

201122030A

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業（感覚器障害分野）

新規開発マルチカラー化チャネルロドプシン遺伝子
を用いた視覚再生研究

（H21－感覚－一般－008）

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 富田 浩史

平成24（2012）年 4月

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業（感覚器障害分野）

新規開発マルチカラー化チャンネルロドプシン遺伝子
を用いた視覚再生研究
(H21-感覚-一般-008)

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 富田 浩史

平成24（2012）年 4月

目 次

I. 総括研究報告	----- 1
新規開発マルチカラー化チャネルロドプシン遺伝子を用いた視覚再生研究	
研究代表者： 富田浩史	(国際高等研究教育機構)
研究分担者： 玉井信	(大学院医学系研究科)
	石塚徹 (大学院生命科学研究科)
	菅野江里子 (国際高等研究教育機構)
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----11
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----13

I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金 障害者対策総合研究事業（感覚器障害分野）

総括研究報告書

新規開発マルチカラー化チャンネルロドプシン遺伝子を用いた視覚再生研究

研究代表者：富田 浩史 国際高等研究教育機構 准教授

研究要旨

一旦失明に至ると、その視機能を再建する方法はない。我々は、高い解像度を持つ視機能を作り出すことを目指して、緑藻類クラミドモナスの遺伝子(ChR2)を用いた視覚再生のための遺伝子治療を検討している。緑藻類ボルボックスのChRを改変したmVChR1は、パッチクランプおよび視覚誘発電位測定により、遺伝盲ラットに幅広い波長感受性を与えられることが明らかとなっている。mVChR1を導入することによって回復した視機能は測定期間を通して減弱することなく長期間維持され、また、オプトモーターを用いた行動解析で、mVChR1を導入したラットでは、白・黒の縞模様の回転にも反応し、ChR2（青型）を導入したラットと比較し、その反応性に違いが見られた。mVChR1、一つを遺伝子導入することで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。

研究分担者

玉井 信 大学院医学系研究科・名誉教授
石塚 徹 大学院生命科学系研究科・講師
菅野江里子 国際高等研究教育機構・助教

A. 研究目的

網膜色素変性症に対して、薬剤や遺伝子治療によって、変性を遅延させる方法が研究されているが、現時点では、有効な治療法は確立されていない。また、一旦失明に至ると、その視機能を再建する方法はない。視機能を再建する唯一の方法として、世界的に機器によって光受容を代用する人工網膜が研究されている。すでに、アメリカ、ドイツでは臨床研究が行われ、形やものの動きを判別できることが示され、人工網膜の有用性が示されている。

我々は、緑藻類クラミドモナスが持つ光受容イオンチャンネル遺伝子

(Channelrhodopsin-2: ChR2) を利用した独自の遺伝子導入による視覚再生法を検討している。これまでの研究で、ChR2 の遺伝子導入によって、ChR2 の感受波長である青色に限定すると、高度な視機能が作られることが明らかになっている。しかしながら、波長感受性が青色領域に限定されるため、540nm以上の波長は感受できない。一方、ボルボックス由来チャンネルロドプシン1(VChR1)は、クラミドモナス由来 ChR2 と同様に光受容陽イオンチャンネルとして機能し、その感受波長域はChR2 と異なり、感受波長ピークは550nm付近であることが知られている。我々は、このVChR1 遺伝子を改変し、哺乳類細胞で機能する改変型 VChR1(mVChR1)を作製し、550nmに波長感受性を持つことを示している。

本年度は、mVChR1 の遺伝子導入後、mVChR1 が長期間、安定して機能するかどうかの安全性研究と mVChR1 と ChR2 の機能的な差異を調べた。

B. 研究方法

昨年度、報告した赤方型チャンネルロドプシン(mVChR1:現在 JST 外国特許出願支援制度により PCT 出願中)を視細胞変性を来たす変性症ラット (RCS ラット) の網膜細胞に導入した。導入後、経時的に視覚誘発電位を測定し、回復した視機能が保持されているかを調べた。また、デジタルオプトモーターを用いて、行動学的に視機能の回復を調べ、青型 ChR と mVChR1 (赤型 ChR) の視機能を比較した。

また、回復される視機能を詳細に調べる目的で、カニクイザルでの視力検査プログラムの開発とカニクイザルのトレーニング、片眼失明モデルの作製に取り組んだ。

(倫理面への配慮)

本研究に用いる実験動物の取扱いは、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律を遵守し、国立大学法人東北大学遺伝子組換え実験安全管理規定のもとに、東北大学動物実験施設において、その規定に従って管理する。本研究に関わる全ての動物実験、遺伝子組み換え実験は東北大学各委員会に承認されている。

C. 研究結果

遺伝子導入後、経時的に視覚誘発電位を記録し、回復した視機能が長期間維持されるかどうかを調べた。回復した視機能は測定期間を通して減弱することなく長期間維持されていた。また、オプトモーターを用いた行動解析で、mVChR1 を導入したラットでは、青-黒の縞模様だけでなく、緑-黒、および白-黒の縞模様の回転にตอบสนองし、縞模様の回転に追従する行動を示した。反応し、ChR2 を導入したラットと比較し、その反応性に違いが見られた。

また、カニクイザルでの視力検査では、1ヶ月のトレーニングでカニクイザルは視力検査を習得した。カニクイザルの視細胞変性モデルは存在しないため、種々の薬剤を用いて視細胞を誘導することを試みた結果、光線力学療法で使用されるビスダインを静注し、網膜に光照射を行うことによって、照射部位に局限した視細胞変性を誘導できることが判明した。また、一酸化窒素を徐放する薬剤(NO donor)を硝子体内に投与することによって、網膜全層の視細胞変性を誘導することができた。しかしながら、NO donor を用いた場合、視細胞だけでなく、網膜内層にも若干の障害が観察された。

D. 考察

ボルボックス由来チャンネルロドプシン-1(VChR1)は、クラミドモナス由来 ChR2 に比べ、波長感受性が赤方にシフトしていることから、ChR2 と VChR1 の両者を利用して、可視光全域を見ることができ視覚を作り出せる可能性が考えられてきた。しかし、我々の研究では、VChR1 は哺乳類細胞で発現させた場合、正常に機能せず、光照射によって誘起される内向き電流は ChR2 に比べはるかに小さいものであった。また、それ自身の発現が細胞毒性として働くことも確認されていた。それに対し、我々が開発した改変型 VChR1 (mVChR1) は、幅広い波長感受性を持つとともに、長期間安定的に生体内で機能することが確認された。また、遺伝盲ラットを用いた研究で、行動学的に白色光にตอบสนอง性を示し、遺伝子治療による視覚再生に有用な遺伝子であることが示された。

E. 結論

黄色に波長感受性ピークを持ち幅広い波長に応答を示す mVChR1 を用いることによって、mVChR1 のみで可視光全域を見ることが可能と思われる。神経節細胞のタイプ別に遺伝子導入をする方法を現在検討中であり、これが可能となれば、ChR2 と mVChR1 を遺伝子導入することによって、色弁別も可能になるかもしれない。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Isago H, Sugano E, Wang Z, Murayama N, Koyanagi E, Tamai M, Tomita H. (2012) 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.

