

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. 研究内容及び目標

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

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）

視覚系以外の末梢及び中枢神経系において、その重要性

が認識されつつある3つの神経特異的分子群（遺伝子発現制御因子、シグナル伝達分子、神経ネットワーク形成関連分子）の網膜・視神経細胞の分化及び可塑性における役割を明らかにすることを目標とする。

(2) 網膜・色素上皮の分化決定と分化維持機構の研究（奈良女子大学理学部）

眼胞に由来する2つの組織、網膜と色素上皮は全く異なる形態と機能をもつ。胚発生においてこれらの組織と周囲の組織（特に間葉組織及び表皮組織）とのあいだに働く相互作用の分子の実体を明らかにし、眼胞由来組織の分化とその安定性の分子機構を解明する。

(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）

脊椎動物の視細胞は薄明視を司る1種類の桿体と、昼間視を司る形態的に異なる数種類の錐体からなる。これらの視細胞に含まれる視物質のcDNAを用いた遺伝子操作により、それぞれの視物質を発現している視細胞の分化、形態と機能の維持機構を解明する。

(4) 新規神経活性化因子による網膜神経節細胞の生存維持の研究（横浜市立大学医学部）

網膜神経節細胞の生存維持、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）

治療が困難である加齢黄斑変性症及び網膜色素変性症に対し、効果が期待される様々なサイトカイン遺伝子を色素上皮細胞に導入し、これをモデル動物に移植してその効果を検討することにより新しい遺伝子治療の技術的な基礎を築く。

2. 網膜内シナプス機能発現と細胞内情報伝達物質との相関の研究

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相関を調べ、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) 網膜神経細胞におけるシナプスとシンシチウムの動的変化の研究（電子技術総合研究所）

成熟及び未成熟の網膜神経回路のスナプスとシンシチウ

ム形成過程における神経伝達物質・神経修飾物質及び細胞内セカンドメッセンジャー (Ca, cGMP, cAMP, NO等) の果たす役割を電気生理学的・形態学的に解明する。

(3) 虚血網膜の神経回路網再生過程と情報伝達物質との関係の研究 (姫路工業大学理学部)

虚血による網膜神経回路網の障害と再生過程を神経層の各ニューロンに発現しているグルタミン酸受容体, G蛋白質等の情報伝達物質の動態から明らかにする。

(4) 網膜内神経結合の再形成における Eph 受容体型チロシンキナーゼの役割の研究 (熊本大学医学部)

神経ガイダンス因子としての役割が明らかになってきた Eph 受容体型チロシンキナーゼのうち EphA3 と EphA4, そのリガンド ephrin-A2 と ephrin-A5 の網膜内神経結合形成における働きを明らかにし, 新しい網膜神経回路網の再生を促進する方法を開発する。

3. 網膜神経回路網の再生・分化と機能評価の研究

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) 再生網膜の培養下における細胞の機能分化とシナプス形成の研究 (筑波大学生物科学系)

網膜再生の起源となる細胞が分裂や増殖を繰り返しつつ種々の個性化した細胞へ機能分化し, 複雑な神経回路網を形成する過程において, 種々の機能分子 (イオンチャネル, 伝達物質とその受容体, 細胞内情報伝達物質など) の発現と発達が如何に再生に寄与するかを, 分子生物学的方法と生理学的方法を用いて評価する。

(2) 網膜神経回路網形成における伝達物質受容体の役割の研究 (大阪大学医学部)

神経回路の入力層から出力層へと整然とした層構造を持つ網膜組織の層形成における神経伝達物質の役割を解明する。特に, 伝達物質受容体の活性化による細胞内カルシウム上昇が細胞周期の進行にどの様に関わり, 層形成に関与するかを明らかにする。

(3) 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)

網膜神経節細胞への主なシナプス入力グルタミン酸作動性であり, 視神経切断後の網膜神経節細胞のグルタミン酸受容体を修飾することによりその生存維持と突起再生を評価する。

