

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2012

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）Effect of retinal remodeling after photoreceptor degeneration on feasibility of STS-based retinal prosthesis

研究代表者

澤井 元 (SAWAI HAJIME)

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：20202103

研究成果の概要（和文）：

近年、視細胞変性後の視機能回復手段として人工網膜の開発・研究が進んでいる。人工網膜では残存網膜神経回路が正常に機能することを前提にしているが、視細胞変性にもなう大規模な網膜内回路のリモデリングが生じることが報告されている。そこで本研究では、我々が開発した脈絡膜上-経網膜刺激型の人工網膜を、このリモデリングに対応させるため、視細胞変性後の網膜神経回路の機能的特性がどのように変化するか、視細胞変性進行中の網膜への電気刺激が残存する網膜神経回路の機能に対してどのような影響を及ぼすのか明らかにすることを目的とした。視細胞変性モデル動物である RCS ラットを用いて、視細胞変性の過程で網膜残存機能がどのように変化するかを電気生理学的計測法および光学計測法により解析した。さらに、網膜刺激に対する網膜の細胞構築や神経節細胞の形態の変化を調べた。その結果、電気刺激に対する網膜応答特性、即ち、上丘における誘発電位の振幅、閾値、潜時や皮質視覚野における VSD 応答の広がりには少なくとも検討期間中ほとんど変化しなかった。この結果は、我々が現在進めている脈絡膜上-経網膜刺激型の人工網膜の開発において、失明後のリモデリングが大きな障害となる可能性は低いことが判った。同時に人工網膜の使用が残存回路の変性過程を加速させる可能性も極めて低いことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The retinal prosthesis is one of the feasible methods to some extent to recover visual sensation of blind patients caused by the degeneration of photoreceptors in the retinas. The feasibility depends on the stable function of retinal circuitry remaining after photoreceptors degeneration. Since remodeling of the retinal neurons and their networks has been reported, we investigated how electrophysiological and optical response in the retina and visual centers to transretinal electrical stimulation could be changed during progress of photoreceptor degeneration in the RCS rat, which is well established as a model animal for patients with retinitis pigmentosa. No significant difference in collicular field potentials and VSD images of visual cortical response to the stimulation was detected between young and old animals. Retinal cytoarchitecture and dendritic morphology of the retinal ganglion cells after loss of photoreceptors also is well preserved until 36 wks of age. These results suggest that remodeling of retinal circuitry, if any, might not be a seriously taken consideration in development of retinal prosthesis.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 7,000,000 | 2,100,000 | 9,100,000 |
| 2009年度 | 4,200,000 | 1,260,000 | 5,460,000 |
| 2010年度 | 2,800,000 | 840,000 | 3,640,000 |
| 2011年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 総計 | 15,100,000 | 4,530,000 | 19,630,000 |

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

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性や加齢黄斑変性などの視細胞変性は眼科における失明原因疾患の約1/3を占め、全国で3万人以上、全世界で数百万人規模の失明患者がいるとされている。視細胞変性に対する遺伝子治療や細胞移植治療はまだ研究段階であり、変性後の視覚機能を回復させる手段はまだない。その現状に対して1990年以降、マイクロデバイス技術と生体適合材料の急速な進歩を背景に、人工網膜の開発が国内外で進んできた。人工網膜とは、眼鏡に装着したマイクロビデオカメラで外界の画像を捉え、その画像データに基づいて失明者の網膜を電気刺激することにより、疑似光覚を発生させる人工感覚器である。米国、ドイツを筆頭にさまざまな網膜埋込電極や刺激方法が提案・開発されており、16極から始まった電極数も49-64極と増え、中には1000極に迫るものも開発され、機能向上が著しい。臨床試験での安全性・有効性の評価も進んでいる。我々も2001年以来、独自の刺激方式である脈絡膜上-経網膜刺激型の人工網膜を考案し、開発を進めてきた。

網膜への電気刺激により疑似光覚を発生させるためには、視細胞変性後も網膜に残存する神経回路が正常に機能することが前提となる。しかし、最近、視細胞変性後の網膜神経回路では、大規模なリモデリングが生じている事が分かってきた。神経節細胞やアマクリン細胞の遊走と変性、樹状突起の退縮や発芽、異所性シナプス結合の形成、ミュラー細胞の肥大、神経腫の形成などが報告されている(Machida et al., 2000; Strettoi et al., 2002; Jones and Marc, 2005,)。しかも、このようなリモデリングは視細胞の変性初期から始まり、経時的に進行するという。したがって、健全な神経回路の残存を前提とした従来型の人工網膜開発では、このリモデリングに対応できず、QOLの向上につながるような視覚機能回復は望めない可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者が開発した脈絡膜上-経網膜刺激型の人工網膜を、このリモデリングに対応させるため、以下の点を明らかにすることとした

