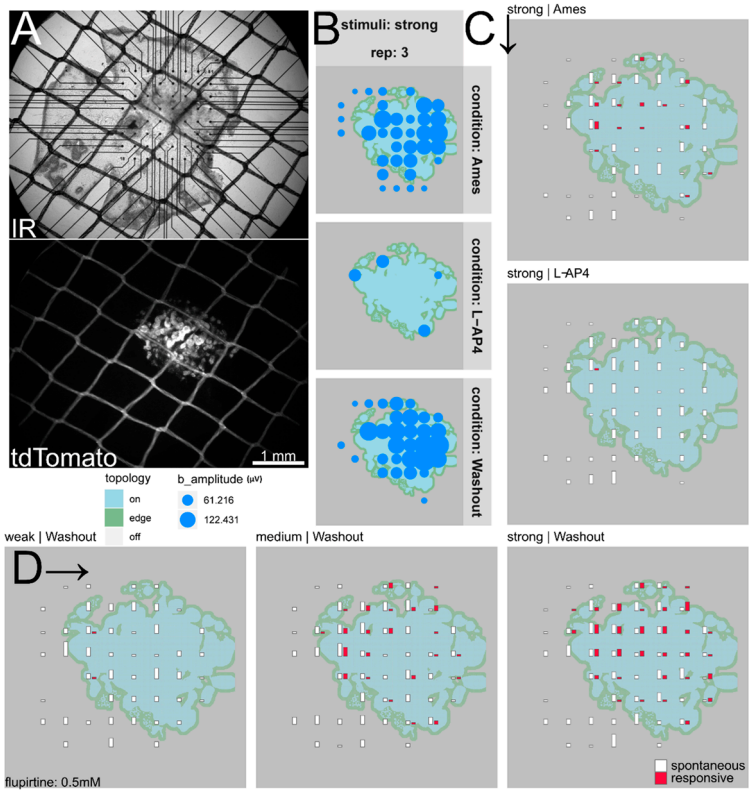
126　網膜介在神経細胞の発生と視覚回路における役割の解析	Tu Hung-Ya

【目的】中枢神経組織の一部である網膜は大別して 5 種類の神経細胞と 1 種類のグリア細胞から構成されるが、すべては共通の未分化網膜前駆細胞から細胞周期を出て分化成熟し、正確な神経回路を形成することによってはじめて光情報を適切に処理・統合することができる。光を受容する視細胞が障害される黄斑変性症や網膜色素変性症、神経節細胞が減少して視野障害を生じる緑内障などの網膜疾患は重篤な視覚障害や失明につながる。主に遺伝子変異が原因となる視細胞の機能障害・細胞変性に対して、様々な遺伝子治療や細胞移植治療の開発が進んでいる。しかしながら、健常な網膜回路の仕組みは過去数十年の間にほぼ明らかにされているにもかかわらず、視細胞の変性によって残された網膜内層細胞およびその回路がどのように変化するか、またはどのように治療に反応するかはほとんどわかっていない。本研究では、変性網膜における病的異常活動はどのように細胞移植による回路の再構築に関与するかを明らかにすることを目的とした。多電極アレイ記録による機能評価手法の確立とともに、移植網膜の系統的な定量評価を行い、異常活動を抑制する拮抗薬の投与によりマウス網膜の光応答性を比較した。

【方法】変性マウス網膜に幹細胞由来網膜オルガノイドを移植し、多電極アレイシステムを用いて網膜レベルにおいて光応答性の回復を評価した。さらに変性網膜の病的な異常活動を抑制するために、移植後マウスの飲料水にカリウムチャネル拮抗薬を投与し、光応答性の回復を比較した。

【結果】移植網膜に特化した多電極アレイ測定および解析手法を確立した上、適量のカリウムチャネル拮抗薬フルピルチンの長期投与により、AⅡアマクリン細胞由来宿主網膜の異常活動を軽減し、移植視細胞との間のシナプス再形成そして網膜の光応答性の回復を促進する可能性が示唆された。

