

Title	光遺伝学を応用した新しい視覚再生技術の確立
Sub Title	Establishment of a novel visual restoration technology utilizing optogenetics
Author	栗原, 俊英(Kurihara, Toshihide)
Publisher	福澤基金運営委員会
Publication year	2024
Jtitle	福澤諭吉記念慶應義塾学事振興基金事業報告集 (2023.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究では、光遺伝学を応用した新しい視覚再生技術の確立を目指し、キメラロドプシンを用いた遺伝子治療法を開発し、その視覚再生効果および網膜変性抑制効果の検証を行った。網膜色素変性や萎縮型加齢黄斑変性は、視細胞が変性し消失する一方、他の網膜神経細胞が残存しているという特徴があり、その残存細胞を利用した視覚再生技術がオプトジェネティクス(光遺伝学)セラピーとして国内外で注目されている。従来の光遺伝学技術では、光感受性が低いため、強い光が必要であり、暗所や屋内での効果が限定的であった。本研究では、微生物型ロドプシンと動物型ロドプシンを融合させたキメラロドプシンを使用することで、この課題を克服し、より低い光環境でも視覚再生を可能とする技術を開発した。 これにより、暗所や屋内などの低光環境においても残存する網膜神経細胞が再活性化され、視覚機能が回復することが示された。さらに、視細胞の変性進行を抑制する効果も確認されており、視覚再生だけでなく、網膜変性疾患の予防にも大きく寄与する可能性が高いと考えられ、このメカニズムの解明を行った。 まず、HPLC (高速液体クロマトグラフィー) を用いてビタミンA代謝産物である11-cis-retinalおよびall-trans-retinalの定量評価系を確立した。この評価系により、キメラロドプシンを導入したマウスモデルで光刺激によるall-trans-retinalへの異性化率の低下を確認し、11-cis-retinalが有意に多く残存することが確認された。さらに小胞体ストレスの電子顕微鏡での評価も実施し、小胞体の膨化、更にウェスタンブロッティングでの小胞体ストレスマーカーの低下で裏付けが得られた。本研究の成果は、視覚再生と網膜変性抑制を同時に実現する新しい治療法の開発に向けた重要な一歩であり、今後の臨床応用に期待が高まる。これにより、網膜変性疾患に苦しむ患者に対する新たな治療オプションの提供が現実味を帯び、特に従来の治療が難しかった症例にも有効な選択肢が提供できる可能性がある。 This study aimed to establish a novel visual restoration therapy utilizing optogenetics by developing a gene therapy approach using chimeric rhodopsin and evaluating its efficacy in restoring vision and preventing retinal degeneration. Retinitis pigmentosa and dry age-related macular degeneration (dry AMD) are characterized by the degeneration and loss of photoreceptors, while other retinal neural cells remain intact. Optogenetic therapy, which leverages these surviving cells to restore vision, has gained attention both domestically and internationally. However, conventional optogenetic techniques suffer from low photosensitivity, requiring strong light sources, thus limiting their efficacy in low-light environments such as indoors or in dim settings. To overcome this challenge, we developed a therapy using chimeric rhodopsin, which combines microbial and animal-type rhodopsins, enabling vision restoration even in low-light conditions. This approach demonstrated that residual retinal neural cells could be reactivated, resulting in the recovery of visual function in low-light environments such as indoors or in darkness. Furthermore, we confirmed that this therapy not only restored vision but also had a significant protective effect against the progression of photoreceptor degeneration, contributing to the prevention of retinal degenerative diseases. The mechanisms underlying these effects were further elucidated. Initially, we established a quantitative evaluation system for vitamin A metabolites, including 11-cis-retinal and all-trans-retinal, using high-performance liquid chromatography (HPLC). This system allowed us to confirm a reduced isomerization rate to all-trans-retinal in chimeric rhodopsin-introduced mouse models under light stimulation, with a significant increase in the residual amount of 11-cis-retinal. Additionally, electron microscopy revealed evidence of reduced endoplasmic reticulum (ER) swelling, and Western blotting confirmed a decrease in ER stress markers, further supporting the protective effects observed. The results of this study represent an important step toward the development of a new therapy that simultaneously achieves both visual restoration and the suppression of retinal degeneration. The potential for clinical application is highly anticipated, offering new treatment options for patients

	suffering from retinal degenerative diseases. This could be particularly beneficial for cases where conventional treatments have been ineffective, providing a novel and viable alternative for restoring vision.
Notes	申請種類：福澤基金研究補助
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO12003001-20230001-0037

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

2023年度 福澤基金研究補助研究成果実績報告書

研究代表者	所属	医学部臨床教室	職名	准教授	補助額	1,500千円
	氏名	栗原 俊英	氏名（英語）	Toshihide Kurihara		

研究課題（日本語）

光遺伝学を応用した新しい視覚再生技術の確立

研究課題（英訳）

Establishment of a novel visual restoration technology utilizing optogenetics

研究組織

氏 名 Name	所属・学科・職名 Affiliation, department, and position
栗原俊英 (Toshihide Kurihara)	慶應義塾大学医学部眼科学教室・准教授
堅田侑作 (Yusaku Katada)	慶應義塾大学医学部眼科学教室・特任助教

