

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K19616

研究課題名(和文) 網膜蛍光超分解能解析と脳機能の同時解析による視覚情報処理系の統合的研究

研究課題名(英文) Hybrid restoration of vision using electrical stimulation on retinitis pigmentosa

研究代表者

不二門 尚 (Fujikado, Takashi)

大阪大学・大学院生命機能研究科・特任教授

研究者番号：50243233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：独自に開発した小型簡易蛍光顕微鏡による生体ラットの網膜神経節細胞及び大脳皮質の細胞の観察が、Thy-1プロモーターによってGFPを発現したラットで可能であることを低倍率観察で確認し、高倍率観察を行うと、これまで他の方法ではin vivo観察ができなかった神経節細胞の軸索および樹状突起等の網膜内構造を、観察できることが示された。また、神経細胞の活動をin vivo観察するため、カルシウム濃度に応じて蛍光強度が変化するGCaMPの遺伝子導入ラットを作成することに成功した。今後GCaMP導入ラットの電気刺激中の蛍光イメージングを試みる予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑内障最初期には、網膜神経節細胞軸索の活動が低下することが知られているが、その早期診断は困難である。本研究では、小型蛍光顕微鏡を開発し、GFPを発現したラットを用いて、網膜および大脳視覚野で、神経細胞を解剖学的に詳細に描出することに成功した。さらに、機能性蛍光タンパクを網膜内の神経節細胞と視覚領の神経細胞に遺伝的に組み込んだラットの作成に成功し、光刺激に対する初期視覚経路の活動を、時空間特性も含め調べる準備ができた。今後は、緑内障最初期のモデルラットに対して、神経節細胞軸索の活動の低下が脳の活動に及ぼす影響を調べ、解析することにより、緑内障の超早期診断に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Observation of retinal ganglion cells and cerebral cortical cells in living rats using a small simple fluorescence microscope developed independently was possible in rats expressing GFP by the Thy-1 promoter. Observations showed that intraretinal structures, such as ganglion cell axons and dendrites, could be observed that could not be observed in vivo by other methods. In addition, in order to observe neuronal activity in vivo, we succeeded in creating GCaMP-transfected rats in which fluorescence intensity changes according to calcium concentration. In the future, we plan to try fluorescence imaging during electrical stimulation of GCaMP-introduced rats.

研究分野：網膜

キーワード：網膜イメージング 軸索 樹状突起 GFP Thy-1プロモーター GCaMP

## 1. 研究開始当初の背景

緑内障最初期には、網膜神経節細胞の軸索の活動が低下することが知られている。網膜神経節細胞層の変化の解剖学的診断は、光干渉断層計（OCT）で臨床的に実用化されているが、機能的な早期診断は困難である。最近、機能性蛍光タンパクを発現した動物モデルで、光学的に神経活動を調べることが可能になっている。我々は、新しい小型のプロトタイプの蛍光顕微鏡を開発中で、機能性蛍光タンパクを発現した動物モデルを使うと、初期知覚の神経系のin vivoでの精密な解剖学的解析が可能であると考えられ、また、機能的な活動を光学的に観察する実験も行なえると考えた。

## 2. 研究の目的

### 小型の蛍光高解像顕微鏡系の開発

Open-sky（角膜と水晶体を除去した）のラット眼に対し、顕微鏡対物を用いた網膜細胞の高解像度イメージング装置（解像度は網膜細胞の内部組織を0.2 μmで観察可能）を開発する

機能性蛍光タンパクを発現させたラットの作成。

Thy-1プロモータを用いると神経節細胞と大脳皮質神経細胞の両方に組み込んだ遺伝子が発現するため、1匹のラットで神経節細胞と大脳皮質神経細胞の両方から同時に形態的、機能的な記録を行うことが可能である。解剖学的in vivo精密解析には、Thy-1プロモータによってGFPを発現したラットを、機能的in vivo精密解析には、カルシウム濃度に応じて蛍光強度が変化するGCaMPの遺伝子を導入したラットを作成する。

