

201122030B

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21年度～23年度 総合研究報告書
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21年度～23年度 総合研究報告書
研究代表者 富田 浩史

平成24（2012）年 4月

目 次

I. 総合研究報告	----- 1
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)	
研究分担者： 玉井信 (大学院医学系研究科)	
松坂義哉 (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	-----13
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----19

I. 総合研究報告

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） （総合）研究報告書

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 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。本研究では、ChR2の遺伝子導入によって得られる視覚特性を明らかにすること、ならびに遺伝子導入による副作用を調べ、臨床応用の可能性を明らかにすることを目的とする。

ChR2を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(ChR2V-TGラット)を用いて、ChR2によって得られる視覚特性について調べた結果、青色（青色：460nm）に限定すると、正常と同等の空間周波数特性が得られ、ChR2の神経節細胞への遺伝子導入によって高度な視機能が作られる可能性が示された。AAVベクターあるいはChR2の恒常的な発現によって引き起こされる副作用は、2年間の観察期間を通して観察されなかった。また、ChR2の波長感受性が青色に限定されるため、新たに幅広い波長感受性を持つチャネルロドプシン(mVChR1)を作製し、ChR2と異なり、白色光に対して光感受性を持つことを示した。

以上のように、ChR2の遺伝子導入によって高度な視覚が作られること、重篤な副作用が見られないことが示され、視覚機能再建のための遺伝子治療法となりえることが明らかとなった。また、幅広い波長感受性を持つチャネルロドプシンの利用によって、色の弁別はできないものの、青色だけでなく、白色光そして赤色におよぶ可視光全域を感受できることが示された。

研究分担者

玉井 信 大学院医学系研究科・客員教授
松坂義哉 大学院医学系研究科・助教
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

網膜色素変性の遺伝子異常保因者は日本人4000人に一人、人口で4~5万人はいると推定されている。網膜色素変性と同様に視細胞変性により失明を来す疾患である加齢黄斑変性は、アメリカでは中途失明原因の1位に位置し、日本でも高齢化社会の進行に伴い、増加の一途を辿っている。これらの疾患は現在有効な治療法は無く、厚生省特定疾患に指定されている。更に重篤な網膜はく離や増加の一途をたどる増殖糖尿病網膜症による失明者を加えると、中途失明者の数は年間16000人にも達し、失明に対する有効な治療法の開発は社会的急務である。

唯一の視覚再生法として、世界的に人工網膜が研究されており、アメリカ、ドイツを中心に臨床研究が行われている。これらの臨床研究で、網膜を電氣的に刺激することによ

て擬似的な光覚が得られることが明らかになっている。しかし、現段階で作製できる網膜刺激電極は100個、最大でも1000個が限度で、100万個存在する網膜神経節細胞の機能を代替できるかなどの様々な問題点が明らかになってきている。

そこで我々は緑藻類より単離したチャネルロドプシン-2 (ChR2) 遺伝子の網膜への導入による視覚再生を検討してきた。現在までに、遺伝盲ラットの光反応性を回復させることに成功し、行動学実験から実際に見えていることを確認している。しかし、ChR2の遺伝子導入によってどの程度の視力が得られるかや緑藻由来の遺伝子を眼内で発現させた場合の副作用、安全性について不明であり、ヒトへの応用に向けて、これらの点を明らかにする必要がある。

本研究では、ChR2の遺伝子導入によって得られる視覚特性を明らかにすること、ならびに遺伝子導入による副作用を調べ、臨床応用の可能性を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

以下の3点を主要研究課題とし、研究を行った。

1. ChR2によって得られる視覚特性
2. 遺伝子導入によって引き起こされる副作用
3. 波長感受性の異なるChRによって得られる視覚

1. ChR2によって得られる視覚特性

1-1. トランスジェニックラットを用いた研究

ChR2を恒常的に神経節細胞に発現するトランスジェニックラットを作製することによって、ChR2の網膜での発現が正常な視機能に及ぼす影響およびChR2によって得られる視覚特性を調べることができる。網膜神経節細胞に特異的なThy1プロモーターを利用して、トランスジェニックラットを作製した。Thy1プロモーターの下流にChR2およびChR2のC末にVenus蛍光タンパク質を融合したプラスミドベクターを作製し、受精卵に注入しトランスジェニックラットを作製した。得られた個体から網膜神経節細胞のみ発現が認められる個体を選別し、繁殖した(ChR2V-TG)。デジタル式オプトモーターを用いて、行動学的に空間周波数特性、コントラスト感度を調べた。ChR2V-TGラットの視細胞のみを選択的に変性させる目的で、少なくとも2週間、12時間5-10lux、12時間0luxの明暗周期で飼育した後、3000lux、7日間連続光照射を行った。視細胞変性後、オプトモーターを用いて視覚特性を調べた。

