

科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年5月11日現在

機関番号：11301
 研究種目：新学術領域研究
 研究期間：2009～ 2011
 課題番号：21200022
 研究課題名（和文） 光感受性分子の遺伝子導入による新たな視覚系構築と再生医工学研究領域の創成
 研究課題名（英文） Establishment of a method for restoring vision using light-gated ion channels and the promotion of optogenetics
 研究代表者
 玉井 信 (TAMAI MAKOTO)
 東北大学・大学院医学系研究科・名誉教授
 研究者番号：90004720

研究成果の概要（和文）：

クラミドモナス由来の光活性化イオンチャネル遺伝子、「チャネルロドプシン」を改変し、波長感受性の異なる新しい光活性化イオンチャネル遺伝子を創出した。その光特性は、青色だけでなく、幅広い波長にตอบสนองし、これを用いることによって、可視光全域を見ることが出来る視機能を作り出せる可能性がある。遺伝盲ラットを用いた行動学実験でも視機能の回復が確認され、光活性化イオンチャネル遺伝子を利用した視覚再生法を確立することができた。

研究成果の概要（英文）：

We have newly developed a light gated cation channel gene by the modification of channelrhodopsin gene derived from the clamydomonas. The modified channelrhodopsin has a sensitivity covered over a visible light. We could regain the visual function of blind patients by using the modified channelrhodopsin. Indeed, we could demonstrate the recovery of visual function in genetically blind rats by transucing the gene.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2010年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2011年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
年度			
年度			
総計	23,800,000	7,140,000	30,940,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：光遺伝学、視覚再生、網膜

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性や加齢黄斑変性に代表される視細胞変性疾患では、視細胞が変性あるいは消失することによって、失明に至る。これらの疾患では、視細胞が完全に変性しても、それ以外の神経細胞は残存している。失明者の視覚を取り戻す治療法（視覚再生法）として、残存する網膜神経細胞を電氣的に刺激し、擬似的な光覚を得る、人工網膜が研究されてはいるが報告を見る限りでは、感覚器から得

られる「視覚」とは程遠く、しかも高い解像度を得ることは難しい。今回提案する遺伝子導入による視覚再生法は、光感受性遺伝子を組み込んだベクターウイルス液を眼内に注入するだけで、残存神経節細胞の約30%に光受容能を与えられることを、我々は明らかにしている。

人工網膜移植術は高度な手技と機器を必要とし、更に人工網膜の固定法、生体適合性などの解決すべき課題が多い。一方我々の方

法は、毛様体扁平部から硝子体内にベクターウイルス液を注入するだけであり、患者の眼球への侵襲は比較的低いと考える。更に人工網膜とは異なり、眼外への配線や動力の供給が不要である。我々の方法では注入後短期間に（ラットの場合 6 週間）、遺伝子が残存神経節細胞の細胞膜に効率よく発現し、一時視覚野で光刺激に対する視覚誘発電位（VEP）が記録できること、行動学的な評価でラットが実際に縞模様に応答すること、を報告している。更に遺伝子導入された神経細胞は光応答性を獲得しただけでなく、刺激強度に応じた興奮性を示すという、感覚器として最も重要な特性を回復し、視覚再生の方法として期待できる。

2. 研究の目的

緑藻類クラミドモナスより単離されたチャネルロドプシン-2 (ChR2) は、発色団としてレチナルを有し、540nm 以下（青色）の光に反応し、細胞内に陽イオンを透過させる光受容陽イオン選択的チャネルとして機能することが知られている。「光受容 + 陽イオンチャネル」という特性から、神経細胞に発現させた場合、単一の分子の働きで光情報を電気信号に変換することができる。我々は、アデノ随伴ウイルスを遺伝子導入の為にベクターとして用い、網膜細胞に ChR2 遺伝子を導入することにより、遺伝盲ラットの視覚を取り戻すことに成功し、行動学的にも視機能の回復を確認している。しかし、ChR2 の感受波長は、上述したように青色に限定されており、これらの方法で視覚が取り戻せたとしても、可視光全域を見ることはできない。クラミドモナス由来の ChR2 とチャネルロドプシン-1 のキメラタンパク質を作ることにより、ChR2 の波長感受性が青から緑方向にシフトすることが報告されている。また、特定のアミノ酸を置換または変異を与えることで、特性が変化することなどが示されている。これらのことから、新しい光特性を持つチャネルロドプシンを人為的に作ることが可能と考えられる。

