

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22249058

研究課題名(和文)電気刺激による視覚回復の基礎的・臨床的研究

研究課題名(英文)Basic and clinical research on recovery of vision by electrical stimulation

研究代表者

不二門 尚(Fujikado, Takashi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50243233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,900,000円、(間接経費) 11,070,000円

研究成果の概要(和文)：RGC5の培養系に対して電気刺激を与えた結果、IGF1のmRNAの増加が認められ、神経保護の機構にIGF1が寄与している可能性が示された。ラマン顕微鏡で、神経細胞死の過程でのチトクロームCの細胞内での変化が画像として時間的に示された。網膜色素変性兔モデルに対して経角膜網膜電気刺激(TES)を行うと、外顆粒層の減少が有意に抑制され、電気刺激による視細胞保護効果が証明された。TESでは刺激周波数により、網膜の賦活の程度が異なることが、ネコ網膜の内因性シグナルの検討で示された。視神経刺激型人工視覚の臨床研究では、長期埋植例でも患者は電気刺激に対して、フォスフェンを自覚することが示された。

研究成果の概要(英文)：IGF1 mRNA was increased by the electrical stimulation on cultured RGC5, which suggests that IGF1 is involved in the neuro-protection mechanism by electrical stimulation (ES). The process of neuronal cell-death was demonstrated sequentially and 2-dimensionally by Raman microscope by probing the intracellular changes of cytochrome C. Trans-corneal electrical stimulation (TES) on rabbit model of retinal degeneration showed a decrease of OPL thickness, which suggests the neuro-protective effect of ES on photoreceptors. Clinical study on the artificial vision by optic nerve stimulation showed the efficacy of ES to elicit phosphine for 2 years for advanced retinitis pigmentosa patients.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：眼科学

キーワード：神経保護 電気刺激 人工視覚 網膜機能画像 ラマン分光

**研究開始当初の背景：**網膜を構成する視細胞、視神経節細胞は、中枢神経系に属する神経細胞である。眼科臨床における広義の神経変性疾患には、虚血性視神経症、網膜色素変性、加齢黄斑変性、更には緑内障があり、本邦における失明原因の約40%を占める極めて重篤な疾患群である（厚生労働省「網膜脈絡膜・視神経萎縮症に関する研究」報告書）。現在、神経細胞の変性・萎縮を阻止する直接的手段が存在しないことが、これらの疾患による失明を阻止できないことの根本的な原因である。

一方、視覚を含めた神経系における信号伝達は電位変化によるので、人工的に電気信号を発生させ二次ニューロン以下に伝達する人工臓器の開発が進んだ。人工内耳、人工視覚等の人工感覚器の目的は入力系の補完であったが、電気刺激が神経系に保護的に働く副次効果が認められた。我々の人工視覚においては、刺激後に視機能が向上する現象があることを経験している。これらの事象は、電気刺激が神経細胞の変性・萎縮を阻止する可能性を示し、上述した難治性神経変性疾患による失明を回避できる新しい治療法となり得る可能性を示唆している。

我々は、以前よりこの電気刺激による視覚回復の可能性に注目しており、すでに2002年に難治性視神経疾患モデルラットに対して、視神経を直接電気刺激すると、網膜視神経節細胞の生存率が上昇することを報告した（Morimoto T, et al, Neuroreport, 2002）。さらに、網膜（視細胞）変性モデルラットに対してTESを行い、視細胞レベルで変性の進行が抑制されることを示した（Morimoto T, et al, IOVS, 2007）。臨床的にも、我々がおこなっている視神経乳頭刺激型人工視覚（AVDONE）の臨床試験において、網膜色素変性患者11例

中4例が自覚的視機能の向上を示し、さらに、虚血性視神経症および外傷性視神経症に対するTESにより、一部の症例で視力向上をもたらすことが確認されている（Fujikado T, et al JJO 2006）。これらのデータは、AVDONEによる視神経直接刺激のみならず、TESによる間接的な網膜電気刺激によっても、視覚回復効果が期待できることを示すものである。このように臨床的に効果が認められつつある電気刺激であるが、その神経保護の分子機構に関しては、ほとんど解明されていない。