1-2. 遺伝盲ラットを用いた研究

遺伝盲ラット(Royal College of Surgeons: RCSラット)に、AAVベクターを用いて、ChR2遺伝子を導入し、オプトモーターで回復される視機能を実験的に調べた。

2. 遺伝子導入によって引き起こされる副作用

RCSラットにAAVベクターを用いて、ChR2遺伝子を導入し、経時的に採血を行い、リンパ球の変動、炎症反応、AAVおよびChR2に対する抗体価測定を行った。2年間の観察の後、眼球を摘出し、遺伝子の発現および組織学的に副作用の有無を検索した。

3. 波長感受性の異なるChRによって得られる視覚

3-1. 改変型ボルボックスChR1の光反応特性

恒常的にmVChR1を発現する細胞株を作製するために、mVChR1遺伝子およびピューロマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドベクターを作製した

(mVChR1-IRES2-puro)。エレクトロポレーション法により、培養HEK細胞にmVChR1-IRES2-puroを導入した。導入後、ピューロマイシンを含む培地で培養、継代を繰り返し、導入細胞のみを選択した(mVChR1-HEK)。パッチクランプ法により、各波長光で刺激した際の膜電流を計測した。発現タンパク質の局在を調べる目的で、mVChR1に蛍光タンパク質を融合させたプラスミドベクターを作製した。エレクトロポレーションにより導入し、蛍光顕微鏡下で局在を調べた。

3-2. 改変型ボルボックスChR1導入ラットの視覚特性

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、明暗ボックスを用いて、明暗期の活動性を調べることによって、光への応答を調べた。さらに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。

C. 研究結果

1. ChR2によって得られる視覚特性

1-1. トランスジェニックラットを用いた研究

網膜神経節細胞の特異的抗原であるThy1のプロモーターを利用して、神経節細胞特異的にChR2を発現するトランスジェニックラットを作製した。トランスジェニックラット、7系統を調べた結果、系統4では、神経節細胞特異的にChR2の発現が認められ、系統4のラットを用いて、ChR2によって得られる視覚特性を検討した。正常な視細胞を持つChR2V-TGラットの視覚特性はChR2を持たない野生型ラットと同等の空間周波数特性、コントラスト感度を示した。一方、視細胞を変性させたChR2-TGラットでは、空間周波数特性は野生型と同等であったのに対し、コントラスト感度は顕著に上昇した。

1-2. 遺伝盲ラットを用いた研究

ChR2遺伝子を導入したRCSラットにつ

いて、オプトモーターを用いて、視機能の回復を行動学的に調べた。

2. 遺伝子導入によって引き起こされる副作用

AAV ベクターの硝子体内への投与後 1 週間に一過性の炎症反応が見られたものの、投与 2 週間後には正常値に回復した。AAV に対する抗体価の上昇が投与 2 ヶ月後、ChR2 に対する抗体価の上昇は、6 ヶ月後に観察されたが、その上昇はごく軽微なものであった。また、網膜組織標本での組織像の観察でも重篤な副作用と思われる所見は認められなかった。

3. 波長感受性の異なる ChR によって得られる視覚

3-1. 改変型ボルボックス ChR1 の光反応特性
mVChR1-IRES2-puro 遺伝子を導入後、ピューロマイシンを含む選択培地で培養することによって、遺伝子導入された細胞のみが生存し、増殖した。mVChR1-HEK 細胞をガラスプレート上に培養し、パッチクランプ法により光刺激によって誘発される膜電流を測定した結果、450nm から 600nm の幅広い波長光に反応した。また、mVChR1 と蛍光タンパク質を融合した遺伝子を導入し、導入遺伝子の発現部位を可視化したところ、細胞膜での発現に加えて、小胞体で果粒状の蓄積として観察された。改変前の VChR1 では、細胞膜での発現はほとんど見られず、小胞体に環粒状の蓄積として観察されるのみであった。VChR1 導入 HEK 細胞 (VChR1-HEK 細胞) は、遺伝子導入後、遺伝子の発現が見られた細胞は、遺伝子導入から 4 日で細胞が死滅し、発現細胞が見られなくなったのに対し、mVChR1-HEK 細胞では、遺伝子発現に伴う細胞死は観察されなかった。

