

網膜神経節細胞の活動電位は全か無かの事象ではない

Andrew Ishida, Genki Ogata, Tyler Stradleigh, Yuki Hayashida, Hanako Oi, Gloria Partida (カリフォルニア大学デビス校・神経生物・生理・行動)

一般的に，刺激に対する神経細胞の生理学的応答は，活動電位発火の頻度やタイミングの変化として測られる。但しこれは，活動電位をデジタル的な信号と見なし，刺激がその発生確率のみを変化させる状況を想定している。我々は，脊椎動物網膜において，これとは異なる可能性について探求してきた。なぜなら，網膜の出力細胞（網膜神経節細胞）には，活動電位の生成に必要な種類以外の多様な電位駆動型イオンチャネルが発現しており [1]，さらに，他の神経組織においてそのチャネル電流を調節していることで知られる物質（ドーパミン等）の放出量が，網膜内においても光刺激によって増加するためである。これまで我々は，網膜神経節細胞において，ドーパミン受容体アゴニストが電位駆動型ナトリウム電流の被賦活性を減少させ [2]，またこれに合致して，ドーパミンが活動電位の振幅と時間幅を変化させることを見出した [3]。さらに我々は，成体哺乳類の網膜神経節細胞において，ドーパミンが古典的および非古典的なドーパミン受容体の双方を活性化するとともに，ドーパミン受容体アンタゴニストが，全面光刺激による細胞内 cAMP レベル上昇とカルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) 活性化を阻害する事を見出した [4]。これらの結果は，幾つかの理由において興味深いものである。

一つ目は，cAMP が神経節細胞の静止電位と入力抵抗に寄与するイオンチャネルの活性を調節すること [5, 6]。二つ目は，cAMP がタンパク質キナーゼ A (PKA) を活性化し，これが他のイオンチャネルを調整すること [7]。三つ目は，cAMP 調節型および PKA 調節型チャネルが，各々過分極電位および脱分極電位において活性化すること。そして四つ目は，光刺激が細胞核における活性化型 CaMKII の出現を惹起することである [4]。これらの結果は，他の研究室から発表された結果 [8-12] とともに，網膜神経節細胞の活動電位が全か無かの事象では無いことを示しており，また光刺激が，異なる膜電位やその時間変化に応じて活動電位発火を調節する事を示唆している。全てではないにせよこれらの幾つかの効果は，網膜神経節細胞が持つ，脳の高次神経細胞への情報伝送能力を変化させ得るものである。

本シンポジウム発表について，開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Ishida: Prog Ret Eye Res **15**: 261-280, 1995
2. Hayashida et al: J Neurophysiol **92**: 3134-3141, 2004
3. Hayashida et al: J Neurosci **29**: 15001-15016, 2009
4. Ogata et al: J Comp Neurol **520**: 4032-4049, 2012
5. Lee et al: J Neurophysiol **97**: 3790-3799, 2007
6. Stradleigh et al: J Comp Neurol **519**: 2546-2573, 2011
7. Vaquero et al: J Neurosci **21**: 8624-8635, 2001
8. Liu et al: J Neurophysiol **71**: 743-752, 1994
9. O'Brien et al: J Physiol **538**: 787-802, 2002
10. Kim et al: J Neurosci **23**: 1506-1516, 2003
11. Rashid et al: Proc Natl Acad Sci USA **104**: 654-659, 2007
12. Weick et al: Neuron **71**: 166-179, 2011

和訳：林田祐樹，緒方元気

視覚誘発性行動の誘発に関連する網膜ニューロン群による情報表現

石金浩史(専修大学人間科学部心理学科/大学院心理学専攻, 専修大学心理科学研究センター/社会知性開発研究センター)

近年の研究成果により，網膜神経回路網は従来仮定されていたより高度な情報処理を行っていることが明らかになってきた [1]。網膜では，視覚的特徴が抽出され，神経節細胞のスパイク列により脳に送られる。これまで，神経節細胞のスパイク頻度やタイミング，またはその他の様式によって視覚的特徴が符号化されていることが示唆されてきた。しかしながら，それらの符号化様式が実際に中枢側で解釈されていることを実証することは難しい。カエルでは，網膜神経節細胞に4つのサブタイプがあり，その1つであるディミング検出器 (Class-4 ニューロン) の広範囲にわたる周期的同期発火が視覚誘発性の逃避行動に必要な情報を符号化していることが示されている [2]。薬理的な操作で Class-4 ニューロンの周期的同期発火の強度を操作することにより，カエルの逃避行動が変化した，発火頻度ではその行動変化を説明することは出来なかった。確かに，Class-4 ニューロンの周期的同期発火は逃避行動の誘発に必要な条件であることは明らかになっている。しかしながら，周期的同期発火が生起する刺激でもカエルの逃避行動が誘発されない場合もあり，他

