

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09713

研究課題名(和文) 視覚再生網膜のレチナール供給機構の解明と視機能の増強

研究課題名(英文) Analysis of retinoid metabolisms in retina received channelrhodopsin-mediated gene therapy and enhanced visual function by additional supply of vitamin A

研究代表者

田端 希多子 (Tabata, Kitako)

岩手大学・理工学部・特任准教授

研究者番号：80714576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：チャネルロドプシン(ChR)は、緑藻類の一部が持つ、光を感じるための物質である。当研究室では、この光感受性物質に遺伝的な操作を加え、視細胞変性網膜の神経節細胞に発現させることで視機能回復を試みている。レチナール(RAL)はChRが光を受容するために必要な補因子であるが、視細胞変性網膜でChRを発現させるとRAL合成関連酵素遺伝子の発現が増加した。ミュラー細胞はこれらを多く含むため、網膜神経節細胞へRALを供給する経路の一つと考えられる。また2つの異なるChRを同時発現させたラットにおいて、視覚誘発電位応答がビタミンA投与により改善され、2つのChR間でのRALの競合が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網膜色素変性症は人口約5000人に一人が罹患しており、重篤な場合には失明に至る。治療法は未だ確立されておらず、難病に指定されている。当研究室では、開発したmVChR1を視細胞変性網膜の神経節細胞に発現させることで視機能回復を試みている。チャネルロドプシン(ChR)は光受容のために補因子としてレチナール(RAL)を持つ。今回、ChRを発現させた網膜はRAL合成関連酵素遺伝子の発現が増加していることがわかった。また二つの異なるChRを発現させたラットの視覚誘発電位が、ビタミンAの投与により改善することがわかった。このことから遺伝子治療後のビタミンA投与により、視機能向上できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Channelrhodopsin (ChR) is a photosensitive material that some green algae have. We have been researching the restoration of vision in blind rats with photoreceptor degeneration by transducing a genetically modified ChR into retinal ganglion cells. ChR needs retinal (RAL) as a cofactor to function in receiving light. RAL-related genes were upregulated in the photoreceptor-degenerated retina by ChR expression. We hypothesized that Muller cells plays some roles in RAL synthesis for supplying ChR because the RAL-related genes are in Muller cells. We observed that amplitudes of VEPs in rats expressing 2 different types of ChRs decreased compared to those in rats expressing a single ChR, and the decreased amplitudes were recovered by a vitamin A supplementation. These results indicated that RAL competition is caused by two different types of ChR.

研究分野：眼生理学

キーワード：眼生理学 遺伝子治療 網膜色素変性症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (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。多くの原因遺伝子が明らかにされており、遺伝子治療や iPS 細胞を利用した臨床研究も進められてはいるが、未だ確立された治療法はない。当研究室では、緑藻類由来の光活性化陽イオンチャネル遺伝子を視細胞の変性により失明に至った網膜の神経節細胞に導入することによって視機能を回復させることに成功している (Tomita H et al, IOVS, 2007; PLOS ONE, 2010; Exp Eye Res, 2011)。しかし、第一世代型の ChR2 は応答できる波長が青色領域に限定されるため、視覚が回復したとしても青色以外の物を見ることができない。この問題点の解決に取り組み、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、多波長に応答する遺伝子(mVChR1)の開発に成功している (Tomita H, et al, Molecular Therapy, 2014; 日米で登録済み, 2015 文部科学大臣表彰「研究部門」)。この mVChR1 を用いた遺伝子治療の一部の GLP 安全性試験は、橋渡し研究加速ネットワーク支援 (AMED) を受け研究室主導で行い、その後、アステラス製薬株式会社とライセンス契約を締結した。海外においてはチャンネルロドプシン類(ChR)を利用した視覚再生のための遺伝子治療はすでに臨床応用されているものの、得られる解像度は 遺伝子導入効率に依存する、生来の視機能に比べて光感受性が低い、といった問題点が残されている。 遺伝子導入効率については、合成ペプチドを添加することで AAV の感染効率を上昇させることに成功している (Tabata K, et al, BBRC, 2016)。後者の 光感受性については、当研究室において2種類の波長特性の異なる ChR を動物に発現させると単独発現の反応よりも劣ることがわかり (Sato M, et al, Sci. Rep, 2017)、同様にパッチクランプ法においても、一つの細胞に共発現させると応答が低くなること、さらに、この反応性の低下は、レチナル(RAL)添加により回復することを見出している (Watanabe Y, et al, BBRC, 2018)。実際、in vivo においても、RAL の投与により、視機能の向上が見られることを確認している。従って、ChR の光感受性には発色団である RAL の供給が重要な役割を担っていることが分かる。視細胞が変性・消失している網膜においては、生来のレチノイドサイクルは機能しておらず、ChR を導入した神経節細胞への RAL 供給経路は不明であり、かつ充分量存在しているかも不明である。

