

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09969

研究課題名(和文) 難治性網膜視神経疾患に対する慢性埋込み型電極を用いた神経保護効果の検討

研究課題名(英文) Study of electrical stimulation therapy for optic neuropathies

研究代表者

森本 壮 (Morimoto, Takeshi)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号：00530198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、難治性の視神経症や従来の眼科治療の効果がない緑内障に対する新たな神経保護的治療を開発するために、慢性刺激を可能にする埋込み型電極の開発および神経保護効果の検討や慢性電気刺激と神経栄養因子などの神経保護作用薬との併用効果の検討、それらのメカニズムの解明を行い、難治性視神経疾患に対する電気刺激治療の新たな方法の確立を目指すことを目的に研究を行った。結果、ラット用の慢性刺激を可能にする埋込み型電極と電気刺激システムを開発し、慢性刺激による神経保護効果を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

電気刺激や神経栄養因子が変性網膜神経節細胞に対して神経保護効果を有することは既に分かっていたが、臨床応用に向けて具体的な方法や実証については十分検討がなされていなかった。本研究は、ラットが自由な状態で慢性電気刺激を行うシステムを確立し、同様に長期間の薬剤注入システムを確立し、実証したことは意義があると考えられる。臨床応用にはまだまだ克服すべき課題が多いが、本研究は今後、同様の研究を推進する上で重要な成果を提供すると考える。

研究成果の概要(英文)：To develop a novel neuroprotective therapy for refractory optic neuropathy and glaucoma, which fail to respond to conventional ophthalmic treatment, this study endeavors to (1) fabricate implantable electrodes that allow for chronic stimulation and investigate their neuroprotective efficacy, (2) explore the combined effects of chronic electrical stimulation and neuroprotective agents like neurotrophic factors, and (3) establish a fresh approach of electrical stimulation therapy for refractory optic nerve diseases. Ultimately, the study has yielded a successful outcome, as we have devised an implantable electrode and electrical stimulation system for long-term stimulation in rats, and discovered the neuroprotective benefits of chronic stimulation.

研究分野：眼科

キーワード：神経保護 眼科 緑内障 難治性視神経症 電気刺激 神経栄養因子

## 1. 研究開始当初の背景

難治性の網膜視神経疾患として、視神経萎縮、虚血性視神経症、遺伝性視神経症、外傷性視神経症、緑内障性視神経症などの視神経変性疾患や、網膜色素変性症とその類縁疾患などの視細胞変性疾患がある。これらの疾患では、何らかの原因により網膜神経節細胞 (RGC) や視細胞が細胞死に至り視力の低下や視野の欠損が起こる。RGC や視細胞は中枢神経系の細胞で一度死んでしまうと二度と再生しないためこれらの疾患に罹患し視力の低下や視野が欠損すると二度と回復することはできない。またこれらの疾患に対する治療法はこれまで数多くの研究がなされていたにもかかわらず有効性および安全性が確立された治療法がないため難治性網膜視神経疾患は中途失明の主要な原因の一つとなっている。この難治性網膜視神経症による失明を防ぐためには、疾患の発症時に RGC や視細胞の細胞死を抑制しより多くの細胞を生存させることが重要で、それによって患者の視機能の低下を抑え、視機能を維持させることが可能となる。このため神経保護治療の研究を進め確立させることが重要である。これまでさまざまな薬剤の投与や遺伝子導入などを用いた神経保護の研究が数多く行われてきたが、現時点では臨床応用に至っていない。