機能性蛍光タンパクを発現させたラットを用いた、初期視覚過程の解剖学的および機能的解析

Thy-1プロモータによってGFPを発現したラットでは、網膜および視覚領の細胞から高分解能の画像が検出可能か否かを検討し、GCaMPの遺伝子を導入したラットでは、電気刺激による網膜および視覚領の機能解析が可能か否かを検討する。

## 3. 研究の方法

### 小型の蛍光高解像顕微鏡系の開発

小型の高解像蛍光顕微鏡は、蛍光を使った超高解像のイメージングに有利な、広範囲の同時計測も可能な、撮像素子タイプの光学系を使用して作成する。

機能性蛍光タンパクを発現させたラットの作成は、外部業者に委託して作成する。

機能性蛍光タンパクを発現させたラットを用いた解剖学的は、GFPを発現したラットを用い、試作した小型の高解像蛍光顕微鏡を用いて、Open-skyのラット眼の網膜に対して解剖学的な詳細な解析を行い、併せて視覚領の解剖学的解析も行う。機能的解析は、GCaMPの遺伝子を導入したラットを用い、網膜を光または電気刺激した場合の反応光量の変化を検討する、

## 4. 研究成果

小型の蛍光高解像顕微鏡は、眼の小さいラットの網膜画像を弱拡大(10倍)から、強拡大(40倍)まで安定して取得できることが分かった。GFP発現ラットでは、高倍率観察を行うと、これまで他の方法ではin vivo観察ができなかった神経節細胞の軸索および樹状突起等の網膜内構造を、観察できることを示すことができた(図1)。逆行性染色よりも細胞全体が強く染色され、また、動物のイメージング前の染色のための手術侵襲が無いこともメリットであると考えられた。ただ問題点として、角膜と水晶体の除去による侵襲で網膜剥離が頻発することが挙げられた。従来カバーガラスの使用で網膜剥離を抑えて来たが、網膜が剥離し観察野に傾斜が付いてしまうこ

とが多かった。2019年の研究後半では対策として、硝子体の代わりに agar を充填する、あるいは除去した角膜部分に眼圧を維持する目的で窓付きプラグを導入し、プラグの場合には大きな剥離が起こるまでの時間を延ばすことができた。2020年度に細胞の活性を *in vivo* 観察するため、カルシウム濃度に応じて蛍光強度が変化する GCaMP の遺伝子導入ラットの作成を進めた。Long-Evans ラットの受精卵に Thy1-GCaMP の cDNA を含む遺伝子配列を注入し、得られた仔から作成した F1 動物のゲノムを PCR で調べることによって、遺伝子導入ラットが得られたことを確認した。今後 GCaMP 導入ラットの電気刺激中の蛍光イメージングを試みる予定である。

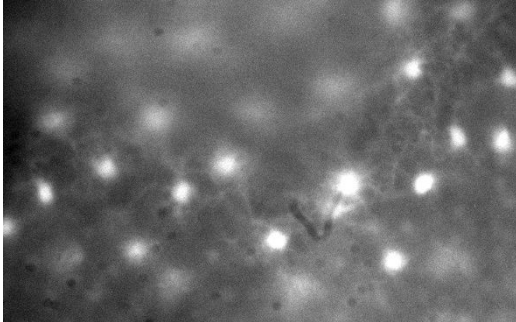


図 1 : 20 倍画像 . starburst amacrine cell とその軸索あるいは樹状突起が観察できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計18件（うち査読付論文 17件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 15件）

