

網膜神経回路網・視神経の再生における制御因子に関する研究

I 試験研究の全体計画

1. 研究の趣旨

網膜は、発生過程において前脳が側方に膨らんでできたもので脳の一部である。実際、神経伝達物質やモジュレータは、脳と網膜とで共通している。網膜はまた大脳皮質に匹敵する整然とした神経細胞による層構造の3次元回路網を形成し、複雑な視覚情報処理を行うが、眼球という独立した形態を持っていることからその実験的操作及び遺伝子学的、薬理学的検討が容易という有利な点を持っている。

これまで哺乳動物ではこの網膜・視神経の系は再生しないと考えられてきたが、最近、末梢神経移植、神経栄養因子の投与などによって再生し、かつ機能回復することが明らかにされてきた。しかしながら、これまでの移植方法だけでは、視神経線維の再生率は低く、視覚機能の回復も十分でない。そこで現在、この成熟哺乳動物での網膜神経回路網と視神経の再生をより効果的にする方法の確立が望まれている。一方、従来より、魚類、両生類などの網膜・視神経では、成熟した固体であっても、損傷を受けた視神経線維のみならず、網膜細胞自身が増殖・分化して層構造の再形成、神経回路の修復、視神経投射の再形成が行われることが知られている。従って、これらの動物で網膜神経細胞の分化、網膜組織と視神経の再生を誘導する因子とその関連遺伝子を探り、その知見を哺乳動物の網膜・視神経再生促進に生かして行くことが必須である。また、最近哺乳動物の網膜組織においても、遺伝子導入マウスや上丘との共培養系などを用いて、視神経突起の伸展・再生を制御する因子の解析が可能になってきた。

そこで本研究では、網膜神経回路網・視神経の発達障害の克服、損傷後の機能回復に資するため、網膜神経細胞の分化、層構築、突起伸長を制御する因子（接着因子、神経伝達物質・受容体、一酸化窒素等）・関連遺伝子を探り、その仕組みを解明する。

2. 研究概要

1. 網膜における神経細胞分化と生存維持の制御因子・遺伝子の研究

網膜細胞の発生分化及び生存維持過程を解明するため、視物質、神経伝達物質、受容体、神経接着因子などの発現とその遺伝子制御過程に関する研究を行う。

(1) 網膜細胞の最終分化に係わる遺伝子発現の制御因子の研究（厚生省国立療養所中部病院長寿医療研究センター）

既知の神経特異的転写統括制御因子 NRSF/REST と神

経細胞特異的シグナル伝達分子 N-Shc の係わりを検討評価するとともに、新しい制御因子についての探索を行う。
(2) 網膜・色素上皮の分化決定と分化維持機構の研究（京都府立医科大学）

色素上皮細胞が合成すると予想される視細胞の機能的・形態的成熟に要求される因子を探索する。

(3) 視細胞の分化と生存維持の研究（大阪大学大学院理学研究科）

視物質 cDNA を用いた遺伝子操作により、桿体・錐体視細胞への分化機構とその形態・機能の維持機構を解明する。

(4) 新規神経活性化因子の研究（横浜市立大学医学部）

網膜からの神経突起伸展を促進する新規神経活性化因子を分離精製・同定し、その因子を遺伝子工学的に産生する系を確立する。

(5) 遺伝子導入・移植による網膜変性阻止の研究（東北大学医学部）

脳由来成長因子及び塩基性繊維芽細胞成長因子の遺伝子を導入した色素上皮細胞を網膜に移植することにより網膜の変性を阻止する技術を開発する。

2. シナプス発現・再生と細胞内情報伝達物質との関連の研究

シナプス発現・再生過程における機能変化及び微細形態変化並びに細胞内情報伝達物質の関連を調べ、その解析法を確立し、伝達物質によるシナプス再生機構の解明を行う。

(1) X線顕微法の開発と細胞内骨格の動態の研究（電子技術総合研究所）

シナプス発現・再生に伴う細胞骨格等の微細形態変化やリン酸の細胞内分布を観測するためのX線顕微法を開発し、その形態・分布を調べる。

(2) 網膜再生過程における細胞内 Ca 濃度の動態の研究（筑波大学生物科学系）

イモリ再生網膜のスライス標本や再生の起源となる網膜色素上皮細胞を培養し、細胞内 Ca イオン濃度の変化を測定することにより網膜再生との関連を調べる。さらに、培養色素上皮細胞へ機能分子・遺伝子を導入するための技術を開発する。