### 2. 研究の目的

視細胞が変性・消失している網膜の、生来のレチノイドサイクルが機能していないにも関わらず、RAL を必要とする mVChR1 は機能している。mVChR1 の機能発現に必須である RAL の産生経路およびその細胞を明らかにすること、また、RAL 投与により mVChR1 の機能を高めることができるか検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) mVChR1 遺伝子を AAV ウイルスに載せ、遺伝的盲ラットである RCSrdy/rdy ラットの硝子体内に投与し2ヶ月以上経過すると、網膜神経節細胞の細胞膜へ mVChR1 が発現する。基剤のみ投与した RCSrdy/rdy ラット、 mVChR1 を発現させた RCSrdy/rdy ラット、 視細胞変性しない正常な網膜を有する野生型 RCS+/+ラット、 クラミドモナス由来 ChR2 を神経節細胞に発現させたトランスジェニック(ChR2-TG)ラット、 ChR2-TG ラットに高照度光照射にて視細胞変性処置をしたラット、 ChR2-TG ラットの基となった品種の Wistar ラットについて網膜の RAL 濃度を測定した。

(2) (1)と同様に、mVChR1 遺伝子もしくは蛍光タンパク遺伝子のみを RCSrdy/rdy ラットに投与し、 蛍光タンパク遺伝子を発現しているラット網膜と mVChR1 を発現しているラット網膜、および 未投与の野生型 RCS+/+ラット網膜を用いて、RNA-seq にて網羅的に解析した。

(3) ChR2-TG ラットおよび Wistar ラットに MNU (N-methyl-N-nitrosourea) を腹腔内投与し、視細胞変性を誘発2週間後、ERG にて反応消失を確認した。その後、mVChR1-mCherry もしくは mCherry を投与し、2ヶ月以上経過してから視覚誘発電位(VEP)を測定した。刺激光は 650nm、525nm、465nm の3種類の波長を用い、各々の光強度は 20/80/160 $\mu$ W/mm<sup>2</sup> の3段階とした。測定ポイントは ビタミン A 投与前 ビタミン A 投与後1日目 3日目 7日目の4点であった。

### 4. 研究成果

(1) RCSrdy/rdy ラットにおける 基剤群、 mVChR1 群での有意差は無く、同じく Wistar ラットにおける 野生型と ChR2 TG 群にも RAL 量に有意差は無かった。チャンネルロドプシンの発現による RAL 量は微量であり、検出できなかったと推察できる。一方、 基剤のみ投与した RCSrdy/rdy ラット、 mVChR1 を発現させた RCSrdy/rdy ラット、 ChR2-TG ラットに高照度光照射にて視細胞変性処置をしたラットの網膜は互いに同程度の RAL 濃度であり、一方 RCS+/+ラット、 ChR2-TG ラット、 Wistar ラットの網膜がそれぞれ同程度の RAL 濃度であった。前者の視細胞変性群( )は後者の正常網膜群( )の半分程度であり、正常網膜内の視細胞に存在するロドプシンが大きく関わっていると考えられた。

(2) RNA-Seq による網羅的遺伝子発現解析を行い検討したところ、光エネルギーを用いて、atRAL から 11cRAL に変換する RGR およびペロプシン、網膜における atROL の輸送を行う CRBP において、mVChR1 発現網膜は 蛍光タンパク遺伝子発現網膜と比較して、高い発現量を示した。また、RCS+/+ ラット網膜はここに挙げた遺伝子においては明らかに低い発現量であった。

において、これらが高い発現量を示したことは mVChR1 へのレチナール供給を意味していると示唆される。また視細胞が変性消失していることから、これら増加遺伝子群は主に網膜色素上皮細胞およびミュラー細胞が有しているものと推察できる。

(3) ChR2 および mVChR1 を両方発現している群のうち、緑光および青光の高輝度条件においてのみ、ビタミン A 投与前に比べ、投与後 7 日目で有意に高い振幅を示した (図 1)。

