

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、成熟した個体であっても、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・遺伝子の研究に関する研究

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に関する研究（厚生省国立療養所中部病院長寿医療研究センター）

視覚系以外の末梢およ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）の網膜視神経細胞分化およ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（特に間葉組織および表皮組織）とのあいだに働く相互作用の分子実体を明らかにし、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) 遺伝子導入・移植による網膜細胞の生存維持の研究（東北大学医学部）

治療が困難である加齢黄斑変性症およ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導入した色素上皮細胞を作出し、モデル動物に移植して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、伝達物質等の制御因子によるシナプス再生・制御機構の解明を行う。

(1) X線顕微法の開発と細胞骨格の動態の研究（通商産業省工業技術院電子技術総合研究所・香川大学工学部）

シナプス発現・再生過程に伴う細胞骨格等の微細形態変化や磷酸の細胞内分布を観測するためのX線顕微法、複屈折顕微鏡を開発し、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（通商産業省工業技術院電子技術総合研究所）

成熟および未成熟の網膜神経回路のシナプスとシンシチウム形成過程における神経伝達物質・神経修飾物質およ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相

関の研究（姫路工業大学理学部）

虚血による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) 細胞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手がかりを得る。

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）

再生可能な網膜神経組織を持つ動物を用いて、再生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に機能分化し、複雑な神経回路網を形成する機構を解明する。

(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（奈良県立医科大学医学部）

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ことが本研究項目の目標である。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) 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（大阪大学大学院医学系研究科）

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（bcl-2 など）を利用して軸索再生率を向上させ、網膜内神経回路・視覚伝導路を再構築して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、視神経再生の成功率を向上させる。

(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（大阪大学大学院医学系研究科）

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。

(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）

切断されたネコの視神経断端と外側膝状体との間を末梢神経移植によって架橋し、網膜-外側膝状体視覚路を再構築する。視覚路の再構築に関与する再生線維の数を増やすために、視神経切断後の生存細胞の増加を図る。そのために、神経栄養因子の眼球内注入あるいはその遺伝子を網膜神経節細胞に導入する。

(3) 新規神経活性化因子の末梢神経移植系への導入と網膜-上丘路再構築の研究（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、その因子を末梢神経移植系に導入して網膜-上丘投射路の再構築をはかる。

(4) 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）

培養シュワン細胞を用いて遺伝子導入などの種々の操作を加えた人工移植片を作成し、人為的な環境によって視神経再生の誘導、さらに再生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中枢神経回路の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。なお、この中項目は3年度以降は削除し、その研究の一部を前後の中項目内に含めることとする。

「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、網膜細胞の発生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、伝達物質と受容体を介した細胞内情報伝達によるシナプス再生機構の解明を行うとともに、特異的神経結合の機序を解明する。

「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。特に、最近注目されている内因性因子による再生促進の可能性について検討する。

「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、視覚中枢再支配を実現する。

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) 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線顕微鏡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鏡法の開発			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) 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	
(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	末梢神経移植技術の確立		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
(3) 新規神経活性化因子の末梢神経移植系への導入と網膜-上丘路再構築の研究	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		
(4) 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	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		遺伝子導入したシュワン 細胞の移植	
5. 研究管理					
所要経費(合計)	258百万円	256百万円	218百万円	218百万円	

4. 平成12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

① 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、この転写因子の視神経分化と再生における役割を知る。特に、神経細胞でのバリエーションの発現が明らかになったので、視神経再生過程での変化について検討する。

② 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 の視覚系の発達および再生過程における発現分布を明確にし、このシグナル伝達分子の視神経分化と再生における役割を解明する。Shc 関連シグナルアダプター分子は視覚野可塑性で重要視されるニューロトロフィンの刺激伝達に関与しているので、視覚系の可塑性の中での Shc 関連分子の挙動を検討する。また、N-Shc が、網膜投射系で重要視されている Ephrin-Eph 受容体系に関与するか否かも調べる。

③ 神経特異的な突起伸長関連分子 (nGAPs) の視覚系の発達およ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。特に RB3 遺伝子の変動の可能性が見えたので、その詳細を検討する。

(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し、異なる微小環境におかれている。各領域の発生運命がいつどのように決まるのかを、トリ胚をもちいた胚移植操作、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。また、発生過程で機能する分化因子が網膜再生過程ではどのような機能を持つのかを検証する。特に以下の点を達成目標とする。