2. Wang Z, Sugano E, Isago H, Hiroi T, Tamai M, Tomita H. (2011) Differentiation of neuronal cells from NIH/3T3 fibroblasts under defined conditions. *Dev Growth Differ.* 53(3):357-65.

3. Asano T, Ishizuka T, Yawo H (2012) Optically controlled contraction of photosensitive skeletal muscle cells. *Biotechnol Bioeng.* 109(1):199-204.

4. Konno A, Honjo Y, Uchida A, Ishizuka T, Yawo H. (2011) Evaluation of Sindbis virus vector displaying immunoglobulin-binding domain - antibody-dependent infection to neurons in living mice. *Neurosci Res Neurosci Res.* 71(4):328-334.

5. Ji Z-G, Ito S, Honjoh T, Ohta H, Ishizuka T, Fukazawa Y, Yawo H. Light-evoked somatosensory perception of transgenic rats which express channelrhodopsin-2 in dorsal root ganglion cells. *PLoS ONE*, Doi: 10.1371/journal.pone.0032699. 2012

2. 学会発表

(口頭)

1. 江川遼、八尾寛：次世代シナプスモデルを用いた発達期シナプス刈込機構の研究。東北大学脳科学 GCOE 異分野融合研究報告会、仙台、2012年3月2日

2. 浅野豪文、石塚徹、八尾寛：オプトジェネティクスを用いた培養骨格筋の光操作。生体情報インターフェース創生のためのフォトニクス研究 - 共同プロジェクト研究会、仙台、2011年12月13日

3. 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

4. 浅野豪文、石塚徹、八尾寛：チャンネルロドプシンを用いた光刺激による筋収縮制御。第1回オプトジェネティクス講習会、仙台、2011年9月23日

5. 菅野江里子、チャンネルロドプシン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 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

(ポスター)

1. 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
2. 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
3. Abe Y, Sekino M, Fukazawa Y, Yawo H, Ohsaki H, Hisatsune T: Functional analysis of the hippocampus using Opto-fMRI. The 3rd International Conference on Cognitive Neurodynamics, Hokkaido, 2011年6月9-13日
4. Umeda K, Shoji W., Sakai S, Ishizuka T, Yawo H: Optogenetic stimulation of transgenic zebrafish expressing an optimized channelrhodopsin variant. 8th IBRO World Congress of Neuroscience, Florence (Italy), 2011年7月14~18日
5. Egawa R, Hososhima S, Ishizuka T, Nakamura H, Yawo H: Development of the calyx-type synapses in the embryonic chick ciliary ganglion – a brainbow study. 8th IBRO WORLD CONGRESS OF NEUROSCIENCE, Florence (Italy), 2011年7月14-18日
6. Yokose J, Ishizuka T, Yawo H: Simultaneous monitoring the caspase-activity under optogenetic actuation: a versatile probe for the study of activity-dependent neurogenesis. The 8th IBRO WORLD CONGRESS OF NEUROSCIENCE, Florence (Italy), 2011年7月15日
7. Sakai S, Ueno K, Honjoh T, Ishizuka T, Yawo H: Patterned optical activation of channelrhodopsin-expressing neurons and neural circuits: Multi-independent light stimulation system (MiLSS). 8th IBRO World Congress of Neuroscience Florence (Italy), 2011年7月15-19日
8. Tanimoto S, Wang H, Sugiyama Y, Ishizuka T, Yawo H: The molecular determinants involved in ion flux regulation of channelrhodopsins. 8th IBRO World Congress of Neuroscience, Florence (Italy), 2011年7月17日
9. Honjoh T, Ishizuka T, Yawo H: Optogenetic enhancement of synaptic network of rat hippocampus in vivo. 8th IBRO WORLD CONGRESS OF NEUROSCIENCE, Florence (Italy), 2011年7月18日
10. Egawa R, Hososhima S, Ishizuka T, Nakamura H, Yawo H: Synaptogenesis in the embryonic chick ciliary ganglion – a brainbow study. OIST International Workshop “Molecular & structural organization of presynaptic function and plasticity”, Okinawa, 2011年9月7-9日
11. Umeda K, Shoji W, Sakai S, Ishizuka T, Yawo H: Transgenic zebrafish expressing optimized channelrhodopsin in Rohon-Beard neurons: escape behavior by light. 第34回日本神経科学大会、横浜、2011年9月14~17日
12. Egawa R, Hososhima S, Ishizuka T, Nakamura H, Yawo H : ニワトリ胚毛様体神経節における杯状シナプスの形成 – Brainbow 法による解析。The 34th annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (NEURO2011)、横浜、2011年9月14-17日
13. Honjoh T, Ishizuka T, Yawo H: Optogenetic enhancement of synaptic network of rat hippocampus in vivo. 第34回日本神経科学大会、横浜市、2011年9月16日

