

# 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（厚生労働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（産業技術総合研究所・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リン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（産業技術総合研究所・都立科学技術大学工学部）

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, 網膜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) 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 (横浜市立大学医学部)

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相関の研究」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相関の研究					
(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		磷酸分布 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相関の研究	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		
(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13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 視神経切断後の神経突起伸長関連分子 (nGAPs) の遺伝子応答を比較検討した結果, 特にRB3 遺伝子の誘導が明らかになったので, まず, それが再生過程でも同様に誘導発現維持されるかどうか, ニューロトロフィン等の神経栄養因子のどれに呼応した変化かを検討し, RB3 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。

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 の視覚系の発達の発現分布が明らかになったので, それを元に再生過程での変動を明確にし, 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に迫る。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。

③ 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, 神経に特異的に発現するバリエーションに着目し, 視神経再生過程での変動について検討する。

###### (2) 網膜・色素上皮の分化決定と分化維持機構の研究

① これまでの発生及び再生過程の研究によって色素上皮とそれを取り囲む間葉組織 (結合組織) の役割がきわめて重要な意味を持つことが明らかにされた。間葉 (結合) 組織の役割はこれまでの研究でほとんど問題にされていなかったため, 不明の部分が多い。この過程に関与する分子群を明らかにし, 発生と再生に共通した分子機構の理解をいっそう深める。特に, 未だ不明のイモリ網膜再生の分子機構解明に向けて, 結合組織由来分子の同定と作用機構をこの研究で開発した組織培養系を用いて明らかにする。

② 我々が見いだしたニューロンで特異的に発現する Neuro-p24 はこれまでに同定されているどの遺伝子とも相同性のないまったく新しい分子である。そのため, その機能解明によってニューロンの突起伸長に関する未知の機構を明らかにできると期待される。マウスの網膜発生や末梢神経再生における機能を明らかにするため, 強制発現や逆に遺伝子発現抑制をおこない, 具体的な機能をいっそう明らかにする。

###### (3) 視細胞の分化と生存維持の研究

① 視細胞分化と視物質発現制御に関する研究: それぞれの視細胞の波長感受性は, 発現する視物質のみの違いにより生じることが明らかになったので, 視細胞の分化過程を視物質の発現制御機構の解析を通して明らかにする。つまり, これまでにクローニングできた視物質遺伝子の上流の

塩基配列において, 制御領域と考えられる部分の挙動を調べる。

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 を用いた *in situ* ハイブリダイゼーション及びそれらの抗体で明らかにする。また, これらの視物質の発現が, 網膜再生過程と発生過程でどのように対応しているかを調べる。

③ 転写制御因子に関する研究: 網膜細胞の分化制御に関与すると考えられる *otx2* や *Rx* などの転写制御因子の発現が, イモリの網膜再生時にどのように変化するかを調べ, これらの因子の強制発現あるいは欠如が, 網膜の構造にどのような影響を及ぼすかを調べる。

###### (4) 遺伝子導入・移植による網膜細胞の生存維持の研究

遺伝子導入による加齢黄斑変性, 色素変性治療の臨床応用を考慮し, 我々はベクターとしてアデノウイルス (Ad) を選択してきた。しかし, 最近, アデノウイルスゲノム自身が炎症反応を惹起する, あるいは他の組織に伝播するなど副作用が懸念されている。そこで本年度はアデノウイルスベクターの副作用を中心に導入遺伝子の発現効率について検討する。①  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) 遺伝子導入アデノウイルスベクター (Ad- $\beta$ -gal) を SD ラット網膜下あるいは硝子体内に投与し, 投与後, 経時的に脳, 眼, 視神経, 肺, 肝臓, 心臓, 腎臓, 精巣を摘出し, PCR 法により, Ad ゲノムの局在を調べる。② 培養下で Ad- $\beta$ -gal を感染させた虹彩色素上皮細胞を網膜下に移植した場合についても同様に調べる。③ 導入遺伝子の発現効率は  $\beta$ -gal の発現を RT-PCR 法により検討し, 各臓器の組織切片を作製し  $\beta$ -gal 染色を行い検討する。以上のウイルスベクターに関する副作用検討を行い, 加齢黄斑変性, 色素変性を対象とした遺伝子治療を東北大学倫理委員会に申請することを最終目標とする。

##### 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

神経の突起伸長時の成長円錐試料の動態解析法として, 今までに整備・開発してきた X線顕微法および複屈折顕微法を用いて, 各々の手法に適した基板上で培養された神経細胞の様相を探る。特に, 成長円錐フィロポディアの形態とフィロポディア内のアクチン束に注目し, 相互の関係を明らかにする。さらに, 蛍光法を併用した複屈折顕微法による像と X線顕微法による像を比較し, 解析する。このことから, 神経の突起伸長時の成長円錐試料の動態解析法として, X線顕微法および複屈折顕微法を評価する。