1. 研究成果実績の概要

本研究では、光遺伝学を応用した新しい視覚再生技術の確立を目指し、キメラロドプシンを用いた遺伝子治療法を開発し、その視覚再生効果および網膜変性抑制効果の検証を行った。網膜色素変性や萎縮型加齢黄斑変性は、視細胞が変性し消失する一方、他の網膜神経細胞が残存しているという特徴があり、その残存細胞を利用した視覚再生技術がオプトジェネティクス(光遺伝学)セラピーとして国内外で注目されている。従来の光遺伝学技術では、光感受性が低いため、強い光が必要であり、暗所や屋内での効果が限定的であった。本研究では、微生物型ロドプシンと動物型ロドプシンを融合させたキメラロドプシンを使用することで、この課題を克服し、より低い光環境でも視覚再生を可能とする技術を開発した。

これにより、暗所や屋内などの低光環境においても残存する網膜神経細胞が再活性化され、視覚機能が回復することが示された。さらに、視細胞の変性進行を抑制する効果も確認されており、視覚再生だけでなく、網膜変性疾患の予防にも大きく寄与する可能性が高いと考えられ、このメカニズムの解明を行った。

まず、HPLC（高速液体クロマトグラフィー）を用いてビタミンA代謝産物である11-cis-retinalおよびall-trans-retinalの定量評価系を確立した。この評価系により、キメラロドプシンを導入したマウスモデルで光刺激によるall-trans-retinalへの異性化率の低下を確認し、11-cis-retinalが有意に多く残存することが確認された。さらに小胞体ストレスの電子顕微鏡での評価も実施し、小胞体の膨化、更にウェスタンブロッティングでの小胞体ストレスマーカーの低下で裏付けが得られた。

本研究の成果は、視覚再生と網膜変性抑制を同時に実現する新しい治療法の開発に向けた重要な一歩であり、今後の臨床応用に期待が高まる。これにより、網膜変性疾患に苦しむ患者に対する新たな治療オプションの提供が現実味を帯び、特に従来の治療が難しかった症例にも有効な選択肢が提供できる可能性がある。

2. 研究成果実績の概要（英訳）

This study aimed to establish a novel visual restoration therapy utilizing optogenetics by developing a gene therapy approach using chimeric rhodopsin and evaluating its efficacy in restoring vision and preventing retinal degeneration. Retinitis pigmentosa and dry age-related macular degeneration (dry AMD) are characterized by the degeneration and loss of photoreceptors, while other retinal neural cells remain intact. Optogenetic therapy, which leverages these surviving cells to restore vision, has gained attention both domestically and internationally. However, conventional optogenetic techniques suffer from low photosensitivity, requiring strong light sources, thus limiting their efficacy in low-light environments such as indoors or in dim settings. To overcome this challenge, we developed a therapy using chimeric rhodopsin, which combines microbial and animal-type rhodopsins, enabling vision restoration even in low-light conditions.

This approach demonstrated that residual retinal neural cells could be reactivated, resulting in the recovery of visual function in low-light environments such as indoors or in darkness. Furthermore, we confirmed that this therapy not only restored vision but also had a significant protective effect against the progression of photoreceptor degeneration, contributing to the prevention of retinal degenerative diseases. The mechanisms underlying these effects were further elucidated.

Initially, we established a quantitative evaluation system for vitamin A metabolites, including 11-cis-retinal and all-trans-retinal, using high-performance liquid chromatography (HPLC). This system allowed us to confirm a reduced isomerization rate to all-trans-retinal in chimeric rhodopsin-introduced mouse models under light stimulation, with a significant increase in the residual amount of 11-cis-retinal. Additionally, electron microscopy revealed evidence of reduced endoplasmic reticulum (ER) swelling, and Western blotting confirmed a decrease in ER stress markers, further supporting the protective effects observed.

The results of this study represent an important step toward the development of a new therapy that simultaneously achieves both visual restoration and the suppression of retinal degeneration. The potential for clinical application is highly anticipated, offering new treatment options for patients suffering from retinal

degenerative diseases. This could be particularly beneficial for cases where conventional treatments have been ineffective, providing a novel and viable alternative for restoring vision.

3. 本研究課題に関する発表			
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年 月 (著書発行年 月・講演年月)
Yusaku Katada, Kazuho Yoshida, Naho Serizawa, Deokho Lee, Kenta Kobayashi, Kazuno Negishi, Hideyuki Okano, Hideki Kandori, Kazuo Tsubota, and Toshihide Kurihara	Highly-sensitive visual restoration and protection via ectopic expression of chimeric rhodopsin in mice	iScience	2023年10月