これに対し、申請者らは神経細胞が発達期に細胞死を免れ、生存を維持していくためには電気的な賦活が重要であることに着目し、視神経切断後に視神経に直接電気刺激を行うと傷害を受けた網膜神経節細胞 (RGC) の生存が促進することをラットの視神経切断モデルを用いた実験で証明し (Morimoto T, et al. *Neuroreport*. 2002;13:227-30)、眼科領域で初めて電気刺激の神経保護効果を見出した。さらに臨床応用を可能にするため視神経電気刺激よりはるかに侵襲の低い方法である、眼球の表面すなわち角膜側から RGC へ電気刺激を行う方法 (経角膜電気刺激法) を開発し、ラットの視神経切断モデルを用いた実験で損傷 RGC の生存を促進し、神経栄養因子の一つである Insulin like growth factor-1 (IGF-1) が関与することを証明した (Morimoto T, et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46:2147-55.)。また、視細胞が変性する網膜色素変性症の動物モデルに対して電気刺激を行ったところ視細胞に対しても神経保護効果があることを証明した (Morimoto T, et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53:4254-61.)。さらにこの刺激方法を用いて、実際に虚血性視神経症や外傷性視神経症などの難治性視神経症の患者に臨床応用したところ視力や視野が改善する症例が多数みられ電気刺激が難治性視神経症に対して治療効果があることを証明した (Fujikado T, Morimoto T, et al. *Jpn J Ophthalmol*.2006;50:266-73.)。このように、申請者らが始めた眼領域での電気刺激治療に関し、現在、国外で臨床試験や実際に治療が行われている。電気刺激治療は簡便であり、眼局所での治療であり、全身への副作用が少なく、脳刺激などすでに臨床で用いられており有望な治療法であるが、眼疾患に対する治療効果は限定的で、より治療効果を増強させる方法を検討する必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、電気刺激治療の網膜視神経に対する神経保護効果のさらなる向上を目指して、次の研究を行う。i) 眼内埋込み型電極などによる慢性刺激による神経保護効果の検討、ii) 網膜視神経に神経保護効果のある薬剤と電気刺激の併用効果の検討、iii) 神経保護効果のメカニズムの解明。これらの研究を進め、難治性の網膜視神経疾患に対する電気刺激治療の神経保護効果のさらなる向上を目指して、前臨床試験レベルでの電気刺激治療の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

### i) 眼内埋込み型電極などによる慢性刺激による神経保護効果の検討

a) 慢性電気刺激が可能な電極の開発：ラット眼に慢性電気刺激が可能な埋込み型の電極を開発する。電極については強膜ポケットに挿入が可能な電極や視神経に巻きつけるタイプの電極など、どの電極が慢性刺激に適しているのかラットを用いて研究を行った。

b) 慢性電気刺激によるラット視神経切断モデルを用いた RGC に対する生存促進効果の検討：ラット眼の視神経を切断し、1) で検討した慢性刺激電極を用い RGC の生存促進効果を検討した。

### ii) 網膜視神経に神経保護効果のある薬剤と電気刺激の併用効果の検討

i-b) と同様にラット眼の視神経を切断モデルを作製し i) で検討した慢性電気刺激に、過去に網膜や視神経に神経保護効果があると報告されたことのある神経栄養因子などについて作用機序を検討し、カクテルを作製し、慢性投与用の体内埋込み型ポンプを用いて、硝子体に投与し、併用効果を検討した。

### iii) 神経保護効果のメカニズムの解明。

上記、i) ii) について、新しい手法としてラマン分光法を用いて検討を行った。

## 4. 研究成果

### i) 眼内埋込み型電極などによる慢性刺激による神経保護効果の検討

まず、慢性埋め込み型電極および電気刺激装置を開発した。図1Aのような装置を作製し、電極の埋植術を確立した。この装置を視神経を切断したラットに埋植し(図1B)、網膜神経節細胞(RGC)を逆行性に標識するフルオロゴールドを用いて、逆行性に標識し、視神経切断1週間後の慢性刺激装置ありと視神経切断のみで比較検討した。



