慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	キメラロドプシンを利用した高感度OFF経路視覚再生遺伝子治療の研究
Sub Title	Study of highly sensitive OFF visual restoration gene therapy using chimeric rhodopsin
Author	堅田, 侑作(Katada, Yusaku)
Publisher	
Publication year	2022
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2021.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究ではOFF経路再生の検討のため、網膜神経節細胞でのみチャネルロドプシン遺伝子が発現するマウス(5B-ChR)と、網膜神経節細胞とアマクリン細胞でチャネルロドプシン遺伝子を発現するマウス(M4-ChR)を作成し、網膜変性を薬剤性に誘導し、アマクリン細胞へのチャネルロドプシンの遺伝子導入でOFF反応が再生されるか検討を行った。 結果、5B-ChRからは想定通り、ON応答のみが得られたが、M4-ChRから得られた反応もON応答のみであった。一方、OKRでは5B-ChR では再生効果が認められなかたが、M4-ChRのみで再生効果が認められた。 In this study, to investigate OFF pathway regeneration, we generated mice in which the channelrhodopsin gene is expressed only in retinal ganglion cells (5B-ChR) and mice in which the channelrhodopsin gene is expressed in both retinal ganglion cells and amacrine cells (M4-ChR), induced retinal degeneration in a drug-induced manner. Then, I examined whether the OFF response could be regenerated by gene transfer of channelrhodopsin into amacrine cells. The results showed that only ON response was obtained from 5B-ChR, as expected, but the response obtained from M4-ChR was also only ON response. On the other hand, OKR showed no regenerative effect in 5B-ChR, but only in M4-ChR.
Notes	研究種目：研究活動スタート支援 研究期間：2019～2021 課題番号：19K24053 研究分野：再生医療
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_19K24053seika

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.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　４ 年　 ６ 月　 ７ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2019～2021
課題番号：１９Ｋ２４０５３

研究課題名（和文）キメラロドプシンを利用した高感度OFF経路視覚再生遺伝子治療の研究

研究課題名（英文）Study of highly sensitive OFF visual restoration gene therapy using chimeric rhodopsin

研究代表者

堅田　侑作（KATADA, Yusaku）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任助教

研究者番号：４０６４５８３４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではOFF経路再生の検討のため、網膜神経節細胞でのみチャネルロドプシン遺伝子が発現するマウス(5B-ChR)と、網膜神経節細胞とアマクリン細胞でチャネルロドプシン遺伝子を発現するマウス(M4-ChR)を作成し、網膜変性を薬剤性に誘導し、アマクリン細胞へのチャネルロドプシンの遺伝子導入でOFF反応が再生されるか検討を行った。
結果、5B-ChRからは想定通り、ON応答のみが得られたが、M4-ChRから得られた反応もON応答のみであった。一方、OKRでは5B-ChR では再生効果が認められなかたが、M4-ChRのみで再生効果が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
スターバーストアマクリン細胞へのChRの導入によって方向性のある刺激の再生ができることが示唆された。将来系には、オプトジェネティクスを利用した視覚再生治療でアマクリン細胞へのチャネルロドプシン導入の有用性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, to investigate OFF pathway regeneration, we generated mice in which the channelrhodopsin gene is expressed only in retinal ganglion cells (5B-ChR) and mice in which the channelrhodopsin gene is expressed in both retinal ganglion cells and amacrine cells (M4-ChR), induced retinal degeneration in a drug-induced manner. Then, I examined whether the OFF response could be regenerated by gene transfer of channelrhodopsin into amacrine cells.
The results showed that only ON response was obtained from 5B-ChR, as expected, but the response obtained from M4-ChR was also only ON response. On the other hand, OKR showed no regenerative effect in 5B-ChR, but only in M4-ChR.

研究分野：再生医療

キーワード：視覚再生　遺伝子治療　網膜色素変性

※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、研究者個人に帰属します。

様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

現在に至るまで予防法も治療法もなく早期の治療法の確立が望まれる失明疾患として、網膜色素変性症・萎縮型加齢黄斑変性がある。これらは共に網膜視細胞が変性消失する疾患である一方、他の網膜細胞は保たれているという共通した表現型を持つ。特に脳との連絡を担う網膜神経節細胞が残存しているため、これを利用した視覚再生研究が国内外で行われている。
そのうちの一つが遺伝子治療によるアプローチである。近年、オプトジェネティクス技術の発展に伴い、チャネルロドプシンをはじめとする光駆動タンパク質を遺伝子導入することで、細胞レベルでの光制御による機能操作が可能となった。この技術を応用し、変性網膜の残存神経細胞に光駆動能を付与することで、視覚再生効果が期待できることが、非臨床レベルで明らかとなっている(Bi et al, Neuron 2006)。しかし、先行研究で使用されている遺伝子は大きな問題として、光の感度が低いということがあり、具体的には屋外光レベルの光量が必要となるため、暗い屋内や夜道などでは、視覚が期待できなかった。そこで申請者らは、キメラロドプシンという、微生物型ロドプシンと動物型ロドプシンをハイブリッドさせることで生まれた、光感受性に G タンパク質を活性化するキメラロドプシン (Nakatsuma et al. Biophys J 2011. Sasaki　et al. PLoS One. 2014) を使うことによって、感度の問題を克服し、また予防効果も見出した (堅田ら 第 122 回日本眼科学会総会 学術展示優秀賞受賞) 。
一方で網膜には単純に明るさを感じる光伝達経路(ON 経路)だけではなく、暗さを感じる機能(OFF 経路)が存在し、それによって境界やコントラスト、方向を感知している。さらには色覚の要素や明暗順応の要素など、網膜は多くの機能を担っていることが知られているが、その光伝達回路は未解明の部分が多い。
本研究課題ではそういった未解明の網膜回路の機能を解明するとともに、それをいかに視覚再生に応用し、健常人の視機能を再現できるか、という学術的問いを検討する背景がある。

