

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：34315

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659038

研究課題名(和文) 神経シグナルを洗練する網膜回路リファインメント機構の解明

研究課題名(英文) Refinement mechanism of primal visual processing in mouse retina

## 研究代表者

小池 千恵子 (Koike, Chieko)

立命館大学・薬学部・准教授

研究者番号：80342723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物網膜は階層構造を持ち、光信号は神経シグナルに変換された後、神経節細胞に至る過程で情報処理を受ける。我々は三次元マルチ電極アレイ(MEA)を作製し、網膜内細胞外電位の計測を行うことにより、正常網膜内層からの振動性シグナルの検出に初めて成功した。本シグナル網膜外からは計測されないことから、正常網膜の高次階層において抑制されるものと考えられた。詳細な解析を予定したがアクシデントにより電極作製装置を再購入しなくてはならなくなった上、新規装置で作製された電極はノイズが大きく、微妙な網膜内シグナルの検出が困難となったがインピーダンスが低いことから、今後も電極の性能向上を図り解析を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：The retinal photoreceptors convert light into electrical signals that are processed by the sequential retinal layers and the ganglion cells. Electroretinogram (ERG) procedure is useful to obtain neuronal electrical activities from the retina. Microelectrode arrays (MEAs) can detect light responses from the isolated retina that have advantages to analyze ganglion cell functions in addition to micro ERG.

In order to directly and spatially stimulate and record multisite electrical responses of the inside retina, we have developed spatially arranged microelectrodes using the wire bonding based probe technology. Both 2D and 3D microelectrodes were designed in a chip to make a comparison between ERG recorded by the fabricated microelectrode probes and conventional planar microelectrodes. The typical signals were successfully detected in 3D microelectrode. These results suggest that the gold microelectrode probe arrays are applicable to retina experiments as a new analysis tool.

研究分野：神経科学

キーワード：視覚 電気生理学 マルチ電極アレイ 網膜 神経回路

## 1. 研究開始当初の背景

神経活動は興奮性入力と抑制性入力のバランスの上に成り立っている。バランスが崩れると神経の異常活動が増加し、てんかんやパーキンソン病などの様々な神経症状を引き起こすものと考えられている。

中枢神経系網膜において視細胞で変換された視覚情報は、中間ニューロンである双極細胞、水平細胞、アマクリン細胞による調節を受け、最終段の神経節細胞において収束され脳へと伝達される。正常マウス網膜では光刺激がなければ神経節細胞からスパイク応答が検出されないが、視細胞変性モデルであるrd1マウス網膜 (rd1 網膜) においては約10Hz の異常な神経活動が検出されることが知られており、光視症の原因ではないかと考えられている。そこで異常シグナルの発生メカニズム研究がなされているが、未だ明確な答えは得られていない。

## 2. 研究の目的

我々は剣山型三次元マルチ電極アレイ (MEA) を使い、マウス網膜内部の細胞外電位を計測することにより、マウス網膜視覚情報伝達過程におけるシグナルの検出を行うことを目的とした。さらに網膜内の振動性シグナルの発生および抑制メカニズムを遺伝子改変モデルマウスや薬剤を用いて明らかにしたいと考えた。

## 3. 研究の方法

### (1) 網膜内部における視覚情報伝達シグナルの検出

網膜における視覚情報伝達シグナルの検出には、光刺激時の網膜全体の電位変化を捉える方法である網膜電位図(ERG)解析と、MEAを用いた網膜出力細胞である神経節細胞のスパイク応答を検出する方法がある。網膜内の個々の細胞の電気応答を検出する方法としてはパッチクランプ法があるが、組織をスライス化する必要があり、完全な網膜ネットワーク下における視覚シグナル検出という目的には不向きである。そこで網膜内部の神経シグナルの検出を目的として、剣山型のMEAを用い、網膜組織の深部に電極を差し込む形で電気シグナルの検出を行う。さらに三次元電極の網膜内位置を特定することにより、電極位置と電気応答の形や大きさを測定し、数理モデルを作成する。