## 研究の目的

**(1)電気刺激の網膜神経節細胞に対する神経保護に関する研究：**電気刺激による神経保護の分子機構を培養網膜神経節細胞を用いて検討する。ラマン分光を用いて、機能画像として、RGCにおいて電気刺激で誘導される物質を検討するとともに、神経細胞死に至る過程での細胞内代謝変化をCytochrome Cの変化をモニターして検討する。**(2)電気刺激の視細胞に対する神経保護の検討：**網膜変性モデル兔にTESを行い、変性進行が防止できる条件（刺激頻度、パルス幅、薬物治療との併用など）を電気生理学および組織化学的に検討する。**(3)経角膜網膜電気刺激の網膜機能画像による評価：**ネコに対してTESを行い、赤外光の反射率変化を用いた網膜機能画像により、RGCが最も効率的に賦活される条件を検討する。**(4)視神経刺激型人工視覚の臨床研究：**視神経刺激型人工視覚システムの長期埋植の安全性、有効性を臨床研究を中心に検討する。

## 研究の方法

**(1) 電気刺激の網膜神経節細胞に対する神経保護に関する研究**

**電気刺激による神経保護の分子機構：**不死化した網膜色素上皮細胞（ARPE-19）および網

膜神経節細胞(RGC-5)の培養系に対して二相性パルスで30分電気刺激を与え、3時間後にmRNAを抽出しReal Time PCRにて解析を行った。

#### ラマン分光画像による神経細胞死の検討

網膜の不死化細胞であるRGC-5を使用し、培養したRGC-5細胞にグルタミン酸(600mM)を投与し、細胞死を誘導した。RGC-5細胞を投与なし、投与30分後、60分後、90分後、120分後に分けてラマン顕微鏡で観察した。ラマン顕微鏡は、本学工学部ホトニクスセンターで独自に開発したラマン顕微鏡を用いた。得られたラマンスペクトルのうち、cytochrome c (cyt c)に関連する $750\text{cm}^{-1}$ のラマンシフトを計測し、cyt cの画像を再構成し、cyt cの分布の変化やシグナル強度の変化について検討した。また、光学顕微鏡写真、cyt cの免疫染色やMitotrackerを用いてミトコンドリアを標識し、ラマン像と比較した。最後に電子顕微鏡によってミトコンドリアの微細構造の変化についても検討した。

#### (2)電気刺激の視細胞に対する神経保護の検討

6週齢のRhodopsin P347Lトランスジェニック家兔に対し、全身麻酔下でTES治療を行った。TES治療は、左眼に対し1週間に1回行い、6週間治療を行った。

TES治療の方法は、左眼に対しコンタクトレンズ型電極を装着し電気刺激装置につなげて電気刺激を行った。電気刺激の条件は、0.7mA、パルス幅10ms、20Hz、1時間で、右眼は同様にコンタクトレンズ電極を装着し電気刺激をしない状態で1時間そのままにし、sham刺激群とした。視機能の評価には、網膜電位図(ERG)を測定し、治療開始前と治療6週間後にERGを測定した。また、治療終了後

(12週齢)に両眼の眼球を摘出し、パラフィン包埋をした後切片を作製しHE染色を行い刺激群とsham刺激群で比較検討した。

#### (3)経角膜網膜電気刺激の網膜機能画像による評価

8匹の成ネコを用い、全身麻酔下でネコを固定器に固定し、左眼を散瞳した後、眼底カメラ(TRC-50LX, トプコン)にCCDカメラ(C8484, 浜松ホトニクス)を備えた自作の眼底カメラを用いて、近赤外光(800-880nm)を眼底に照射して、網膜の反射光を測定した。次に左眼に電極を縫い付け、TESを行なった。TESの電気刺激の条件は両相矩形波で電流強度0.1から2.0mA、パルス幅0.5から10msで刺激頻度5から50Hz、20パルスの刺激を行なった。網膜内因性シグナルの測定は、25ms毎に測定し、測定時間は、測定開始2秒後に電気刺激を行い、全部で26秒間測定した。

