

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15631

研究課題名(和文) 中心視野の再生に資する2光子励起イメージングを用いた新規機能解析法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a live cell imaging system for the central retina by two-photon microscopy

研究代表者

小坂田 文隆(Osakada, Fumitaka)

名古屋大学・大学院創薬科学研究科・准教授

研究者番号：60455334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：網膜変性疾患に対して脱落した視細胞を移植する網膜再生治療に期待が寄せられている。しかし現在、視細胞の再生の対象となっているのは網膜周辺部であり、高解像度の視覚を担う中心視野の再生は未だに手つかずである。その原因として、網膜中心領域の神経機能を正確に評価する方法がないことが挙げられる。本研究では、2光子顕微鏡システムおよびイメージングチャンバーなどを自作することで、網膜全層を撮影可能なこと、視細胞の核構造が発生・成熟とともに変化することを示した。以上より、本研究において網膜の発生過程および神経活動を細胞レベルで評価することが可能な2光子顕微鏡ライブイメージング法の確立に成功した。

研究成果の概要(英文)：Regenerative medicine represents a promising future treatment of retinal degenerative diseases by making use of the proliferation and differentiation potential of stem cells. At present, transplantation of photoreceptors in the peripheral retina can be most promising therapy. Regeneration of the central retina, however, has not been tried due to the lack of appropriate methods that evaluate the function of the central retina with cellular resolution in mice and monkeys. In the present study, we succeeded in establishment of two-photon microscope system with imaging chamber that makes it possible to evaluate the development and function of photoreceptors in the live retina.

研究分野：眼科学

キーワード：2光子顕微鏡 視細胞 クロマチン 発生 再生 ライブイメージング 網膜 細胞核

1. 研究開始当初の背景

視機能が損なわれる網膜変性疾患に対して、脱落した視細胞を移植により補充し、2次ニューロンへの伝達の再構築を目標とした網膜の再生医療に期待が寄せられている。しかし現在までに、視細胞の再生の対象となっているのは、網膜の周辺部であり、高解像度の視覚を担う中心視野の再生は、未だに手つかずである。その原因として、網膜の中心領域の神経機能を正確に評価する方法がないことが挙げられる。

2. 研究の目的

本研究では、高密度に分布する視細胞の機能を細胞レベルで評価可能な新規網膜イメージング法の確立することを目的とした。

3. 研究の方法

2 光子顕微鏡システムおよびイメージングチャンバーなどを自作した。単離した網膜をイメージングチャンバーに静置した。培地や緩衝液の組成、灌流システムの有無、対物レンズの倍率、蛍光色素およびタンパク質、2 光子レーザーの波長などの条件を検討した。

4. 研究成果

2 光子顕微鏡のセットアップを行った。システムの主な導入ポイントを以下に挙げる。多色による標識と可視化を行うために、それが可能なデュアルレーザーおよび検出器、フィルターセットなどを整備した。網膜の水平方向および深さに対応できる対物レンズおよび光軸方向に高速移動が可能なピエゾ素子を導入した。網膜を静置・観察するチャンバーには2種類を検討した。混合ガス(酸素 95%・二酸化炭素 5%)をバブリングした緩衝液を灌流する実験系、および二酸化炭素に依存しない緩衝液を用いて灌流が不要な実験系を開発した。イメージング中に観察する網膜を固定するために、2 種類の方法を検討した。単離網膜にアンカーを置いて固定する方法、および網膜をアガロース中に包埋する方法である。イメージングの時間や目的に応じて、緩衝液や灌流方法、固定法を選択するのが良いと考えられた。

2 光子顕微鏡システムおよびイメージングチャンバーなどを自作することで、マウス網膜の全層を2光子顕微鏡にて撮影可能なこと、マウスの眼球を摘出し、単離した網膜をイメージングチャンバーに静置し経時的にライブ観察が可能なこと、視細胞の核構造およびクロマチンの分布が発生・成熟とともに変化することを示した。以上より、本研究において、網膜の発生過程および神経活動を評価することが可能な、2 光子顕微鏡を用いたライブイメージング法を確立することができた。

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 8 件)

1. **Osakada F** (Corresponding author).
From the connectome to brain function: rabies virus tools for elucidating structure and function of neural circuits
Nihon Yakurigaku Zasshi. 146, 98-105 (2015) (査読有)
2. Tuncdemir SN, Wamsley B, Stam FJ, **Osakada F**, Goulding M, Callaway EM, Rudy B, Fishell G.
Early Somatostatin Interneuron Connectivity Mediates the Maturation of Deep Layer Cortical Circuits.
Neuron. 89, 521-535 (2016) (査読有)
3. Faget L, **Osakada F**, Duan J, Ressler R, Johnson AB, Proudfoot JA, Yoo JH, Callaway EM, Hnasko TS.
Afferent Inputs to Neurotransmitter-Defined Cell Types in the Ventral Tegmental Area.
Cell Reports. 15, 2796-2808 (2016) (査読有)
4. Padmanabhan K, **Osakada F**, Tarabrina A, Kizer E, Callaway EM, Gage FH, Sejnowski TJ.
Diverse Representations of Olfactory Information in Centrifugal Feedback Projections.
The Journal of Neuroscience. 36, 7535-7345 (2016) (査読有)
5. Suzuki T, **Osakada F** (Corresponding author).
Visual system and inhibitory neural circuits in the mouse.
Nihon Yakurigaku Zasshi. 148, 162 (2016) (査読有)
6. Tian J, Huang R, Cohen JY, **Osakada F**, Kobak D, Machens CK, Callaway EM, Uchida N, Watabe-Uchida M.