14. Ueno K, Sakai S, Honjoh T, Yawo H: Patterned optogenetic activation of neurons and neural circuits: Multi-independent light stimulation system (MiLSS). 第34回日本神経科学大会、横浜、2011年9月16日
15. Kawazoe Y, Yawo H, Kimura K: A multi-worm optogenetic system for the nematode *C. elegans*. 第34回日本神経科学大会、横浜、2011年9月16日
16. Abe Y, Sekino M, Fukazawa H, Yawo H, Ohsaki H, Hisatsune T: Functional analysis of the hippocampus using optp-fMRI. 第34回日本神経科学大会、横浜、2011年9月16日
17. Kuki T, Matsuzaki Y, Fukazawa Y, Yawo H, Mushiake H: Analysis of functional connectivity among cortical layers during optogenetically induced perturbations. 第34回日本神経科学大会、横浜、2011年9月16日
18. Shimizu M, Yawata S, Miyamoto K, Miyasaka K, Asano T, Yoshinobu T, Yawo H, Ogura T, Ishiguro A: Toward Biorobotic Systems with Muscle Cell Actuators. The 5th International Symposium on Adaptive Motion in Animals and Machines (AMAM2011). 兵庫、2011年10月12日
19. Ito S, Ishizuka T, Yawo H: Ectopic projection of hippocampal synapses in pilocarpine-treated mice expressing synaptophysin. NIPS International Workshop 2011 Cutting Edge in Synapse Research, Okazaki, 2011年12月8~9日
20. Egawa R, Hososhima S, Ishizuka T, Nakamura H, and Yawo H: ニワトリ胚毛様体神経節における杯状シナプスの発達プロセス—Brainbow法による解析。生化学若い研究者の会 若手シンポジウム、仙台、2011年12月10日
21. 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ンネルロドプシン1遺伝子改変による感受波長の改善、第82回動物学会、旭川、2011年9月21日
22. 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回動物学会、旭川、2011年9月21日
23. 砂金ひとみ、菅野江里子、村山なみえ、玉井信、富田浩史：チャンネルロドプシン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回動物学会、旭川、2011年9月21日
24. 細島頌子、侯旭濱、仲村春和、石塚徹、八尾寛：Localization of the actin binding protein, coactosin that expressed in the developing chick ciliary ganglion. 第44回日本発生生物学会年会、沖縄、2011年5月19日
25. 八幡慎太郎、清水正宏、宮本浩一郎、宮坂恒太、浅野豪文、吉信達夫、八尾寛、小椋利彦、石黒章夫：光入力駆動が可能な筋細胞アクチュエータの開発。日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会2011 (ROBOMECH2011)、岡山、2011年5月27日
26. 伊藤信、酒井誠一郎、上野賢一、深澤有吾、太田宏之、石塚徹、虫明元、八尾寛：汎用性の高いオプトジェネティクス研究システムの提案。2011年度包括脳ネットワーク夏のワークショップ、神戸、2011年8月21~24日
27. 酒井誠一郎、石塚徹、八尾寛：海馬CA3錐体細胞樹状突起の周波数応答特性：チャンネルロドプシンによるオプト-カレントクランプ解析。第34回日本神経科学大会、横浜、2011年9月15-17日
28. 横瀬淳、石塚徹、八尾寛：海馬スライス培養における新生ニューロンの活動依存的生存評価のための新規光遺伝学プローブ。第34回日本神経科学大会、横浜、2011年9月16日

29. 細島頌子、侯旭濱、仲村春和、石塚徹、八尾寛 : Expression of the actin-binding proteins, coactosin and drebrin, in the developing chick ciliary ganglion. 第 34 回日本神経科学大会, 横浜, 2011 年 9 月 17 日
30. Tanimoto S, Wang H, Sugiyama Y, Ishizuka T, Yawo H: The molecular determinants involved in ion flux regulation of channel-rhodopsin-2. 第 34 回日本神経科学大会、横浜、2011 年 9 月 17 日
31. Teh DBL, Yokose J, Wang H, Sakai S, Ishizuka T, Yawo H: APACOP, a FRET apoptosis probe with manipulation of neuronal activity. 第 34 回日本神経科学大会、横浜、2011 年 9 月 17 日
32. 細島頌子、侯旭濱、仲村春和、石塚徹、八尾寛 : Distribution of the actin-binding protein, coactosin in the chick ciliary ganglion during embryonic synaptogenesis. 3rd UCL-Tohoku symposium, London, 2011 年 10 月 19 日
33. 八尾寛: 樹状突起における情報処理ダイナミクスの解明. 新学術領域研究「メゾスコピック神経回路から探る脳の情報処理基盤」平成 23 年度第 2 回領域班会議, 熱海, 2011 年 10 月 26-27 日
34. 浅野豪文、石塚徹、八尾寛 : 光収縮制御可能な培養筋細胞の開発。第 33 回日本バイオマテリアル学会大会、京都、2011 年 11 月 21 日
35. 太田宏之、酒井誠一郎、伊藤信、石塚徹、深澤 有吾、煙山健仁、晝間恵、虫明元、佐藤義昭、八尾寛、西田育弘 : ラット海馬における逆行的可塑性。生理研研究会「シナプス伝達概念志向型研究」、岡崎、2011 年 12 月 6 日
36. Egawa R, Hososhima S, Ishizuka T, Nakamura H, and Yawo H : ニワトリ胚毛様体神経節における杯状シナプスの発達プロセス—Brainbow 法による解析。東北脳科学ウィンタースクール、仙台・蔵王、2012 年 2 月 18-19 日
37. 菊地琴美、稲垣壮、田村篤史、柳川右千夫、八尾寛、森一生、小山内実 : 多細胞 Ca²⁺イメージングによるマウス線条体神経ネットワークの解明。第 89 回日本生理学会大会、長野県、松本市、2012 年 3 月 29 日
38. Ohta H, Sakai S, Ito S, Ishizuka T, Fukazawa Y, Kemuriyama T, Tandai-Hiruma M, Mushiake H, Sato Y, Yawo H, Nishida Y: Retrograde Plasticity in Hippocampus. 第 89 回日本生理学会大会、長野県、松本市、2012 年 3 月 29 日
39. Sakai S, Ueno K, Ishizuka T, Yawo H: Bidirectional and Patterned Photomanipulation of Neuronal activities Using Multi-independent Light Stimulation System (MiLSS). 第 89 回日本生理学会大会、長野県、松本市、2012 年 3 月 29 日

招待講演

1. Tomita H, Sugano E, Isago H, Murayama N, Wang Z, Tamai M : Gene therapy in optijalmology `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

2. Yawo H, Wen L, Sakai S, Wang H, Tanimoto S, Egawa R, Ishizuka T: Resonant rhythms generated by neurons and network – opto-current-clamp with optimized channel-rhodopsins. 第 84 回日本生化学会大会、京都、2011 年 9 月 21 日

3. 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

4. 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

5. 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

6. 菅野江里子、砂金ひとみ、富田浩史：藻類チャン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

7. 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

8. 菅野江里子、砂金ひとみ、富田浩史：チャンネルロドプシン-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