本研究では、チャネルロドプシンの遺伝子導入によって、どのような視覚が得られるかを、電気生理学的・行動学的に明らかにするとともに、視覚再生に有用な新たな光感受性分子を創出する。また、遺伝子導入による視覚再生法のヒトへの応用を目指し、高等動物での評価法を確立する。

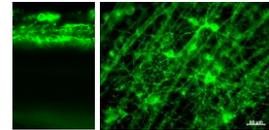
3. 研究の方法

ChR2 によって得られる視覚特性を調べる目的で、チャネルロドプシンを網膜神経節細胞に恒常的に発現するトランスジェニックラットを作製し、デジタルオプトモーターを用いて、コントラスト感度-空間周波数特性

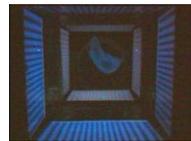
を調べた。また、遺伝子導入ラットの視覚野の反応を初期応答遺伝子、c-fos を指標に、免疫組織化学により調べた。一方、クラミドモナス、ボルボックス由来のチャネルロドプシンを用いて、新しい光特性を持つチャネルロドプシンを作製することを試み、数個の改変型チャネルロドプシンを作製した。作製した改変体は培養細胞を用いてパッチクランプ法により光特性を調べた。高等動物でチャネルロドプシン-2 によって得られる視覚特性を調べる目的で、カニクイザルでの視力検査法を確立するとともに、片眼失明モデルの作製を試みた。

4. 研究成果

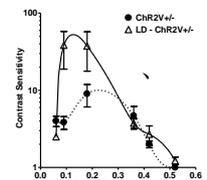
作製したトランスジェニックラットでの ChR2 の発現は系統により様々な発現を示した。今回の目的に合致した網膜神経節細胞のみに発現が見られた系統を用い、オプトモーターによるコントラスト感度-空間周波数特性を



調べた。視細胞を正常に持つトランスジェニックラットのコントラスト感度は野生型のラットと同等の特性を示した。一方、トランスジェニックラットの視細胞のみを連続光照射によって変性させ、ChR2 によって得られる視覚特性を調べたところ、予想に反して、コントラスト感度の上昇が確認された。以上の結果から、

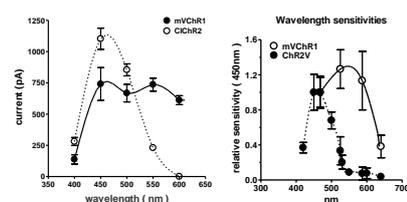


ChR2 を発現する神経節細胞によって、青色に限定すると正常と同等の空間周波数特性と高いコントラスト感度が得られることが明らかとなった。片眼に遺伝子導入した遺伝盲ラットを光照射下で飼育した後、還流固定を行い、視覚野での c-fos の発現を免疫組織化学により調べた。光照射によって視覚野に c-fos 免疫反応性の亢進が見られ、眼球で捉えた光情報が視覚野に伝わっていることが確認された。



クラミドモナス由来 ChR1 とボルボックス由来 ChR1 を利用し

て、作製した改変型 VChR1 は、パッチクランプ法、並びに遺伝盲ラットへの導入による視覚誘発電位測定結果から幅広い波長感受性を



持つことが明らかとなった。

遺伝子導入による視覚再生法のヒトへの応用を目指し、ラットでの安全性研究を行うとともに、カニクイザルでの視力検査プログラムを開発し、カニクイザルで視力検査ができることを確認した。ラットを用いた安全性研究で、重篤な副作用は見られず、これらの研究データをまとめ、海外での臨床試験申請に至った。