1. 著者名 Kawamorita Takushi, Uozato Hiroshi, Oshika Tetsuro, Negishi Kazuno, Fujikado Takashi, Murakami Akira, Kamiya Kazutaka, Maeda Naoyuki, Ueno Yuta, Onuma Kazuhiro, Hirota Masakazu, Hoshikawa Rie, Masui Sachiko, Yamaguchi Masahiro, Mihashi Toshifumi	4. 巻 17
2. 論文標題 Evaluation of ocular biometry in the Japanese population using a multicenter approach: Prospective observational study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0271814
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0271814	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sato Shigeru, Morimoto Takeshi, Fujikado Takashi, Tanaka Sayaka, Tsujikawa Motokazu, Nishida Kohji	4. 巻 13
2. 論文標題 Extensive Macular Atrophy with Pseudodrusen in a Japanese Patient Evaluated by Wide-Field OCTA	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Case Reports in Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 847 ~ 854
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000526970	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishida Kentaro, Morimoto Takeshi, Terasawa Yasuo, Sakaguchi Hirokazu, Kamei Motohiro, Miyoshi Tomomitsu, Fujikado Takashi, Nishida Kohji	4. 巻 67
2. 論文標題 The influence of stimulating electrode conditions on electrically evoked potentials and resistance in suprachoroidal transretinal stimulation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 182 ~ 188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10384-022-00972-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Koh Shizuka, Inoue Ryota, Maeno Sayo, Mihashi Toshifumi, Maeda Naoyuki, Jhanji Vishal, Nishida Kohji	4. 巻 48
2. 論文標題 Characteristics of Higher-Order Aberrations in Different Stages of Keratoconus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice	6. 最初と最後の頁 256 ~ 260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/ICL.0000000000000897	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Koh Shizuka, Inoue Ryota, Iwamoto Yuuri, Mihashi Toshifumi, Soma Takeshi, Maeda Naoyuki, Nishida Kohji	4. 巻 49
2. 論文標題 Comparison of Ocular Wavefront Aberration Measurements Obtained Using Two Hartmann-Shack Wavefront Aberrometers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice	6. 最初と最後の頁 98 ~ 103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/ICL.0000000000000965	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Palchunova Kseniya, Mino Toshihiro, Mihashi Toshifumi, Liu Jonathan, Tasaki Kuniharu, Hasegawa Yumi, Hiraoka Takahiro, Oshika Tetsuro	4. 巻 29
2. 論文標題 Precise retinal shape measurement by alignment error and eye model calibration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Optical Review	6. 最初と最後の頁 188 ~ 196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10043-022-00733-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyoshi Tomomitsu, Morimoto Takeshi, Sawai Hajime, Fujikado Takashi	4. 巻 15
2. 論文標題 Spatial Resolution of Suprachoroidal-Transretinal Stimulation Estimated by Recording Single-Unit Activity From the Cat Lateral Geniculate Nucleus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2021.717429	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shinomiya Kayo, Fujikado Takashi, Kitora Akiko, Okamoto Satoe, Iwata Akiko, Ogushi Yoko, Mitamura Yoshinori	4. 巻 Volume 15
2. 論文標題 Depth Perception with a Newly Developed Microscope Stereotest	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 3901 ~ 3908
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/OPHTH.S326695	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Osamu Hieda , Takahiro Hiraoka , Takashi Fujikado, et al	4. 巻 -
2. 論文標題 Efficacy and safety of 0.01% atropine for prevention of childhood myopia in a 2-year randomized placebo-controlled study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10384-021-00822-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Horiguchi Hiroshi, Suzuki Eiji, Kubo Hiroyuki, Fujikado Takashi, Asonuma Sanae, Fujimoto Chihomi, Tatsumoto Muneto, Fukuchi Takeo, Sakaue Yuta, Ichimura Mika, Kurimoto Yasuo, Yamamoto Midori, Nakadomari Satoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Efficient measurements for the dynamic range of human lightness perception	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10384-020-00808-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hirota Masakazu, Morimoto Takeshi, Miyoshi Tomomitsu, Fujikado Takashi	4. 巻 61