9. 八尾寛、石塚徹：新世代チャンネルロドプシンによるオプトジェネティクス。神経組織の成長・再生・移植研究会 第26回学術集会、東京、2011年6月25日

10. 八尾寛：光受容イオンチャンネル、チャンネルロドプシンの光受容—チャンネル構造・機能関連。CBI学会 第317回研究講演会、東京、2011年5月27日

11. 八尾 寛, 石塚徹:神経細胞活動の光制御. 電子情報通信学会技術研究報告「ME とバイオサイバネティクス」, 仙台, 2011年11月24日

12. 伊藤信、酒井誠一郎、上野賢一、深澤有吾、太田宏之、石塚徹、虫明元、八尾寛：中枢神経ネットワークモデルのオプトジェネティクス（光遺伝学）。日本薬学会第132年会企画シンポジウム「光が切り拓く新しい薬理学」、札幌、2012年3月30日

その他

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

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Isago H, Sugano E, Wang Z, Murayama N, Koyanagi E, Tamai M, Tomita H.	Age-Dependent Differences in Recovered Visual Responses in Royal College of Surgeons Rats Transduced with the Channelrhodopsin-2 Gene.	Journal of Molecular Neuroscience	46(2)	393-400	2012
Asano T, Ishizuka T, Yawo H.	Optically controlled contraction of photosensitive skeletal muscle cells.	Biotechnology and Bioengineering	109(1)	199-204	2012
Ji Z-G, Ito S, Honjoh T, Ohta H, Ishizuka T, Fukazawa Y, Yawo H.	Light-evoked somatosensory perception of transgenic rats which express channelrhodopsin-2 in dorsal root ganglion cells.	PLoS ONE	7(3)	e32699	2012
Wang Z, Sugano E, Isago H, Hiroi T, Tamai M, Tomita H.	Differentiation of neuronal cells from NIH/3T3 fibroblasts under defined conditions. Dev Growth Differ.	Development, Growth and Differentiation	53(3)	357-65	2011
Konno A, Honjo Y, Uchida A, Ishizuka T, Yawo H.	Evaluation of Sindbis virus vector displaying immunoglobulin-binding domain - antibody-dependent infection to neurons in living mice.	Neuroscience Research	71(4)	328-334	2011

その他

雑誌名	タイトル	巻・号	ページ
日本の眼科	チャンネルロドプシンを用いた視覚再生	82 巻 12 号 2011 年	1602-1607

III. 研究成果の刊行物・別刷

Age-Dependent Differences in Recovered Visual Responses in Royal College of Surgeons Rats Transduced with the Channelrhodopsin-2 Gene

Hitomi Isago · Eriko Sugano · Zhuo Wang ·
Namie Murayama · Eri Koyanagi · Makoto Tamai ·
Hiroshi Tomita

Received: 29 November 2010 / Accepted: 12 July 2011 / Published online: 27 July 2011
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract The objective of this study is to investigate age-related differences in recovered visual function in Royal College of Surgeons (RCS) rats transduced with the Channelrhodopsin-2 (ChR2) gene. An adeno-associated virus vector that contained *ChR2* was injected intravitreally into young or aged RCS rats. After 4 months, visual evoked potentials were recorded. To estimate the transduction efficiencies, ChR2V-expressing cells and retrograde labeled retinal ganglion cells (RGCs) were counted. After photoreceptor degeneration, immunohistochemistry was used to detect glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the retinas. The

amplitudes and latencies from young RCS rats were higher and shorter, respectively, than those from aged RCS rats. ChR2V was expressed in the RGCs of both groups of rats; there was no significant difference in the transduction efficiency of either group. However, the number of RGCs in aged RCS rats was significantly less than that in young RCS rats. In addition, strong GFAP immunoreactivity was observed after photoreceptor degeneration, whereas it was weaker in ChR2V-expressing RGCs. *ChR2* transduction produced photosensitive RGCs in both young and aged rats. However, the degree of recovery depended on the age at the time of transduction.

H. Isago · E. Sugano · Z. Wang · N. Murayama · E. Koyanagi ·
H. Tomita (✉)
Institute for International Advanced Interdisciplinary Research,
Tohoku University,
4-1 Seiryō-machi, Aoba-ku,
Sendai 980-8575, Japan
e-mail: hiroshi-tomita@iiares.tohoku.ac.jp

H. Tomita
Tohoku University School of Medicine United Centers for
Advanced Research and Translational Medicine,
Sendai, Japan

H. Tomita
Tohoku University Hospital Innovation of New Biomedical
Engineering Center,
Sendai, Japan

M. Tamai
Tohoku University Graduate School of Medicine,
Sendai, Japan

Z. Wang
Japan Foundation for Aging and Health,
Sendai, Japan

Keywords Channelrhodopsin-2 · Adeno-associated virus
vector · Royal College of Surgeons rat · Visual evoked
potentials

Introduction

Channelrhodopsin-2 (ChR2) (Nagel et al. 2003; Sineshchekov et al. 2002) is a 7-transmembrane protein that contains an all-*trans*-retinal chromophore (Tsuda et al. 1980) and functions as a light-driven cation-selective channel (Nagel et al. 2003). Since *ChR2* transduction can confer photosensitivity to neurons (Boyden et al. 2005; Ishizuka et al. 2006), channelrhodopsins have optogenetic applications to restore vision.

Retinitis pigmentosa (RP), the common inherited disease that causes blindness, has a prevalence of 1 in 4,000. Although RP is considered to be an incurable disease because photoreceptor cells are often degenerated, other retinal neurons, such as retinal ganglion cells (RGCs), that

are usually preserved can be used to restore vision (Humayun et al. 1999; Santos et al. 1997; Stone et al. 1992). For example, Bi et al. (2006) showed that transducing *ChR2* into RGCs restores the visual responses in the rd1 mouse model of RP (Bowes et al. 1990; McLaughlin et al. 1993). Similarly, we restored visual (Tomita et al. 2007) and behavioral responses (Tomita et al. 2010) in another type of genetically blind rats, Royal College of Surgeons rats and photoreceptor-degenerated Thy-1 *ChR2* transgenic rats (Tomita et al. 2009). Thus, *ChR2* gene therapy is a potentially promising treatment for RP patients with viable RGCs. The number of remaining RGCs depends on the disease progression. In severe cases, they may be eliminated (Humayun et al. 1999). In general, functional abnormalities of the inner retinal neurons and retinal remodeling occur after photoreceptor degeneration (Strettoi et al. 2002, 2003). However, the function of RGCs after photoreceptor degeneration is not completely understood.

