以上より、成体マウスにおいても杆体系視覚は十分な可塑性を有していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、先天的に視覚障害をもつ網膜変性症患者に対して、遺伝子治療が試みられている。しかし、この治療では、網膜感度は改善されるが、視力は向上しない。その原因として、視覚の可塑性の欠落が考えられる。本研究では、「先天性網膜変性症に対する治療では、視覚再建に有効な感受性期が、杆体系視覚と錐体系視覚とは異なる」との仮説を立て、その検証した。その結果、驚くべきことに、成体マウスにおいては、杆体系の視覚は非常に高い可塑性を有することが初めて明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Mice defective of Pde6c and Gnat1 resulting in congenital lack of cone and rod function are virtually blind from birth. In this study, we treated mice of different ages by supplementing GNAT1 gene followed by assessment of visual recovery. As a result, the levels of functional restoration measured at the retina and visual cortex were not significantly different between mice treated at 1M, 3M, and 9M following GNAT1 gene supplementation therapy. Moreover, visual restoration at the level of visual cortex were similar to mice with only Pde6c defect. The results indicate that rod visual pathway in adult mice retain substantial plasticity.

研究分野：眼科学

キーワード：遺伝子治療 可塑性 網膜

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

1. 研究開始当初の背景

先天性の網膜ジストロフィーの中には、幼少期から視機能が著しく障害されるものがある。患者は、視覚障害のために、様々な局面で学習・成長の機会を奪われ、成人してもなかなか生まれ持ったハンディキャップを乗り越えられないケースは珍しくない。しかし、遺伝子異常により引き起こされる網膜疾患の治療は極めて難しく、これまでこれらの疾患に対して有効な治療はほとんどなかった。

網膜視細胞には、暗所視覚を担う杆体視細胞と明所視覚を担う錐体視細胞とがある。また、視覚発達の感受性期に網膜が適切な視覚刺激を受けない場合、網膜機能に異常がなくても、視路が十分に発達せず、視覚障害が起こりうる。これを弱視という。日常生活での視覚の大部分は、明所での視覚を担当する錐体視細胞に依存する。近年、若年発症の遺伝性網膜疾患に対する遺伝子治療により杆体系視覚が改善したとの報告が複数行われた (Bainbridge ら NEJM 2008、Mcguire ら NEJM 2008、Hauswirth ら Human Gene Therapy 2008)。これらの臨床試験の共通した成果として、治療による杆体系網膜感度の上昇が挙げられる。一方、視力向上など遺伝子治療による有効な錐体系視覚の再建を示す信頼性あるデータはほとんどない。その理由として、より高度な視覚情報の処理が行われる錐体系視覚では、加療時に既に不可逆性の弱視状態に陥っている可能性が考えられる。実際、先天的に錐体視機能がほとんどない全色盲の成人患者では、通常錐体系視覚を担う部分の後頭葉視覚野が、杆体系の視覚野に置き換わってしまっていることが分かっている (Baseler ら Nat Neurosci 2002)。

錐体機能不全マウスに遺伝子治療を行い、錐体系視覚の感受性期を報告したグループがある (Carvalho ら Hum Mol Genet 2011)。最近、申請者は、そのグループに参加し (2011-2013の間)、報告を再検証した。その結果、実験結果を再現することができなかった。その原因として、この実験の2つの問題点を見出した。すなわち、(1)マウスでは杆体系も錐体系もほぼ同等な視力を有し、治療後測定された視力がどちらによるものか区別できないことと、(2)用いられた錐体機能不全マウス (Cngb3 ノックアウトマウス) では、視覚低下がほとんどない点である。つまり、そもそも遺伝子治療によって改善しうる視力の程度はわずかである、ということになる。この検証結果より、錐体系視覚の感受性期は十分に解明されておらず、さらに検証する必要があると考えられる。また、杆体系視覚に関してはその感受性期については、これまで報告はない。

2. 研究の目的

近年、先天的に視覚障害をもつ網膜変性症患者に対して、遺伝子治療が試みられている。しかし、この治療では、杆体視細胞系の視覚は改善されるが、錐体視細胞系の視機能向上を示した報告はほとんどない。本研究では、「先天性網膜変性症に対する治療では、視覚再建に有効な感受性期が、杆体系視覚と錐体系視覚とでは異なる」との仮説を立て、その検証をめざす。この仮説の検証は、全盲のマウスの錐体系視覚または杆体系視覚のどちらか一方のみを再建した後にマウスの視機能測定を行い、それぞれの視覚系での感受性期を同定することで行う。

3. 研究の方法

本研究においては、3年間で錐体視細胞と杆体視細胞の両視覚系における視覚再建が可能な感受性期をそれぞれ同定することを目標とする。正確な視覚を測定する方法としては、覚醒下のマウスの視機能を測定することが望ましい。しかし、覚醒下では、杆体系視覚と錐体系視覚を分離して測定することは難しい。そこで、本研究では、以下のような到達目標を掲げ、着実な研究の遂行を目指す。