(4) 網膜神経節細胞の生存維持と軸索再生の制御因子の研究 (大阪大学医学部)

成熟網膜神経節細胞の軸索再生に関与する外因性 (神経栄養因子など) 及び内因性因子を利用して軸索再生率を向上させ, 網膜内神経回路形成を促進させ, その機能評価を行う。

4. 再生視神経とその中枢投射路再構築の研究

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視神経線維の再生伸展を促進させ, 再生視神経の中枢支配様式を形態学的, 電気生理学的に解析し, 視覚中枢投射路の再構築を図る。

(1) 再生視神経における機能評価と網膜内情報処理機構の研究 (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て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, 再生視神経線維の視覚情報処理機能と網膜内神経回路の変化について生理学的に評価する。

(2) 末梢神経移植による網膜——外側膝状体視覚路の再構築の研究 (愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所)

網膜——外側膝状体経路の機能回復を目標として, 末梢神経の自家移植による架橋手術法, 機能回復の評価法を開発する。神経節細胞の活動を網膜内で記録した後, 色素を細胞内注入することによって, 軸索を再生した後の神経節細胞の機能と形態の関連を調べる。

(3) シュワン細胞移植による視神経再生と中枢投射路の再構築の研究 (千葉大学医学部)

遺伝子導入などの種々の操作を加えた培養シュワン細胞を用いて人工移植片を作成し人為的な環境によって視神経再生を誘導し, さらに再生神経回路網の人為的制御の可能性を検討する。また, 人工移植片を上丘に架橋移植し, 視覚中枢投射路の再構築を試みる。

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。

「網膜内シナプス機能発現と細胞内情報伝達物質との関係の研究」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・誘導因子の役割を研究してきた。しかし, 本研究プロジェクトの中心課題は網膜内ニューロン回路網形成にあるため, この中項目は3年度以降は削除し, その研究の一部は前後の中項目内に含めて推進することとした。

「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。

「網膜内シナプス機能発現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。

「網膜神経回路網の再生・分化と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路再構築の研究」において、視神経伸展の制御を行い、視覚中枢投射路の再構築を図る。

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係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誘導因子			誘導か維持か決定の分子機構	
(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による網膜神経節細胞の生存維持の研究	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・移植による網膜細胞の生存維持の研究	網膜色素変性阻止			加齢黄斑変性阻止	
2. 網膜内シナプス機能発現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骨格の動態の研究	磷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) 網膜神経細胞におけるシナプスと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		
(3) 虚血網膜の神経回路網再生過程と情報伝達物質との関連の研究	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関連の証明		
(4) 網膜内神経結合の再形成における Eph 受容体型チロシンキナーゼの役割の研究	再生阻害抗体の開発		リガンドによる網膜再生の促進		
3. 網膜神経回路網の再生・分化と機能評価の研究					
(1) 再生網膜の培養下における細胞の機能分化とシナプス形成の研究	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) 網膜神経回路網形成における伝達物質受容体の役割の研究	初期胚組織の Ca 濃度		初期胚の単離培養細胞の Ca 濃度		
(3) 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	
(4) 網膜神経節細胞の生存維持と軸索再生の制御因子の研究	移植法、標識法の確立		電気生理手法による解析		行動学的評価
4. 再生視神経とその中枢投射路再構築の研究					
(1) 再生視神経における機能評価と網膜内情報処理機構の研究	視覚生理学的機能評価			網膜内神経回路の機能評価	

研究項目	9年度	10年度	11年度	12年度	13年度
(2) 末梢神経移植による網膜——外側膝状体視覚路の再構築の研究 (3) シュワン細胞移植による視神経再生と中枢投射路の再構築の研究 5. 研究管理	末梢神経移植技術の確立 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	解剖学的及び電気生理学的評価法の開発	人工網膜の検討	
所要経費(合計)	258百万円	256百万円	218百万円		