(3) 網膜シナプス機能発現における Ca の役割の研究（電子技術総合研究所）

魚類網膜周辺部での分化機構を調べるため、スライス標本を用いて細胞内 Ca イオン濃度の動的変化並びに機能的役割を解明する。

(4) 細胞内情報伝達における G 蛋白の役割と興奮性アミノ

酸の作用機序の研究(姫路工業大学理学部)

網膜の2次ニューロンに発現しているグルタミン酸受容体、G蛋白質、キナーゼのクローニングを基に抗体を作成し、各情報機能分子の網膜内発現の組織化学的定量法を確立する。

3. 網膜の層形成と組織修復におけるグリア細胞の果たす役割の研究

グリア細胞が如何に神経細胞をガイドし網膜の層構造構築へと導くかという観点から細胞接着・誘導因子の役割を解明する。さらに、層形成と組織修復関連の遺伝子制御機構を解明する。

(1) ミュラー細胞のグルタミン酸受容体に関する研究(北里大学医学部)

胎生及び幼若ラットの網膜グリア細胞培養系を用いてグルタミン酸受容体の性格、役割を明らかにし、ミュラー細胞の組織修復に関する役割を明らかにする。

(2) Eph受容体型チロシンキナーゼの再生網膜の層形成における機能の研究(熊本大学医学部)

Eph受容体型チロシンキナーゼCek4, Cek8とリガンドRAGS, ELF-1の機能阻害抗体を開発し、網膜層形成と再生過程における機能を解析する。

4. 網膜神経回路網の機能再生評価の研究

網膜のスライス及び*in vivo*標本を用いてその神経回路網の機能再生の機構を電気生理学的・薬理的に把握するとともに神経再生の評価方法を確立する。

(1) 再生網膜のスライス標本の培養とシナプス形成過程の研究(筑波大学生物科学系)

イモリの再生網膜スライス標本を培養し、神経伝達物質とその受容体の発現と発達ならびにそれらのシナプス形成に果たす役割について生理学的・分子生物学的に解析する。

(2) 網膜神経組織の発生と伝達物質受容体の発現の研究(大阪大学医学部)

網膜神経組織の形成過程における細胞内カルシウム代謝系と伝達物質受容体を介する細胞内カルシウム上昇の機能的役割を解明する。

(3) 網膜神経細胞におけるシンシチウムの動的変化の研究(電子技術総合研究所)

神経修飾物質によるギャップ結合チャンネルの動的修飾・制御の機構を生理学的に解明する。

(4) 視神経切断後のグルタミン酸毒性阻止による機能再生評価の研究(岡山県立大学保健福祉学部)

視神経切断後の網膜神経節細胞の生存と突起再生に及ぼすグルタミン酸受容体関連物質の効果を評価する。

(5) ミクログリアの活性制御による機能再生評価(大阪大学医学部)

活性化されたミクログリアの生理学的性質の変化と遺伝子発現、サイトカイン分泌の関係を明らかにし、細胞内伝達経路を調節することによって活性化制御を図る。

(6) 坐骨神経移植によって再生した視神経の機能評価(大阪大学医学部)

哺乳動物を用い、切断した視神経の断端に坐骨神経を移植し、再生した視神経線維と視覚中枢との機能的な再結合を形成させるため、再生視神経線維の光情報処理機能と網膜神経回路の変化について生理学的に評価する。

5. 再生視神経とその中枢投射の研究

神経移植、神経栄養因子の眼球内注入、シュワン細胞移植、神経栄養因子の遺伝子導入などの方法によって再生した視神経線維の再生伸展を促進させ、再生視神経の上丘支配様式を形態学的、電気生理学的に解析し、視神経再生の成功率を向上させる。

(1) 神経栄養因子および関連遺伝子の導入による再生視神経投射の研究(大阪大学医学部)

神経栄養因子および関連遺伝子の導入によって視神経再生がどのように修飾されるかを観察し、再生軸索数が従来よりも増える条件を見いだす。

(2) *bcl-2* transgenic miceでの視神経再生・上丘再支配能力の評価の研究(大阪大学医学部)