To elucidate the age dependence of the function of the remaining RGCs after photoreceptor degeneration, we transduced *ChR2* into the RGCs of young and aged RCS rats and then measured their electrophysiological functions.

Materials and Methods

Animals

Young (6-month-old) and aged (10-month-old) male RCS (rdy/rdy) rats were purchased from CLEA Japan, Inc. These rats were maintained on a 12-h light–dark cycle

and fed standard laboratory chow and water ad libitum. All experiments were approved by the Animal Research Committee, Graduate School of Medicine, Tohoku University, Japan. In addition, the experimental procedures adhered to the Association for Research in Vision and Ophthalmology Statement for the Use of Animals in Ophthalmologic and Vision Research.

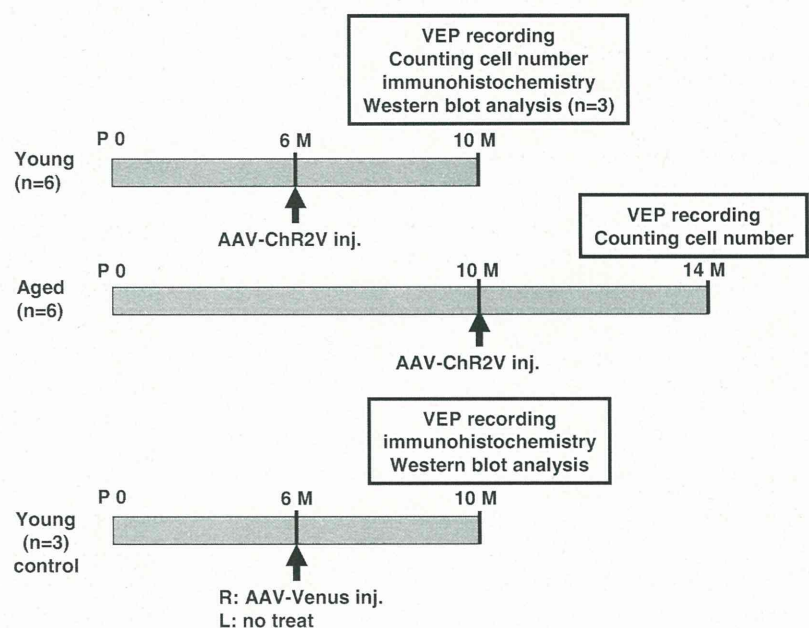
Preparation of the Adeno-Associated Virus Vector

The adeno-associated virus (AAV) vector with the *ChR2* gene was constructed as described previously (Tomita et al. 2007). Briefly, the first 315 amino acids of *ChR2* (GenBank Accession No. AF461397) were fused to Venus, a fluorescent protein. Then, the AAV Helper-Free System (Stratagene, La Jolla, CA) was used to produce infectious, AAV-Venus (control) and AAV-*ChR2V* virions, which were purified by a single-step column purification method as previously described (Sugano et al. 2005).

Intravitreal Delivery of Adeno-Associated Virus

The AAVs were injected into rats at the times shown in Fig. 1. Prior to this operation, the rats were anesthetized by an intramuscular injection of 66 mg kg⁻¹ ketamine and 33 mg kg⁻¹ xylazine. Then, by using an operating microscope, an incision was made into the conjunctiva to expose the sclera. Five microliters of a suspension that contained 1–10×10¹² virions·μL⁻¹ was intravitreally injected through the ora serrata with a 10-μL Hamilton syringe with a 32-G needle (Hamilton Company, Reno,

Fig. 1 Experimental design. Adeno-associated virus vectors that contained the Channelrhodopsin-2 gene (AAV-*ChR2V*) were injected intravitreally into 6- or 10-month-old Royal College of Surgeons (RCS) rats. After recording visual evoked potentials (VEPs), the left (*L*) eyes were used for cell counts and immunohistochemistry. As a control, AAV vectors that contained the gene for the Venus fluorescent protein (AAV-Venus) were injected into the right (*R*) eye of 6-month-old RCS rats



NV). The AAV-ChR2V virions were injected into both eyes of young and aged RCS rats. As a control, the AAV-Venus virions were injected into the right eye of young RCS rats.

Recording of Visual Evoked Potentials

Four months after the intravitreal injections, the visual evoked potentials (VEPs) were recorded as described previously (Tomita et al. 2007, 2009, 2010). Briefly, VEPs were recorded by using a Neuropack (MEB-9102; Nihon Kohden, Tokyo, Japan). First, the rats were anaesthetized with ketamine-xylazine, and then their pupils were dilated with 1% atropine and 2.5% phenylephrine hydrochloride. Photostimuli of various intensities were generated from a blue light-emitting diode (LED) at 435–500 nm (peak at 470 nm) and applied for 10 ms with a frequency of 0.5 Hz. The high and low pass filters were set to 50 and 0.05 kHz, respectively. VEP responses were measured 100 consecutive times, and then the response waveform was averaged.

Retrograde Labeling of Retinal Ganglion Cells

After recording the VEPs, retrograde labeling was used to identify RGCs in the ganglion cell layer. The labeling was performed by injecting 4 μ L of a solution of 2% aqueous fluorogold (FG; Fluorochrome, Englewood, CO) (Brecha and Weigmann 1994) and 1% dimethylsulfoxide into the superior colliculus with a Hamilton syringe and a 32-G needle (Sato et al. 2005).

Determination of Transduction Efficiency

At the end of the experiment, the rats were sacrificed and their eyes were resected and fixed in 4% paraformaldehyde and 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. The left eye of each rat was flat-mounted on a slide and covered with Vectashield medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA) to prevent the degradation of fluorescence. Then, the number of fluorogold-positive RGCs and double-positive (fluorogold and Venus) RGCs were counted in 12 different areas (3 areas \times 4 quadrants) by using a fluorescence microscope (Axiovert 40, Carl Zeiss, Tokyo). These numbers were used to estimate the transduction efficiency of AAV-ChR2V. In addition, the vertical image in the retinal whole mount was reconstructed from z-stacked images that were captured with the Apotome[®] z-scanning mode of the Axiovert 40 microscope.