図1A 慢性電気刺激装置



図1B ラットに埋植した状態

結果、図2のように視神経切断2週間後に慢性電気刺激なし(A)に比べ、慢性電気刺激ありでは、数多くのRGCの生存が認められた。

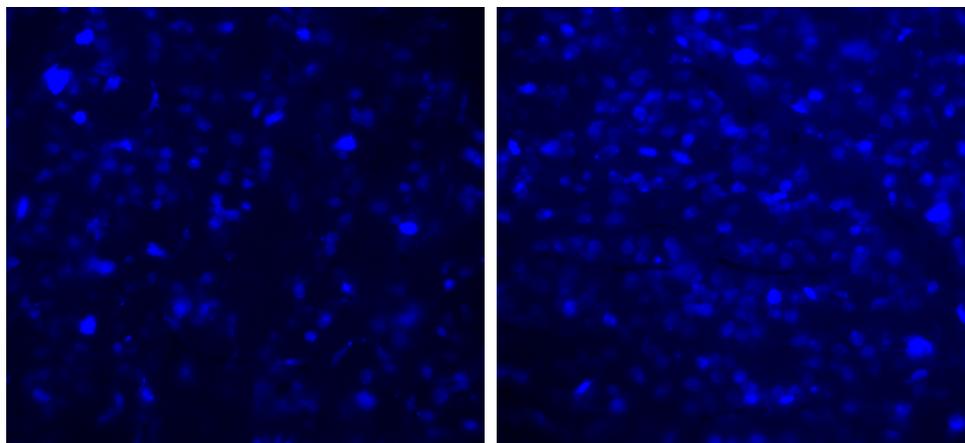


図2 視神経切断2週間後のRGC 電気刺激なし(A)、電気刺激あり(B)

生存RGCの細胞密度についても、電気刺激では正常網膜のRGC密度の88%の生存に対し、視神経切断のみでは、55%に低下していた(図3)。

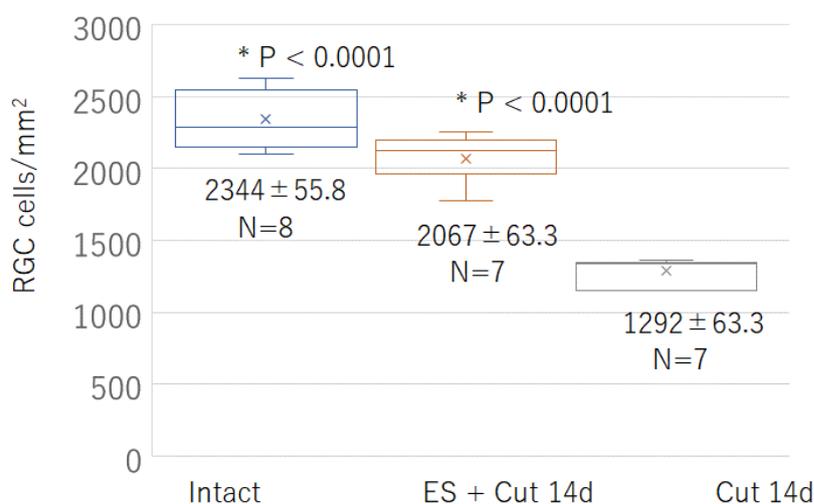


図3 RGCの細胞密度

このことから2週間の慢性電気刺激は有効であることが示された。また4週間でも約30%のRGCが生存していることがわかった(N=2)。このことから慢性刺激装置の神経保護効果および有効性が認められた。

