

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月20日現在

機関番号：11201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659804

研究課題名（和文） 一次視覚野への遺伝子導入による脳刺激型人工視覚

研究課題名（英文） Artificial sight produced by transducing genes into primary visual cortex

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

研究成果の概要（和文）：

本研究では、1. 皮質への遺伝子導入法、2. 導入効率の高いアデノ随伴ウイルスベクターの血清型の決定、3. 導入後の光反応性について調べた。AAV2型に比べAAV5型で導入効率が高いことが明らかとなったが、広範囲に遺伝子導入するためには更なる工夫が必要であると考えられた。また、プロモーターの種類により、光反応性が異なり、脳光刺激型人工視覚を成功させるためには、最適なプロモーターを検索する必要があると思われた。

研究成果の概要（英文）：

The transduction efficiency to the cortex using AAV type 2/5 was higher than that using AAV2/2. However we could not succeed to transfer to the broad area. It was limited to the only injection site. We tested two types of AAVs including a CAG or CaMKII promoter. Different light responsivities elicited by ChR2 transferred cortex were recorded depending on the promoter the AAV included. These results indicated that it is important to choose appropriate promoter to transfer a gene into the cortex.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：視覚再生、人工網膜、チャンネルロドプシン-2

1. 研究開始当初の背景

失明に対する視機能再建方法として、世界的に人工網膜（機械の眼）が研究されている。一般的な人工網膜の形態は、眼内に設置し、画像情報に基づいて残存する網膜細胞を電氣的に刺激し、脳へ視覚情報を伝達する仕組みである。この脳への情報伝達は網膜に残存

する神経節細胞（視神経）を介して行われるために、神経節細胞の変性による失明、あるいは外傷による失明は適応外である。これらの失明原因に対する視覚再建法として、視覚野を直接電氣的に刺激する、脳刺激型の人工視覚が研究されているが、普及するに至っていない。網膜神経節細胞の変性に代表される

失明を来す疾患として、緑内障が挙げられ、糖尿病網膜症と並んで、中途失明原因の上位に位置する。

これまでに我々は、視細胞（光受容細胞）の変性による失明に対する視機能再建の方法として、ChR2を神経節細胞に導入する視覚再生方法を検討し、遺伝盲ラットの視機能を回復できることを電気生理学的(Tomita H., et al., 2007, IOVS, 特許)、行動学的(Tomita H., et al., Exp. Eye Res., 2010)に明らかにしている。この方法では、1回の眼内注射で約30万個(30万画素)の神経節細胞が光受容細胞として機能し、現在、臨床研究が行われている人工網膜の最大1000画素に対し、遥かに高い解像度が期待される。また、ChR2が網膜神経節細胞に特異的に発現するトランスジェニックラットを用いた研究で、ChR2によって得られる視覚は、感受波長領域である青色に限定すると、正常網膜と同等の空間周波数特性を持つことを報告している(Tomita H., et al., 2009, PLoS ONE, 一般科学雑誌 NEWTON2月号)。しかしながら、この方法による視覚再生法は、神経節細胞が残存していることが必須条件であり、上述したような神経節細胞変性による失明には適応できない。失明原因の上位に位置する緑内障などの神経節細胞変性による失明に対する視覚再生法を開発する必要がある。

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可能である。本研究では、一次視覚野にChR2遺伝子を導入し、視覚野を直接、映像で刺激するという全く新しい脳刺激型人工視覚装置の基礎を築くことを目的とする。

3. 研究の方法

研究は以下の3課題を行った。

- (1) 視覚野への遺伝子導入技術の開発
- (2) 性質の異なるプロモーターを持つアデノ随伴ウイルスベクターの作製
- (3) 光反応性評価

実験には、遺伝的に視細胞変性を来す遺伝盲ラット (Royal College of Surgeons; RCS) を使用した。

皮質に広範囲に遺伝子導入を行う目的で、厚膜を剥離し、ウイルスベクター溶液を散布し

遺伝子導入を行う手法とマイクロシリッジで注入する方法を試みた。また、アデノ随伴ウイルスの血清型は2型と5型を使用した。また、上丘への遺伝子導入も試みた。遺伝子導入の確認は蛍光顕微鏡を用いた、ChR2のC末に融合した蛍光タンパク質の発現を指標にした。また、光反応性について、直接遺伝子導入部位に、468nmのLEDを照射し瞳孔反射を調べた。