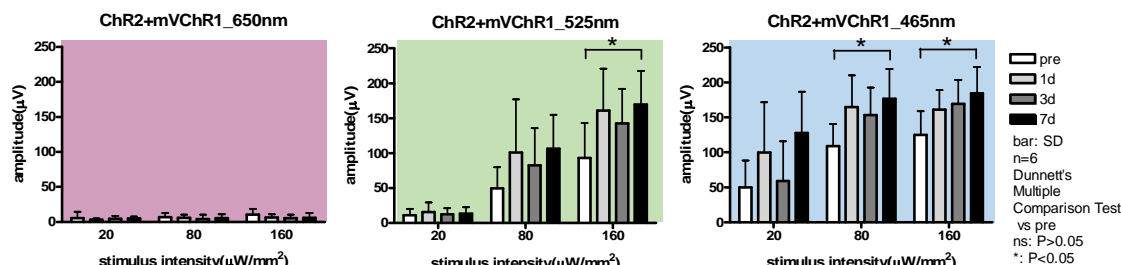


図 1. 2 種類チャンネルロドプシン発現ラット (ChR2+mVChR1) におけるビタミン A 投与前と 1 日後、3 日後、7 日後の視覚誘発電位の比較 (光条件: 650nm / 525nm / 465nm, 20 / 80 / 160µW/mm<sup>2</sup>)

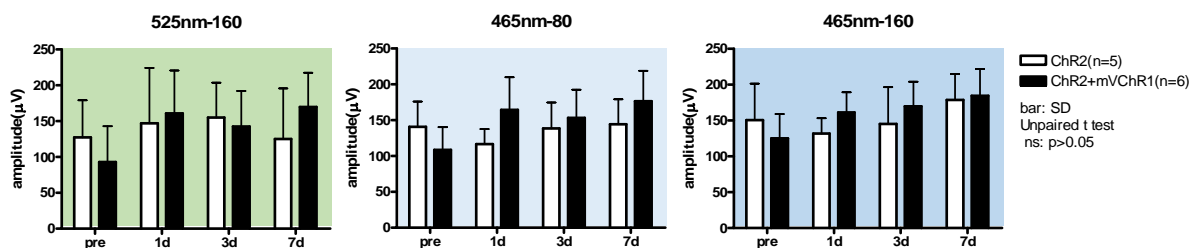


図 2. ビタミン A 投与前と 1 日後、3 日後、7 日後における 2 種類チャンネルロドプシン発現ラット (ChR2+mVChR1) および単独チャンネルロドプシン発現ラット (ChR2) の視覚誘発電位の比較 (光条件、左から: 525nm, 160µW/mm<sup>2</sup>/ 465nm, 80µW/mm<sup>2</sup>/ 465nm, 160µW/mm<sup>2</sup>)

この有意差があった光条件下での応答は、ChR2 単独発現しているラットと有意差は無かった (図 2)。これまでに、異なるチャンネルロドプシン (ChR) を二種類持つラットはそれぞれ 1 種類ずつ有するラットに比べ、最大応答が低くなる傾向にあることを見出しており (論文発表済み) その低下の要因のひとつは発色団が不足する可能性を提唱してきた。以上の結果から、二種類の ChR を有するラットでは、ChR 機能発現に必須のビタミン A の不足により RAL の競合が起こったことで視覚誘発電位が低下し、ビタミン A の投与により機能が改善したと考えられた。