- (1) 視細胞変性後の網膜神経回路の機能的特性がどのように変化するかを、経時的に明らかにする。
- (2) 視細胞変性進行中の網膜への電気刺激が残存する網膜神経回路の機能に対してどのような影響を及ぼすのか明らかにする。
- (3) 以上の結果を踏まえて、リモデリング後の網膜神経回路に最適な人工網膜用刺激パラメータを確立する。

3. 研究の方法

実験材料には、Royal College of Surgeons (RCS) ラットを用いた。これ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。変性初期の12週齢から完全変性後の36週齢までのRCSラットを用いて脈絡膜上-経網膜刺激(STS)に対する網膜および視覚中枢の応答の時空間特性と網膜神経節細胞の形態を調べ、それが加齢、すなわち視細胞変性の進行、さらに経角膜電気刺激にもなるとどのように変化するかを解析した。具体的には

- (1) in vitro 実験：摘出網膜伸展標本を作製し、標本への直接電気刺激に対する網膜神経細胞の応答を、細胞内カルシウムイオン濃度指示薬や膜電位感受性色素を使ってイメージングした。健常ラットおよび視細胞変性ラットの眼球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(RH1691)あるいは細胞内Ca²⁺濃度指示薬(Oregon Green 488 BAPTA-AM)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

バーに固定し、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て蛍光強度変化比の時空間変動を光学計測システム (Brain Vision 社製 MiCAM Ultima L) で計測した。

(2) *in vivo* 実験：麻酔した RCS ラットの頭部を固定し、右上丘を外科的に露出した。上丘表層に記録電極を置いた。電極を上丘全域を 250 μ m 間隔で格子状に分けた各地点において左眼球に加えた STS に対する誘発電位を記録した。その振幅や閾値が変性期間中にどのように変化するのかを調べた。さらに、固定した動物の右大脳皮質視覚野を膜電位感受性色素 (RH1691) で染色し、左眼球に加えた STS に対する視覚野の蛍光強度変化比の時空間変動を光学計測システム (Brain Vision 社製 MiCAM Ultima L) で計測した。

(3) 組織学実験：RCS ラットの摘出網膜伸展標本を作製し、顕微鏡観察下で通気した培養液内で維持しながら、網膜神経節細胞内にビオチン化合物または蛍光色素 Lucifer Yellow を注入して樹状突起を可視化し、その形態を解析した。また、RCS ラット眼球を摘出し樹脂包埋した後、ミクロトームで網膜切片標本を作製し、顕微鏡下で網膜の細胞構築を観察した。作製した標本からは神経線維層・神経節細胞層・内網状層・内顆粒層の平均の厚さ、神経節細胞層・内顆粒層の平均細胞密度を計測した。

4. 研究成果

(1) *in vitro* 実験：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。この応答は TTX により消失することから、STS による網膜に残存する神経節細胞の興奮性応答であることが判った。次に、16-20 週齢 (n=4) と 30-36 週齢 (n=7) の網膜で応答の範囲と閾値を比較したところ、有意な差は認められなかった。

(2) *in vivo* 実験：強膜においた Pt 製 STS 電極を通じて矩形電流パルス (0.2 ms, 0.3 mA) を与えると、上丘の局所から潜時約 15 ms で陽性-陰性波が記録された。また、予め RH1691 で染色された皮質視覚野では潜時約 20ms から局所の脱分極性応答が発生し、約 30 ms で最大応答に達した。上丘誘発電位の振幅・閾値ならびに皮質視覚野の脱分極性応答の範囲と閾値を 16-20 週齢 (n=9) と 30-36 週齢 (n=11) のラットで比較したところ、有意な差は認められなかった。

(3) 組織学実験：視細胞変性の進行にともなう網膜神経節細胞の形態変化を解析するため、12-20 週齢と 28-36 週齢の 2 群の RCS ラット網膜神経節細胞にトレーサを細胞内

注入して樹状突起を可視化し、その樹状突起の広がりや分枝パターン、細胞体の大きさを解析した結果、両群に差は認められなかった。また、網膜全伸展標本上で網膜神経節細胞のマーカーである抗 TuJ-1 抗体による免疫染色を行い、神経節細胞の残存数を調べても、有意な細胞数の変化は見いだせなかった。さらに、網膜各層の厚みと顆粒層の細胞密度についても両群間に有意な差は認められなかった。次に、経角膜電気刺激の及ぼす効果を検討するために、25 週齢の RCS ラットの片側の眼球に二相性矩形電流パルス (0.2 ms/相, 0.1-0.5 mA) を 20Hz で 1hr/日、1日/週の頻度で 4 週間経角膜的に与えた。コントロールとして、反対側の眼球には電極を装着するのみで電気刺激は与えなかった。両眼への STS に対する効果を上記の *in vivo* 実験で調べたところ、両条件間で有意な差は認められなかった。また、Lucifer Yellow 細胞内注入による神経節細胞の樹状突起を可視化して、樹状突起の広がりや分枝を観察したが、電気刺激側とコントロール側との間に有意な差は見いだせなかった。