#### (4)視神経刺激型人工視覚の臨床研究

7本の刺激電極、2本の参照電極、1本のデバイス把持用白金線、シリコンパッドからなる電極デバイスを作成し、両眼視力が光覚弁の44歳の網膜色素変性患者の左眼に対し、倫理委員会の承認、インフォームドコンセント取得後、その埋植手術を施行した。

#### 研究成果

##### (1)電気刺激の網膜神経節細胞に対する神経保護に関する研究

電気刺激による神経保護の分子機構ARPE-19細胞ではglial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)のmRNAが有意にup regulationされ、RGC-5細胞ではInsulin-like growth factor 1 (IGF1)のmRNAの増加が認められた。これらの結果は、眼内で神経栄養因子を分泌するDrug Delivery Systemの開発に寄与すると期待された。

### ラマン分光画像による神経細胞死の検討

図1のようにグルタミン酸を投与すると、細胞が収縮し、2 時間後に細胞は死に至る像が得られた。しかしながら、投与 30 分後から 90 分後の間では、光学顕微鏡では形態的な変化が判別しづらいことがわかった。

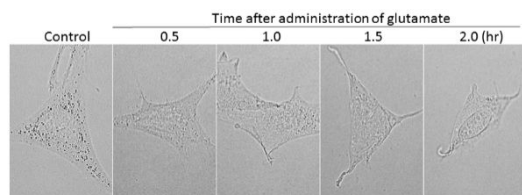


図 1

一方、cyt c のラマン画像では、投与後に cyt c の分布が変化し、シグナルの強度が低下することがわかった (図 2)。

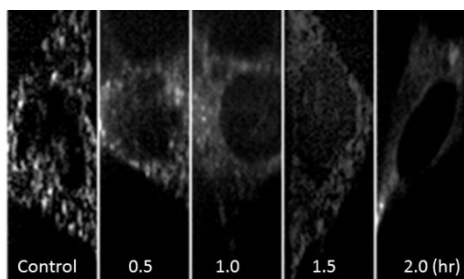


図 2

また、cyt c の免疫染色や Mitotracker によるミトコンドリアの染色と比較すると分布の変化が似ていた (図 3) さらに電顕写真では、投与 30 分後ですでにミトコンドリアの微細構造が変化し、変性が始まっていることがわかった (図 3)。今回、免疫染色では、ミトコンドリアの変性や cytochrome c の変化については検出が不可能で、電顕でしかわからなかったミトコンドリアの変化について、ラマン顕微鏡ではミトコンドリアの変性を示唆する所見が得られた。このため、ラマン顕微鏡はこれまでの組織学的検査とことなり、細胞や組織を非染色、固定などをせずに計測し、検

出が可能であると考えられた。

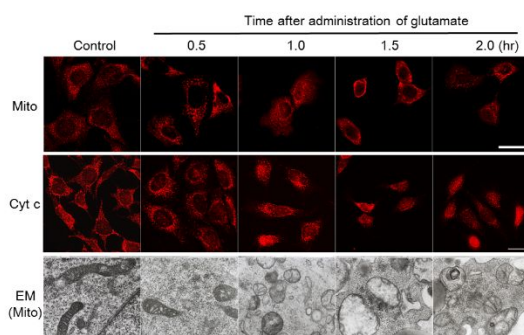


図 3

### (2)電気刺激の視細胞に対する神経保護の検討

TES 治療眼と sham 刺激眼の網膜について HE 染色を用いた組織学的検討の結果、visual streak 付近の網膜では、両群に差が見られ、sham 刺激群では、外顆粒層が変性し、視細胞の核がかなり減少していたのに対し、TES 治療群では、外顆粒層に多くの視細胞の核が残っていた。一方周辺網膜では両群に差は見られなかった。