3-2. 改変型ボルボックス ChR1 導入ラットの視覚特性

遺伝盲ラット網膜に、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて、mVChR1 遺伝子を導入し、様々な波長光を用いて視覚誘発電位測定した。その結果、パッチクランプで得られた結果と同様に、450-600nm の幅広い波長光に反応した。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反応し、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。

D. 考察

神経節細胞には種々の役割の異なる神経節細胞が存在し、それらの神経節細胞に一樣に ChR2 が導入された時にどのような視覚が得られるか不明であった。今回のトランスジェニックラットを用いた研究から、神経節細胞の種類に関係なく、ChR2 が導入されたとしても高度な視覚が得られる可能性が示された。トランスジェニックラットでの研究であり、生まれながらにして ChR2 を発現しているために、トランスジェニックラットの視覚システムが正常な視覚システムと同じであるか疑問があり、さらに、遺伝盲ラットを用いて、行動学実験を行った。その結果もまた、神経節細胞への ChR2 遺伝子導入により視覚機能の回復を表すものであった。クラミドモナス由来 ChR2 は、青色にのみ感受性を持ち、この遺伝子治療で視覚が回復したとしても青色の物体しか見ることができない。これに対して、ボルボックスから赤方形の光活性化イオンチャネル遺伝子が見出されている。ボルボックス由来チャンネルロドプシン-1 (VChR1) は、哺乳類細胞で発現させた場合、正常なタンパク質構造を作ることができず、小胞体に蓄積し、細胞毒性を引き起こすと予想される。現在使用しているプラスミド、あるいはウイルスベクターは、強力な発現を誘導するプロモーターを利用しているのも細胞毒性を引き起こす要因の一つであるかもしれない。一方、改変型 VChR1 (mVChR1) では、依然として、小胞体での蓄積が観察されたが、その量は、VChR1 に比べて少なく、細胞膜に発現が認められ、光受容陽イオンチャネルとして、機能できたと考えられる。行動学的に白色光に反応性を示し、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

緑藻類クラミドモナス、およびボルボックス由来の光活性化遺伝子を利用することによって、視覚機能を回復できることが示された。特に、改変型ボルボックス由来チャンネル

ロドプシンは、幅広い波長域に感受性を持ち、単一の分子で可視光全域を感受できると考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tomita H, Sugano E, Isago H, Tamai M. Channelrhodopsins provide a breakthrough insight into strategies for curing blindness. *J Genetics*, 88, 409-415. 2009.
2. Tomita H, Sugano E, Fukazawa Y, Isago H, Sugiyama Y, Hiroi T, Ishizuka T, Mushiake H, Kato M, Hirabayashi M, Shigemoto R, Yawo H, Tamai M. Visual Properties of Transgenic Rats Harboring the Channelrhodopsin-2 Gene regulated by the Thy-1.2 Promoter. *PLoS ONE*, 4(11), e7679, 2009.
3. Hikima T, Araki R, Ishizuka T, Yawo H. beta-Phorbol ester-induced enhancement of exocytosis in large mossy fiber boutons of mouse hippocampus. *J Physiol Sci*, 59, 263-274, 2009.
4. Matsuzaka Y, Sakamoto K, Tanaka T, Furusawa Y, Mushiake H. Cannula-aided penetration: a simple method to insert structurally weak electrodes into brain through the dura mater. *Neurosci Res*, 65, 126-129, 2009.
5. Wang H, Sugiyama Y, Hikima T, Sugano E, Tomita H, Takahashi T, Ishizuka T, Yawo H. Molecular determinants differentiating photocurrent properties of two channelrhodopsins from *Chlamydomonas*. *J Biol Chem*, 284, 5685-5696, 2009.
6. Kobayashi R, Kanno S, Lee S, Fukushima T, Sakamoto K, Matsuzaka Y, Katayama N, Mushiake H, Koyanagi M, Tanaka T. Development of double-sided Si neural probe with microfluidic channels using wafer direct bonding technique. *Neural Engineering*, 2009. NER '09. 4th International IEEE/EMBS Conference 2009, 6-99. 2009.
7. Sakamoto K, Matsuzaka Y, Suenaga T, Watanabe H, Kobayashi R, Fukushima T, Katayama N, Tanaka T, Koyanagi M, Mushiake H. A simple device allowing silicon microelectrode insertion for chronic neural recording in primates. *Neural Engineering*, 2009. NER '09. 4th International IEEE/EMBS Conference 2009, 104-107. 2009.
8. Tomita H, Sugano E, Isago H, Hiroi T, Wang Z, Ohta E, Tamai M. Channelrhodopsin-2 Gene Transduced into Retinal Ganglion Cells Restores Functional Vision in Genetically Blind Rats. *Exp Eye Res*, 90, 426-436, 2010.
9. Sugano E, Isago H, Wang Z, Murayama N, Tamai M, Tomita H. Immune responses to adeno-associated virus type 2 encoding channelrhodopsin-2 in a genetically blind rat model for gene therapy. *Gene Therapy*, 18(3), 266-74, 2010.
10. Semo M, Gias C, Ahmado A, Sugano E, Allen A, Lawrence JM, Tomita H, Coffey PJ, Vugler A. Dissecting a Role for Melanopsin in Behavioural Light Aversion Reveals a Response Independent. *PLoS ONE*, 5(11), E15009, 2010.
11. Wen L, Wang H, Tanimoto S, Egawa R, Matsuzaka Y, Mushiake H, Yawo H. Opto-current-clamp actuation of cortical neurons using a strategically designed channelrhodopsin. *PLoS ONE*, 5(9), e12893. 2010
12. Wang Z, Sugano E, Isago H, Hiroi T, Tamai M, Tomita H. Differentiation of neuronal cells from NIH/3T3 fibroblasts under defined conditions. *Development Growth and Differentiation*, 53(3), 357-365, 2011.
13. 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*. 53(3):357-65. 2011
14. 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. *Neurosci Res*. 71(4):328-334. 2011
15. Yokose J, Ishizuka T, Yoshida T, Aoki J, Koyanagi Y, Yawo H. Lineage analysis of newly generated neurons in organotypic culture of rat hippocampus. *Neurosci. Res*. 69, 223-233. 2011.
16. Asano T, Ishizuka T, Yawo H. Optically controlled contraction of photosensitive skeletal muscle cells. *Biotechnol Bioeng*. 109(1):199-204. 2012
17. 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. *J Mol Neurosci*. 46(2):393-400. 2012