のニューロンの活動も必要な条件であることが考えられる。そこで、本研究ではカエルの逃避行動の誘発に必要な視覚刺激の条件を調べ、Class-4ニューロンの周期的同期発火以外のニューロン活動の関与について検討した。カエルの視覚誘発性逃避行動は、拡大する暗いスポットが一定の大きさを超えることにより誘発されることが知られている。系統的に視覚刺激を呈示してカエルの逃避行動の生起率を調べた結果、連続した暗い領域が拡大することが必要であることが分かった。また、連続した暗い領域の面積が増大することでClass-4ニューロンの周期的同期発火は観察されるが、暗いスポットであっても外側から内側に暗い領域が増大する刺激に対しては、カエルの逃避行動は誘発されなかった。そこで、周期的同期発火が同程度に観察される拡大する暗いスポットと外側から内側に暗い領域の面積が増大する刺激を用い、カエル網膜の4つのサブタイプについてスパイク応答を調べた。その結果、Class-1およびClass-2ニューロンの発火頻度は逃避行動の生起率と相関しなかった。これらの結果から、Class-3ニューロンの活動とClass-4ニューロンの周期的同期発火が逃避行動の誘発に必要なことが示唆された。Class-4ニューロンの周期的同期発火の強度は、刺激の大きさと連続性と相関し、それらを符号化することが示唆されている [2, 3]。しかしながら、Class-4ニューロンは、刺激の運動方向などの性質に依存した活動を示さない。Class-3ニューロンの活動は、刺激の拡大運動を符号化していることが考えられる。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Gollisch et al: *Neuron* **65**: 150-164, 2009
2. Ishikane et al: *Nat Neurosci* **8**: 1087-1095, 2005
3. Ishikane et al: *Vis Neurosci* **16**: 1001-1014, 1999

微小電気刺激による視覚補綴インターフェイス

林田祐樹¹、亀田成司^{1,2}、石川直裕¹、竹内浩造¹、田中宏喜²、岡崎祐香²、八木哲也^{1,2} (大阪・工・情報電気電子,²大阪・臨床医工学融合研究教育センター)

重度視覚障害者に対する視覚補綴では、視覚伝導路上の網膜、視神経、外側膝状体や視覚皮質に対して微小電気刺激を与え、刺激部位に対応する視野内の位置にスポット状の光の知覚(光覚)を惹起する [1-3]。過去の健常被験者を対象とした心理物理実験では、そうしたスポット状光の空間

パターンにより視覚として有用な情報を与えるためには、数百程度の刺激電極が必要となることが示唆されている [4, 5]。一方、金属素材を表面に持つ刺激電極を用い、神経興奮を誘発するに足りる電荷を通電するうえで、電極-組織液界面での水の電気分解や金属溶出を抑えるために、各電極の電気化学的表面積を広げる必要があり、加えて、組織内での刺激電流の空間的拡散を考慮すると、隣接電極間の間隔は数百 μm 以上となる [6, 7]。従って、多数の刺激電極を組織内に配置するうえで、大脳皮質刺激型の視覚補綴が有効になると考えられる。我々はこれまで、マウスやラットの大脳皮質視覚野において、膜電位感受性色素を用いたin-vivoイメージング法により、局所電流刺激に対する神経応答をポピュレーションレベルで解析してきた [8]。刺激誘発性の皮質応答は、単発パルス刺激の電流振幅やパルス幅はもちろんのこと、パルス列刺激の時間構造などにも依存して変化する。さらに、空間的に離れた二箇所を与えた刺激に対する応答は、各々一箇所ずつ与えた刺激に対する応答の線形加算とはならず、非線形な相互作用のあることが分ってきた [9]。当然ながら、齧歯類と霊長類とでは視覚野の神経回路構造に違いはあるものの、過去のヒト臨床試験においても、複数電極により誘発された光覚が、単一電極により誘発された光覚の単純な空間的重ね合わせとしては知覚されない場合のあることが示されている [7]。従って、効率的・効果的な多点電極刺激の設計指針を得るには、実験動物を用いた生理学実験を通じて、神経応答の時空間的な非線形特性を明らかにすることが重要であると考えられる。そこで最近我々は、集積電子回路技術を用いて、そうした生理学実験をシステムティックに行ううえで必要となる多チャンネル刺激システムの開発・試作を行っている。特に、刺激電流パルス生成用の集積回路チップは、正方約1.2cm角、高さ3mm程度の体内埋設可能なサイズであり、8チャンネル同時もしくは64チャンネル時分割の電流パルス出力が実現可能である。現在のところ、in-vivo生理学実験により、この刺激生成チップの実証試験を行っている。さらに、このチップ64個を並列に制御する別の集積回路デバイスも併せて開発を行っており、将来的には数千電極を用いた多点パターン刺激の生成も可能になると期待される。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Shepherd et al: *Trends Biotechnol* **31**: 562-571, 2013
2. Lorach et al: *J Physiol Paris* **107**: 421-431,