① 網膜と色素上皮に発生する領域の決定に眼胞の背腹軸がどのような意味を持つのかを胚移植操作によって明らかにする。背腹に特異的に発現する遺伝子群の発現様式と分化マーカー遺伝子の発現様式との関係を明らかにする。

② 色素上皮が網膜に分化転換する過程には、脱分化・増殖、再分化過程がある。これらは IGF, EGF, FGF などの細胞栄養因子群によって制御可能である。器官培養系で明らかになったこれらの因子群の作用機構を解明する。

③ 新規のニューロン特異遺伝子 p24 の神経線維伸長における機能解明を進め、この遺伝子が軸索再生に積極的な機能を果たす可能性を *in vitro* および *in vivo* の強制発現系で調査する。

(3) 視細胞の分化と生存維持の研究

① 視物質発現制御に関する研究：特定の視細胞では特定の視物質が発現しているが、その発現制御を知るために、これまで視物質遺伝子上流の DNA をクローニングし、

塩基配列を解析してきたが、制御領域と推定される領域は未だ特定できていないので、引き続き解析を進め、制御領域を見つける。

② イモリ網膜再生過程での視物質発現制御に関する研究：視物質発現時期を、視物質の cDNA 及びそれらの抗体で明らかにする。

③ 視細胞分化に関わる研究：視細胞内情報伝達に関わるタンパク質のサブタイプを明らかにする。

④ 転写制御因子に関する研究：細胞での機能性タンパク質の発現は転写因子の DNA 制御部位への脱着によっているが、視物質発現や細胞分化に関連している転写因子の発現部位、時期を明らかにする。

(4) 遺伝子導入・移植による網膜細胞の生存維持の研究

① 加齢黄斑変性モデル動物に対するサイトカイン遺伝子導入細胞移植による保護効果の検討：加齢黄斑変性モデル動物として Fischer 344 ラットが知られており、このラットの網膜下に BDNF 遺伝子導入色素上皮細胞を移植し、網膜色素変性症モデル動物と同じように生存する網膜視細胞数を計測する。SV40 large T 導入マウスからクローン化した視細胞を用いて、視細胞および BDNF 遺伝子導入細胞を共培養することにより、視細胞死に対する BDNF 遺伝子導入色素上皮細胞の効果について検討する。

② BDNF 遺伝子導入細胞移植による網膜神経細胞保護効果についての検討：BDNF は虚血による神経節細胞死に対して保護作用を持つことが知られている。これらのことから BDNF 遺伝子導入細胞移植により、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が考えられる。そこで正常ラット網膜下に BDNF 遺伝子導入細胞を移植し、虚血負荷を行い、その保護効果について検討する。

2. 網膜内シナプス機能発現と細胞内情報伝達物質の相関の研究

(1) X線顕微法の開発と細胞骨格の動態の研究

神経の突起伸長時の成長円錐試料の動態解析法の開発のため、X線顕微法および複屈折顕微法の、二つの顕微鏡の整備を行う。X線顕微法では試料帯電の影響の除去法を研究し、複屈折顕微法では、複屈折像と蛍光画像の時分割取得を可能にする。さらに、各顕微法に適した試料処理法を探る。すなわち、導電性基板および石英ガラス基板上での神経細胞培養を可能にし、成長円錐フィロポディア内のアクチン束の様相を探る。達成目標は、X線顕微法および複屈折顕微法のハードウェアの構成とする。

(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

網膜が感受性を持たない赤外光を用いた多光子励起法による神経回路微小操作法として次の二つの方法、すなわち、①ドーパミン等の神経制御因子の caged 化合物 (分子的に封じ込めたもの) を光の焦点位置 (1-5 μm 大) で生じる多

光子吸収で活性化し、局所的に作用を与える方法、および、
②二光子吸収で生じる局所的な光刺激方法を開発し、神経の電気的応答測定および既存の共焦点顕微鏡観察を併用し神経回路網内のシナプスの形態・機能変化の観察を行う。達成目標として、成熟および未成熟網膜あるいは培養系におけるシナプスとシンシチウムの伸長・形成過程における制御因子の果たす役割、とりわけ BDNF やドーパミン等の神経栄養因子・神経修飾物質と cAMP 等の細胞内情報伝達物質との関係を電気生理学的・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