多電極アレイにおける光反応および移植片トポロジー



126. 網膜介在神経細胞の発生と視覚回路における役割の解析

Tu　Hung-Ya

大阪大学 蛋白質研究所 分子発生学研究室

Key words：マウス，網膜，アマクリン細胞，多電極アレイ，細胞移植

緒　言

中枢神経系組織におけるすべての種類の神経細胞とグリア細胞は、共通の未分化前駆細胞から増殖期最後の細胞周期で分化運命が決定され、最終的に複雑な神経回路を構築する。その分子機構の解明にアプローチするために、中枢神経系の組織である網膜は優れたモデルシステムである。網膜は大別して 5 種類の神経細胞と 1 種類のミューラーグリア細胞から構成され、比較的に単純かつ構造が明瞭である。網膜の神経回路は光センサー細胞である錐体および桿体視細胞に始まり、多様なシナプスを介して視覚情報を二次ニューロンである双極細胞、抑制性の介在ニューロンであるアマクリン細胞と水平細胞、脳への出力を担う神経節細胞に伝わる。環境の光の変化をもとに様々な視覚情報は緻密な網膜神経回路によって脳に伝達されるが、その回路は大まかに ON（明るくなることに対して反応する）と OFF（暗くなることに対して反応する）の経路に分かれている。錐体視細胞に繋がる錐体双極細胞から直接網膜神経節細胞へシグナルを伝達することと異なり、桿体視細胞のシグナルは特定の桿体双極細胞から AⅡアマクリン細胞に伝達され、gap junction とグリシン作動性シナプスを介して桿体信号を ON と OFF の錐体経路に伝え、最終的に神経節細胞を介して脳へ伝わると知られている。

網膜の疾患としては前述した光を受容する視細胞が障害される黄斑変性症や網膜色素変性症、神経節細胞や網膜神経線維が減少して視野障害を生じる緑内障などがあり、これらの疾患は重篤な視覚障害や失明につながる。主に遺伝子変異が原因となる視細胞の機能障害・細胞変性に対して、様々な遺伝子治療や細胞移植治療の開発が進んでいる。しかしながら、健常な網膜回路の仕組みは過去数十年の間にほぼ明らかにされているにもかかわらず、視細胞の変性によって残された網膜内層細胞およびその回路がどのように変化するか、またはどのように治療に反応するかはほとんどわかっていない。網膜色素変性症モデルである rd1 マウス網膜では、神経節細胞が自発的活動を示す［1］。このような活動亢進は AⅡアマクリン細胞の自発的膜電位の振動に起因し［2］、そして神経節細胞のみならず双極細胞やアマクリン細胞でも観察され、網膜内層回路の機能的な乱れを示唆している。本研究では、このような異常活動はどのように細胞移植による回路の再構築に関与するかを明らかにすることを目的とした。具体的には AⅡアマクリン細胞の過分極を誘導するカリウムチャネル拮抗薬を用いてその膜電位振動を抑制することにより、AⅡアマクリン細胞に起因する網膜内層の異常活動を停止させ、幹細胞由来網膜細胞移植後の神経回路再構築を促進する可能性を試みた。多電極アレイ記録による機能評価手法の確立とともに、移植網膜の系統的な定量評価を行い、拮抗薬を長期投与したマウスと投与しなかったマウスの光応答性を比較した。

方　法

1. マウス

移植に使用した ON 双極細胞に特異的に緑色蛍光タンパク GFP が発現する網膜変性マウスモデル（以下 rd1-2J;L7-GFP）は C57BL/6J-Pde6brd1-2/rd1-2J/J（JAX stock #004766）マウスと B6;FVB-Tg(Pcp2-EGFP)2Yuza/J（JAX stock #004690）マウスの交配により作製した。