### (2) 視覚機能欠損マウスモデルを用いた網膜内部の電気シグナル検出

振動性シグナルの発生・抑制メカニズムを、薬剤による機能阻害などにより解析する。さらに網膜内多点同時計測の計測結果から、網膜細胞間ネットワークにおける振動性シグナルの同調性とその生理学的意義について検討する。

## 4. 研究成果

共同研究者である理工学部の小西・殿村らは、素材として金を用いることによりインピーダンスの低い剣山型三次元 MEA 電極の作製に成功していた。我々は網膜深部における視覚刺激時の電位変化の解析が行えないかと考えていたため、本剣山型電極を用いて野生型網膜由来の細胞外電位測定を行ったところ、網膜スライス切片ではなく組織のままでの野生型正常網膜内部の振動性シグナルの検出に世界で初めて成功することができた。また、フーリエ変換解析を行ったところ、検出された内在性の振動が約 10Hz の周波数を持つことが明らかとなった。

一方で、同じ電極板上の神経節細胞が接する平面電極からは振動シグナルは検出されなかったことから、我々は、剣山電極により得られた振動性シグナルは、網膜内部に存在するものであり、網膜内情報伝達における高次階層においては抑制される可能性を考えた。そこで、網膜深部由来の振動性シグナルの発生場所の特定を行い、また振動性シグナルの視覚情報経路における抑制メカニズムを明らかにしたいと考えた。

しかしながら、初年度に学内の火事により剣山型電極の作製装置が灰を被り、電極の作製が不可能となってしまった。当初の剣山型電極では、ワイヤーボンディング法により電極を作成するという方法がとられていたが、ワイヤーボンディング法では段差構造にボンディングした金属ワイヤーのブリッジ (すなわちワイヤーの両端が固定され、弓なりとなっている) をレーザーにより切断することで三次元プローブを得るため、先端部分の形状は鋭利である一方、電極の先端の形状を制御できなかった。

そこで共同研究者らは電極作製装置の新規搬入にあたり、従来のワイヤーボンディング型ではなく、ワイヤーカットが不要でより垂直性が高い電極を作製可能な装置を購入した。実際に新しい装置では、垂直性が高い電極を作成することはできたが、完成された電極においては以前の装置で作製した電極ではみられないノイズが乗ってしまう確率が非常に高く、網膜深部から検出される微妙な網膜内のシグナル測定に用いることができるクオリティーの電極を作成するための条件設定にかなりの時間を費やすこととなった。具体的には、絶縁膜パターンニング方法の検討を行い、電極以外の部分からのノイズを減少させるための条件検討も相当繰り返したものの、そもそも得られていた網膜深部由来の振動性シグナルは振幅が小さく、このような微妙な網膜内部からのシグナルを検出可能なレベルまでのノイズの軽減には困難を極めた。

一方で、繰り返し条件検討を繰り返すうち、網膜シグナルの検出が可能なレベルとなっ

たが、プラズマエッチング装置の故障など他のトラブルも発生し、電極の供給にかなりの支障があり、結果的に本プロジェクトの遅延の根本的な原因となった。

一方で、電極作製以外の部分に関しては、市販の二次元電極を用いた遺伝子改変マウスモデルなどを用いた解析を行い、解析系の確立を行うことができた。光刺激条件の安定化、ノイズが乗らない還流系の確立、様々な薬剤を用いた視覚伝達情報経路の制御ができるようにし、また電気生理データ解析としてはラスタプロット、インタースパイクインタバル解析、新しいプログラムを新規作製することによるソーティングプログラムの確立など、3次元MEA電極にてデータを取ることができさえすれば、解析ができる状態のレベルまで確立することができた。また、遺伝子改変モデルマウスにおける異常なシグナルの検出と、その抑制メカニズムを検討することにより、様々な薬剤を用いた視覚伝達情報経路の制御ができるようになった。

このように、三次元電極の作成とそれに伴うデータを得ることができればすぐに解析ができる状態となっている。共同研究者の三次元MEA電極はインピーダンスが低い優れたものであるゆえ、本電極でなければ網膜内部の微妙なシグナルを検出することが難しいと考えている。また、研究期間の最終段階において、ようやく内在性シグナルの再確認が可能となった。このように、なんとかデータの再現と剣山型プローブ電極の新規作製が可能となったため、本助成期間は終了したが、引き続き三次元MEA電極を作成し、継続して実験を進めていく予定である。