4. 平成11年度における実施内容と達成目標

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係わる遺伝子発現の制御因子の研究

ア) 神経特異的な遺伝子発現の制御因子 NRSF/REST の視覚系における発現分布を明らかにし、この転写因子の網膜・視神経の分化と再生における役割を知る。イ) 神経特異的なチロシンリン酸化シグナルにおけるアダプター分子 N-Shc, Sck の視覚系の発達及び再生過程における発現分布を明らかにし、このシグナル伝達分子の網膜・視神経の分化と再生における役割を知る。ウ) 神経特異的な突起伸長関連分子 (nGAPs) の視覚系の発達及び再生過程における発現分布を明らかにし、これらの分子の網膜神経回路網形成と視神経再生における役割を知る。エ) 以上の情報を元に視神経再生における神経特異的誘導分子を特定し、その遺伝子をアデノウイルスを用いてラットの視神経切断面に感染させ、視神経再生過程におけるその遺伝子発現の効果を検討する。

(2) 網膜・色素上皮の分化決定と分化維持機構の研究

網膜と色素上皮は眼胞の異なる領域から発生する。色素上皮に分化する領域は神経堤由来の間葉性の細胞に囲まれ、網膜に分化する領域は表皮外胚葉と接する。眼胞と周囲の組織との相互作用の実体を、トリ胚の胚操作、遺伝子発現の動態、組織培養等の技法によって明らかにするため以下の研究を実施する。ア) 予定色素上皮領域と網膜領域を、胚操作によって本来の位置から変更し、組織分化にどのような変化が生じるかを遺伝子マーカーを使って調べる。イ) 遺伝子の眼の形態形成異常を起こす神経堤細胞に着目して、神経堤の移動パターンと遺伝子発現の異常が組織分化にどのような影響を与えているかをトリ突然変異体で明らかにする。ウ) 表皮由来の分化シグナルとしての FGF ファミリーに注目して、その作用機構を組織培養及び胚移植で調べる。

(3) 視細胞の分化と生存維持の研究

ア) 各種脊椎動物の視物質及び視細胞特異的に発現する

タンパク質遺伝子を単離する。イ) それらのタンパク質を発現する視細胞のタイプを同定し、分子レベルでの視細胞サブタイプの違いを解析する。ウ) 硬骨魚類の発生過程及び網膜周辺部での視物質遺伝子の発現と発現調節領域の解析を行い、発現調節因子を検索し、視細胞の分化と維持の機構を明らかにする。

(4) 新規神経活性化因子による網膜神経節細胞の生存維持の研究

平成10年度に確立した視神経再生の *in vitro* 系をアッセイ系とし、新規視神経再生促進因子を特定し、同定する。また視神経再生に必須なシュワン細胞から分泌されている新規因子並びにシュワン細胞を活性化し視神経再生を促進する新規因子の特定・同定も行う。特定された視神経再生促進の実現により網膜神経節細胞の細胞死を抑制すると同時に視覚機能回復の達成への道を開く。そのためにここで特定された新規神経活性化因子を遺伝子工学的に産生する系の確立を試みる。

(5) 遺伝子導入・移植による網膜細胞の生存維持の研究

ア) サイトカイン遺伝子発現産物の網膜に及ぼす副作用、保護作用の検討：サイトカインは網膜視細胞の変性治療に有効であるが、一方で網膜のグリア細胞やマクロファージの遊走・増殖を誘導する可能性がある。中でもアストロサイトは網膜内の血管を取り巻き、血液網膜柵を形成しているので、サイトカインに反応する可能性がある。網膜全体のグリア細胞の変化を蛍光標識法によりとらえることの出来る、われわれの開発した方法を用いて、グリア細胞やマクロファージの変化を観察し、様々のサイトカインの中から、副作用の少なく有効なサイトカインを選出する。イ) BDNF 遺伝子導入細胞移植による網膜細胞保護作用の検討：BDNF 遺伝子導入細胞の移植により、RCS ラットの視細胞変性のみならず、虚血性疾患による網膜内層の変性に対しても保護効果を有する可能性を、正常ラット網膜下への BDNF 遺伝子導入細胞移植によって検討する。