これまで視細胞変性後の網膜内リモデリングが形態学的研究に基づいていくつか報告されている。しかしながら、本研究においては電気刺激に対する網膜応答特性、即ち、上丘における誘発電位の振幅、閾値、潜時や皮質視覚野における VSD 応答の広がりや少なくとも検討期間中ほとんど変化しなかった。これらの結果は、視細胞変性マウスやラットの網膜神経回路の機能が視細胞変性後も長期に維持されているという最近の報告 (Kolomiets, et al., 2010; Margolis, et al., 2008; Mazzoni, et al., 2008) とも一致する。微細形態のリモデリングの報告にもかかわらず今回の研究で機能的変化が見いだせなかった理由として、いくつかの可能性が考えられる。

一つは RCS ラットの網膜変性の進行が緩やかであるため、残存回路の可塑的变化を起こしにくいかもしれない。また、今回は主に視覚中枢での機能解析に基づいて網膜のリモデリングを評価したが、中枢における代償的な回路の可塑的再構築が起こることによって機能的変化を観察出来なかった可能性もある。あるいは、現在の脈絡膜上-経網膜刺激型人工網膜が提供できる視力が指数弁程度なので、特に微細なリモデリングが起こったとしても余り大きな影響を与えないかもしれない。同時に、本研究の *in vitro* 実験での機能的リモデリングの評価の精度が不足していた可能性も考えられる。ただし、上述の Kolomiets, et al. や Margolis, et al. も視細胞変性マウス網膜を用いた研究で機能的リモデリングが認められなかったことを報告していることから、単なる評価手段の

精度の問題だけに帰因することはできないと考えられる。

本研究により、我々が現在進めている脈絡膜上-経網膜刺激型の人工網膜の開発において、失明後のリモデリングが大きな障害となる可能性は低いことが判った。同時に人工網膜の使用が残存回路の変性過程を加速させる可能性も極めて低いことが示唆された。しかし、患者の長寿化で視細胞変性後の期間が長くなれば、網膜を含めた視覚系神経回路の機能特性が変化し、人工網膜の電気刺激により発生する疑似光覚の質が変化する可能性は残されている。また、欧米で進められている網膜上刺激型や網膜下刺激型の人工網膜では電極が直接網膜に接触ないし刺入されるので、自然発生的なりモデリングがなくとも電極による網膜侵襲が機能的リモデリングを誘発する可能性はあるかもしれない。また、今回の刺激パラメータでは十分に見いだせなかったが、適切な電気刺激が与えられれば網膜神経回路が賦活化され、変性の進行が抑制ないし阻止される可能性は依然残っている。実際、経角膜電気刺激によって視細胞変性や視神経挫滅後の視覚中枢での視覚刺激応答が動物実験で報告されている。さらに、臨床試験では、刺激中に網膜色素変性患者の視力が回復し、その視力改善が数週間にわたって持続することを見出している。これらの可能性に関しては今後さらに検討する必要があると考えられる。

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 23 件)