坐骨神経移植によって伸展した視神経が再支配した上丘の光応答反応を生理学的な観点から調べ、視覚機能回復がどこまで実現しているか評価する。

(3) 末梢神経移植による網膜-膝状体経路の再構築の研究(愛知県コロニー発達障害研究所)

網膜-膝状体経路の機能回復を目的として、末梢神経の移植法、機能回復の評価法を開発するとともに、網膜における再生神経節細胞の機能評価法を確立する。

(4) シュワン細胞移植による視神経の中枢投射経路再構築の研究(千葉大学医学部)

培養系シュワン細胞に操作を加えて人工移植片を作成し、視神経再生促進作用を解析すると共に移植による視神経投射路の再構築法を開発する。

3. 年次計画

本プロジェクトでは、網膜及び視神経を例として神経再生を制御するのに十分なデータ及び知識を蓄積することを目標とする。

第I期(前期3年間)では、再生過程の解析法の確立と、再生制御因子・関連遺伝子の探索を行う。

「網膜における神経細胞分化と生存維持の制御因子・遺伝子の研究」において、網膜細胞の分化・再生過程に注目し、その過程での制御因子・遺伝子の探索を行い、再生過程の解析法を確立する。

「シナプス発現・再生と細胞内情報伝達物質との相関の研究」において、シナプス発現・再生過程と細胞内情報伝達物質の相関を調べ、その解析法を確立する。

「網膜の層形成と組織修復におけるグリア細胞の役割の研究」において、グリア細胞が如何に層構造構築へ導くか

という観点から、細胞接着・誘導因子の役割を解明する。

「網膜神経回路網の機能再生評価の研究」において、網膜神経回路網のスライス標本及び移植された視神経標本を用いて神経機能の再生の機構を把握する。

「再生視神経とその中枢投射の研究」においては、神経移植、神経栄養因子の眼球内注入、シュワン細胞移植、神経栄養因子の遺伝子導入などの方法によって再生した視神経線維の伸展機構や、再生視神経の上丘支配様式を形態学的、電気生理学的に解析し、評価する。

第Ⅱ期では、分化、再生、生存維持因子の機能解明を行う。

「網膜における神経細胞分化と生存維持の制御因子・遺伝子の研究」において、網膜細胞の発分化および生存維

持過程における制御因子の発現とその遺伝子制御過程を解明する。

「シナプス発現・再生と細胞内情報伝達物質との関連の研究」において、伝達物質によるシナプス再生機構の解明を行う。

「網膜の層形成と組織修復におけるグリア細胞の役割の研究」において、層形成と組織修復関連の遺伝子制御機構を解明する。

「網膜神経回路網の機能再生評価の研究」において、網膜神経回路網の機能の再生の評価方法を確立する。

「再生視神経とその中枢投射の研究」において、視神経伸展の制御を行い、視神経再生の成功率を向上させる。

研究項目	9年度	10年度	11年度	12年度	13年度
1. 網膜における神経細胞分化と生存維持の制御因子・遺伝子の研究					
(1) 網膜細胞の最終分化にかかわる遺伝子発現の制御因子の研究	分化でのNRSF/RESTの役割		分化・再生でのN-Shc, Sckの役割		
(2) 網膜・色素上皮の分化決定と分化維持機構の研究	組織特異的転写因子の発現解析			分化誘導と分化維持機構	
(3) 視細胞の分化と生存維持の研究	視物質のクローニング		視細胞の機能・構造維持機構		
(4) 新規神経活性化因子の研究	新規神経活性化因子の同定		遺伝子工学による因子の生産と機能回復		
(5) 遺伝子導入・移植による網膜変性阻止の研究	網膜色素変性阻止			加齢黄斑変性阻止	
2. シナプス発現・再生と細胞内情報伝達物質との関連の研究					
(1) X線顕微法の開発と細胞内骨格の動態の研究	リン酸対象の光電子顕微法の開発			リン酸分布 微細形態変化の観測	
(2) 網膜再生過程における細胞内Ca濃度の動態の研究	再生網膜のCa濃度変化		Ca情報伝達関連遺伝子導入と回路網形成		
(3) 網膜シナプス機能発現におけるCaの役割の研究	Ca像と電気生理の同時測定		伝達物質, 修飾物質と分化の相関		
(4) 細胞内情報伝達におけるG蛋白の役割と興奮性アミノ酸の作用機序の研究	変性による情報伝達分子の変化の解析		変性と細胞内伝達分子の相関の証明		
3. 網膜の層形成組織修復におけるグリア細胞の果たす役割の研究					
(1) ミュラー細胞のグルタミン酸受容体に関する研究	ミュラー細胞のグルタミン酸受容体のサブクラス決定		グルタミン酸賦活による細胞内物質輸送		
(2) Eph受容体型チロシンキナーゼの再生網膜の層形成における機能の研究	再生阻害抗体の開発		リガンドによる網膜再生の促進		
4. 網膜神経回路網の機能再生評価の研究					
(1) 再生網膜のスライス標本の培養とシナプス形成過程の研究	再生網膜細胞の光応答と伝達物質依存性電流の同時測定			再生網膜細胞への遺伝子導入	
(2) 網膜神経組織の発生と伝達物質受容体の発現の研究	初期胚組織のCa濃度	初期胚の単離培養細胞のCa濃度			