## 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 1件)

小池千恵子 夜盲を引き起こす夜盲症と網膜色素変性症 ファルマシア 50巻 2014 p222-226 査読無

〔学会発表〕(計 9件)

大下陽介、瀧澤伸剛、古藤涼、川島桐吾、多賀駿、吉田圭佑、石金浩史、古川貴久、天野晃、下ノ村和弘、北野勝則、坪泰宏、小池千恵子 網膜 ON 型双極細胞視覚伝達チャンネル TRPM1 ノックアウトマウス網膜の電気生理学的解析  
第 135 回 日本薬学会 年会 2015 年 3 月 27 日 神戸学院大学(兵庫)

瀧澤伸剛、古藤涼、川島桐吾、大下陽介、多賀駿、吉田圭佑、石金浩史、古川貴久、天野晃、下ノ村和弘、北野勝則、坪泰宏、小池千恵子 網膜 ON 型双極細胞視覚伝達チャンネル TRPM1 ノックアウトマウス網膜の電気生理学的解析

包括脳冬のシンポジウム 2014 年 12 月 13 日  
東京ガーデンパレス(東京)

瀧澤伸剛、古藤涼、谷田裕樹、川島桐吾、大下陽介、谷原明子、多賀駿、吉田圭佑、石金浩史、古川貴久、天野晃、下ノ村和弘、北野勝則、坪泰宏、小池千恵子 網膜 ON 型双極細胞視覚伝達チャンネル TRPM1 ノックアウトマウス網膜の電気生理学的解析  
視覚科学フォーラム 2014 年 8 月 18 日 前橋工科大学(群馬)

細木ゆかり、竹田有加里、小池千恵子、天野晃、杵体、錐体視細胞光電位変換機構モデルによる死物質-トランスデューシグナル増幅現象の再現  
生体医工学シンポジウム 2013 2013 年 9 月 21 日 九州大学(福岡)

細木ゆかり、竹田有加里、小池千恵子、天野晃 強光下の光応答再現可能な杵体・錐体視細胞の光電位変換機構モデルの提案  
視覚科学フォーラム 2013 年 8 月 5 日 立命館大学(滋賀)

吉田圭佑、多賀駿、生田昌平、石金浩史、下ノ村和弘、古川貴久、小池千恵子 網膜 ON 型双極細胞の視覚伝達チャンネル TRPM1 ノックアウトマウスの視機能解析  
日本薬学会第 133 回年会 2013 年 3 月 28 日 パシフィコ横浜(神奈川)

宮本翔平、多賀駿、吉田智和、山岡昭二、生田昌平、三好淳、高井義美、小池千恵子 網膜視機能獲得における接着構造形成の役割  
日本薬学会第 133 回年会 2013 年 3 月 28 日 パシフィコ横浜(神奈川)

多賀駿、殿村 渉、天野 晃、下ノ村和弘、近藤 峰生、小西 聡、小池 千恵子 三次元マイクロプローブ電極アレイを用いたマウス網膜光応答解析  
第 35 回日本神経科学学会大会 2012 年 9 月 18 日 名古屋国際会議場(愛知)

〔その他〕  
ホームページ等  
[www.ivrc.jp](http://www.ivrc.jp)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小池 千恵子 (Chieko Koike)  
立命館大学 薬学部 准教授  
研究者番号: 80342723

### (2) 研究分担者

小西 聡 (Satoshi Konishi)  
立命館大学 理工学部 教授

研究者番号： 50288627

殿村 涉 (Wataru Tonomura)  
立命館大学 理工学部 助教  
研究者番号 50581493

天野 晃 (Akira Amano)  
立命館大学 生命科学部 教授  
研究者番号：60252491

下ノ村 和弘(Kazuhiro Shimonomura)  
立命館大学 理工学部 准教授  
研究者番号：80397679