ii) 網膜視神経に神経保護効果のある薬剤と電気刺激の併用効果の検討

薬剤との併用効果について、まずは、図4のような浸透圧によって持続的に液を注入することができるカプセルを用いて、ラット視神経切断モデルを用いて検討を行った。

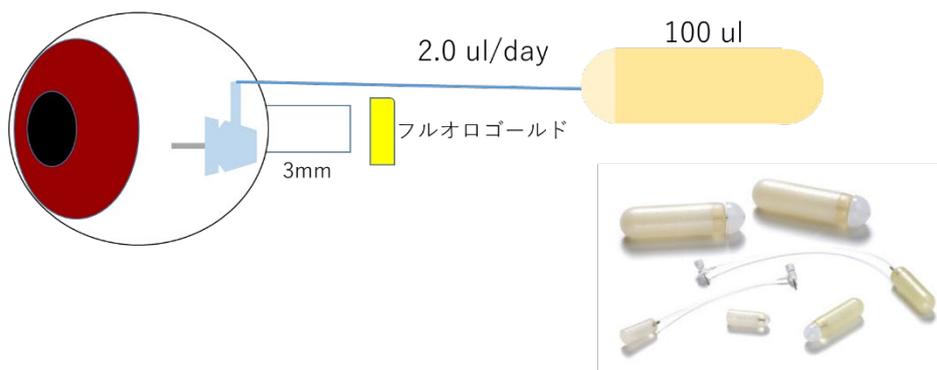


図4 実験のシエーマ

ラット眼の片眼の視神経を切断し、神経栄養因子のカクテル (N T F s) (BDNF、CNTF、IGF-1、GDNF、bFGF、濃度各 0.1 $\mu$ g/ $\mu$ l) を注入したカプセルをラットの背中の皮下に埋植し、注入針をラットの眼球に刺入し留置させ、2週間後の生存促進効果を検討した。

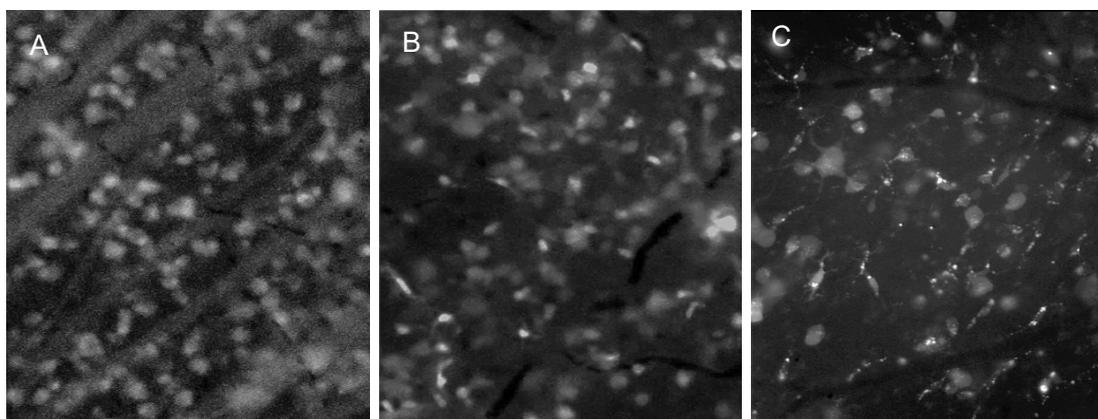


図5 神経栄養因子カクテルの神経保護効果 A(正常網膜)、B(切断2週間後+NTF s)、C(切断のみ)