2. 学会発表

(和文)

1. 菅野江里子、富田浩史、姫志剛、松坂義哉、虫明元、砂金ひとみ、廣井照、玉井信：「カンクイサルを用いた視機能評価」第 63 回日本臨床眼科学会（福岡）2009
2. 王紅霞、杉山友香、引間卓弥、石塚 徹、八尾 寛：「構造-機能連関解析によるチャンネルロドプシン最適化-新規オプトジェネティクスツールの創出法」第 6 回東北大学バイオサイエンスシンポジウム/第 14 回学際ライフサイエンスシンポジウム（仙台）2009
3. 宇野秀隆、浅野豪文、中井直史、石塚 徹、八尾 寛、宇理須恒雄：「光受容体チャンネルロドプシン 2 の光励起分子応答モデル」第 70 回応用物理学学会学術講演会（富山）2009
4. 宇野秀隆、浅野豪文、石塚 徹、八尾 寛、宇理須恒雄：「培養型イオンチャンネルバイオセンサー内での初代培養ニューラルネットワークの形成とグリア細胞制御」第 70 回応用物理学学会学術講演会（富山）2009
5. 石塚 徹、杉山友香、王 紅霞、引間卓弥、佐藤 南、黒田 潤、高橋哲朗、八尾 寛：「チャンネルロドプシン 2 の 97 残基めのグルタミン酸は陽イオンの透過を決定するアミノ酸の一つである」第 32 回日本神経科学大会（名古屋）2009
6. 王 紅霞、杉山友香、引間卓弥、菅野江里子、富田浩史、高橋哲朗、石塚 徹、八尾 寛：「クラミドモナス光受容チャンネルの構造-機能連関に関する研究」第 32 回日本神経科学大会（名古屋）2009
7. 温 磊、王 紅霞、石塚 徹、八尾 寛：「改変型チャンネルロドプシン (channelrhodopsin/Wide-receiver) を用いたマウス運動野ニューロンの光刺激」第 32 回日本神経科学大会（名古屋）2009
8. 八尾 寛、王 紅霞、石塚 徹：「フォトバイオ機能モジュール：チャンネルロドプシンの最適化」第 32 回日本神経科学大会（名古屋）2009
9. 石塚 徹：「チャンネルロドプシンの構造-機能連関解析とオプトジェネティクスへの応用」第 37 回薬物活性シンポジウム（仙台）2009

10. 李相勲、小林吏悟、菅野壮一郎、福島誉史、坂本一寛、松坂義哉、片山統裕、虫明元、田中徹、小柳光正：「in-vivo 神経細胞活動記録用両面電極つき Si プローブの開発」第 56 回応用物理学関係連合講演会（つくば）2009
11. 砂金ひとみ、菅野江里子、廣井照、王卓、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 2 を導入した遺伝盲ラットの光反応性、日本動物学会、東京、2010 年 9 月 23 日
12. 王卓、菅野江里子、砂金ひとみ、廣井照、玉井信、富田浩史、NIH 3T3 線維芽細胞からの神経細胞の誘導、日本動物学会、東京、2010 年 9 月 23 日
13. 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
14. 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
15. 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
16. 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