視細胞変性網膜に mVChR1 を発現させることで、レチナールの合成が再活性化されていることが明らかとなり、網膜神経節細胞への RAL 供給は網膜色素上皮細胞およびミュラー細胞が関わっていることが示唆された。本年度行った 2 種類の異なる ChR を発現するラットの視覚誘発電位から RAL の競合が考えられ、ビタミン A 投与により ChR 機能向上に寄与している可能性があると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kikuchi Yuki, Sugano Eriko, Yuki Shiori, Tabata Kitako, Endo Yuka, Takita Yuya, Onoguchi Reina, Ozaki Taku, Fukuda Tomokazu, Takai Yoshihiro, Kurose Takahiro, Tanaka Koichi, Honma Yoichi, Perez Eduardo, Stock Maxwell, Fernandez Jose R., Tamura Masanori, Voronkov Michael, Stock Jeffrey B., Tomita Hiroshi	4. 巻 23
2. 論文標題 SIG-1451, a Novel, Non-Steroid Anti-Inflammatory Compound, Attenuates Light-Induced Photoreceptor Degeneration by Affecting the Inflammatory Process	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8802 ~ 8802
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23158802	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Hatakeyama Akito, Sugano Eriko, Sayama Tatsuki, Watanabe Yoshito, Suzuki Tomoya, Tabata Kitako, Endo Yuka, Sakajiri Tetsuya, Fukuda Tomokazu, Ozaki Taku, Tomita Hiroshi	4. 巻 24
2. 論文標題 Properties of a Single Amino Acid Residue in the Third Transmembrane Domain Determine the Kinetics of Ambient Light-Sensitive Channelrhodopsin	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5054 ~ 5054
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24055054	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tabata Kitako, Sugano Eriko, Hatakeyama Akito, Watanabe Yoshito, Suzuki Tomoya, Ozaki Taku, Fukuda Tomokazu, Tomita Hiroshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Phototoxicities Caused by Continuous Light Exposure Were Not Induced in Retinal Ganglion Cells Transduced by an Optogenetic Gene	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6732 ~ 6732
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22136732	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe Yoshito, Sugano Eriko, Tabata Kitako, Hatakeyama Akito, Sakajiri Tetsuya, Fukuda Tomokazu, Ozaki Taku, Suzuki Tomoya, Sayama Tatsuki, Tomita Hiroshi	4. 巻 6
2. 論文標題 Development of an optogenetic gene sensitive to daylight and its implications in vision restoration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 npj Regenerative Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41536-021-00177-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小野口玲奈、菅野江里子、佐渡愛、新林史悠、田端希多子、富田浩史
2. 発表標題 硝子体内投与で用いる AAV 基剤の検討
3. 学会等名 第42回日本眼薬理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村悠、菅野江里子、岩間優記、田端希多子、富田浩史
2. 発表標題 アニオンチャンネルロドプシンを用いた視細胞保護の可能性
3. 学会等名 第42回日本眼薬理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 遠藤由佳、菅野江里子、福田智一、世古裕子、田端希多子、富田浩史
2. 発表標題 ダイレクトリプログラミング法による網膜 Muller 細胞から視細胞への分化 誘導条件の検討
3. 学会等名 第42回日本眼薬理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅野江里子、畠山暁斗、田端希多子、佐山達樹、小野口玲奈、遠藤由佳、木村悠、富田浩史
2. 発表標題 シンポジウム 視覚再生/オプトジェネティクスと創薬「オプトジェネティクス技術による網膜変性阻止および視覚再建の可能性」
3. 学会等名 第42回日本眼薬理学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅野江里子、畠山暁斗、田端希多子、佐山達樹、小野口玲奈、遠藤由佳、木村悠、富田浩史
2. 発表標題 オプトジェネティクス遺伝子の開発と網膜疾患への応用
3. 学会等名 第43回レーザー学会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 菊地 由樹、菅野 江里子、田端 希多子、渡邊 義人、佐渡 愛、富田 浩史
2. 発表標題 新規ステップ関数型オプシンによる網膜神経細胞保護
3. 学会等名 第41回 日本眼薬理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐渡愛、菅野江里子、田端希多子、新林史悠、小野口玲奈、富田浩史
2. 発表標題 遺伝子治療による視覚再生後の脳の可塑性～視覚野の可塑性～
3. 学会等名 第41回 日本眼薬理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 畠山暁斗、渡邊義人、菅野江里子、田端希多子、佐山達紀、鈴木智也、富田浩史
2. 発表標題 マイクロワットオーダーの光に応答する高感度型チャンネルロドプシンの開発
3. 学会等名 第43回 日本光医学・光生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐渡愛、菅野江里子、田端希多子、新林史悠、小野口玲奈、富田浩史
2. 発表標題 オプトジェネティクスによる視覚再生後の視覚野の可塑性
3. 学会等名 細胞ダイバース 第4回若手ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新林史悠、菅野江里子、田端希多子、佐渡愛、富田浩史
2. 発表標題 オプトジェネティクスによるパーキンソン病モデルラットの行動評価
3. 学会等名 細胞ダイバース 第4回若手ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 畠山暁斗、渡邊義人、菅野江里子、田端希多子、佐山達紀、鈴木智也、富田浩史
2. 発表標題 日光光レベルの光に応答する高感度チャネルロドプシンの開発
3. 学会等名 細胞ダイバース 第4回若手ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菊地由樹、菅野江里子、田端希多子、渡邊義人、佐渡愛、富田浩史
2. 発表標題 オプトジェネティクスを用いた網膜神経細胞保護
3. 学会等名 細胞ダイバース 第4回若手ワークショップ
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	富田 浩史  (Tomita Hiroshi)  (40302088)	岩手大学・理工学部・教授   (11201)	
研究分担者	菅野 江里子  (Sugano Eriko)  (70375210)	岩手大学・理工学部・准教授   (11201)	
研究分担者	尾崎 拓  (Ozaki Taku)  (70621069)	岩手大学・理工学部・准教授   (11201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------