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 12 件)

1. Isago H, Sugano E, Wang Z, Murayama N, Tamai M, Tomita H. Age-dependent differences in recovered visual responses in Royal College of Surgeons rats transduced with the Channelrhodopsin-2 gene. *J Mol Neurosci*, 46(2), 393-400, 2012 (査読有)
2. Wang Z, Sugano E, Isago H, Hiroi T, Tamai M, Tomita H. Differentiation of neuronal cells from NIH/3T3 fibroblasts under defined conditions. *Development Growth and Differentiation*, 53(3); 357-65, 2011. (査読有)
3. Sugano E, Isago H, Wang Z, Murayama N, Tamai M, Tomita H. Immune responses to adeno-associated virus type 2 encoding channelrhodopsin-2 in a genetically blind rat model for gene therapy. *Gene Therapy*, 18(3); 266-74, 2011. (査読有)
4. Semo M, Gias C, Ahmado A, Sugano E, Allen A, Lawrence JM, Tomita H, Coffey PJ, Vugler A*. Dissecting a Role for Melanopsin in Behavioural Light Aversion Reveals a Response Independent. *PLoS ONE*, 29; 5(11): e15009, 2010. (査読有)
5. Tomita H, Sugano E, Isago H, Hiroi T, Wang Z, Ohta E, Tamai M. Channelrhodopsin-2 gene transduced into retinal ganglion cells restores functional vision in genetically blind rats. *Exp Eye Res*,

90:426-436, 2010. (査読有)

6. Ito Y, Shimazawa M, Inokuchi Y, Yamanaka H, Tsuruma K, Imamura K, Onoe H, Watanabe Y, Aihara M, Arae M, Hara H. Involvement of endoplasmic reticulum stress on neuronal cell death in the lateral geniculate nucleus in the monkey glaucoma model, 33, 843-55, 2010 (査読有)
7. Katsuyama N, Imamura K, Onoe H, Tanaka H.K, Onoe K, Tsukada H, Watanabe Y. Cortical activation during color discrimination task in macaques as revealed by positron emission tomography. *Neurosci Letter*, 484(3), 168-73, 2010 (査読有)
8. Tomita H, Sugano E, Fukazawa Y, Isago H, Sugiyama Y, Hiroi T, Ishizuka T, Mushiake H, Kato M, Hirabayashi M, Shigemoto R, Yawo H, Tamai M. Visual properties of transgenic rats harboring the channelrhodopsin-2 gene regulated by the Thy-1.2 promoter. *PLoS ONE*, 4(11):e7679, 2009. (査読有)
9. Tomita H, Sugano E, Isago H, Tamai M. Channelrhodopsins provide a breakthrough insight into strategies for curing blindness. *J Genetics*, 88: 409-415. 2009. (査読有)
10. Wang H, Sugiyama Y, Hikima T, Sugano E, Tomita H, Takahashi T, Ishizuka T, Yawo H. Molecular determinants differentiating photocurrent properties of two channelrhodopsins from chlamydomonas. *J Biol Chem*, 284:5685-5696. 2009. (査読有)
11. Imamura K, Onoe H, Shimazawa M, Nozaki S, Wada Y, Kato K, Nakajima H, Mizuma H, Onoe K, Taniguchi T, Sasaoka M, Hara H, Tanaka S, Araie M, Watanabe Y. Molecular imaging reveals unique degenerative changes in experimental glaucoma., *Neuroreport*, 20(2), 139-144.