ERG の結果は、図 4 のように、TES 治療群は、sham 刺激群と比べて、明順応 ERG で反応が大きかった。一方暗順応 ERG では、両群に差はなかった。

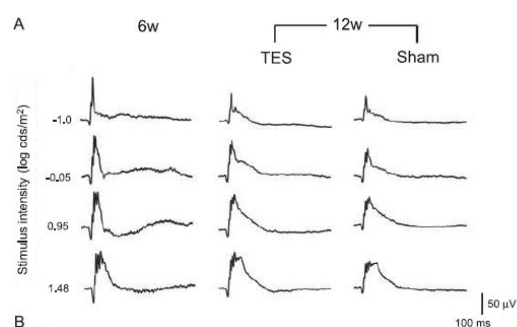


図 4 明順応 ERG

以上のように、網膜色素変性の中型動物モデルに対して TES 治療が有効であることが証明

され、論文発表を行なった。

また今回得られた研究成果は、今後網膜色素変性患者に対する新しい治療法となる可能性がある。

### (3)経角膜網膜電気刺激の網膜機能画像による評価

TES による網膜の内因性シグナルの変化は主に網膜血管と視神経乳頭で見られた。

電流強度を変化させると刺激電流が大きくなると反応もそれに伴い大きくなった。

刺激頻度を変化させた結果、図 5 のように内因性シグナルの反応は、刺激頻度によって変化し、10 から 30Hz の時に反応が大きくそれより周波数が高くて、低くても反応は小さくなった。

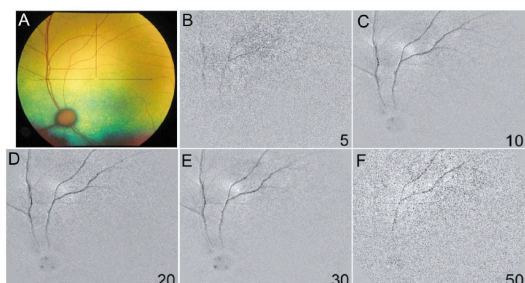


図 5 刺激頻度による網膜内因性シグナルの変化

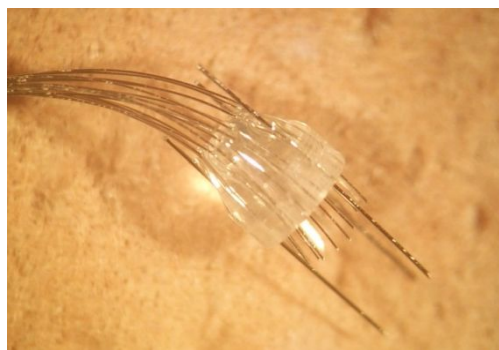
今回の検討の結果、電気刺激の強度によって網膜の内因性シグナルが大きくなることがわかった。また同じ強度でも刺激頻度によって網膜の内因性シグナルは変化し、これらの結果から網膜の内因性シグナルは、TES によって網膜がどの程度刺激されているかを示す指標となると考えられる。TES と網膜内因性シグナル測定を組み合わせることで自覚的な擬似光覚でしか評価できなかった重症網膜色素変性患者の視機能の客観的な評価が可能になるかもしれない。

### (4) 視神経刺激型人工視覚の臨床研究

・視神経刺激型人工視覚システムの患者への埋植術後 1 年半以上を経ても、電気刺激(刺激強度 10-500  $\mu$ A, 刺激時間 250  $\mu$ s)により、患者がフォスフェンを認識することができた。