4. 研究成果

アデノ随伴ウイルスベクター2型、および5型を用いて、注入による遺伝子導入法を検討したところ、両ウイルスで遺伝子の導入が確認された。導入効率は5型の方が高いことが確認された。一方、皮質の広い範囲に導入するために、厚膜を剥がし、ウイルス液を散布した。しかし、この方法では皮質に遺伝子を導入することができなかった。CAGではなくCaMKIIプロモーターを用いた場合にわずかに瞳孔反射が確認された。しかし、その発現効率はCAGプロモーターを用いた場合の方が高く、導入効率とその反応は必ずしも一致しなかった。

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6件)

1. Osawa S, Iwasaki M, Hosaka R, Matsuzaka M, Tomita H, Ishizuka T, Sugano E, Okumura E, Yawo H, Nakasato N, Tominaga T, Mushiaki H, 2013. Optogenetically Induced Seizure and the Longitudinal Hippocampal Network Dynamics, PUBLIC LIBRARY OF SCIENCE ONE, 査読有,8(4):e60928.
2. Sugano E, Isago H, Murayama N, Tamai M, Tomita H, 2013. Different anti-oxidant effects of thioredoxin 1 and thioredoxin 2 in retinal epithelial cells. Cell structure and Function, 査読有,38(1), 81-88.
3. Ozaki T, Nakazawa M, Yamashita T, Sorimachi H, Hata S, Tomita H, Isago H, Baba A, Ishiguro SI. 2012. Intravitreal injection or topical eye-drop application of a μ -calpain C2L domain peptide protects

- against photoreceptor cell death in Royal College of Surgeons' rats, a model of retinitis pigmentosa. *Biochimica et Biophysica Acta*, 査読有,1822(11); 1783-1795.
4. Wang Z, Sugano E, Isago H, Hiroi T, Tamai M, Tomita H. 2012. Notch signaling pathway regulates proliferation and differentiation of immortalized Muller cells under hypoxic conditions in vitro. *Neuroscience*, 査読有,214(12); 171-180.
 5. Isago H, Sugano E, Wang Z, Murayama N, Tamai M, Tomita H. 2012. Age-dependent differences in recovered visual responses in Royal College of Surgeons rats transduced with the Channelrhodopsin-2 gene. *Journal of Molecular Neuroscience*, 査読有,46(2); 393-400.
 6. Wang Z, Sugano E, Isago H, Hiroi T, Tamai M, Tomita H. 2011. Differentiation of neuronal cells from NIH/3T3 fibroblasts under defined conditions. *Development Growth and Differentiation*, 査読有, 53(3); 357-365.
- [学会発表] (計 13 件)
1. 菅野江里子, チャ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 (名古屋), 2012 年 10 月 6 日
 2. 砂金ひとみ, 菅野江里子, 村山奈美枝, 原富雄, 萩森一郎, 玉井信, 富田浩史, カニクイザルの片眼視細胞変性モデルの確立, 日本動物学会 (大阪) 2012 年 9 月 13 日
 3. 村山奈美枝, 菅野江里子, 砂金ひとみ, 斎藤建彦, 玉井信, 富田浩史, 変異型チャネルロドプシンのパッチクランプ法による評価, 日本動物学会 (大阪) 2012 年 9 月 13 日
 4. 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. XIVth International Symposium on Retinal Degeneration. Annual meeting Association for Research in Vision and Ophthalmology, Ft. Lauderdale, FL. 2012 年 5 月 9 日
 5. Sugano E, Isago H, Murayama N, Saitoh T, Tamai M, Tomita H. Restore vision covering visible light by using single gene, modified volvox channelrhodopsin-1. Annual meeting Association for Research in Vision and Ophthalmology, Ft. Lauderdale, FL. 2012 年 5 月 7 日
 6. 富田浩史, “遺伝治療による視覚再生” 近畿眼科先進医療研究会, 大阪, 2012 年 2 月 4 日 (研究会: 招待講演)
 7. 富田浩史. "緑藻類チャネルロドプシン遺伝子を用いた視覚再生研究: 現状と課題." 日本網膜色素変性症協会 (J R P S) 岩手県支部 総会・医療講演会, 盛岡: 2011 年 9 月 10 日
 8. Tomita H, Visual properties of genetically blind rats transduced with channelrhodopsin-2 gene, The 4th Global Chinese Ophthalmic Conference, Guangzhou, China: 2011 年 9 月 8 日 (招待講演)
 9. 富田浩史, 菅野江里子, 砂金ひとみ, 王卓, 村山奈美枝, 玉井信. "遺伝子治療による視覚再建 ~ 緑藻類由来遺伝子の利用 ~." 第 17 回バーチャルリアリティ心理学研究会, 富山 (国際会議場): 2011 年 7 月 23 日 (研究会: 招待講演)
 10. 富田浩史. "緑藻類チャネルロドプシン