2013

3. Fernandes et al: *Neurosci Lett* **519**: 122-128, 2012
4. Cha et al: *Ann Biomed Eng* **20**: 439-449, 1992
5. Cha et al: *Vision Res* **32**: 1367-1372, 1992
6. Cogan: *Annu Rev Biomed Eng* **10**: 275-309, 2008
7. Schmidt: *Visual Prosthetics*, Ed. Dagnelie, pp 301-315, 2011
8. 岡崎ら：脳 21 **15**：86-90, 2012
9. Hayashida et al: *Proc Life Engineering Symposium* **2013**: 497-500, 2013

オプトジェネティクスの視覚への応用—失明者の視覚再建を目指して—

富田浩史^{1,2}, 菅野江里子¹, 村山奈美枝¹, 田端喜多子¹, 高橋麻紀¹, 斎藤健彦¹, 西山史朗¹, 玉井信² (¹岩手大・工・応化生命, ²東北大学・医)

近年，光で神経細胞を操作する技術が注目されている。その中心的な役割を担うタンパク質は，2003年 Nagelらによって機能の詳細が報告された緑藻類クラミドモナス由来のチャンネルロドプシン-2 (ChR2) である [1]。ChR2 は光受容に伴い細胞内に陽イオンを透過させる光活性化陽イオン選択的チャンネルとして機能する。この特徴的な機能から，神経細胞に ChR2 遺伝子を導入し発現させることによって，光応答性の神経細胞を作ることが可能となっている。また，このような光活性化陽イオン選択的チャンネルに加えて，光によってクロライドイオンを透過させるハロロドプシンが発見され，これらを用いて神経細胞の興奮と抑制を制御できることが報告されている。これらの技術は神経科学分野を中心に広く利用されるようになり，光遺伝学（オプトジェネティクス）という新しい研究領域が生まれている。我々はオプトジェネティクスを利用した失明者の視覚再建法の確立を目指している。本邦の中途失明原因をみると，上位から順に，緑内障，糖尿病性網膜症，網膜色素変性症，加齢黄斑変性症がある。なかでも網膜色素変性症は現在までに有効な治療法が無く，その要因は網膜の光受容細胞である視細胞の変性であることが報告されている。我々は，網膜色素変性症では視細胞変性後も網膜のその他の神経細胞が残存し機能することに着目し，残存する網膜神経節細胞に ChR2 を導入し神経節細胞に光受容能を与えることによって視覚機能を再建する

ことを試みてきた。これまでに，網膜色素変性症のモデルラットを用いた実験で，神経節細胞に ChR2 を導入することによって視機能を回復できること，遺伝子導入後も重篤な副作用を示さず，長期間安定的に機能することなどを報告している。しかしながら，ChR2 は 540nm 以下の光波長（青領域に相当）しか感知できず，この方法によって視覚を回復できたとしても，青色の物体しか見ることが出来ないなどの問題がある。

そこで本研究では，緑藻類ボルボックスから見出された光活性化遺伝子，ボルボックス由来チャンネルロドプシン-1 (VChR1) の視覚再建への応用を試みた。VChR1 は ChR2 に比べ長波長側に感受波長を持ち，ヒトの感受波長域を考えた場合，ChR2 より有用と考えられる。まず，VChR1 をアデノ随伴ウイルスに組み込み，網膜色素変性症モデルラットの眼内に注入し，視覚誘発電位を測定することによって視覚の回復を調べた。VChR1 遺伝子の発現が網膜神経節細胞で観察されたものの，視機能の回復は見られなかった。その要因を調べるために，培養細胞に VChR1 遺伝子を導入し，パッチクランプ法により光刺激に伴う膜電流の変化を記録したところ，ChR2 に比べ極端に小さいことが判明した。また，VChR1 タンパク質は細胞膜ではなく，細胞質に存在し，細胞毒性を示すことも明らかとなった。そこで，我々は VChR1 遺伝子を改変し，細胞膜に局在する改変型 VChR1 遺伝子 (mVChR1) を作製した。その結果，光刺激に伴う膜電流は，VChR1 の約 30 倍となり，さらに 450~600nm の幅広い波長光に反応することが示された。また，網膜色素変性症モデルラットの神経節細胞に mVChR1 を導入したところ，青~赤の光刺激で視覚誘発電位が記録された。また，mVChR1 を導入したラットはオプトモーターを用いた行動学的視機能評価で，青-黒，緑-黒，黄-黒および赤-黒の縞模様の回転に反応することが明らかとなった [2]。

これらの結果から，mVChR1 遺伝子を神経節細胞に導入することによって，色覚は得られないものの，幅広い波長光を感知できる視機能を作り出せる可能性がある。

本シンポジウム発表について，開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Nagel et al: *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 13940-13945, 2003
2. Tomita et al: *Mol Ther* In press