2. 網膜オルガノイドの調製と移植

移植に使用するマウス iPSC/ESC 由来網膜オルガノイドは Tg(Nrl-GFP);Ribeye-reporter iPS 細胞あるいは Thy1-GCaMP6f;Ribeye-reporter ES 細胞から分化させ、移植当日に視胞構造（分化 13 日目）を約 0.5 mm×2 mm の大きさに切断した［3］。マウスは吸入麻酔システム（Narcobit-E type Ⅱ、夏目製作所）を用いてイソフルランで麻酔し、目に散瞳剤 Mydrin-P®（0.5%フェニレフリン／0.5%トロピカミド、参天製薬）を点眼した。術中の麻酔状態はマウス用に改良したノーズコーンを用い、O_2 流量 1.5 L/min で 2.0～5.0%のイソフルランによって維持した。切り出した網膜シートは先端径約 500 μm のガラス製マイクロピペットを用いて、10～15 週齢の rd1-2J;L7-GFP マウスの網膜下に 1 mM のバルプロ酸溶液と一緒に挿入した。インドメタシン（10 mg/L）は移植当日からすべての移植マウスの飲料水に添加した。

3. カリウムチャネル拮抗薬の投与

移植マウスを 4 群に分け、それぞれ 0 mM、0.5 mM、1 mM と 2 mM のカリウムチャネル拮抗薬フルピルチン（Flupirtine）を飲料水に添加した。マレイン酸フルピルチン（東京化成工業）は DMSO に溶解した 100 mM 原液を事前に調製し、−30℃で保存した。フルピルチンの投与は、移植後 1.5 週目頃、移植片視細胞がシナプスを形成し始めた時期に開始した。全群の動物の血中フルピルチン濃度は多電極アレイによる網膜光応答性を評価すると同時に高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。

4. 多電極アレイの測定およびデータ解析

測定および解析手法は Methods in Molecular Biology シリーズに書籍の一章として寄稿された［4］内容より改変した。移植したマウスは移植後約 8～9 週目に網膜を回収し、USB-MEA60-Up-System（MultiChannel Systems）を用いて多電極アレイ測定を行った。動物は測定の前に 1～3 日間暗順応させ、暗室内で麻酔して安楽死させた。摘出した眼球から角膜と水晶体を除去し、使用するまでに強膜が付いた状態でエイムズ培地に漬けて保存した。測定の際に神経節細胞と電極（60MEA200/30iR-Ti-gr）との接触を良くするために、網膜から硝子体を注意深く取り除き、新鮮な状態で強膜から単離した。移植部位は特徴的な白い斑点で識別し、メッシュ付きアンカーの補助のもと、神経節細胞側を下にして電極に取り付けた。測定中の網膜は 95% O_2＋5% CO_2入り、34±0.5℃に温めたエイムズ培地を 3～3.5 mL/分で常時灌流し、細胞の活性を保った。網膜は電極に貼り付けた後 20 分間以上静置して安定させてから測定を行った。光刺激として白色 LED 光源を用いて照度 10～13 log photons/cm^2/s の 10 ms または 1 s フラッシュを対物レンズ経由で全視野に照射した。異なるバンドパスフィルターを用いて、視細胞・双極細胞の活動を示す微小網膜電図（microERG または mERG）と神経節細胞の活動電位（スパイク）を抽出し、解析を行った。mERG の a 波（視細胞由来反応）は、フラッシュから 55 ms までの最低点の振幅、b 波（双極細胞由来反応）は 120 ms 以内の最大点の振幅と定義した。神経節細胞の活動電位は、Spike 2 version 7.2（Cambridge Electronic Design）ソフトウェアを用いて、活動電位の振幅と形状に基づいて分離した。移植片に局在する視細胞に特異的に発現させた赤色蛍光タンパク tdTomato により、測定後に移植片の場所を確認できた。電極に対するおおよその移植片位置を 552×552 ピクセルの解像度で手動マッピングし、各ピクセルを移植片の「上」（on）または「外」（off）、あるいは移植片の「端」（edge）と定義した。

