

## 論文の内容の要旨

**論文題目** 網膜－上丘視覚情報処理系 *in vitro* モデルの構築と活動評価

**氏名** 廣田 晋也

現在我が国では、糖尿病や緑内障、交通事故等を原因とする中途失明者の数は数十万人に及ぶ。また加齢性の網膜変化による視覚機能不全に陥る患者数が増加する傾向にある。今後更なる高齢者人口の増加が予想され、視覚機能の回復に向けた治療法の開発が重要課題と位置付けられる。視覚情報処理系の神経回路網は解剖学的、生理学的に非常に複雑に形成されており、網膜と脳を中継する視神経を損傷すると本来の視覚機能の再生は不可能とされている。しかし、近年マウス中枢神経の軸索周囲を取り巻く髄鞘内に複数の軸索伸長阻害因子の存在が特定され、その働きを薬理的に抑制することで軸索再生が行われたという報告があり、視神経損傷に対する治療薬開発に期待が高まっている。

脊椎動物の視覚情報処理は複数の経路で並行して行われている。ヒトの場合、形態視や空間視など視知覚を担う網膜－外側膝状体－大脳皮質視覚野の経路が視覚情報処理の中心的役割を果たすが、霊長類に限り著しく発達している。一方、網膜－上丘の経路は視覚対象を注視する際の高速眼球運動（サックード運動）に重要な役割を果たし、比較的下等な動物においてもヒトと解剖学的構造が共通している。また外側膝状体と同様、上丘内で網膜の位置特異性（レチノトピー）も保存されていることから実験的にも扱いやすく、視覚情報処理系を理解する上で適した系と考えられる。

本研究では、網膜－上丘視覚情報処理系の発達時における神経回路網形成と機能発現を細胞レベルで理解することを目的に設定し、第一に微小電極基板（Microelectrode array,

MEA) 上にラットより採取した網膜, 上丘を共培養することで, 網膜-上丘視覚情報処理系の *in vitro* モデルの構築を試みた.

また, 網膜の神経活動は胎生 16 日目に開始するのに対し, 上丘では生後 5-6 日目に始まるとされる. 先行研究では, 網膜の投射先である上丘の神経回路網の発達に対する網膜からの信号入力の効果や上丘の神経活動で自律的に行われるのか, 明らかではなかった. そこで, 第二に視覚情報処理系の *in vitro* モデルを用いて, 上丘神経回路網の発達に対する網膜の関与を確認するとともに, さらに網膜由来の液性因子, 信号入力が作用する可能性を調べた.

以下, これまで得られた結果を示す.

#### 1) 視覚情報処理系を構成する網膜, 上丘の, 発達過程における電気活動の遷移の観測

網膜-上丘視覚情報処理系 *in vitro* モデルの構築を目的とする立場から, 網膜-上丘共培養の最適条件を検討・確立した. 新生児ラット由来の網膜組織及び上丘スライスを一か月以上培養可能な最適条件について培養液の組成, 培養液量等の指標をもとに検討し, 得られた条件を MEA 上での培養に適用した. 結果として, 各組織を一か月以上培養し自発電気活動を経時観測することに成功した. 網膜については, 自発電気活動パターンの遷移が *in vivo* 実験での報告と類似する傾向を示した. 上丘については, 培養初期に散発的なスパイク発火が出現し, 培養日数の経過とともにスパイク数が増加, その後スライス全域に伝搬する同期バーストへと活動パターンが移行する現象が認められた. ここで, 同期性の発現が細胞間のシナプス形成やその機能の成熟に基づくものとする, 上丘の発達時の活動をとらえたものと考えられる. さらに薬理操作実験により, *in vitro* 系においても上丘内で神経伝達物質受容体の発現等の機能的な発達が行われる様子が確認された.

#### 2) 網膜-上丘共培養による視覚情報処理系の *in vitro* モデルの構築

視覚情報処理系における神経回路網の形成と機能発現を調べることを目的に, 胎児ラットから網膜組織, 上丘スライスを採取し, MEA 上で網膜-上丘視覚情報処理系の *in vitro* モデルを構築した. ここで示す *in vitro* モデルとは, 各組織から一か月以上自発電気活動が観測できる, 組織間で信号伝達が行われている, の基礎的条件を基準にしている. 共培養の際は, 1) で得られた網膜組織及び上丘スライスの最適条件を考慮し, 上丘に合わせて培養条件を設定した. その結果, 各組織の自発電気活動を一ヶ月間追跡することができ, 両方の組織で 1) と同様の活動パターンの経時変化を示すことがわかった. また, 網膜-上丘間において神経連絡の形成が形態的に観察され, 組織間で信号伝達が行われる様子も確認された. この結果から, 初段階の網膜-上丘視覚情報処理系の *in vitro* モデルを構築できたと考えられる.

### 3) 網膜の神経活動/液性因子が視覚情報処理系の神経回路網形成に果たす役割の検討

網膜-上丘視覚情報処理系の神経回路網形成時において、上丘内の視神経投射地図の精緻化は一般に網膜の神経活動に依存すると考えられているが、上丘の神経回路網の構造変化や活動に影響されることも十分に考えられる。しかし現状では上丘の神経活動に関する知見は少なく、上丘の発達に対してこれまで網膜からの信号入力が作用するのか、あるいは自律的に行われるのか、明らかではなかった。

本研究では、はじめに網膜の活動や液性因子等が上丘の発達に与える影響を調べるため、胎児由来の網膜-上丘共培養系と上丘単独培養系から一カ月間観測された上丘の自発電気活動パターンを比較した。その結果、共培養系では培養日数の経過に従って散発的なスパイク発火からスライス全域にわたる同期バーストへと一定の活動パターンの遷移が確認された。一方、胎児由来の上丘単独培養系では電気活動が安定して観測されず、散発的なスパイク発火が見られるにとどまった。二つの培養系で上丘の活動パターンに明確な差が現れたことから、上丘の発達に対して網膜が何らかの作用を及ぼすことが示唆された。ここでは主な要因として、網膜からの“信号入力”または“液性因子”が作用している可能性を考えた。

次に組織間の神経連絡の形成を防ぎ培養液を介して液性因子のみ交換可能な培養チャンバーを作製し、その中で共培養を行った。その結果、胎児由来の上丘単独培養試料と同様の活動パターンが観測されたことから、網膜由来の液性因子が上丘の神経活動及び神経回路網の発達に決定的でないことが推測される。また、1) で述べた新生児由来の上丘単独培養試料では胎児由来共培養試料と同様、スライス全域にわたる同期バーストが観測されている。以上の結果を考察すると、網膜からの信号入力が上丘の活動開始のトリガーとして作用し、出生時期付近から上丘の自発活動が開始、その後上丘の神経活動、網膜からの信号入力により活動依存的に神経回路網の発達が行われる可能性が考えられる。

本研究では、網膜-上丘視覚情報処理系 *in vitro* モデルを MEA 上で構築することで、以下の新たな知見が得られた。

- 1) 上丘の自発電気活動を培養環境下で経時的に追跡することで、これまで不明であった発達過程における上丘の神経活動パターンの遷移をとらえることができた。
- 2) 上丘の神経回路網の発達・成熟は、上丘の神経活動のみで自律的に行われるのではなく網膜からの信号入力が重要な役割を果たす可能性が示唆された。

今後はこの網膜-上丘視覚情報処理系 *in vitro* モデルについてレチノトピー形成を確認し、この系では細胞レベルで形態変化及び神経活動を捉えられることから、将来的には視神経損傷に対して軸索伸長阻害因子の機能抑制を利用した新たな治療薬効果の観察に応用できるものと期待している。