- ① Sato S, Omori Y, Katoh K, Kondo M, Kanagawa M, Miyata K, Funabiki K, Koyasu T, Kajimura N, Miyoshi T, Sawai H, Kobayashi K, Tani A, Toda T, Usukura J, Tano Y, Fujikado T, Furukawa T. Pikachurin, a dystroglycan ligand, is essential for photoreceptor ribbon synapse formation. *Nat Neurosci*. 査読有 Vol. 11, 2008, pp. 923-31
- ② Okazaki Y, Morimoto T, Sawai H. Parameters of optic nerve electrical stimulation affecting neuroprotection of axotomized retinal ganglion cells in adult rats. *Neurosci Res*. Vol. 61, 2008, pp. 129-35
- 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 査読無 Vol. 37, 2008, pp. 163-167
- ④ Shimonomura, K., Yagi, T. Neuromorphic VLSI vision system for real-time texture segregation. *NEURAL NETWORKS* 査読有 Vol. 21 2008 Vol. 1197-1204
- ⑤ Okuno, H., Yagi, T. A visually guided collision warning system with a neuromorphic architecture. *NEURAL NETWORKS* 査読有 Vol. 21, 2008, pp. 1431-1438
- ⑥ Osanai, M., Tanaka, S., Takeno, Y., Yagi, T. Inhibitory synapses are responsible for the signal propagation properties in the visual cortical circuit. *NEUROSCIENCE RESEARCH* 査読有 Vol. 61, 2008, S175
- ⑦ Hasegawa, J., Yagi, T. Real-Time Emulation of Neural Images in the Outer Retinal Circuit. *JOURNAL OF PHYSIOLOGICAL SCIENCES* 査読有 Vol. 58 2008, pp. 507-514
- ⑧ Ishiki, T., Tanaka, S., Osanai, M., Doi, S., Kumagai, S., Yagi, T. BIFURCATION-BASED MODEL CONSTRUCTION OF A PYRAMIDAL CELL OF THE PRIMARY VISUAL CORTEX. *INTERNATIONAL JOURNAL OF INNOVATIVE COMPUTING INFORMATION AND CONTROL* 査読有 Vol. 5, 2008, pp. 831-845
- ⑨ Okuno, H., Yagi, T. Mixed analog-digital vision sensor for detecting objects approaching on a collision course. *ROBOTICS AND AUTONOMOUS SYSTEMS* 査読有 Vol. 57, 2008, pp. 508-516
- ⑩ Yamashita M. Synchronous Ca²⁺ oscillation emerges from voltage fluctuations of Ca²⁺ stores. *FEBS JOURNAL* 査読有 Vol. 275, 2008, pp. 4022-4032
- ⑪ Yamashita M. Synchronization of Ca²⁺ oscillation by fluctuations in the membrane potential of Ca²⁺ stores. *NEUROSCIENCE RESEARCH* 査読有, Vol. 61, 2008, S88

- ⑫ Morimoto 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* 査読有, Vol. 90, 2009, pp. 285-291
- ⑬ Tagami Y, Kurimoto T, Miyoshi T, Morimoto T, Sawai H, Mimura O. Axonal regeneration induced by repetitive electrical stimulation of crushed optic nerve in adult rats. *Jpn J Ophthalmol.* 査読有 Vol. 53, 2009, pp. 257-66
- ⑭ Okazaki Y, Sawai H, Yagi T. In vivo optical measurements of cortical response evoked by electrical stimulation in the mouse visual cortex. *電子情報通信学会技術研究報告* 査読無 Vol. 109, 2010, pp. 119-122
- ⑮ Yamashita M. Synchronization of Ca²⁺ oscillations: Is gap junctional coupling sufficient? *FEBS Journal* 査読有 VOL. 277, 2010, pp. 277
- ⑯ Yamashita M. Synchronization of Ca²⁺ oscillations: a capacitive (AC) electrical coupling model in neuroepithelium. *FEBS Journal* 査読有 VOL. 277, 2010, pp. 293-299

[学会発表] (計 14 件)

- ① Sawai H: Voltage sensitive-dye imaging of visual cortical response to suprachoroidal transretinal electrical stimulation in the retinal degenerated rat. (第 90 回日本生理学会大会 2013/3/27-29 東京)
- ② Miyoshi 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)
- ③ 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)

- ④ 長谷川潤, 八木哲也: 網膜双極細胞ニューラルイメージの実時間再構築 (視覚科学フォーラム第 12 回研究会 2008/8/28-29 大阪)
- ⑤ 山下勝幸: 発生初期網膜の電気生理学的解析 (第 114 回 日本解剖学会総会 2009/3/29 岡山)
- ⑥ T. Yagi, K. Shimonomura, Y. Okazaki, H. Okuno, M. Osanai, and H. Sawai: Analog VLSI vision device for cortical implants. (The 36th International Congress of Physiological Sciences Jul. 27 - Aug. 1, 2009 Kyoto, Japan)
- ⑦ 岡崎 祐香, 八木哲也: マウス一次視野内電気刺激による皮質神経活動の in vivo 膜電位感受性色素イメージング (第 24 回生体・生理工学シンポジウム 2009/9/24-26 仙台)
- ⑧ Yamashita M.: Voltage fluctuations of calcium store in retinal neuroepithelium. (The 36th International Congress of Physiological Sciences Jul. 27 - Aug. 1, 2009 Kyoto, Japan)
- ⑨ 山下勝幸: 網膜神経上皮細胞間におけるカルシウムオシレーションの同期化メカニズム (第 32 回日本神経科学大会 2009 年 9 月 17 日 名古屋市)

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

三好智満 (MIYOSHI TOMOMITSU)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号: 70314309

八木 哲也 (YAGI TETSUYA)
大阪大学・工学系研究科・教授
研究者番号: 50183976

山下勝幸 (YAMASHITA MASAYUKI)
奈良県立医科大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 20183121