Immunohistochemistry

The right eye of each rat was rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) and serially immersed in 10%,

20%, and 30% sucrose in PBS at 4°C. Subsequently, the samples were embedded in optimal cutting temperature compound (Sakura, Tokyo, Japan), and then stored at -80°C (Tomita et al. 2005). Tissue cryosections (10 μm thick) were mounted on slides and air-dried. These sections were incubated with blocking buffer (0.05% Tween-20, 3% BSA, 3% goat serum in PBS) at room temperature (RT) for 1 h, and then with mouse anti-rat glial fibrillary acid protein (GFAP) antibody (1:250; Nihon Millipore, Tokyo, Japan) with blocking buffer overnight at 4°C. For the negative control, sections were incubated with the same concentration of mouse immunoglobulin G (IgG). After the incubations, the sections were rinsed three times with PBS, incubated with Alexa 594-conjugated anti-mouse IgG antibody (Molecular Probes, Eugene, OR) at RT for 30 min, and then rinsed three times with PBS. Finally, the sections were mounted with Vectashield medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA), and the GFAP immunoreactivity was visualized with an Axiovert40 fluorescence microscope.

Antibody Production

A polyclonal antibody was prepared against the ChR2. Two Japanese white rabbits were injected intradermally with 200 μg of the synthetic peptides GDIRKTTKLNIGGT (279–292aa), emulsified with complete Freund's adjuvant. Keyhole limpet hemocyanin (KLH) was used as a carrier protein, and synthetic peptides were conjugated to it by the *m*-maleimidobenzoyl-*N*-hydroxysuccinimide ester method. The rabbits received five booster injections of the synthetic peptide emulsified with incomplete Freund's adjuvant. Following the measurement of the antibody titer by ELISA, whole blood was collected and then the serum was purified through a KLH column.

Western Blot Analysis

Retinas were lysed and sonicated in lysis buffer [10 mM Tris-HCl, 0.5% *n*-Dodecyl- β -D-maltoside, pH 8.0 containing a protease inhibitor (Roche Diagnostics, Tokyo)]. For Western blots of GFAP, ChR2, and β -actin in the retinal extracts (12 μg protein) were electrophoresed on 4–20% SDS-polyacrylamide gels (BIO-RAD, Tokyo) and transferred onto a PVDF membrane. The membranes were bathed with the GFAP antibody and then washed three times with TBST [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, and 0.1% Tween 20]. Alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG (Invitrogen, Tokyo) was used as secondary antibody. Protein bands were developed by the CDP-star detection reagent (GE Healthcare, Tokyo) according to the manufacturer's instructions. Protein bands were detected by exposing the membranes to X-ray film

(Fuji, Tokyo, Japan). The membranes were then stripped of the first antibody and reprobbed with antibodies of β -actin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) or Chr2.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed by using GraphPad Prism software ver. 4.00 (GraphPad Software, San Diego, CA). Statistically significant differences were determined by using unpaired *t* tests. The criterion for statistical significance was $p < 0.05$.

Results

Visual Evoked Potentials

No VEPs were recorded in any of the wild-type or control RCS rats, even with most intense photic stimuli (data not shown). In contrast, photic stimuli produced VEPs in both the young and aged RCS rats that were infected with the AAV-ChR2V virions. However, there were some differences between the overall shapes of the waveforms of the young and aged RCS rats (Fig. 2a). For example, the VEP amplitudes from young RCS rats were larger than those from aged RCS rats (Fig. 2b). In addition, the P1 latency in young RCS rats was significantly shorter than that in aged RCS rats (Fig. 2c).

Transduction Efficiency of Chr2V

Chr2V was expressed in the retinas of both young (Fig. 3a) and aged RCS rats (Fig. 3b). Most Chr2V-expressing cells were considered to be RGCs because their axons and dendrites were labeled with Venus fluorescent protein. In addition, a vertical section of the z-stacked images showed that the Chr2V-expressing cells coincided with retrograde-labeled RGCs (Fig. 3c). The number of RGCs and double-labeled RGCs in the retinas of aged rats was less than that of young rats (Fig. 3d). However, the transduction efficiencies in the retinas of young ($28.3 \pm 5.3\%$) and aged ($27.7 \pm 9.5\%$) rats were very similar.

Immunohistochemistry and Western Blot Analysis

GFAP immunoreactivity was strong after photoreceptor degeneration (Fig. 4a–c). However, GFAP immunoreactivity was weak in Chr2V-expressing retinal cells (Fig. 4d). Western blot analysis of retinal extracts showed that the GFAP protein expression in untreated or AAV-Venus injected RCS rats was higher than that in AAV-ChR2V injected RCS