結果および考察

1. 移植網膜の多電極アレイ測定および解析

移植による回路の再構築とその機能回復を客観的に評価するために、網膜の光応答性を多電極アレイシステムで測定した。多電極アレイシステムは網膜のみならず様々な生理実験系に応用されてきたが、移植網膜から得られたデータは独特であり、それに特化する解析手法の検討が必要となった。まず、移植網膜は変性した宿主網膜を部分的にしか覆っておらず、局所的に再構築されたシグナル伝達と病的な自発活動が混在している。このよう

な状況では、移植片のトポロジーが極めて重要になり、多電極アレイ上で移植片の位置を正確にマッピングする必要がある。また、多電極アレイでは電極に直接接触している神経節細胞の活動電位と、培地を介して伝達されてきた視細胞／双極細胞の集団的電位変化を検出することができる。オルガノイド由来移植網膜シートには視細胞だけでなく他の網膜神経細胞も含まれているため、mERG b 波（双極細胞の光反応）は移植片内もしくは移植片外、すなわち移植視細胞と宿主双極細胞間のシナプス伝達双方に由来する可能性がある。したがって、同じ電極で検出された mERG b 波と神経節細胞活動電位を一緒に考えることは、有効な（移植視細胞—宿主双極細胞間の）と無効な（移植片内の）シグナル伝達を区別するために重要である。さらに、神経節細胞の光応答と自発発火の相互作用に注目した。これは、移植後の網膜回路の再構築によって、病的な網膜内層の異常活動が抑制されるという仮説に基づくものであり、実際に移植片に覆われて光応答を示す神経節細胞の自発発火頻度は光応答しないものに比べて低くなったことが度々観察された。また、オルガノイド由来網膜シートの調製、移植の手法、移植片と宿主網膜の相互作用、薬理学的治療などの組み合わせによって、大きなばらつきが生じる。したがって、多電極アレイを含めあらゆる電気生理実験結果を定量的に比較する際には、これら異なるパラメータ間の相互作用をベイズ推定および統計分布仮説を用いて考慮することが重要である。データの可視化の例として図 1 を提示した。光に応答した神経節細胞は移植した領域にのみ見られ（図 1C、D）、そして自発発火の頻度は移植片と関係なく散在していた。

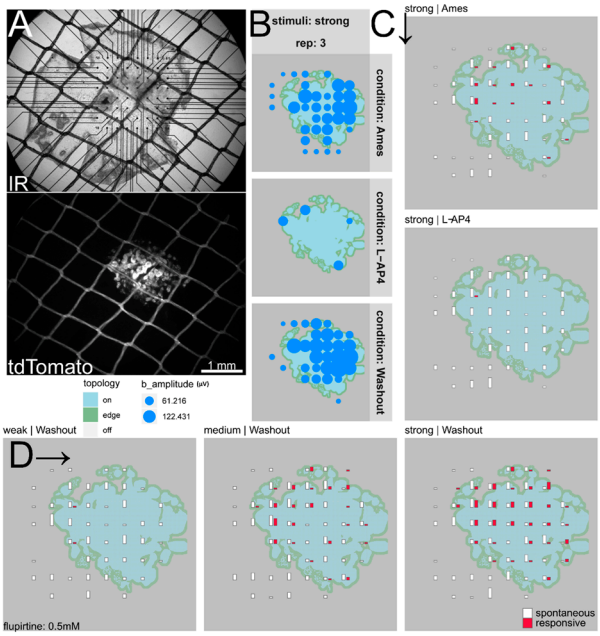


図 1. 多電極アレイにおける光反応および移植片トポロジー

A） 電極にマウントした移植後網膜（IR）および移植片（tdTomato）。

B） 視細胞－双極細胞間シナプス阻害薬 L-AP4 を加えた前後の mERG b 波振幅。移植片が覆われた範囲は水色で示した（topology, on）。

C、D） 神経節細胞の自発活動（白）および光による活動（赤）。L-AP4 前後の自発活動は一定であることに対して、光反応が L-AP4 後に強くなった。
光刺激の強さによって神経節細胞の光反応も強くなった。