2. 網膜内シナプス機能発現と細胞内情報伝達物質の関連の研究

(1) X線顕微法の開発と細胞骨格の動態の研究

きわめて含有量が低い細胞内の磷酸を迅速に計測するため、高速データ取り込み・解析法を開発する。神経の伸長時の成長円錐試料の、X線顕微法に適した処理法を探る。達成目標としては、磷酸計測用の高速データ取得装置を完成する。フラッシュX線による培養神経細胞の微細形態像の取得法を確立する。

(2) 網膜神経細胞におけるシナプスとシンシチウムの動的変化の研究

明暗順応・色覚等の視覚機能に及ぼす神経伝達物質・神経修飾物質の影響を知るために、これら制御因子の双極細胞・水平細胞の化学シナプスや電気シナプスへの影響を電気生理学的に把握する。達成目標としては、成熟網膜のスライス標本で、グルタミン酸・モノアミン等の神経伝達物質・神経修飾物質の作用に関して、双極細胞や水平細胞の膜電位・膜抵抗などの電気的活動のパッチクランプ法による電気生理的測定と細胞内Ca等の濃度変化の光学的測定とが同時に測定できるシステムを構築する。これにより、網膜の神経細胞の化学シナプスや電気シナプスの機能の動的変化を把握する。

(3) 虚血網膜の神経回路網再生過程と情報伝達物質との相関の研究

ラット網膜スライス標本にグルタミン酸及び各種活性アミノ酸を投与して、グルタミン酸受容体により興奮する神経細胞層をCaイメージング法で明らかにする。虚血モデル網膜スライス標本において網膜神経層及び各神経細胞においてグルタミン酸受容体やGタンパク質など情報伝達分子がどのように振舞うかを明らかにする。さらに、多量のグルタミン酸投与によって得られた網膜スライス標本におけるグルタミン酸応答をCaイメージング法で研究する。

(4) 網膜内神経結合の再形成におけるEph受容体型チロシンキナーゼの役割の研究

Eph受容体型チロシンキナーゼとそのリガンドに対する機能獲得、機能阻害実験として以下の実験法を採用し、網膜の層形成を、内網状層のマーカーであるSV2抗体などを使用して組織学的に解析する。1) これまでの成果として開発出来た機能阻害抗体の投与、2) Eph受容体の機能を阻害するためにドミナントネガティブ受容体遺伝子の導入、3) リガンド遺伝子の導入。これらの遺伝子導入には*in vivo*電気穿孔法を採用する。これら一連の実験から、Eph受容体型チロシンキナーゼの網膜内神経結合形成における機能を解明する。次に、ショウジョウバエの眼をモデルとして使い、Eph受容体型チロシンキナーゼとそのリガンドのシグナル伝達機構解析を開始する。

3. 網膜神経回路網の再生・分化と機能評価の研究

(1) 再生網膜の培養下における細胞の機能分化とシナプス形成の研究

網膜色素上皮細胞の神経細胞への分化転換や各種網膜神経細胞の機能発現のメカニズムの解明のために、以下の研

究を行う。ア) 再生の起源となる網膜色素上皮細胞や再生網膜のスライス標本を培養し、培養液中に種々の増殖因子、栄養因子、神経伝達物質等を投与し、イオンチャネルや受容体の発現と発達様式をホールセルパッチクランプ法によって調べる。またCa関連の機能分子の発現を調べるため、細胞内Ca濃度の蛍光測定を行う。イ) 単離色素上皮細胞や神経細胞を多電極皿の上で培養し、細胞への電気刺激によって細胞分化やシナプスの形成が起こるか否かを細胞の電気活動を記録することによって明らかにする。ウ) 神経細胞の分化やシナプス形成に係わる分子・遺伝子を単離し、*in vivo*ならびに*in vitro*の色素上皮細胞へ導入する技術を開発する。