(英文)

1. Ito S, Ishizuka T, Yawo H. Ectopic synaptogenesis of hippocampal mossy fiber in the mouse model of status epilepticus. 36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS)/86th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, (Kyoto, Japan), 2009.
2. Yokose J, Yawo H, Ishizuka T. Lineage analysis of postnatal neurogenesis in the slice culture of hippocampus. 36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS)/86th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, (Kyoto, Japan), 2009.
3. Sakai S, Miyawaki A, Ishizuka T, Yawo H.

- Involvement of BACE1 in postnatal development of synaptic vesicle pools. 36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS)/86th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, (Kyoto, Japan), 2009.
4. Wang H, Sugiyama Y, Ishizuka T, Yawo H. Molecular determinant differentiating photocurrent properties of two channelrhodopsins from *Chlamydomonas*. 36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS)/86th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, (Kyoto, Japan), 2009.
 5. Sugiyama Y, Wang H, Hikima T, Sato M, Kuroda J, Takahashi T, Ishizuka T, Yawo H. Photocurrent attenuation by the Glu97Ala mutation of channelrhodopsin-2. 36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS)/86th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, (Kyoto, Japan), 2009
 6. Sugano E, Tomita H, Isago H, Yawo H, Fukazawa Y, Shigemoto R, Hiroi T, Kato M, Hirabayashi M, Tamai M. Visual Function of Wild Type and Channelrhodopsin-2 Transgenic Rats. Association for Research in Vision and Ophthalmology (Ft. Lauderdale, FL), 2009
 7. Tomita H, Sugano E, Isago H, Hiroi T, Yawo H, Tamai M. Properties of Recovered Visual Function in the Channelrhodopsin-2 Transferred Royal College of Surgeons Rats. Association for Research in Vision and Ophthalmology (Ft. Lauderdale, FL), 2009
 8. Sugano E, Tomita H, Isago H, Hiroi T, Wang Z, Tamai M. Systematic and Local Responses of Channelrhodopsin-2 Gene Therapy. Annual meeting Association for Research in Vision and Ophthalmology, Ft. Lauderdale, FL. 2010年5月2日
 9. Tomita H, Sugano E, Isago H, Hiroi T, Wang Z, Tamai M. Retinal and systemic immune responses after the transfer of channelrhodopsin-2 into RCS rats. XIVth International Symposium on Retinal Degeneration. Quebec, Mont-Tremblant, 2010年7月15日
 10. Sugano E, Tomita H, Isago H, Hiroi T, Wang Z, Tamai M. Optimization of volvox-derived channelrhodopsin-1 to express expression in mammalian cells. XIVth International Symposium on Retinal Degeneration. Quebec, Mont-Tremblant, 2010年7月15日
 11. Wen L, Wang H, Ishizuka T, Yawo H. Opto-current-clamp characterization of neuronal rhythm using an optimized channelrhodopsin. Channelrhodopsin and Light-gated Enzymes, Germany, 2010年5月25日
 12. Sakai S, Ishizuka T, Yawo H. Layer specific properties of hippocampal CA3 dendrites. 1st Tohoku International Symposium on Multidisciplinary Neuroscience, Sendai, 2011年1月21日
 13. Wen L, Wang H, Tanimoto S, Egawa R, Matsuzaka Y, Mushiake H, Isizuka T, Yawo H. Optocurrent-clamp actuation of cortical neurons using a strategically designed channelrhodopsin. 1st Tohoku International Symposium on Multidisciplinary Neuroscience, 仙台, 2011年1月21日
 14. Yokose J, Yoshida T, Aoki J, Ishizuka T, Koyanagi Y, Yawo H. Tracking the fate of a newly generated cell and lineage construction in organotypic hippocampal slice culture. Adult Neurogenesis: Structure and Function, Frauenchiemsee, Germany 2010年5月27-30日
 15. Konno A, Honjo T, Ishizuka T, Yawo H. Antibody-directed gene delivery with Sindbis viral vectors displaying the IgG-binding domain of protein A, International Symposium on Multidisciplinary Neuroscience, Tohoku University, Japan, Sendai, 2011年1月21-23日
 16. Tanimoto S, Wang H, Sugiyama Y, Ishizuka T, Yawo H. The Glu-97 mutation of channelrhodopsin-2 attenuates its photocurrent. 1st Tohoku International Symposium on Multidisciplinary Neuroscience, 仙台, 2011年1月21日
 17. Konno A, Honjo T, Ishizuka T, Yawo H, TARGETED GENE TRANSFER THROUGH NEURON-TYPE SPECIFIC MEMBRANE PROTEINS USING SINDBIS VIRUS VECTOR DISPLAYING SPECIFIC ANTIBODY, The third Brain Science Summer Retreat, 仙台市、2010年7月31日