2009. (査読有)

12. Tanaka S, Tani T, Ribot J, O'hashi K, Imamura K. A postnatal critical period for orientation plasticity in the cat visual cortex. 4(4), e5380, 2009 (査読有)

[学会発表] (計 26 件)

1. Wang Z, Sugano E, Tomita H : Induction of neuronal cells from NIH/3T3 fibroblasts under defined conditions, The 5th China Medicinal Biotech Forum (CMBF2011), 北京, 2011 年 11 月 8 日

2. 菅野江里子, 砂金ひとみ, 富田浩史 : チャネルロドプシン-2 を用いた視覚再生の可能性、第 6 回網脈絡膜変性フォーラム、盛岡、2011 年 10 月 10 日

3. 菅野江里子, 砂金ひとみ, 村山なみえ, 玉井信, 富田浩史 : ボルボックス由来チャネルロドプシン 1 遺伝子改変による感受波長の改善、第 82 回 日本動物学会、旭川、2011 年 9 月 21 日

4. 富田浩史, 菅野江里子, 砂金ひとみ, 村山なみえ, 玉井信 : 視細胞変性モデルの確立、第 82 回 日本動物学会、旭川、2011 年 9 月 21 日

5. 砂金ひとみ, 菅野江里子, 村山なみえ, 玉井信, 富田浩史 : チャネルロドプシン 2 を導入した週齢の異なる RCS ラットの視覚反応の違い、第 82 回 日本動物学会、旭川、2011 年 9 月 21 日

6. Tomita H, Sugano E, Isago H, Murayama N, Wang Z, Tamai M : Gene therapy in ophtjalmology `Visual properties of genetically blind rats transduced with channelrhodopsin-2 gene." , The Fourth Global Chinese Ophthalmic conference, The 16th Congress of chinese Ophthalmological Society, 広州 (中国) , 2011 年 9 月 8 日

7. 菅野江里子, チャネルロドプシン 2 による視覚再生治療における効果的時期の検討 : 「光感受性分子の遺伝子導入による新たな視覚系構築ち再生医工学研究領域の創成」 研究班会議、群馬、2011 年 7 月 16 日

8. 富田浩史, 菅野江里子, 砂金ひとみ : 視機能再建のための遺伝子治療～実現に向けて、JRPS 三重県支部医療講演会、松阪市、2011 年 6 月 26 日

9. 菅野江里子, 砂金ひとみ, 富田浩史 : 藻類チャネルロドプシン遺伝子を用いた視覚再生、JRPS 大阪支部医療講演会、大阪市、2011 年 6 月 11 日

10. 富田浩史, 菅野江里子, 砂金ひとみ : 能再生に向けた遺伝子治療研究の現状、第 12 回網膜色素変性症患者のつどい、福岡市、2011 年 6 月 5 日

11. 菅野江里子, 砂金ひとみ, 玉井信, 富田浩史 : チャネルロドプシン 2 を用いた視覚の再生について、JRPS (網膜色素変性症協会) 新潟支部医療講演会、新潟市、2011 年 5 月 22 日

12. 富田浩史, 菅野江里子, 砂金ひとみ : 視覚再生研究の新たな展開、日本眼科学会総会、東京、2011 年 5 月 12 日

13. Sugano E, Isago H, Wang Z, Murayama N, Tamai M, Tomita H : Effective Time Point For Channelrhodopsin-2 mediated Gene Therapy After Photoreceptor Degeneration In Rcs Rats, ARVO Annual meeting, Fortlauderdale, FL, 2011 年 5 月 1 日

14. Tomita H, Sugano E, Isago H, Murayama N, Wang Z, Tamai M : Improvement Of Wavelength Sensitivities By The Modification Of Volvox Channelrhodopsin-1 Gene, ARVO Annual meeting, Fortlauderdale, FL, 2011 年 5 月 1 日

15. Kato K, Imamura K, Sekino Y,

Involvement of drebrin, an actin binding protein, in regulation of AMPA receptor recruitment in cultured hippocampal neurons, International radiation neurobiology, 2011 年 1 月 29 日, 群馬

16. Imamura K, Ocular dominance plasticity in abnormally developed visual cortex, International radiation neurobiology, 2011 年 1 月 29 日, 群馬

17. 富田浩史, 菅野江里子, 砂金ひとみ, 王卓, 村山なみえ, 玉井信. 遺伝子導入による視覚再生、日本視覚学会、2011 年 1 月 20 日、東京

18. 富田浩史, 菅野江里子, 砂金ひとみ, 王卓, 村山なみえ, 玉井信. 緑藻類由来遺伝子を用いた視覚再生技術、日本人工臓器学会、2010 年 11 月 20 日、仙台