###### (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

発生過程の網膜神経回路のシナプス回路形成過程におけるグルタミン酸等の神経伝達物質などの果たす役割を細胞内カルシウム濃度変化を指標として解明する。特に, ニワ

トリ網膜のON型とOFF型双極細胞のシナプス回路形成過程を高空間解像度の共焦点顕微鏡を用いて調べ、形態学的に解明する。神経細胞の電気的応答測定と併用し、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、未成熟網膜あるいは培養網膜神経細胞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NGFやドーパミン等の神経栄養因子・神経修飾物質やグルタミン酸等の神経伝達物質と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を虚血条件にしたときのグルタミン酸刺激による各神経細胞層での興奮をカルシウムイメージング法で明らかにしてきた。その結果、当初に注目していた双極細胞より神経節細胞で大きな変化が生じることが分かった。神経節細胞でのカルシウム応答にはグルタミン酸受容体の関与が強く示唆されたので、平成12年度からイオン型レセプターであるNMDAレセプターの関与する情報伝達系に注目した。その結果、NMDAレセプターの下流にある一酸化窒素合成酵素(NOS)の局在を組織化学的に明らかにできた。平成13年度はラット網膜スライスにNOSの阻害剤を投与して、各神経細胞層での興奮をカルシウムイメージング法で観察して、虚血網膜の神経回路網再生過程におけるNOSなどの情報伝達分子との関係を明らかにする。

### (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

① Eph受容体型チロシンキナーゼとそのリガンドが、軸索反発作用と共に強い細胞接着力を持つことを新たに見出したため、細胞接着の観点からも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。さらにこの探索過程から見出した新規分泌分子をカエル初期胚に過剰発現すると、網膜腹側が欠損することが明らかになった。この分子の網膜再生過程に対する影響を解析する。

### 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

これまでの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に関する成果研究をもとに、平成

13年度は以下の研究を行う。①イモリの発生・再生網膜から、神経細胞の機能分化やシナプス形成に関連する遺伝子を単離し、それらを色素上皮細胞の単離培養系、網膜のスライス培養系、そして眼球内培養系に導入し、分子・遺伝子の機能を生理学的・分子生物学的両面から評価する。②イモリやニワトリの色素上皮細胞や発生・再生初期の網膜のスライス標本を多電極培養皿上で培養し、増殖因子、神経伝達物質、時空間的電気刺激等の組み合わせにより、活動依存的な細胞分化やシナプス形成の誘導を試みると共に、神経活動の記録により機能分化を評価をする。

#### (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

層構造形成期の網膜神経層を鶏胚から単離し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いた光学的解析により以下の研究を行う。

① 伝達物質受容体の活性化によるカルシウム上昇が、網膜神経節細胞に分化開始した細胞と増殖中の網膜神経上皮細胞とでどのように異なるかを明らかにする。

② 細胞内カルシウム上昇がDNA合成期(S期)に生じることを平成12年度の研究で明らかにした。平成13年度はこの細胞周期特異性のメカニズムを同定する。

#### (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

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：成熟網膜神経節細胞の軸索再生には生存維持だけでなく、積極的に軸索再生をさせる因子を見つけねばならない。最近その可能性が指摘されているbcl-2遺伝子が果たして軸索進展効果があるかどうかを、同遺伝子の過剰発現マウスを用いて、坐骨神経移植片への軸索進展効果から定量的に評価する。

② 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：視神経切断後の網膜における細胞外グルタミン酸濃度の変化を継続的測定する。その変化をグルタミン酸受容体アゴニスト・アンタゴニスト投与により修飾して、網膜神経節細胞の生存および軸索再生を促進させ得るかどうかを調べる。

③ 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。

#### 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变化の様子を明らかにすることを目標に以下の研究を行う。

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。

(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

視覚路を再構築するために相当数の再生視神経線維が必要になる。これまでの研究から、BDNF, CNTF, フォルスコリンを眼球内に同時に注入すると、再生細胞数を2倍以上増加できることが明らかになった。平成13年度は軸索伸長を促進する薬剤の投与で再生細胞数がさらに増加できるかどうかを検討し、軸索を再生した網膜神経節細胞が実際に機能しているかどうかを調べる。

① ラットで末梢神経を視神経断端に移植し、移植部へガレクチンを浸透圧ポンプで長期間供給する。4週後に再生細胞の数を調べて、ガレクチンが視神経再生に有効かどうかを検討する。なおこの研究は堀江秀典リエゾン（横浜市立大学医学部）と共同で行う。