ラット網膜スライス標本にグルタミン酸および各種活性アミノ酸を投与して、神経細胞層でのグルタミン酸受容体による興奮をカルシウムイメージング法で明らかにする。ラットから眼球を摘出後、FuraII を導入した網膜スライス標本を得るまで、酸素の供給を止めるとグルタミン酸刺激による網膜神経層での興奮が見られなくなる。この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、もう一つの虚血網膜モデルとして、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をカルシウム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

① 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、ならびに蛋白分解酵素阻害剤の作用解析により、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解析を継続する。

② 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を解析する。

③ レンズは網膜神経節細胞からの軸索成長を制御するため、その活性因子を決定する。

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

これまでに、色素上皮細胞の培養系を確立し、培養条件下におけるイオンチャネルの発現と発達様式、網膜再生過程における各種神経細胞の発現順序、再生網膜のスライス標本によるイオンチャネルや伝達物質受容体の発現と発達様式等を明らかにした。これらの成果をもとに、平成 12 年度は以下の実験を行う。

① 網膜色素上皮細胞や再生網膜組織を培養し、伝達物質受容体、特にムスカリン性アセチルコリン受容体の発現を制御するようにデザインした遺伝子を再生網膜の細胞へ導入する技術を確立する。

② 再生網膜のスライス標本を作製し、細胞分化やシナプ

ス形成過程における伝達物質受容体の発現と発達を培養条件下でホールセル・パッチクランプ法や細胞内 Ca²⁺濃度蛍光測定法で調べる。

③ 多電極培養皿の上で色素上皮細胞や再生網膜の細胞を培養し、時空間的電気刺激や種々の増殖因子、栄養因子、神経伝達物質等の投与により、細胞分化やシナプス形成の誘導を試みる。細胞の機能分化やシナプス形成の評価は多電極による電気活動の継時的記録、ホールセルパッチクランプ法、細胞内 Ca²⁺濃度蛍光測定法、そして免疫組織化学法等を用いて多角的に行う。

(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

層構造形成期の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部位で起こるかを同定する。達成目標は次の 2 つである。

① 細胞内カルシウム上昇と、細胞周期の進行にともなうエレベーター運動との関係を明確にする。

② P2Y 型 ATP 受容体、ムスカリン受容体、及び、リゾフォスファチジン酸 (LPA) 受容体の各受容体によるカルシウム動員、及び、容量性カルシウム流入が、ア) 細胞増殖、イ) 細胞の移動および ウ) 神経突起の形態変化、のいずれのプロセスを制御するかを同定する。

(3) 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

網膜神経節細胞の生存維持・軸索再生の促進因子としては内因性の抗アポトーシス遺伝子 bcl-2 に着目し、阻害因子としてはミクログリア由来の腫瘍壊死因子とグルタミン酸に注目して以下の実験を行う。

① 神経節細胞の生存および軸索再生に対する bcl-2 発現の効果：視神経切断後も多数の神経節細胞が生存する bcl-2 transgenic mice において、ア) 網膜内での生存神経節細胞の軸索突起伸展が促進されているかどうか、イ) 神経栄養因子の突起伸展促進効果が wild mice に比べて著明であるかどうかを in vitro 系で明らかにする。

② 活性型ミクログリア由来腫瘍壊死因子の軸索切断後の神経節細胞細胞死誘導の作用機序：腫瘍壊死因子受容体の刺激により培養網膜神経節細胞に誘導されるアポトーシスが、蛋白合成阻害剤やアポトーシス誘導酵素 (カスパーゼ) 阻害剤の投与によって阻止されるかどうかを検討する。

③ 視神経切断後の網膜神経節細胞の生存と軸索再生におけるグルタミン酸の及ぼす影響を評価する：視神経切断後の網膜におけるグルタミン酸受容体の発現様式と受容体刺激に対するカルシウム応答特性の変化を調べる。

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。

① 軸索切断された網膜神経節細胞から *in vivo* で記録を行い、受容野特性の変化と、神経栄養因子など細胞死を抑制する物質の投与が切断に伴う受容野の変化に及ぼす影響を明らかにする。

② 視神経切断後に末梢神経を自家移植した成ネコから、再生視神経から単一ニューロン活動の記録を行い、受容野構造を定量的に解析することで、軸索切断と再生の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。

③ *in vitro* のネコ網膜標本で、軸索再生した神経節細胞の膜電位特性、シナプス入力特性などの生理学的記録を行い、網膜内での視覚情報入力機構を明らかにするため、まず記録システムを導入し、標本から記録できるように準備する。