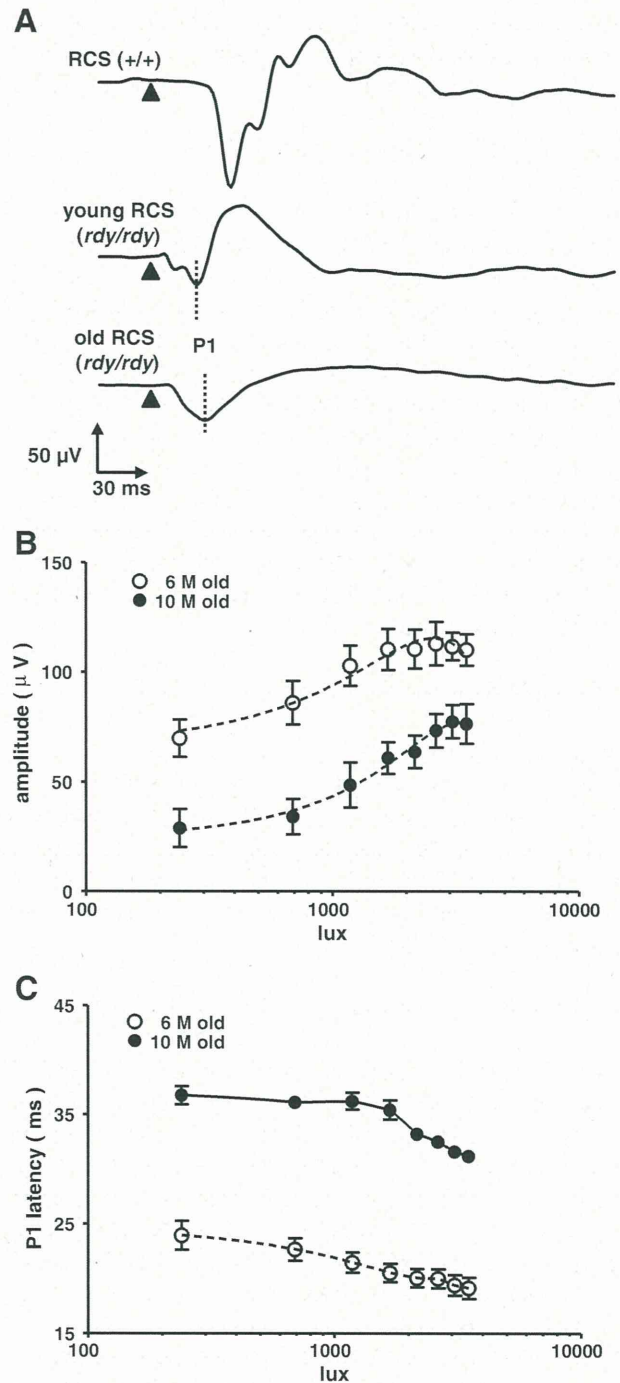
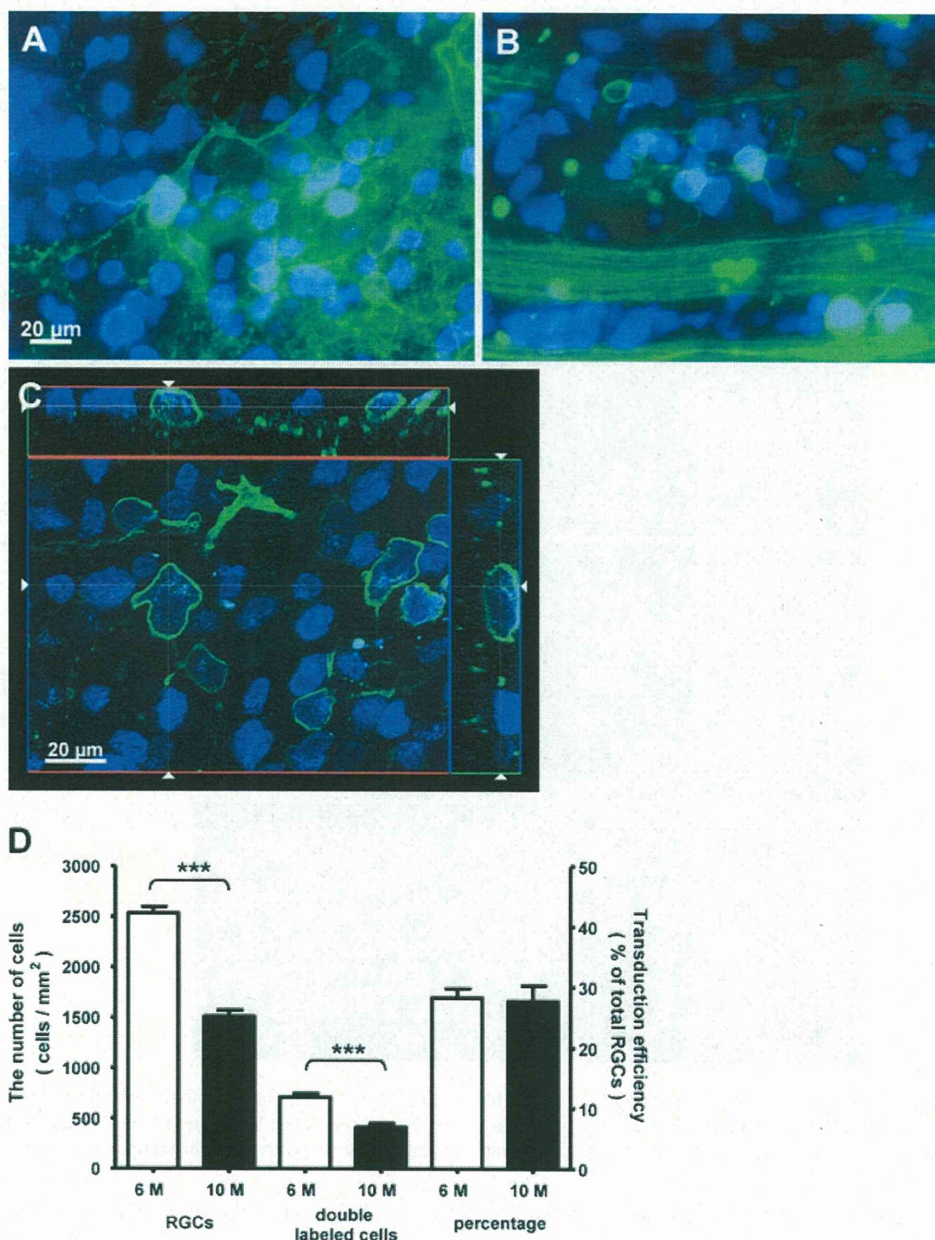


Fig. 2 VEPs recorded from the eyes of young and aged RCS rats transduced with the Channelrhodopsin-2 (ChR2) gene. **a** Typical waveforms evoked by photic stimuli from a blue LED (upper panel: wild-type rat, middle panel: young RCS rat, lower panel: aged RCS rat). **b, c** The relationships between the light stimulus intensity and VEP amplitude (**b**) or the P1 latency (**c**). The data points and error bars indicate the mean and standard deviation, respectively ($n=6$)

Fig. 3 ChR2V expression in the inner retinal layers of the eyes of young and aged RCS rats. **a, b** Fluorescence microphotographs from young (**a**) and aged (**b**) RCS rats. **c** A vertical image of the retina in a young RCS rat that was reconstructed from z-stacked images. **d** The transduction efficiencies were estimated by counting Venus and fluorogold positive cells. The height of the bars and the error bars indicate the mean and standard deviation, respectively ($n=6$). *** $p<0.001$



rats. The GFAP protein expression was slightly detected in non-dystrophic (RCS, +/+) rats (Fig. 4e).

Discussion

Degenerative eye diseases, such as RP, usually affect photoreceptor cells first. Subsequently, RGCs are also affected and the inner retinal neurons are remodeled (Grunder et al. 2001; Marc et al. 2003, 2007; Strettoi and Pignatelli 2000; Strettoi et al. 2002, 2003). However, the function of the

remaining RGCs is not clear. In this study, we observed age-dependent reductions in the number of RGCs. In addition, the ChR2V-expressing RGCs of both young and aged rats responded to light stimuli and evoked potentials. Although there were some differences in the maximum VEP amplitudes in the two groups of rats, they both showed similar increases in VEP amplitude with increasing stimulus intensity. These results indicated that the surviving RGCs are still able to produce action potentials.