(2) 網膜神経回路網形成における伝達物質受容体の役割の研究

神経組織の発生過程では、神経原基細胞は神経上皮の最外層部で分裂し(M期)、最内層部でDNA合成期(S期)となる。中間部には、G1期とG2期の細胞が存在する。このことから、細胞体の位置によりその細胞の細胞周期を推定することが可能である。そこで、発生初期胚から網膜神経層を単離し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて、伝達物質受容体の活性化によるカルシウム上昇が網膜神経層内のどの位置で起こるかを同定する。この解析により細胞内カルシウム上昇と細胞周期との関係を明確にすることを目標とする。

(3) 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

視神経切断後の網膜神経節細胞の変性・細胞死の過程及び切断視神経への末梢神経移植後の軸索再生過程における神経節細胞へのグルタミン酸作動性シナプス入力及び影響を評価するために、以下の実験を行う。ア) 視神経切断後の眼球内に各種のグルタミン酸関連物質を投与して、その効果を網膜神経節細胞の生存数、分布、樹状突起形態や軸索突起形態の面から評価する。イ) 網膜神経節細胞のグルタミン酸受容体各種サブタイプの分布が変性過程及び再生過程でどのように変化するかを免疫組織学的手法及び*in situ* hybridization法を用いて明らかにする。ウ) 変性過程及び再生過程にある網膜神経節細胞のグルタミン酸応答特性の変化を明らかにするため、グルタミン酸関連物質投与時における細胞内カルシウムイオン濃度の変化を測定する。

(4) 網膜神経節細胞の生存維持と軸索再生の制御因子の研究

ア) 網膜神経節細胞の生存維持と軸索再生における*bcl-2*遺伝子の役割: 成体*bcl-2*トランスジェニックマウスの視神経切断端へ末梢神経を移植し、その先端を上丘に挿入した後、神経節細胞の生存率及び上丘までの軸索再生率を明らかにし、野生型での結果と比較する。これによって*bcl-2*が生体内で神経節細胞の生存並びに軸索再生を促進する機

能を持つかどうかを評価する。さらにトランスジェニックマウスで、末梢神経移植と同時に神経栄養因子やシュワン細胞などを眼球内投与し、神経節細胞の軸索再生がさらに促進されるかどうかを検討する。イ) ミクログリアの網膜神経節細胞の生存維持と軸索再生の制御効果：培養ミクログリアの生理的活性化段階と神経節細胞の生存及び軸索再生の制御との相関を、細胞及び遺伝子レベルで明らかにし、次に網膜組織内でも同様の制御が見られるかどうかを *in situ* hybridization 法によって明らかにする。さらに眼球内にミクログリア活性化の拮抗薬を投与することによって、神経節細胞の軸索再生を促進させられるかどうかを検討する。

4. 再生視神経とその中枢投射路再構築の研究

(1) 再生視神経における機能評価と網膜内情報処理機構の研究

再生視神経の視覚情報処理機能を定量的に明らかにし、軸索切断とその再生過程に伴う網膜内神経回路の可塑的変化の様子を明らかにするため、再生視神経の単一ニューロン記録を行い、受容野特性を定量的に解析する。達成目標としては受容野の中心・周辺構造を解析するための、コンピュータ制御の画像刺激装置を開発する。定量的解析を行うために、まずディスプレイに高速描画できるグラフィックシステムを開発し、次いで、視神経切断後に末梢神経を自家移植した成ネコの、再生視神経から単一ニューロン活動の記録を行い、作成した装置で受容野構造を定量的に解析することで、軸索切断と再生過程における受容野構造の変化を調べ、網膜内神経回路の変化について検討する。

(2) 末梢神経移植による網膜——外側膝状体視覚路の再構築の研究

ア) 成熟ネコ及びフェレットの視神経断端と外側膝状体とを末梢神経移植によって架橋し、再生した視神経の終末と外側膝状体神経細胞との間にシナプスを形成させる。シナプス形成は WGA-HRP 等により再生終末を順行性に標識し、電子顕微鏡で検出する。さらにシナプスを形成している膝状体ニューロンを特定する。イ) 軸索を再生した神経節細胞の受容野特性と樹状突起形態の関連を調べる。すなわち、網膜内あるいは色素上皮とともに剥離した網膜で神経節細胞の光に対する反応を記録し、蛍光色素あるいはニューロビオチンの細胞内注入によって樹状突起の形態を得て、 α 、 β 等のタイプのどれであるかを決定する。