遺伝子を用いた視覚再生研究：現状と課題." 日本網膜色素変性症協会（J R P S）三重県支部 総会・医療講演会, 大阪: 2011年6月21日

11. 富田浩史. "緑藻類チャネルロドプシン遺伝子を用いた視覚再生研究：現状と課題." 日本網膜色素変性症協会（J R P S）福岡県支部 総会・医療講演会, 福岡:2011年6月5日 富田浩史, 菅野江里子, 砂金ひとみ, 王卓, 村山奈美枝, 玉井信. "視覚再生研究の新たな展開." 日本眼科学会総会 イブニングセミナー, 東京 (東京国際フォーラム): 2011年5月13日 (セミナー：招待講演)
12. Sugano E, Tomita H, Isago H, Hiroi T, Wang Z, Tamai M. Effective Time Point For Channelrhodopsin-2 mediated Gene Therapy After Photoreceptor Degeneration In RCS Rats. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Ft. Lauderdale, 2011年5月1日

[図書] (計4件)

1. 菅野江里子, 富田浩史, (株)エヌ・ティー・エス出版, オプトジェネティクス(光遺伝学)～光工学と遺伝学による行動制御技術の最前線～「チャネルロドプシンによる遺伝子治療の開発」 p248-257, 2013.
2. Tomita H, Sugano E, Isago H, Tamai M. InTech Books, Gene Therapy for Retinitis pigmentosa, Gene Therapy / Book 2", ISBN 980-953-307-690-9, p494-507,2012.
3. 富田浩史, 菅野江里子, 社団法人日本眼科学会出版, 【網膜の視覚再生】 わかりやすい臨床講座 チャネルロドプシンを用いた視覚再生、日本の眼科,82(12), 1602-1607. ISSN: 0285-1326, 2011.
4. 富田浩史, メディカルトリビューン社発

行,「遺伝子治療による新たな視覚再生法チャネルロドプシン遺伝子導入が鍵」, Medical Tribune, 44(24), p.48, 2011.

[その他]

ホームページ等
岩手大学工学部
http://www.eng.iwate-u.ac.jp/jp/profile/tomita_hiroshi.html
東北大学臨床試験推進センター
<http://www.crieto.hosp.tohoku.ac.jp/seedlist/seed14.html>
東北大学脳科学センター
http://www.bsc.tohoku.ac.jp/contents/c2_32/c2_32_tomita_h.html

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

菅野 江里子 (SUGANO ERIKO)
岩手大学・工学部・特任准教授
研究者番号：70375210

伊藤 拓哉

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教
研究者番号：70396539

(平成24年5月8日 追加)