Histological examinations show that photoreceptor degeneration in RCS rats begins on approximately

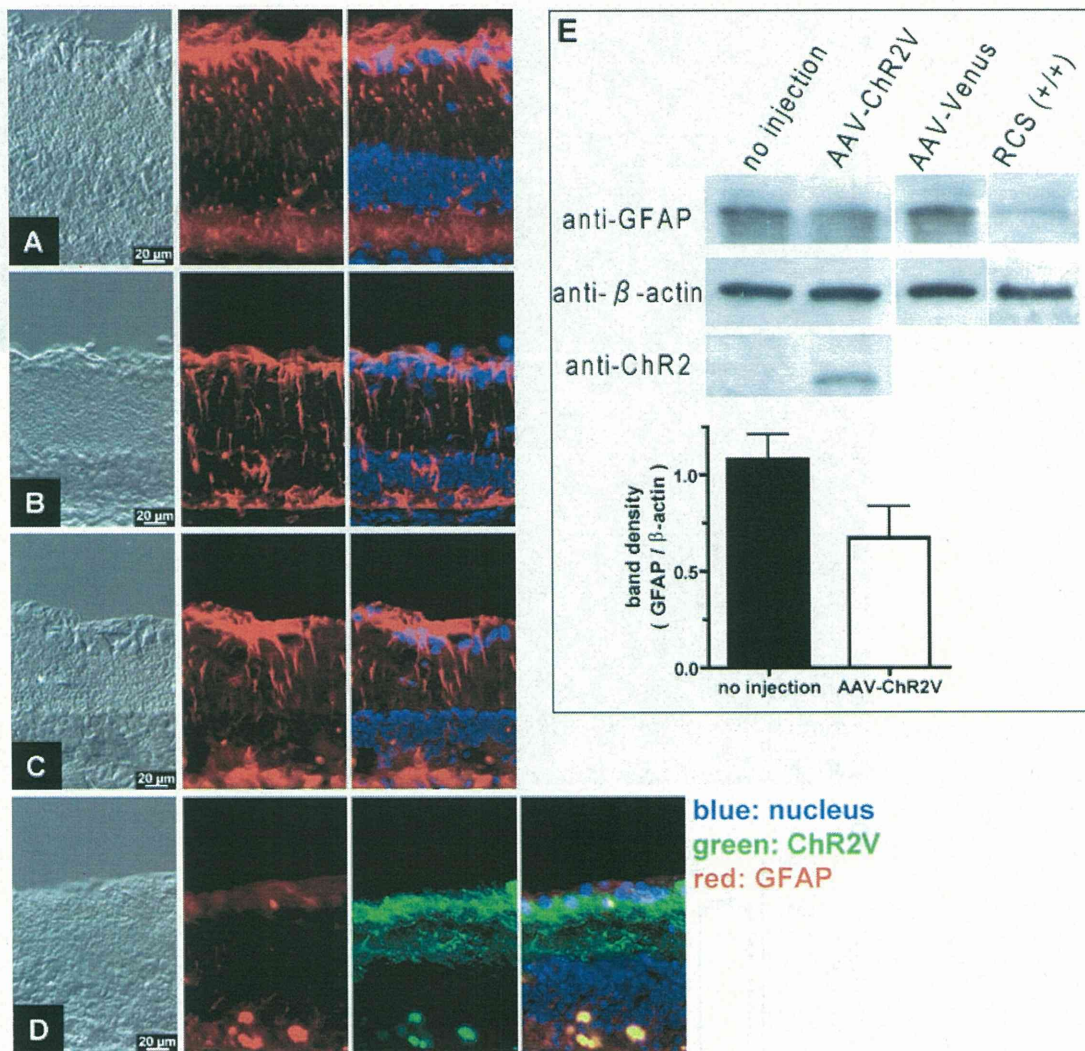


Fig. 4 Changes in GFAP immunoreactivity after photoreceptor degeneration. GFAP immunoreactivity (red) was measured in 3-month-old (a), 6-month-old (b), and 10-month-old (c) RCS rats. d Weak GFAP

immunoreactivity was observed in the retinal cells of young RCS rats that had been transduced with Ch2R. Western blots showed the decreased GFAP protein expression in AAV-ChR2V transduced rat retinas (e)

postnatal day 20 (P20) and ends with rod degeneration by P100 (LaVail and Battelle 1975; Mullen and LaVail 1976; Tamai and Chader 1979). Similarly, electroretinogram analyses demonstrate that photoreceptors disappear by P80 (Bush et al. 1995; Sauve et al. 2004). In the latter studies, the first definitive signs of photoreceptor degeneration are decreased receptive field size, contrast sensitivity, and threshold sensitivity within a month after birth (Pu et al. 2006). However, these characteristics are determined by indirect stimulation of RGCs by photoreceptors because the native RGCs are not light sensitive. In this study, we overcame this limitation by transducing RGCs with *ChR2* to make them photosensitive.

We did not observe a decrease in the number of RGCs in young RCS rats, which is consistent with a previous study that did not show any significant loss of RGCs for 6 months

(Pavlidis et al. 2000). In contrast, we observed a significant loss of RGCs in aged RCS rats. Interestingly, the transduction efficiencies of both groups of rats were the same; however, the cause is not known. Since RGCs are classified into different groups by their morphology (Huxlin and Goodchild 1997), it is possible that the AAV type-2 vector may have a higher affinity to some types of RGCs. Nevertheless, the high transduction efficiency of the AAV type-2 vector in RGCs in this study is in agreement with previous results (Ali et al. 1998; Martin et al. 2002). The lack of a significant difference between the contribution of individual ChR2-expressing RGCs to the maximum VEP amplitude in young and aged RCS rats (young rats: $111.7 \pm 17.7 \mu\text{V}/710.6 \pm 117.7$ cells = $0.157 \mu\text{V} \cdot \text{cell}^{-1}$, aged rats: $77.5 \pm 15.1 \mu\text{V}/414.2 \pm 144.5$ cells = $0.187 \mu\text{V} \cdot \text{cell}^{-1}$) indicated that the activity of individual RGCs was independent of age.