

令和元年5月28日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11333

研究課題名(和文) マウス双極細胞周辺受容野応答極性反転のメカニズム解析

研究課題名(英文) Mechanism analysis of mouse bipolar cell surround response polarity reversal

研究代表者

尹成珠(yin, chengzhu)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：30535430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：網膜双極細胞は受容野の応答特性からON型とOFF型に分ける。ON型とOFF型で見られる受容野周辺部応答は同じGABA受容体を介して起こると考えられるが、その機序はまだ明らかになっていない。本研究での結果、ON型双極細胞ではNKCC1の遺伝子発現レベルが高く、OFF型双極細胞では低いという結果が得られた。KCC2はON型とOFF型双極細胞の両方でほぼ同じ発現レベルを示した。これらの結果から、網膜双極細胞の受容野周辺部応答極性を反転させるのは細胞内のCl⁻濃度であり、このような濃度差を起こすのは双極細胞のCl⁻トランスポーターであるNKCC1とKCC2分布の違いだと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網膜双極細胞は受容野の応答特性からON型とOFF型に分けることができる。ON型とOFF型で見られる受容野周辺部応答は同じGABA受容体を介して起こると考えられるが、どのようにして網膜双極細胞受容野周辺部応答極性を反転させているのかはまだ明らかになっていない。

本研究の結果から網膜での光応答に関する重要なメカニズムが解明され、網膜での光刺激の伝達機序が一部明らかになり、視覚障害や失明などの患者さんに対する治療、人口網膜の作成などの未来眼科技術の発展に重要な理論的根拠、メカニズムを提示したと思う。

研究成果の概要(英文)：Surround responses of bipolar cells are explained by the hypothesis that the differences of the reversal potential of GABA-mediated chloride currents reverse the polarity between ON and OFF bipolar cells. In this study, we will investigate the distribution pattern of Cl⁻ ion transporter in ON and OFF bipolar cells, and clarify the mechanism of surround response polarity reversal.

The difference between NKCC1 and KCC2 distribution was confirmed in ON and OFF bipolar cells using electrophysiological, immunohistochemical method and fluorescence in situ hybridization method. As a result, the expression level of NKCC1 was high in ON bipolar cells, low in OFF bipolar. KCC2 showed almost the same expression level in both ON and OFF bipolar cells. From these results, it is the intracellular Cl⁻ ion concentration that reverses the retina bipolar cell surround response polarity, and the concentration difference is caused by difference of Cl⁻ ion transporter NKCC1 and KCC2 distribution.

研究分野：生理学

キーワード：mouse retina bipolar cell NKCC1 KCC2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

網膜双極細胞は受容野の応答特性から ON 型と OFF 型に分けることができる。今までの研究から、ON 型と OFF 型で見られる受容野中心部の応答極性の反転は、樹状突起に発現しているグルタミン酸受容体の種類が異なるため、同じグルタミン酸に対して異なる応答が生じることで形成されることが明らかとなっている。一方、受容野周辺部応答は水平細胞と呼ばれる神経細胞から放出される GABA により形成されると考えられているが、ON 型と OFF 型双極細胞が、同じ GABA 受容体 (GABAA 受容体と GABAC 受容体) を持っているため、周辺部応答の反転は、中心部とは異なる機序で起こるものと推測されてきた。Vardi らのグループは双極細胞に存在する Cl⁻ トランスポーターの免疫組織化学的検討から、ON 型と OFF 型双極細胞では樹状突起に存在する Cl⁻ トランスポーターの分布パターンが違うことを見出した (Vardi et al., J. Neurosci., 2000)。この事実から Vardi らは、ON 型と OFF 型双極細胞樹状突起の細胞内 Cl⁻ 濃度は異なっており、ON 型と OFF 型が同じ GABA 受容体に対して異なる平衡電位を持つため応答極性が反転するとの仮説を提唱した。また Cl⁻ 感受性蛍光色素を用いた実験で、ON 型双極細胞の樹状突起と軸索終末間で、Cl⁻ の濃度勾配が存在していることが示されたこと (Duebel et al., Neuron, 2006) から現在幅広く支持される仮説となっている。しかしながら電気生理学的検討で得られたデータは GABA 受容体の存在する樹状突起内部の Cl⁻ 濃度を測定したものではなく、細胞内 Cl⁻ 濃度差も小さかったため、細胞内 Cl⁻ 濃度の相違だけで ON 型と OFF 型の応答極性が反転するかどうかについて決定的な結論を得るには至っていない。また Duebel らのデータも、GABA 受容体を活性化した時の細胞内 Cl⁻ 濃度の濃度変化が仮説を必ずしも支持するものではないなど、樹状突起部の Cl⁻ 濃度のみで応答反転を説明できるだけの十分なデータが揃っていないのが現状である。また我々の行った免疫組織化学的再検討では、Cl⁻ トランスポーターの分布が従来報告されている結果と異なる点も認められており、樹状突起の Cl⁻ 濃度の違いで応答極性の反転を説明できるとする仮説は再検討が必要と考えられる。

2. 研究の目的

本研究では ON 型と OFF 型双極細胞で見られる周辺部応答の極性反転に、GABAA 受容体と GABAC 受容体の HCO₃⁻ 透過性が関係しているのかどうかを、パッチクランプ法と免疫組織化学的手法を用いて明らかにすることを目的とする。また従来の免疫組織化学的研究で報告された、ON 型と OFF 型双極細胞の樹状突起における Cl⁻ トランスポーターの分布を、単一細胞レベルで免疫組織化学的手法を用いて詳細に再検討し、従来考えられていたような Cl⁻ トランスポーターの分布で、双極細胞内部の Cl⁻ 濃度勾配が形成されているのかどうかを再検討することを目的とする。