(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

これまでの研究から、視覚路の再構築の機能的を評価するためには、再生神経節細胞の数を増加させる必要があることが判明した。さらに BDNF, CNTF, forskolin を眼球内に同時に注入すると、再生細胞が増加することがわかった。12年度は神経栄養因子の遺伝子導入で再生細胞を増加させ、それらの細胞が機能するかどうかを調べる。

① 視神経切断端に末梢神経を自家移植し、直後 BDNF あるいは CNTF を組み込んだプラスミドを、網膜の細胞内に導入する。約 60 日後に軸索を再生した細胞を逆行性に標識して、標識細胞の数から遺伝子導入による再生促進効果を調べる。

② 視神経断端と外側膝状体を末梢神経移植により架橋し、網膜細胞に栄養因子の遺伝子を導入して従来より多くの再生線維を外側膝状体に導く。100 日以上後に視覚野で光誘発電位を測定して、視覚路再構築の可能性を検討する。

③ *in vitro* 網膜標本で、軸索再生した網膜神経節細胞の

光受容野特性を調べ、その後、細胞内注入法により、その性質と樹状突起形態との相関性を検討する。

(3) 新規神経活性化因子の末梢神経移植系への導入と網膜-上丘路再構築の研究

昨年度までの研究成果として全く新しい末梢神経再生促進因子新規神経活性化因子酸化型ガレクチン-1 を発見した。この成果を末梢神経移植による網膜-視神経再生系に応用するため、以下の目標を立てて研究を推進する。

① 新規神経活性化因子酸化型ガレクチン-1 の標的細胞を確定する。

② 酸化型ガレクチン-1 による末梢神経再生促進の機構を解明する。

③ 解明された機構をもとに酸化型ガレクチン-1 の移植末梢神経への投与方法を確立する。

④ この方法に従って視神経に移植した末梢神経にこの因子を投与し、視神経再生の促進、網膜神経節細胞の生存維持と上丘への軸索再投射をはかる。

(4) 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

シュワン細胞を主成分とした人工移植片によって中枢投射である上丘までの再生が誘導可能であることを確認してきた。本年度はこれらの再生視神経の形態的・機能的解析を上丘に重点をおいて解析する。一方、軸索再生率のさらなる向上を目指して、生体における網膜神経節細胞への新たな遺伝子導入法の開発を行う。具体的達成目標としては、① 平成 9 - 11 年度において条件設定した人工移植片を切断視神経-上丘間に架橋し、上丘におけるシナプス形成を電顕レベルで確認し、また網膜神経節細胞の再生率を逆行・順行の標識法を用いて確認する。さらに電気生理学的手法を用いて再生線維の機能的解析を行う。

② 細胞体である網膜神経節細胞の生存維持と軸索再生を促進させるため *in vivo* electroporation 法を独自に改良し、実際の生体レベルにおける網膜神経節細胞への遺伝子導入方法を開発する。

II 平成12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 (2) 網膜・色素上皮の分化決定と分化維持機構の研究 (3) 視細胞の分化と生存維持の研究 (4) 遺伝子導入・移植による網膜細胞の生存維持の研究	厚生省国立療養所中部病院長寿医療研究センター 奈良女子大学理学部 大阪大学大学院理学研究科 東北大学医学部	森 望 荒木正介 徳永史生 玉井 信
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 (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 (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 (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	通商産業省工業技術院電子技術総合研究所 通商産業省工業技術院工技院電子技術総合研究所 姫路工業大学理学部 熊本大学医学部	清水秀明 山田雅弘 津田基之 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 (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 (3) 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	筑波大学生物科学系 奈良県立医科大学医学部 大阪大学大学院医学系研究科	齋藤建彦 山下勝幸 澤井 元
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 (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) 新規神経活性化因子の末梢神経移植系への導入と網膜-上丘路再構築の研究 (4) 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	大阪大学大学院医学系研究科 愛知県コロニー発達障害研究所 横浜市立大学医学部 千葉大学医学部	三好智満 渡部眞三 堀江秀典 安達恵美子
5. 研究管理	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
齋 藤 建 彦	筑波大学 生物科学系教授
澤 井 元	大阪大学 大学院医学系研究科助教授
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, 香川大学工学部教授
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	奈良県立医科大学 医学部教授
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)