2. 論文標題 Simultaneous Measurement of Objective and Subjective Accommodation in Response to Step Stimulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 38 ~ 38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.61.13.38	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawashima Rumi, Matsushita Kenji, Hashida Noriyasu, Kuniyoshi Kazuki, Fujikado Takashi, Nishida Kohji	4. 巻 Publish Ahead of Print
2. 論文標題 Complete Visual Recovery From Severe Outer Retinitis After Tonsillitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuro-Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/WNO.0000000000001073	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sato Shigeru, Morimoto Takeshi, Tanaka Sayaka, Hotta Kikuko, Fujikado Takashi, Tsujikawa Motokazu, Nishida Kohji	4. 巻 20
2. 論文標題 Novel mutation identified in Leber congenital amaurosis - a case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12886-020-01577-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hirota Masakazu, Yada Kozue, Morimoto Takeshi, Endo Takao, Miyoshi Tomomitsu, Miyagawa Suguru, Hirohara Yoko, Yamaguchi Tatsuo, Saika Makoto, Fujikado Takashi	4. 巻 15
2. 論文標題 Objective evaluation of visual fatigue in patients with intermittent exotropia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0230788 ~ 0230788
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0230788	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ayton Lauren N., Barnes Nick, Dagnelie Gislin, Fujikado Takashi, Goetz Georges, Hornig Ralf, Jones Bryan W., Muqit Mahiul M.K., Rathbun Daniel L., Stingl Katarina, Weiland James D., Petoe Matthew A.	4. 巻 131
2. 論文標題 An update on retinal prostheses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Neurophysiology	6. 最初と最後の頁 1383 ~ 1398
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clinph.2019.11.029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hirota Masakazu, Morimoto Takeshi, Miyoshi Tomomitsu, Fujikado Takashi	4. 巻 70
2. 論文標題 Binocular Coordination during Smartphone Reading in Esophoric Patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Binocular Vision and Ocular Motility	6. 最初と最後の頁 15 ~ 20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/2576117X.2019.1690349	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Shigeru, Morimoto Takeshi, Hotta Kikuko, Fujikado Takashi, Nishida Kohji	4. 巻 40
2. 論文標題 Eleven-year follow-up of a Japanese retinitis pigmentosa patient with an HK1 gene mutation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ophthalmic Genetics	6. 最初と最後の頁 466 ~ 469
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/13816810.2019.1678179	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morimoto T, Chiu LD, Kanda H, Kawagoe H, Ozawa T, Nakamura M, Nishida K, Fujita K, Fujikado T	4. 巻 144
2. 論文標題 Using redox-sensitive mitochondrial cytochrome Raman bands for label-free detection of mitochondrial dysfunction.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analyst	6. 最初と最後の頁 2531 2540
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c8an02213e	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 不二門 尚
2. 発表標題 近視進行防止の現状
3. 学会等名 第213回宮城県眼科集談会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 不二門 尚
2. 発表標題 人工網膜による視覚再建
3. 学会等名 第21回日本ロービジョン学会シンポジウム視覚再建の近未来
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 不二門 尚
2. 発表標題 視力：測定法 表示法
3. 学会等名 第74回日本臨床眼科学会シンポジウム視力・視覚生理
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 不二門 尚
2. 発表標題 網膜色素変性に対する治療の展望：人工網膜を中心に
3. 学会等名 第2回沖縄眼科臨床懇話会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 SHIGERU SATO; Noriyasu Hashida; Takeshi Morimoto; Kikuko Hotta; Takeshi Fujikado; Kohji Nishida
2. 発表標題 Novel OPA1 gene mutations in Japanese patients with optic atrophy
3. 学会等名 2019 ARVO meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三橋俊文, 三好智満, 小木美恵子, 大鹿哲郎, 不二門尚,
2. 発表標題 動物用の網膜高倍率蛍光イメージング光学系とラット生体の網膜神経節細胞
3. 学会等名 日本眼科学会
4. 発表年 2018年

## 〔図書〕 計3件

1. 著者名 Takashi Fujikado	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 -
3. 書名 Pathologic Myopia (Prevention of Myopia Progression in Children and Adolescents) Richard F. Spaid, Kyoko Ohno-Matsui, Lawrence A. Yannuzzi Editors	

1. 著者名 不二門 尚	4. 発行年 2020年
2. 出版社 メディカル葵出版	5. 総ページ数 -
3. 書名 あたらしい眼科【屈折矯正に関する話題】近業による近視化への対処法 ポストコロナ時代を見据えて	

1. 著者名 不二門 尚	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医歯葉出版	5. 総ページ数 -
3. 書名 医学のあゆみ【ブレイン・マシン・インターフェース(BMI)-臨床応用の展望】網膜電気刺激による視覚再建	

## 〔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
研究分担者	三橋 俊文  (Mihashi Toshifumi)  (20506266)	帝京大学・医療技術学部・教授    (32643)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	三好 智満  (Miyoshi Tomomitsu)  (70314309)	大阪大学・大学院医学系研究科・助教     (14401)	

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