18. Tanimoto S, Sugiyama Y, Ishizuka T, Yawo H. The Glu-97-Gln or Glu-101-Gln mutant of channelrhodopsin-2 attenuates its photocurrent. The third Brain Science Summer Retreat、仙台市、2010年7月31日
19. 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
20. 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
21. 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
22. 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
23. 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
24. 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
25. 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
26. 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
27. 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
28. 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
29. 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
30. 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
31. 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
32. 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
33. 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
34. 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
35. Abe Y, Sekino M, Fukazawa H, Yawo H, Ohsaki H, Hisatsune T: Functional analysis of the hippocampus using opto-fMRI. 第34

- 回日本神経科学大会、横浜、2011年9月16日
36. 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
37. 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
38. Ito S, Ishizuka T, Yawo H: Ectopic projection of hippocampal synapses in pilocarpine-treated mice expressing synaptotagmin. NIPS International Workshop 2011 Cutting Edge in Synapse Research, Okazaki, 2011年12月8~9日
39. 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
40. Tanimoto S, Wang H, Sugiyama Y, Ishizuka T, Yawo H: The molecular determinants involved in ion flux regulation of channelrhodopsin-2. 第34回日本神経科学大会、横浜、2011年9月17日
41. 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
42. 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
43. 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
44. 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
3. 招待講演・医療講演会
1. 富田浩史:「チャンネルロドプシンの遺伝子導入によって得られる視覚」第63回臨床眼科学会 専門別研究会 特別講演 (福岡) 2009
 2. 富田浩史:「チャンネルロドプシン-2による視覚再生」視覚科学技術コンソーシアム (VSAT) 特別講演 (仙台) 2009
 3. 富田浩史:「緑藻類由来遺伝子の導入による視覚再生の現状と課題」日本眼科学会総会 シンポジウム 13 (東京) 2009
 4. 富田浩史:「視機能再生のための遺伝子治療、チャンネルロドプシンによって得られる視覚特性」日本網膜色素変性症協会 (J R P S) 宮城県支部総会・医療講演会 (仙台) 2009
 5. 富田浩史:「緑藻由来遺伝子を利用した視覚再生研究」日本網膜色素変性症協会 (J R P S) 新潟県支部総会・医療講演会 (新潟) 2009
 6. Tomita H. Channelrhodopsins provide a breakthrough insight into strategies for curing blindness. Tohoku University-Hanyang University Joint Symposium on "Biomedical Engineering in Future Medicine. Souel, Korea, 2010年11月22日
 7. 富田浩史, 菅野江里子, 砂金ひとみ, 王卓, 村山なみえ, 玉井信. 遺伝子導入による視覚再生, 日本視覚学会, 東京, 2011年1月20日
 8. 富田浩史, 菅野江里子, 砂金ひとみ, 王卓, 村山なみえ, 玉井信. 緑藻類由来遺伝子を用いた視覚再生技術, 日本人工臓器学会, 仙台, 2010年11月20日
 9. 富田浩史, 菅野江里子, 砂金ひとみ, 王卓, 村山なみえ, 玉井信. 緑藻類由来遺伝子を用いた視覚再生技術, 集積光デバイスと応用技術(IPDA)第4回研究会 (IEEE 分科会), 仙台, 2010年5月20日
 10. 富田浩史:「視機能再生のための遺伝子