２．研究の目的

そこで、本研究では先述の暗さを感じる機能(OFF 経路)の高感度な再生を検証することを目的とする。これまで、OFF 経路の再生についてはハエを使ったモデル(Mauss et al. Sci Rep. 2017) などが報告されているが、これは ON 経路と同様感度が低いもので、一方我々が独自に開発したキメラロドプシンを利用した視覚再生手法 (特許出願中)は、高い感度が実現できることからヒトへの臨床応用性が高い。また、本研究の成果から、特に境界検出やコントラスト感知、方向選択といった高次の視覚機能の再生が期待され、また帰納的に網膜回路の一端の解明に繋がる創造性が期待できる。

３．研究の方法

<u>・OFF 経路視覚再生モデルマウスの作製</u>
本研究では OFF 経路再生の検討のため、tetO-ChR2 (RBRC05843), Chrm4-tTA (RBRC09551)と Htr5b-tTA (RBRC05445)を交配し、網膜神経節細胞でのみチャネルロドプシン遺伝子が発現するマウス Htr5b-tTA::tetO-ChR2 (5B-ChR)と、網膜神経節細胞とアマクリン細胞でチャネルロドプシン遺伝子を発現するマウス Chrm4-tTA::tetO-ChR2 (M4-ChR)を作成した。次に網膜変性を誘導するため、N-methyl-N-nitrosourea (MNU)を腹腔内投与し、網膜変性の生じる投与後 2 週経過観察した。それらのマウスに対し、アマクリン細胞へのチャネルロドプシンの遺伝子導入で OFF 反応が再生されるか検討を行った。

<u>・OFF 経路視覚再生モデルマウスの視覚再生効果の検証</u>
多電極アレー(Multi-electrode array; MEA)を用いて ex vivo での網膜神経節細胞細胞外電位測定を行う。その中で、OFF 刺激に対する応答、コントラストや方向選択的な刺激に対する反応も確認した。また薬理学的手法を用いて、その再生された網膜回路に関する検討も行った。
視覚誘発電位測定(Visual evoked potentials; VEP)を用いて視覚刺激に対する中枢での応答を確認、眼球運動反射測定(Optokinetic reflex; OKR)、明暗選択箱試験(Light/dark transition test; LDT)などを用いて行動レベルでの再生効果の検討を行った。

<u>・予防効果の検証と機序解明</u>
以前のキメラロドプシンでも認められた予防効果が同様に認められるか検討するとともに、その作用機序の解明を HPLC、qPCR、Western Blotting などを用いて行う。

P23H マウスを使用し、P0 で AAV-CMV-キメラロドプシンベクターの網膜下投与を行い、遺伝子が発現する投与後 8 週以降に評価を行った。
HPLC は 6 時間以上暗順応させたマウスに、所定の光刺激を実施し、その後直ちに赤色照明下で頸椎脱臼によりサクリファイスし、摘出した網膜サンプルをホモジナイズ、オキシム化し、酢酸エチル及びヘ

キサンで抽出した。
抽出したサンプルを HPLC 機器にロードし、解析を行った。

４．研究成果

・OFF 経路視覚再生

MEA の結果、5B-ChR からは想定通り、ON 応答のみが得られたが、アマクリン細胞にも ChR2 が発現している M4-ChR から得られた反応も ON 応答のみであった。VEP や LDT では M4-ChR の方が視覚再生効果が高いことが示された。一方、OKR では 5B-ChR では再生効果が認められなかったが、M4-ChR のみで再生効果が認められた。このことから M4-ChR におけるアマクリン細胞での ChR2 の発現は、OFF 応答を再生しないが、OKR の再生から縞刺激に対する応答性は再生することができ、また M4-ChR のアマクリン細胞はスターバーストアマクリン細胞であったことから、スターバーストアマクリン細胞への ChR の導入によって方向性のある刺激の再生ができることが示唆された。将来系には、オプトジェネティクスを利用した視覚再生治療でアマクリン細胞へのチャネルロドプシン導入の有用性が示唆された。

・予防効果の検証と機序解明

本研究ではまず、予防効果の確認の目的で、レチノイド分析手法の確立を行った。
具体的には網膜サンプル中の All-trans-retinal と 11-cis-retinal の定性的な分析手法を確立した。これによって網膜中の All-trans-retinal と 11-cis-retinal の存在比を測定することが可能となった。
さらに、オキシム法による網膜サンプルからのレチナール抽出方法の最適化、カラムの検討、HPLC の条件検討を実施し、1 網膜からでも All-transretinal と 11-cis-retinal を鋭敏に検出できる最適な条件を見出した。
これを使ってキメラロドプシン導入網膜のレチノイド分析を行ったところ、キメラロドプシンの導入によって、11-cis-retinal の存在比が変化する傾向が認められたが、有意差は認められなかった。これは in vivo でマウスに行う光照射で網膜に届く光量がマウスの姿勢などによってばらつくことが、測定結果のばらつきに影響していると考えられ、今後刺激系の改善が必要と考えられた。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計1件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 堅田侑作、小林憲太、神取秀樹、坪田一男、栗原俊英
２．発表標題 キメラロドプシンを用いた網膜色素変性症に対する視覚再建手法の検討
３．学会等名 第41回日本炎症再生医学会
４．発表年 2020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

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