研究項目	9年度	10年度	11年度	12年度	13年度
(3) 網膜神経細胞におけるシンシチウムの動的変化の研究	ギャップ結合チャンネルの制御		分化過程とシンシチウム形成		
(4) 視神経切断後のグルタミン酸毒性阻止による機能再生評価の研究	逆行性変性におけるグルタミン酸毒性		突起再生へのグルタミン酸の影響		
(5) ミクログリアの活性制御による機能再生評価	活性化ミクログリアの生理的解析		活性化ミクログリアで発現する遺伝子の同定と定量化		
(6) 坐骨神経移植によって再生した視神経の機能評価	視覚生理学的機能評価		網膜内神経回路の機能評価		
5. 再生視神経とその中枢投射の研究					遺伝子導入による再生軸索数の増大
(1) 神経栄養因子および関連遺伝子の導入による再生視神経投射の研究	遺伝子導入法の確立				
(2) <i>bcl-2</i> transgenic mice での視神経再生・上丘再支配能力の評価の研究	移植法, 標識法の確立		電気生理的手法による解析	行動学的評価	
(3) 末梢神経移植による網膜-膝状体経路の再構築の研究	末梢神経移植技術の確立		解剖学的および電気生理学的評価法の開発		人工網膜の検討
(4) シュワン細胞移植による視神経の中枢投射路再構築の研究	シュワン細胞培養法の確立	活性化したシュワン細胞の移植と機能評価	シュワン細胞による人工移植片の作成		
6. 研究管理					
所要経費(合計)	258百万円	256百万円			

4. 平成10年度における達成目標

1. 網膜における神経細胞分化と生存維持の制御因子・遺伝子の研究

(1) 網膜細胞の最終分化にかかわる遺伝子発現の制御因子の研究

・網膜細胞の発達・再生過程における NRSF/REST mRNA の発現分布を明らかにするとともに、N-Shc, Sck, nGAPs, Semaphorin 等の遺伝子発現についても検討を加える。

(2) 網膜・色素上皮の分化決定と分化維持機構の研究

・色素上皮や網膜神経細胞の分化に関与する特異的転写調節因子の発現誘導を解明するために、胚内操作や組織培養系を開発し、組織間相互作用の分子的な実体を明らかにする実験系を確立する。

(3) 視細胞の分化と生存維持の研究

・桿体・錐体視物質の cDNA のクローニングを行い、塩基配列を明らかにし、アミノ酸配列を推定する。

(4) 新規神経活性化因子の研究

・新規神経活性化因子を分離・精製し、網膜内でこの因子により活性化される物質、細胞の分布を明らかにする。

(5) 遺伝子導入・移植による網膜変性阻止の研究

・ラット色素上皮細胞へのサイトカイン遺伝子の導入を行い、発現させる技術を確立する。

2. シナプス発現・再生と細胞内情報伝達物質との相関の研究

(1) X線顕微法の開発と細胞内骨格の動態の研究

・細胞のリン酸を対象とする光電子分光顕微法を開発するため、超高真空下での、高速X線照射装置を開発する。

(2) 網膜再生過程における細胞内 Ca 濃度の動態の研究

・イモリ再生網膜での電位依存性細胞内 Ca 濃度の変化を測定し、網膜色素上皮細胞を培養し Ca 関連機能分子、遺伝子導入のための準備を行う。

(3) 網膜シナプス機能発現における Ca の役割の研究

・網膜における Ca イメージングと電気生理学的方法による単一細胞応答記録との併用により細胞の分類を試みる。また網膜における神経細胞性の順応機構などの機能に対する Ca イオンの寄与について解明する。