・一旦視神経乳頭に埋植された刺激デバイスを安全に抜去することが可能であった

・デザイン通りに、刺激デバイスを作成することができた。従来型の刺激デバイスは直径が 2mm で刺激電極が 7 本、把持棒が 1 本であったが、今回開発した刺激デバイスは、直径が 2.4mm へと若干の拡大で、刺激電極は 17~19 本、把持棒も 1~3 本へと大幅に増加させることができた(下図)。



また、従来型の刺激デバイスの把持棒は中心から 1.3mm の場所にあったが、今回開発した刺激デバイスでは、中心から 1.63mm の位置とした。刺激デバイスを固定する際、把持棒の間隔は広い方がより安定すると考えられる。

今後は、このデバイスの安定性を確認するために、動物実験を行って、把持棒の数の適正化を行っていく予定である。

・ERG s が測定できなかった 40 週齢の RCS ラットにおいて、EEP s は計測することができた。今回、開発した刺激デバイスに使用した刺激電極を用いることで、完全に失明したモデル動物で EEP s を誘発できたことから、今回開発したデバイスでも、実際の臨床におい

ても有用であることが期待できる。

#### 主な発表論文等

##### 雑誌論文 (計 6 件)

1. Morimoto T, Kanda H, Miyoshi T,

Hirohara Y, Mihashi T, Kitaguchi Y, Nishida K, Fujikado T.: Characteristics of Retinal Reflectance Changes Induced by Transcorneal Electrical Stimulation in Cat Eyes. PLOS ONE 9(3) 1, Mar. 2014

2. Fujikado T, Kamei M, Sakaguchi H, Kanda H,

Morimoto T, Nishida K, Kishima H, Maruo T, Oosawa K, Ozawa M, Nishida K. Feasibility of 2nd generation STS retinal prosthesis in dogs. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. 2013;2013:3119-21.

3. Morimoto T, Kanda H, Kondo M, Terasaki H, Nishida K, Fujikado T.:

Transcorneal electrical stimulation promotes survival of photoreceptors and improves retinal function in rhodopsin P347L transgenic rabbits. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012 28;53:4254-61.

4. Fujikado T, Kamei M, Sakaguchi H, Kanda H,

Morimoto T, Ikuno Y, Nishida K, Kishima H, Maruo T, Konoma K, Ozawa M, Nishida K. Testing of semichronically implanted retinal prosthesis by suprachoroidal-transretinal stimulation in patients with retinitis pigmentosa. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011 ;52:4726-33.

5. Morimoto T, Kamei M, Nishida K, Sakaguchi H, Kanda H, Ikuno Y, Kishima H, Maruo T, Konoma K, Ozawa M, Nishida K, Fujikado T.: Chronic implantation of newly developed suprachoroidal-transretinal stimulation (STS) prosthesis in dogs. Invest Ophthalmol Vis Sci. 52 : 6785-92. .2011

6. 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.;90:285-91..2010

##### 学会発表 (計 3 件)

1. Fujikado T. Feasibility of 2nd Generation STS Retinal Prosthesis in dogs. Artificial Vision 2013: The International Symposium on Visual Prosthetics 11.8.2013 Aachen, Germany.

2. Morimoto T Evaluation of residual retinal preservation by using transcorneal electrical stimulation and optical coherence tomography in patients with advanced retinitis pigmentosa, candidates for retinal prosthesis. The International Symposium on Visual Prosthetics 11.8.2013 Aachen, Germany.

3. Fujikado T Feasibility of 2nd Generation STS Retinal Prosthesis with 49 Channel Electrode Array in Dogs ARVO 5.9.2013, USA, Seattle,

##### 図書 (計 1 件)

Morimoto T.: Role of electrical activity of neurons for neuroprotection. Int Rev Neurobiol. 105: 19-38. Dec.2012

##### 産業財産権

○出願状況 (計 1 件)

名称 : 特許権

発明者 : 瓶井 資弘、坂口 裕和

権利者 : (株)ニデック

種類 : 特願

番号 : US13/027392

出願年月日 : 平成 23 年 2 月 1 日