N T F s では多くのRGCが生存しており、4週間後でもその効果が持続していた (図6)。

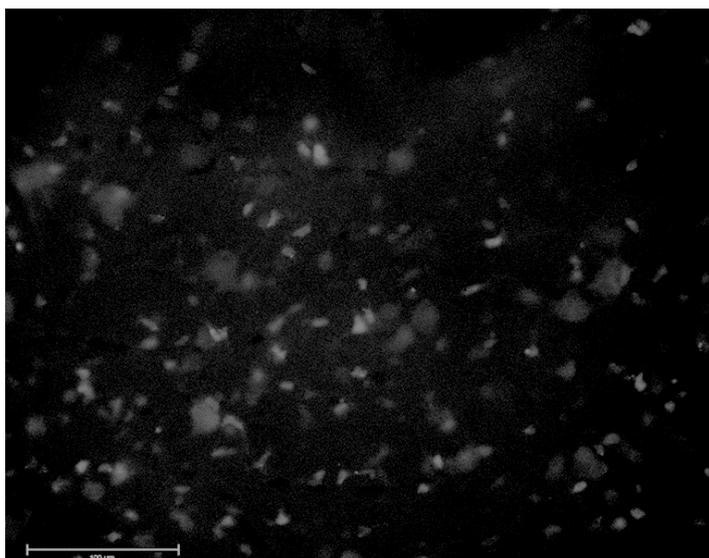


図6 視神経切断4週間後+NTF s

薬剤として神経栄養因子のカクテル療法が有用であることは確かめたが、慢性電気刺激との併用効果については、両者の埋植法が確立できず、期間内に達成できなかった。

iii) 神経保護効果のメカニズムの解明。

上記、i) ii) について、新しい手法としてラマン分光法を用いて検討を行った。

神経保護のメカニズムの解明についてはラマン分光法などの新しい手法を用いて検討し、新たな神経保護のターゲットとしてグルコースの可能性を見出した(図7)が、詳細は詰め切れず、今後の検討課題となった。

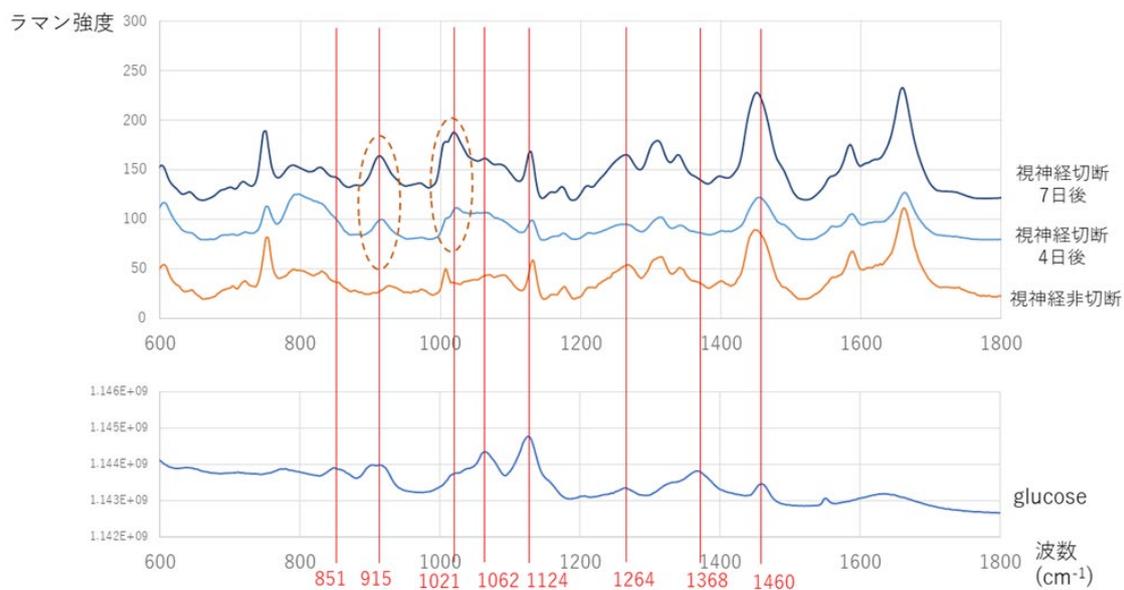


図7 ラマン分光法 赤線のピークがグルコースの波数を示す。

#### まとめ

今回の研究によって、慢性刺激は、一回の電気刺激より神経保護効果が持続することがわかり、神経栄養因子のカクテル療法も有効であることを示したが、両者を埋植する方法をラットなどの動物モデルで確立することはできず、今後の課題となったが、次の研究につながる可能性を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takeshi Morimoto, Takashi Fujikado, Tomomitsu Miyoshi, and Kohji Nishida
2. 発表標題 Chronic trans-scleral electrical stimulation by an implanted microstimulator for the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats
3. 学会等名 ARV02020（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------