

自己評価報告書

平成23年5月9日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2011

課題番号：20300187

研究課題名 (和文) 人工網膜による視機能再建-視細胞変性にともなう網膜神経回路のリモデリングへの対応

研究課題名 (英文) A prosthesis for the retina with remodeling of the neural circuitries after photoreceptor cell degeneration

研究代表者 澤井 元 (SAWAI HAJIME)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：20202103

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：「人間医工学」・「リハビリテーション科学・福祉工学」

キーワード：人工感覚器、可塑性、再生医学、網膜、視覚、電気刺激

1. 研究計画の概要

人工網膜は、視細胞変性疾患による失明患者の視機能を回復させる目的で研究されている人工感覚器であり、カメラで捉えた画像データに基づいて網膜を電気刺激することにより患者に疑似光覚を発生させるものである。現在、国内外で研究されている人工網膜は、視細胞変性後の残存網膜神経回路が正常に機能することを前提にしてきた。しかし、最近、視細胞変性後の網膜神経回路では、その変性初期から残存する神経細胞の遊走、変性、異所性シナプスの形成など大規模なリモデリングが始まっている事が分かってきた。そこで、本研究の目的は、我々が開発している脈絡膜上・経網膜刺激型 (suprachoroidal-tranretinal electrical stimulation, STS) の人工網膜をリモデリングに対応させるため、網膜神経回路の機能特性が視細胞変性に伴ってどのように経時的に変化していくのかを解析するとともに、網膜神経回路への電気刺激がこのリモデリングにどのような影響を与えるのかを検討することとする。実験材料には視細胞変性疾患モデル動物で、ヒトの網膜色素変性症と酷似した経過の視細胞変性をおこすことで知られる Royal College of Surgeons (RCS) ラットを使う。まず、変性初期の8週齢から完全変性後の32週齢までの RCS ラットを用いて STS に対する網膜興奮の時空間応答特性を調べ、それが加齢、すなわち視細胞変性の進行にともなってどのように変化するのかを解析する。

続いて、網膜への慢性 STS が網膜神経回路のリモデリングに与える影響を評価するため、RCS ラットの片側眼球に2時間/日、5日/週の頻度で STS を1ヶ月間加えたのち、

この動物の網膜切片標本を作製する。反対側の眼球は sham operation を施しておく。神経節細胞・ミュラー細胞・アマクリン細胞・双極細胞の免疫染色を行い、網膜の細胞構築を光学顕微鏡下で解析する。さらに、同様の電気刺激をした網膜を用いて、STS に対する網膜興奮の時空間応答特性がどのように変化したかを調べるため、前述の (1) (2) の解析をおこなう。

最後に、以上の結果を踏まえて、リモデリングした網膜神経回路に最適な刺激パラメータを検討する。

2. 研究の進捗状況

(1) 変性網膜における神経細胞の応答の in vitro イメージングの手法を検討した。健常ラットおよび視細胞変性ラットの眼球内に膜電位感受性色素あるいは細胞内 Ca^{2+} 濃度指示薬を注入し、2時間後に網膜を摘出した。眼底観察から色素は硝子体内全体に広がっていたが、網膜の染色部位はごく一部にとどまっていた。そこで、眼球から摘出した網膜組織を、通気した培養液内で維持しながら、液中に膜電位感受性色素あるいは細胞内 Ca^{2+} 濃度指示薬を添加した。添加1時間後の網膜を観察するとほぼ全体が染色されていた。この標本を神経線維層を上にして記録チャンパーに固定し、その表面に金属製刺激電極を設置して定電流矩形パルス刺激を加えたところ、脱分極性の応答が電極付近で発生するのを観察することができた。しかし、 Ca^{2+} 濃度の変化は捉えることが出来なかった。

(2) STS に対する網膜神経細胞の応答のイメージングの確立するため、予め膜電位感受性色素 (VSD) で染色したラットの摘出網膜

伸展標本に STS を与え、その応答を VSD イメージング法で記録・解析した。その結果、刺激電極直下の部位から潜時 1 ms 以内で数 ms の興奮性応答が発生した。この応答は網膜内の視神経線維の走行に沿うように視神経円板に向かう方向とその逆に遠ざかる方向との 2 方向に広がった。更に、この応答は TTX により消失することが分かった。以上のことから、STS による VSD イメージング法で網膜に残存する神経節細胞の応答特性を解析可能になった。(3)視細胞変性後の網膜神経節細胞の形態変化を解析するため、変性開始直後の RCS ラットの網膜神経節細胞内にビオチン化合物を注入して樹状突起を可視化し、その形態を解析した結果、この段階では特に異常は認められなかった。

3. 現在までの達成度

③やや遅れている。

(理由) 視細胞変性モデル動物である RCS ラットの供給(繁殖)が悪いこと。さらに、この動物ではしばしば白内障を伴うことや強膜と網膜の癒着が強く、遊離網膜実験を行うのが技術的に困難であること。また、慢性刺激の埋植手術が確立できていないことによる。

4. 今後の研究の推進方策

網膜全伸展標本を作製するのは困難なので、強膜付きの網膜断片組織を用いて研究を継続する。また、慢性刺激に替えて急性電気刺激に対する効果を検討する予定である。

5. 代表的な研究成果

(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 21 件)

①Morimoto T, Miyoshi T, Sawai H, Fujikado T. Optimal parameters of transcorneal electrical stimulation (TES) to be neuroprotective of axotomized RGCs in adult rats. *Exp Eye Res.* 90:285-291, 2009. 査読有り

②Yamashita M. Synchronous Ca^{2+} oscillation emerges from voltage fluctuations of Ca^{2+} stores. *FEBS J.* 275: 4022-4032, 2008. 査読有り

③澤井元、三好智満、不二門尚、田野保雄 人工感覚器-最近の進歩 人工臓器 37:163-167, 2008. 査読無し

[学会発表] (計 10 件)

①Miyoshi T, Morimoto T, Sawai H, Fujikado T, Tano Y.: Optimal parameters of

transcorneal electrical stimulation for neuroprotection of axotomized retinal ganglion cells in adult rats. International Congress of Physiological Science, 2009/7/30 (Kyoto)

②澤井元、岡崎祐香、八木哲也: 脈絡膜上-経網膜刺激型人工視覚の空間分解能の評価. 第 24 回神経組織の成長・再生・移植研究会 2009/6/21(群馬)