19. Tomita, H., Sugano, E., Isago, H., Hiroi, T., Wang, Z. and Tamai, M., Retinal and systemic immune responses after the transfer of channelrhodopsin-2 into RCS rats, XIVth International Symposium on Retinal Degeneration, 2010 年 7 月 14-16 日, Quebec, Canada

20. Sugano, E., Tomita, H., Isago, H., Hiroi, T., Wang, Z. and Tamai, M., Optimization of volvox-derived channelrhodopsin-1 to expressexpression in mammalian cells, XIVth International Symposium on Retinal Degeneration, 2010 年 7 月 14-16 日, Quebec, Canada

21. Tomita, H., Sugano, E., Isago, H., Hiroi, T., Wang, Z. and Tamai, M., Visual Responses of Royal College of Surgeons Rats Transferred Modified Volvox Channelrhodopsin-2 Gene. Annual meeting Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2010 年 5 月 2 日, Ft. Lauderdale, US

22. Sugano, E., Tomita, H., Isago, H., Hiroi, T., Wang, Z. and Tamai, M., Systematic and Local Responses of Channelrhodopsin-2 Gene Therapy, Annual meeting Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2010 年 5 月 2 日, Ft. Lauderdale, US

23. 菅野江里子、富田浩史、姫志剛、砂金ひとみ、廣井照、松坂昌哉、虫明元、玉井信、カニクイザルを用いた視機能評価、日本動物学会、平成 21 年 9 月 19 日、静岡

24. 砂金ひとみ、富田浩史、菅野江里子、廣井照、王卓、玉井信、Channelrhodopsin-2 トランスジェニックラットの視機能について、日本動物学会、平成 21 年 9 月 19 日、静岡

25. Nishino K, Imamura K. EMG and motor recovery, XIV World Congress of Neurological Surgery of the World Federation of Neurosurgical Societies, 平成21年9月2日, Boston, MA, US

26. Imamura K, Onoe H, Shimazawa M, Nozaki S, Mizuma H, Wada Y, Onoe K, Ishii K, Mayama C, Taniguchi T, Sasaoka M, Yamanaka H, Hara H, Tanaka S, Araie M, Watanabe Y, Central changes in Experimental Glaucoma, 国際生理学会世界大会, 平成 21 年 8 月 1 日, 京都

〔図書〕(計 1 件)

1. 富田浩史、菅野江里子：チャネルロドプシンを用いた視覚再生、社団法人 日本眼科医会、日本の眼科、82：12 号、2011 年、p1602-1607

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

1. 名称：発現効率が改善された光受容チャネルロドプシン
発明者：富田浩史、菅野江里子
権利者：東北大学
種類：PCT
番号：特願 2009-185455
出願年月日：平成 21 年 8 月 10 日

国内外の別：国内

2. 名称：発現効率が改善された光受容チャネルロドプシン

発明者：富田浩史、菅野江里子

権利者：東北大学

種類：PCT

番号：PCT/JP2010/063786

出願年月日：平成 22 年 7 月 10 日

国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.visual-neuroscience.med.tohoku.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉井 信 (TAMAI MAKOTO)

東北大学・大学院医学系研究科・名誉教授

研究者番号：90004720

(2) 研究分担者

今村 一之 (IMAMURA KAZUYUKI)

前橋工科大学・システム生体工学科・教授

研究者番号：30203326

菅野 江里子 (SUGANO ERIKO)

東北大学・国際高等融合領域研究所・助教

研究者番号：70375210

砂金 ひとみ (ISAGO HITOMI)

東北大学・国際高等融合領域研究所・技術補佐員

研究者番号：30400451

(3) 連携研究者

富田 浩史 (TOMITA HIROSHI)

東北大学・国際高等融合領域研究所・准教授

研究者番号：40302088

渡部 眞三 (WATANABE MASAMI)

東北大学・国際高等融合領域研究所・非常勤講師

研究者番号：10093486