- Distributed and Mixed Information in Monosynaptic Inputs to Dopamine Neurons. *Neuron*. 91, 1374-1389 (2016) (査読有)
7. Xu C, Krabbe S, Gründemann J, Botta P, Fadok JP, **Osakada F**, Saur D, Grewe BF, Schnitzer MJ, Callaway EM, Lüthi A. Distinct Hippocampal Pathways Mediate Dissociable Roles of Context in Memory Retrieval. *Cell*. 167, 961-972 (2016) (査読有)
8. **Osakada F** (Corresponding author). Development of Cellular and Tissue-based Products for Retinal Regenerative Medicine. *Yakugaku Zasshi*. 137, 23-29 (2017) (査読有)

[学会発表](計 15 件)

1. **小坂田文隆**
網膜色素上皮シートの移植および神経回路の再構築による視覚機能の再生に向けて
第 34 回動物細胞工学シンポジウム, 東京, 2015 年 5 月
2. **小坂田文隆**
視覚機能の再生に向けた治療開発と神経回路研究
田辺三菱製薬, 横浜, 2015 年 6 月
3. **小坂田文隆**
高密度多電極アレー解析による網膜神経節サブタイプ特異的な機能変化
生体機能と創薬シンポジウム 2015, 千葉, 2015 年 8 月
4. **小坂田文隆**
神経回路の構造と機能を対応付ける狂犬病ウイルストレーシング法
研究戦略ワークショップ「Strategy for Neuroscience 2015」, 埼玉, 2015 年 9 月
5. **Fumitaka Osakada**
Molecular and viral approaches to elucidate structure and function of neural circuits
第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2015 年 12 月
6. **小坂田文隆**
G 遺伝子欠損狂犬病ウイルスを用いた新規神経回路解析法
第 89 回日本薬理学会年会, 横浜, 2016 年 3 月
7. **Fumitaka Osakada**
Neural Circuit Tracing with Glycoprotein-Deleted Rabies Viruses
第 89 回日本薬理学会年会, 横浜, 2016 年 3 月
8. **小坂田文隆**
網膜再生治療に向けた新規幹細胞由来網膜細胞作成法の開発と創薬への応用
日本薬学会第 136 年会, 横浜, 2016 年 3 月
9. **小坂田文隆**
網膜の神経回路を解析するウイルス遺伝子工学と電気生理学的手法
第 31 回東北眼疾患病態研究会, 仙台, 2016 年 5 月
10. **Fumitaka Osakada**
Neural Circuit Tracing with Glycoprotein-Deleted Rabies Viruses
第 38 回日本神経科学大会, 横浜, 2016 年 8 月
11. **小坂田文隆**
「再生医療等製品」としての iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞の可能性
生きた再生医療用材料の開発研究会, 名古屋, 2016 年 10 月
12. **小坂田文隆**
視覚再生を目指した新規治療開発
材料科学フロンティア研究院講演会, 名古屋, 2016 年 11 月
13. **Fumitaka Osakada**
Neural circuit tracing with rabies viral vectors for neural circuit research
Viral vector technology for neural circuit and pathology research, 岡崎, 2016 年 12 月

14. **小坂田文隆**

視覚再生を目指した「再生医療等製品」
の開発に向けて

第6回超異分野学会, 東京, 2017年3月

15. **Fumitaka Osakada**

Viral and electrophysiological approaches to
elucidate structure and function of retinal
circuits,

日本薬学会第137年会, 仙台, 2017年3月

〔図書〕(計 2 件)

1. **Osakada F** (Corresponding author),

Takahashi M.

Stem cells in the developing and adult
nervous system

*Regenerative Medicine –from Protocol to
Patient-* 3rd edition, Springer, 123-149
(2016)

2. **小坂田文隆**、高橋政代

網膜

**臨床薬学テキストシリーズ バイオ医薬
品と再生医療**, 中山書店 (2016)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称: なし

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称: なし

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等: なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小坂田 文隆 (OSAKADA, Fumitaka)

名古屋大学 大学院創薬科学研究科・准教授

研究者番号: 60455334

(2) 研究分担者 なし
()

研究者番号:

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号:

(4) 研究協力者 なし
()