2. 移植後の網膜再建に対するフルピルチンの効果

AⅡアマクリン細胞特異的に発現するカリウムチャネルの拮抗薬フルピルチン投与の効果は前述の手順に従って多電極アレイ測定システムを用いて評価した。コントロール（0 mM フルピルチン）群を除き、移植後 10 日目から 3 種類濃度のフルピルチン（0.5 mM、1 mM、2 mM）を飲料水経由で移植マウスに常時投与した。

フルピルチンを投与したマウス網膜の mERG b 波（双極細胞の光反応）の検出確率がコントロール群より低くなり、フルピルチン濃度の上昇に伴いさらに低下することが観察された（図 2、Flupirtine）。この結果はフルピルチン投与量の増加により溶媒の DMSO 濃度も増えて細胞に毒性をもたらしたと考えられる。一方、同じ 10 ms 光刺激に対して神経節細胞が応答した割合は、0.5 mM フルピルチンを投与した場合にはコントロールより高くなったが、1 mM と 2 mM 群では低下した（図 3、Flupirtine）。この結果から適量のフルピルチン（0.5 mM）が AⅡアマクリン細胞由来宿主網膜の異常活動を軽減し、移植視細胞との間のシナプス再形成を促進する可能性が示唆された。フルピルチンの溶媒である DMSO の毒性を軽減するために、今後フルピルチンの局所制御放出および手法の検討が必要になる。また、1 s の光刺激で神経節細胞の光応答型を区別したところ、4 群間の ON 型、OFF 型、非応答型の細胞割合において明らかな差は見られなかった（図 4）。このことは、フルピルチンの投与は再構築された網膜回路の細胞構成に影響を与えないこと、すなわち、ON または OFF 経路のどちらかに偏った影響を与えないことを示した。単離した網膜においてフルピルチン投与のありなしは神経節細胞の自発発火率に関して特に影響が見られなかったが、これはフルピルチンがイオンチャネル阻害薬であり、網膜の単離により効果が持続しなかったためと考えられる。

これらの結果から、AⅡアマクリン細胞の膜電位振動に起因する変性網膜の異常神経活動を抑制すると、移植片視細胞に対して双極細胞がより効率よくシナプスを形成する可能性が示唆された。興味深いことに、類似する自発的膜電位変化や振動が発生期の網膜にも観察されているにもかかわらず、シナプス形成または神経回路の構築にどのような影響を与えるのかはまだ不明であり、その解明により中枢神経ネットワーク構築の分子メカニズムそしてその再構築の可能性について理解が進むことが期待される。