(3) シュワン細胞移植による視神経再生と中枢投射路の再構築の研究

ア) 平成9～10年度において作成した人工移植片を切断視神経——上丘間にバイパスし、視神経の上丘投射の有無を確認する。その際、これまで用いてきたシリコンチューブでは移植片内のシュワン細胞死率が高いため、本年度は物質交換性のある透析膜等を改良し、シュワン細胞の生存や視神経再生を確認し、移植片における適切な素材の検討を加える。イ) 網膜神経節細胞に対する生存・再生作用のある BDNF、NT-4 の遺伝子を培養シュワン細胞に導入し、人工移植片を作成する。予備実験として、ルシフェラーゼあるいは Green fluorescence protein の遺伝子をリポフェクション、エレクトロポレーションを用いて導入し、最適条件を設定する。ラット脳全 RNA から PCR を用いて BDNF、NT-4 の遺伝子を同定し、それをサイトメガロウイルスないし SV40 のプロモーターの下流に組み込んでシュワン細胞に導入する。これらの細胞を用いて移植片を作成し、視神経再生を評価する。

II 研究実施体制

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・遺伝子の研究		
(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	森 望
(2) 網膜・色素上皮の分化決定と分化維持機構の研究	奈良女子大学理学部	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による網膜神経節細胞の生存維持の研究	通商産業省工業技術院電子技術総合研究所 横浜市立大学医学部	清水秀明 堀江秀典
(5) 遺伝子導入・移植による網膜細胞の生存維持	東北大学医学部	玉井信

研究項目	担当機関	研究担当者
2. 網膜内シナプス機能発現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	通商産業省工業技術院電子技術総合研究所	清水 秀 明
(2) 網膜神経細胞におけるシナプスと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
(3) 虚血網膜の神経回路網再生過程と情報伝達物質との相関の研究	通商産業省工業技術院電子技術総合研究所 姫路工業大学理学部	清水 秀 明 津 田 基 之
(4) 網膜内神経結合の再形成における Eph 受容体型チロシンキナーゼの役割の研究	熊本大学医学部	田 中 英 明
3. 網膜神経回路網の再生・分化と機能評価の研究		
(1) 再生網膜の培養下における細胞の機能分化とシナプス形成の研究	筑波大学生物科学系	斉 藤 建 彦
(2) 網膜神経回路網形成における伝達物質受容体の役割の研究	大阪大学医学部	山 下 勝 幸
(3) 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	通商産業省工業技術院電子技術総合研究所 岡山県立大学保健福祉学部	清水 秀 明 澤 井 元
(4) 網膜神経節細胞の生存維持と軸索再生の制御因子の研究	大阪大学医学部	井 上 徹
4. 再生視神経とその中枢投射路再構築の研究		
(1) 再生視神経における機能評価と網膜内情報処理機構の研究	大阪大学医学部	三 好 智 満
(2) 末梢神経移植による網膜 — 外側膝状体視覚路の再構築の研究	通商産業省工業技術院電子技術総合研究所 愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所	清水 秀 明 渡 部 眞 三
(3) シュワン細胞移植による視神経再生と中枢投射路の再構築の研究	千葉大学医学部	安 達 恵 美 子
5. 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 千寿製薬(株)コーベクリエティブセンター	清水 秀 明 福 田 淳

Ⅲ リエゾン会議

委 員	所 属
○福 田 淳	大阪大学 大学院医学系研究科教授, 千寿製薬(株)コーベクリエイティブセンター
安 達 恵美子	千葉大学 医学部教授
荒 木 正 介	奈良女子大学 理学部教授
斉 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
渡 部 眞 三	愛知県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)