(4) 細胞内情報伝達における G 蛋白の役割と興奮性アミノ酸の作用機序の研究

・一過性に眼虚血を起こしたラット網膜細胞の変性・再生過程での細胞内情報伝達分子の変化を2次元ウェスタンブロット法、免疫組織化学的手法で明らかにする。

3. 網膜の層形成組織修復におけるグリア細胞の果たす役割の研究

(1) ミュラー細胞のグルタミン酸受容体に関する研究

・ミュラー細胞に発現するグルタミン酸受容体のサブクラ

スと分子遺伝学的に同定するとともに、同受容体の発現状態の変化に関する因子の解明、同受容体を介しての細胞内輸送に与える影響を明らかにする。

(2) Eph 受容体型チロシンキナーゼの再生網膜の層形成における機能の研究

・活性の強い阻害抗体を開発するとともに、抗体の胚への投与方法を開発する。

4. 網膜神経回路網の機能再生評価の研究

(1) 再生網膜のスライス標本の培養とシナプス形成過程の研究

・再生網膜細胞のスライス標本で膜電位および伝達物質依存性膜電流の測定し伝達物質とその受容体の発現に関わる分子・遺伝子を単離する技術を導入する。

(2) 網膜神経組織の発生と伝達物質受容体の発現の研究

・発生初期の鶏胚網膜標本を用いて、網膜各層の細胞のイオンチャネル活動及び神経伝達物質に対する電流応答を解析する。

(3) 網膜神経細胞におけるシンシチウムの動的変化の研究

・アマクリン細胞・双極細胞におけるギャップ結合チャンネルにおける制御の分子メカニズムを解明する。

(4) 視神経切断後のグルタミン酸毒性阻止による機能再生評価の研究

・グルタミン酸関連物質の眼球内投与による網膜神経節細胞の変性及び生存への影響を定量的に解析する。また、変性過程や、長期生存細胞の突起形状についての3次元解析を行う。

(5) ミクログリアの活性制御による機能再生評価

・活性化された網膜組織内ミクログリアに発現する神経伝

達物質受容体、遺伝子、胞内カルシウム代謝を解析し、細胞内信号伝達経路を明らかにする。

(6) 坐骨神経移植によって再生した視神経の機能評価

・坐骨神経移植によって再生した視神経軸索の単一ニューロン活動の定量的解析を行うとともに、網膜電図による網膜機能評価法を確立する。

5. 再生視神経とその中枢投射の研究

(1) 神経栄養因子および関連遺伝子の導入による再生視神経投射の研究

・神経栄養因子およびその受容体を網膜神経細胞に強制発現させ、視神経の再生を飛躍的に増大させるために、ウィルスベクター開発など遺伝子工学的手法を確立する。

(2) *bcl-2* transgenic mice での視神経再生・上丘再支配能力の評価の研究

・抗細胞死の作用を持つ *bcl-2* 遺伝子の transgenic mice において、坐骨神経移植によって再生する網膜神経節細胞の形態学的特徴を画像処理装置によって評価・検討

(3) 末梢神経移植による網膜-膝状体経路の再構築の研究

・視神経断端と外側膝状体との間に末梢神経を架橋移植して、網膜-膝状体視覚路を再構築し、その起始細胞である軸索再生網膜神経節細胞の光反応性を解析する。

(4) シュワン細胞移植による視神経の中枢投射路再構築の研究

・再生促進作用を持ったシュワン細胞の単離、培養法の確立及び培養シュワン細胞、細胞外基質、神経成長因子を組み合わせた人工的移植片の開発を行い、移植による視神経再生、生存を評価する。