- 治療、チャンネルロドプシンによって得られる視覚特性」日本網膜色素変性症協会（JRPS）群馬県支部総会・医療講演会 2010年6月19日
11. 富田浩史：「緑藻由来遺伝子を利用した視覚再生研究」日本網膜色素変性症協会（JRPS）栃木県支部総会・医療講演会 2010年6月20日
12. Tomita H, Sugano E, Isago H, Murayama N, Wang Z, Tamai M : Gene therapy in optjalmology `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
13. 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 channelrhodopsins.第84回日本生化学会大会, 京都, 2011年9月21日
14. 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
15. 菅野江里子、砂金ひとみ、玉井信、富田浩史：チャンネルロドプシン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
16. 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
17. 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
18. 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
19. 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
20. 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
21. 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一チャンネル構造・機能関連。CBI学会 第317回研究講演会、東京、2011年5月27日
22. 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
23. 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
4. その他
1. 河北新報朝刊（2009年11月6日一面）「緑藻遺伝子で視力再生」
2. 一般向け科学雑誌「NEWTON」2010年2月号（12月26日発売）「藻のタンパク質が眼で働く!？」
3. 子供の科学 3月号 「藻類の遺伝子で視力回復」
4. NHK ラジオ第2放送 2010年2月8日【国内向け英語放送】番組名：「Japan & World Update」14:00~14:30（後半10分間）【海外向け短波ラジオ放送】英、仏、中国、アラビアなど17言語で放送
5. 雑誌 Medical Bio、2010年9月号、オーム社、pp.55-57、緑藻の光受容体遺伝子の導入による網膜色素変性ラットの視力回復
6. 朝日新聞（全国）2010年11月23日 「脳を動かす光のスイッチ」記事内で紹介「視力回復に成功」
7. 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 日本眼科医会、日本の眼科、82:12号、2011年、p1602-1607
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特願 2009-185455、「発現効率が改善された光受容チャネルロドプシン」、発明者：富田浩史、菅野江里子、出願日：H21年8月10日

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
Tomita H, Sugano E, Isago H, Tamai M	Channelrhodopsins provide a breakthrough insight into strategies for curing blindness	J Genetics	88	409-415	2009
Tomita H, Sugano E, Fukazawa Y, Isago H, Sugiyama Y, Hiroi T, Ishizuka T, Mushiake H, Kato M, Hirabayashi M, Shigemoto R, Yawo H, Tamai M	Visual Properties of Transgenic Rats Harboring the Channelrhodopsin-2 Gene regulated by the Thy-1.2 Promoter.	PLoS ONE	4(11)	e7679	2009
Wang H, Sugiyama Y, Hikima T, Sugano E, Tomita H, Takahashi T, Ishizuka T, Yawo H	Molecular determinants differentiating photocurrent properties of two channelrhodopsins from chlamydomonas	J Biol Chem	284	5685-5696	2009
Hikima T, Araki R, Ishizuka T, Yawo H	beta-Phorbol ester-induced enhancement of exocytosis in large mossy fiber boutons of mouse hippocampus	J Physiol Sci	59	263-274	2009
Matsuzaka Y, Sakamoto K, Tanaka T, Furusawa Y, Mushiake H	Cannula-aided penetration: a simple method to insert structurally weak electrodes into brain through the dura mater	Neurosci. Res.	65	126-129	2009
Kobayashi R, Kanno S, Lee S, Fukushima T, Sakamoto K, Matsuzaka Y, Katayama N, Mushiake H, Koyanagi M, Tanaka T.	Development of double-sided Si neural probe with microfluidic channels using wafer direct bonding technique	Neural Engineering, 2009. NER '09. 4th International IEEE/EMBS Conference 2009		96-99	2009
Sakamoto K, Matsuzaka Y, Suenaga T, Watanabe H, Kobayashi R, Fukushima T, Katayama N, Tanaka T, Koyanagi M, Mushiake H.	A simple device allowing silicon microelectrode insertion for chronic neural recording in primates.	Neural Engineering, 2009. NER '09. 4th International IEEE/EMBS Conference 2009		104-107	2009
杉山友香、王 紅霞、石塚 徹、八尾 寛	光信号を電気情報に換えるタンパク質チャンネルロドプシン-オプトジェネティクスへの招待-	現代化学	459	30-36	2009
Tomita H, Sugano E, Isago H, Hiroi T, Wang Z, Ohta E, Tamai M	Channelrhodopsin-2 Gene Transduced into Retinal Ganglion Cells Restores Functional Vision in Genetically Blind Rats	Exp Eye Res	90	426-436	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sugano E, Isago H, Wang Z, Murayama N, Tamai M, Tomita H.	Immune responses to adeno-associated virus type 2 encoding channelrhodopsin-2 in a genetically blind rat model for gene	Gene Therapy	18(3)	266-274	2010
Semo M, Gias C, Ahmado A, Sugano E, Allen A, Lawrence JM, Tomita H, Coffey	Dissecting a Role for Melanopsin in Behavioural Light Aversion Reveals a Response Independent	PLoS ONE	5(11)	e15009	2010
Wen L, Wang H, Tanimoto S, Egawa R, Matsuzaka Y, Mushiake H, Yawo H.	Opto-current-clamp actuation of cortical neurons using a strategically designed channelrhodopsin	PLoS ONE	5(9)	e12893	2010
Wang Z, Sugano E, Isago H, Hiroi T, Tamai M, Tomita H.	Differentiation of neuronal cells from NIH/3T3 fibroblasts under defined conditions	Development and Differentiation	53(3)	357-365	2011
Yokose J, Ishizuka T, Yoshida T, Aoki J, Koyanagi Y, Yawo H.	Lineage analysis of newly generated neurons in organotypic culture of rat hippocampus.	Neurosci. Res.	69	223-233	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
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
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	Journal of Molecular Neuroscience	46(2)	393-400	2012