② ネコにおいてガレクチンを移植片接合部に、ザイモザンを眼球内にそれぞれ投与し、視神経再生にどの細胞タイプの軸索の伸長を促進するかを検討する。

③ 昨年度から引き続き *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、記録後色素の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、この因子がマクロファージを刺激し神経再生促進因子(GAL-1/MAC因子)を分泌させることが判明した。この分泌因子は末梢神経再生のみならず網膜からの神経再生を促進させることが判明した。平成13年度は愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所の渡部真三リエゾン、大阪大学大学院医学系研究科の澤井元リエゾンらと共同で次の①~③の研究を行う。

① ラットの視神経に移植した末梢神経に酸化型ガレクチン-1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。

② GAL-1/MAC因子による *in vitro* 視神経再生モデルにおける軸索再生促進効果を検討する。

③ GAL-1/MAC因子による①と同様の系における視神経再生促進、網膜神経節細胞の生存維持と上丘への軸索再投射・機能再建をはかる。

さらに、単独で、

④ 酸化型ガレクチン-1により刺激を受けたマクロファージから分泌される GAL-1/MAC 因子を同定する。

(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

平成12年度までの研究で、視神経切断端にシュワン細胞を主成分とした人工移植片を移植することによって、上丘への再生視神経の投射が可能であることを確認してきた。平成13年度は以下の研究を行う。

① 形態学的解析として上丘における再生線維でのシナプス関連蛋白の発現を共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析し、免疫電顕を用いて上丘におけるシナプス形成を確認する。

② 機能的解析として光刺激を手がかりとした行動生理学的解析を行い、また上丘における光誘発電位を測定し視覚路再構築の可能性を検討する。

II 平成13年度における実施体制

研究項目	担当機関	研究担当者
<p>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</p> <p>(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</p> <p>(2) 網膜・色素上皮の分化決定と分化維持機構の研究</p> <p>(3) 視細胞の分化と生存維持の研究</p> <p>(4) 遺伝子導入・移植による網膜細胞の生存維持の研究</p>	<p>厚生労働省国立療養所中部病院長寿医療研究センター</p> <p>奈良女子大学理学部</p> <p>大阪大学大学院理学研究科</p> <p>東北大学医学部</p>	<p>森 望</p> <p>荒木正介</p> <p>徳永史生</p> <p>玉井 信</p>
<p>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</p> <p>(1) X線顕微法の開発と細胞骨格の動態の研究</p> <p>(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</p> <p>(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</p> <p>(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</p>	<p>独立行政法人産業技術総合研究所</p> <p>独立行政法人産業技術総合研究所</p> <p>都立科学技術大学工学部</p> <p>独立行政法人産業技術総合研究所</p> <p>兵庫県立姫路工業大学理学部</p> <p>熊本大学医学部</p>	<p>清水秀明</p> <p>山田雅弘</p> <p>津田基之</p> <p>田中英明</p>
<p>3. 網膜神経回路網の再生・分化と機能評価の研究</p> <p>(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</p> <p>(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</p> <p>(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</p>	<p>筑波大学生物科学系</p> <p>独立行政法人産業技術総合研究所</p> <p>奈良県立医科大学医学部</p> <p>大阪大学大学院医学系研究科</p>	<p>齋藤建彦</p> <p>山下勝幸</p> <p>澤井 元</p>
<p>4. 再生視神経とその中枢投射路再構築の研究</p> <p>(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</p> <p>(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</p> <p>(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</p> <p>(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</p>	<p>大阪大学大学院医学系研究科</p> <p>独立行政法人産業技術総合研究所</p> <p>愛知県コロニー発達障害研究所</p> <p>独立行政法人産業技術総合研究所</p> <p>横浜市立大学医学部</p> <p>独立行政法人産業技術総合研究所</p> <p>横浜市立大学医学部</p>	<p>三好智満</p> <p>渡部真三</p> <p>堀江秀典</p> <p>出澤真理</p>
<p>5. 研究管理</p>	<p>独立行政法人産業技術総合研究所</p> <p>千寿製薬(株)コーベクリエティブセンター</p>	<p>清水秀明</p> <p>福田 淳</p>

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
荒 木 正 介	奈良女子大学 理学部教授
斎 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	香川大学 工学部教授, 独立行政法人産業技術総合研究所脳神経情報研究部門
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	兵庫県立姫路工業大学 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	厚生労働省 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	東京都立科学技術大学 工学部教授, 独立行政法人産業技術総合研究所脳神経情報研究部門
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)