II 平成 10 年度における実施体制

研究項目	担当機関	研究担当者
1. 網膜における神経細胞分化と生存維持の制御因子・遺伝子研究		
(1) 網膜細胞の最終分化にかかわる遺伝子発現の制御因子の研究	厚生省国立療養所中部病院長寿医療研究センター	森 望
(2) 網膜・色素上皮の分化決定と分化維持機構の研究	京都府立医科大学	荒木正介
(3) 視細胞の分化と生存維持の研究	大阪大学大学院理学研究科	徳永史生
(4) 新規神経活性化因子の研究	横浜市立大学医学部	堀江秀典
(5) 遺伝子導入・移植による網膜変性阻止の研究	東北大学医学部	玉井信

研究項目	担当機関	研究担当者
2. シナプス発現・再生と細胞内情報伝達物質との関連の研究		
(1) X線顕微法の開発と細胞内骨格の動態の研究	通商産業省工業技術院電子技術総合研究所	富江敏尚
(2) 網膜再生過程における細胞内Ca濃度の動態の研究	筑波大学生物科学系	斉藤建彦
(3) 網膜シナプス機能発現におけるCaの役割の研究	通商産業省工業技術院電子技術総合研究所	清水秀明
(4) 細胞内情報伝達におけるG蛋白の役割と興奮性アミノ酸の作用機序の研究	姫路工業大学理学部	津田基之
3. 網膜の層形成組織修復におけるグリア細胞の果たす役割の研究		
(1) ミュラー細胞のグルタミン酸受容体に関する研究	北里大学医学部	若倉雅登
(2) Eph受容体型チロシンキナーゼの再生網膜の層形成における機能の研究	熊本大学医学部	田中英明
4. 網膜神経回路網の機能再生評価の研究		
(1) 再生網膜のスライス標本の培養とシナプス形成過程の研究	筑波大学生物科学系	千葉親文
(2) 網膜神経組織の発生と伝達物質受容体の発現の研究	大阪大学医学部	山下勝幸
(3) 網膜神経細胞におけるシンシチウムの動的変化の研究	通商産業省工業技術院電子技術総合研究所	山田雅弘
(4) 視神経切断後のグルタミン酸毒性阻止による機能再生評価の研究	岡山県立大学保健福祉学部	澤井元
(5) ミクログリアの活性制御による機能再生評価	大阪大学医学部	森際克子
(6) 坐骨神経移植によって再生した視神経の機能評価	大阪大学医学部	佐々木仁
5. 再生視神経とその中枢投射の研究		
(1) 神経栄養因子および関連遺伝子の導入による再生視神経投射の研究	大阪大学医学部	小坂淳
(2) <i>bcl-2</i> transgenic mice での視神経再生・上丘再支配能力の評価の研究	大阪大学医学部	井上徹
(3) 末梢神経移植による網膜-膝状体経路の再構築の研究	愛知県コロンイ発達障害研究所	渡部真三
(4) シュワン細胞移植による視神経の中枢投射路再構築の研究	千葉大学医学部	安達恵美子
6. 研究進行管理	通商産業省工業技術院電子技術総合研究所	清水秀明
	大阪バイオサイエンス研究所	福田淳

Ⅲ リエゾン会議

委 員	所 属
○福 田 淳	大阪大学 大学院医学研究科教授, 大阪バイオサイエンス研究所, 客員研究員
安 達 恵美子	千葉大学 医学部教授
荒 木 正 介	京都府立医科大学 教授
齐 藤 建 彦	筑波大学 生物科学系教授
澤 井 元	岡山県立大学 保健福祉学部助教授
清 水 秀 明	通商産業省 工業技術院電子技術総合研究所超分子部主任研究官
田 中 英 明	熊本大学 医学部教授
玉 井 信	東北大学 医学部教授
津 田 基 之	姫路工業大学 理学部教授
徳 永 史 生	大阪大学 大学院理学研究科教授
堀 江 秀 典	横浜市立大学 医学部講師
森 望	厚生省 国立療養所中部病院長寿医療研究センター分子遺伝学研究部長
山 下 勝 幸	大阪大学 医学部助教授
山 田 雅 弘	通商産業省 工業技術院電子技術総合研究所超分子部主任研究官
若 倉 雅 登	北里大学 医学部助教授
渡 部 眞 三	愛知県立心身障害者コロニー発達障害研究所 生理学部門課長補佐級研究員

(注：○は研究管理統括者)