その他

雑誌名	タイトル	巻・号	ページ
河北新報（新聞）	緑藻遺伝子で視力再生	2009年11月6日	一面
NEWTON	緑藻のタンパク質で視力回復	2010年2月号	123
Medical Bio	「緑藻の光受容体遺伝子の導入による網膜色素変性ラットの視力回復」	2010年9月号	47-49
朝日新聞（全国）	「脳を動かす光のスイッチ」 -視力回復に成功	2010年11月23日	-
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

Channelrhodopsins provide a breakthrough insight into strategies for curing blindness

HIROSHI TOMITA¹, ERIKO SUGANO¹, HITOMI ISAGO² and MAKOTO TAMAI²

¹Tohoku University Institute for International Advanced Interdisciplinary Research, ²Tohoku University Graduate School of Medicine, 4-1 Seiryō Aoba Sendai Miyagi 980–8575, Japan

Abstract

Photoreceptor cells are the only retinal neurons that can absorb photons. Their degeneration due to some diseases or injuries leads to blindness. Retinal prostheses electrically stimulating surviving retinal cells and evoking a pseudo light sensation have been investigated over the past decade for restoring vision. Currently, a gene therapy approach is under development. Channelrhodopsin-2 derived from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, is a microbial-type rhodopsin. Its specific characteristic is that it functions as a light-driven cation-selective channel. It has been reported that the channelrhodopsin-2 transforms inner light-insensitive retinal neurons to light-sensitive neurons. Herein, we introduce new strategies for restoring vision by using channelrhodopsins and discuss the properties of adeno-associated virus vectors widely used in gene therapy.

[Tomita H., Sugano E., Isago H. and Tamai M. 2009 Channelrhodopsins provide a breakthrough insight into strategies for curing blindness. *J. Genet.* **88**, 409–415]

Phototransduction pathway

Retinitis pigmentosa (RP) is the most common type of inherited disease that leads to blindness; it has an expected prevalence of one in 4000 cases and its symptoms include night blindness, loss of peripheral visual field, and loss of central vision (Hartong *et al.* 2006). A number of genes responsible for RP – most of them associated with phototransduction pathways – have been identified and their functions elucidated (<http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/home.htm>).

In the vertebrate retina, phototransduction is initiated by activation of rhodopsin. In the dark, rhodopsin contains 11-*cis*-retinal as the chromophore, embedded in its protein moiety. Light-induced isomerization of 11-*cis*-retinal to all-*trans*-retinal initiates a G protein-coupled signalling cascade, involving the hydrolysis of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) by upregulated phosphodiesterase, which causes closure of a cGMP-regulated cation channel (figure 1). The photoreceptor cells are hyperpolarized, and they transmit light signals to second-order neurons such as bipolar cells. After the isomerization of 11-*cis*-retinal to all-*trans*-retinal

by absorption of photon(s), the latter travels from retinal photoreceptor outer segments to the retinal pigment epithelium (RPE) for regeneration of the chromophore. Thus, visual cycle requires sequential propagation of steps, including enzymatic reactions (Lamb and Pugh 2004); any loss of function causes various retinal disorders.

Gene therapy for retinal disorders

Gene therapies have attempted to compensate the loss of function for the treatment of retinal disorders, mainly hereditary diseases. Various types of viral vectors such as retrovirus (Sakamoto *et al.* 1995), lentivirus (Miyoshi *et al.* 1997; Lotery *et al.* 2002), adenovirus (Reichel *et al.* 2001), and adeno-associated virus (AAV) (Ali *et al.* 1996) have been investigated for an efficient transfer of the relevant gene into target cells, and they have been selected specific to each disorder or purpose, e.g. for transient or long-term gene expression according to the target cell type. Viral vector-based gene transfer may cause undesirable side effects such as systemic dissemination of the vector, immune responses, and overexpression of the gene. To deal with these complications, the eyes specifically have the blood-retinal barrier and

*For correspondence. E-mail: hiroshi-tomita@iicare.tohoku.ac.jp.

Keywords. channelrhodopsin-2; retinitis pigmentosa; adeno-associated virus vector; blindness.