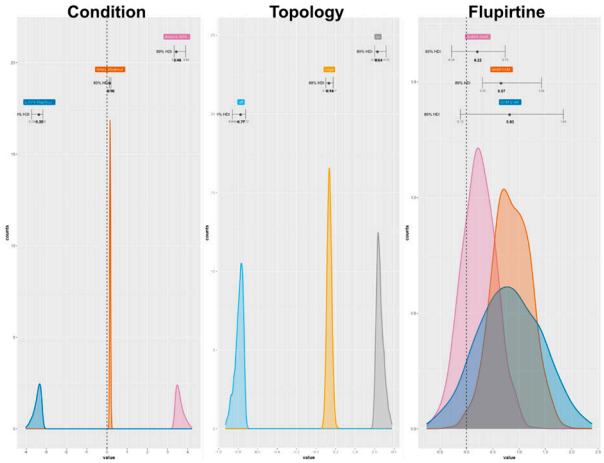


図 2. 移植後の網膜再建に対するフルピルチンの効果（双極細胞の光応答性）

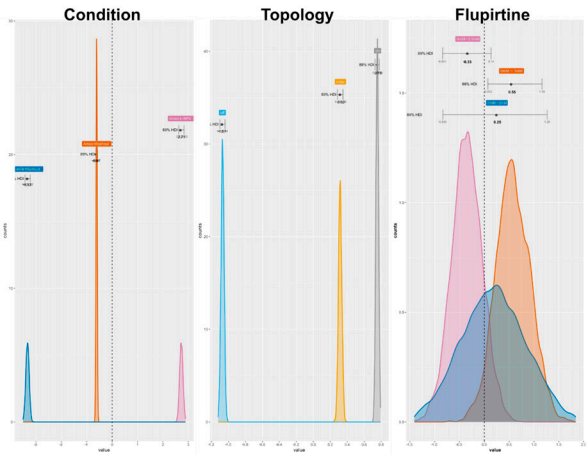


図 3. 移植後の網膜再建に対するフルピルチンの効果（神経節細胞の光応答性）

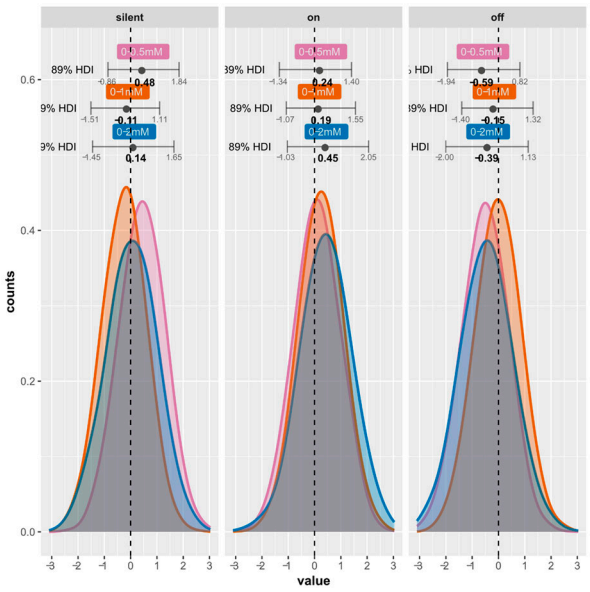


図 4. 移植後の網膜再建に対するフルピルチンの効果（神経節細胞の光応答型）

共同研究者・謝辞

本研究にご支援を賜りました公益財団法人上原記念生命科学財団に深謝いたします。

文　献

1) Stasheff SF. Emergence of sustained spontaneous hyperactivity and temporary preservation of OFF responses in ganglion cells of the retinal degeneration (rd1) mouse. J Neurophysiol. 2008 Mar;99(3):1408-21. doi: 10.1152/jn.00144.2007. Epub 2008 Jan 23. PMID: 18216234.

2) Trenholm S, Awatramani GB. Origins of spontaneous activity in the degenerating retina. Front Cell Neurosci. 2015 Jul 29;9:277. doi: 10.3389/fncel.2015.00277. PMID: 26283914; PMCID: PMC4518194.

3) Matsuyama T, Tu HY, Sun J, Hashiguchi T, Akiba R, Sho J, Fujii M, Onishi A, Takahashi M, Mandai M. Genetically engineered stem cell-derived retinal grafts for improved retinal reconstruction after transplantation. iScience. 2021 Jul 16;24(8):102866. doi: 10.1016/j.isci.2021.102866. PMID: 34409267; PMCID: PMC8361135.

4) Tu HY, Matsuyama T. Multielectrode Array Recording of Mouse Retinas Transplanted with Stem Cell-Derived Retinal Sheets. Methods Mol Biol. 2020;2092:207-220. doi: 10.1007/978-1-0716-0175-4_15. PMID: 31786791.

5) Watari K, Yamasaki S, Tu HY, Shikamura M, Kamei T, Adachi H, Tochitani T, Kita Y, Nakamura A, Ueyama K, Ono K, Morinaga C, Matsuyama T, Sho J, Nakamura M, Fujiwara M, Hori Y, Tanabe A, Hirai R, Terai O, Ohno O, Ohara H, Hayama T, Ikeda A, Nukaya D, Matsushita K, Takahashi M, Kishino A, Kimura T, Kawamata S, Mandai M, Kuwahara A. Self-organization, quality control, and preclinical studies of human iPSC-derived retinal sheets for tissue-transplantation therapy. Commun Biol. 2023 Feb 10;6(1):164. doi: 10.1038/s42003-023-04543-5. PMID: 36765170; PMCID: PMC9918541.