(1) 全盲マウス (Pde6cK0・Gnat1K0 マウス) の作製

錐体機能欠損マウス (Pde6cK0 マウス) と杆体機能欠損マウス (Gnat1K0 マウス) を交配し、両視細胞機能が欠損した全盲マウス (Pde6cK0・Gnat1K0 マウス) を作製する。作製した全盲マウスにおいて視細胞変性が起こるかを調べるために、網膜を継時的に組織学的に評価する。

(2) 遺伝子治療

全盲マウス (Pde6cK0・Gnat1K0 マウス) に対して、Pde6c または Gnat1 の一方のみを AAV8 を用いて視細胞に遺伝子補充治療を行い、錐体系視覚または杆体系視覚のいずれかの機能をレスキューする。

(3) 遺伝子治療効果確認

AAV8 に搭載された遺伝子 (transgene) が視細胞で安定発現すると考えられる治療2週後に、遺伝子治療による transgene の発現を共焦点走査型レーザー検眼鏡 (cSLO) を用いて確認し、網膜機能の再建の判定を ERG を用いて行う。

(4) 視機能と視路の組織学的評価

様々な年齢のマウスに治療を施し、網膜機能の再建が確認されたマウスを対象に、高次視機能 (視力・コントラスト感度・動的視力) の評価を行う。得られた高次視機能と治療時期の関係性を解析することにより、遺伝子治療により視覚再建可能な感受性期を視細胞種別に同定し比較する。また、視機能と大脳視覚野の発達の程度の関連を明らかにする。

4. 研究成果

近年、先天的に視覚障害をもつ網膜変性症患者に対して、遺伝子治療が試みられている。

しかし、この治療では、杆体視細胞系の視覚は改善されるが、錐体視細胞系の視機能向上

を示した報告はほとんどない。本研究では、「先天性網膜変性症に対する治療では、視覚再建に有効な感受性期が、杆体系視覚と錐体系視覚とでは異なる」との仮説を立て、その検証をめざす。この仮説の検証は、全盲のマウスの錐体系視覚または杆体系視覚のどちらか一方のみを再建した後にマウスの視機能測定を行い、それぞれの視覚系での感受性期を同定する予定であった。しかし、モデルマウスの組織学的評価を行ったところ、予想外に錐体視細胞の変性の進行が早く、錐体系視覚の経時的評価が困難であった。そのため、研究計画を変更して、杆体系視覚の可塑性のみの評価を行った。

先天的に錐体機能・杆体機能の両方が欠落している Pde6c、Gnat1 両欠損マウスは生まれつきほぼ全盲である。様々な月齢のマウスに対して GNAT1 遺伝子治療を施行して、杆体視細胞の治療を行い、その視覚回復に対する影響を検討した。

その結果、生後 1、3、9 か月で GNAT1 遺伝子治療を施行したマウスで、回復した網膜機能（網膜電図で測定）と視覚領野レベルの視覚（Optokinetic response と視覚誘発電位の測定）に差がなかった。しかも、視覚領野レベルの遺伝子治療後の視機能は、Pde6c 欠損マウス（生下時より Gnat1 遺伝子は正常）の視機能と有意差がなかった。

さらに、これらのマウスで視覚野 Layer IV における Arc の神経機能依存性転写活性を測定したところ、治療を 1 ヶ月と 9 ヶ月では、後者の方がむしろ活性が上昇していた。

以上より、成体マウスにおいても杆体系視覚は十分な可塑性を有していることが明らかになった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Nishiguchi KM, Fujita K, Tokashiki N, Komamura H, Takemoto-Kimura S, Okuno H, Bito H, Nakazawa T. Retained Plasticity and Substantial Recovery of Rod-Mediated Visual Acuity at the Visual Cortex in Blind Adult Mice with Retinal Dystrophy. *Mol Ther.* 2018;26:2397-2406. doi: 10.1016/j.ymthe.2018.07.012. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 2019.03.09 国際学会シンポジウム, Nishiguchi KM, Retained plasticity at the visual cortex and recovery of vision in blind adult mice with retinal dystrophy following gene therapy, 34th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology Congress, Bangkok, Thailand
2. 2018.12.22 国際学会シンポジウム, Nishiguchi KM, Retained cortical plasticity and full recovery of rod-mediated visual acuity in blind adult mice with retinal dystrophy, 6th Joint Meeting in Sendai, Sendai

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：中澤 徹
ローマ字氏名：Toru Nakazawa
所属研究機関名：東北大学
部局名：医学研系究科
職名：教授
研究者番号（8桁）：30361075

(1)研究分担者

研究分担者氏名：藤田 幸輔
ローマ字氏名：Kosuke Fujita
所属研究機関名：東北大学
部局名：医学系研究科
職名：教授
研究者番号（8桁）：80708115

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。