3. 研究の方法

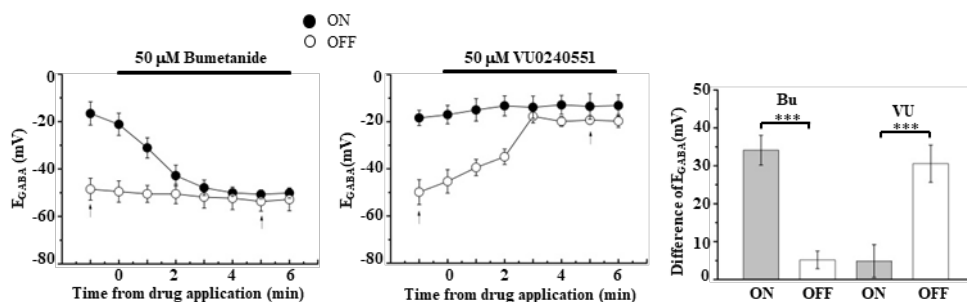
本研究では、ON 型と OFF 型双極細胞間でみられる周辺受容野応答極性の反転機序を明らかにするため、電気生理学・分子生物学・免疫組織化学的手法を用いて以下の実験を行う。

- (1) GABA 受容体サブタイプ別の HCO₃⁻ と Cl⁻ に対する透過性の比較。
- (2) ON 型と OFF 型双極細胞に分布する GABA 受容体サブタイプの異同の検討。
- (3) ON 型と OFF 型双極細胞での Cl⁻ トランスポーター (NKCC1 と KCC2) 活性の再検討。
- (4) ON 型と OFF 型双極細胞での Cl⁻ トランスポーター分布の再検討。

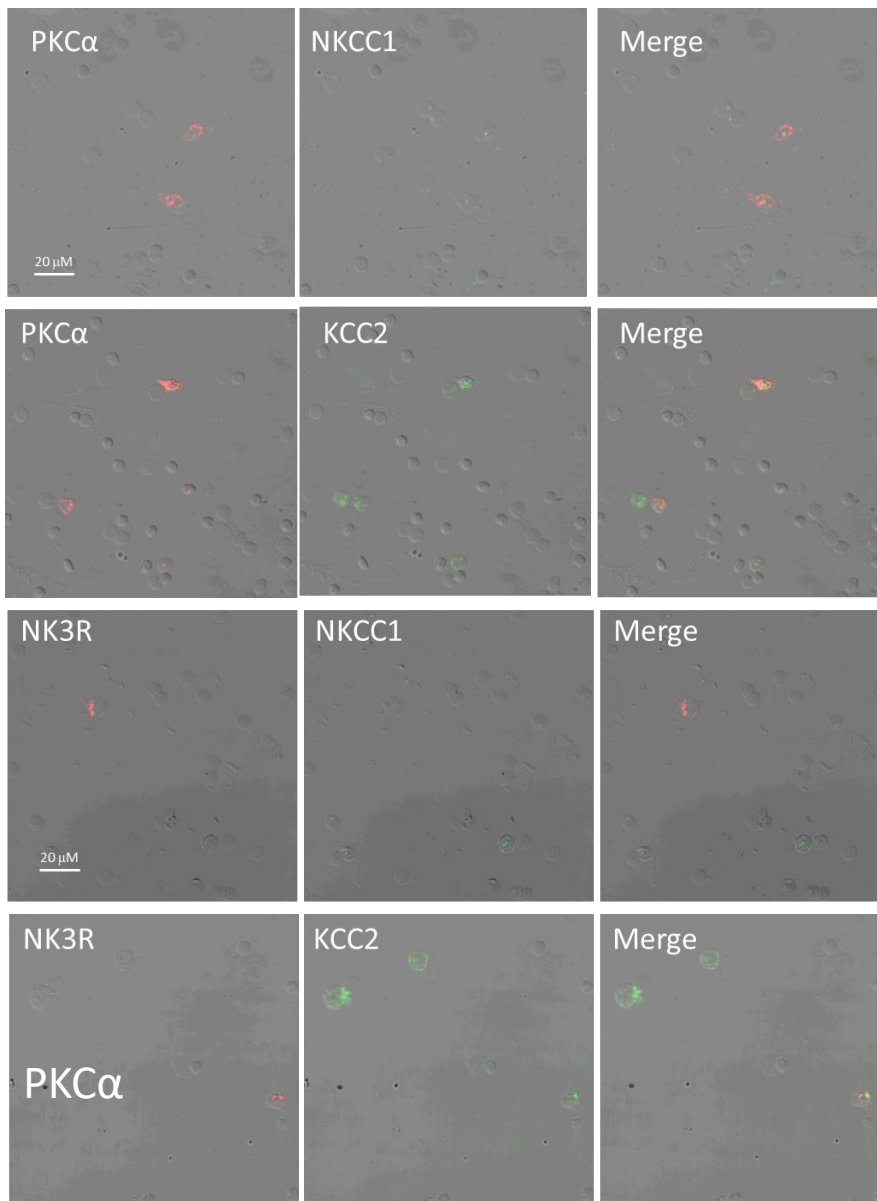
4. 研究成果

平成 28 年度の網膜双極細胞の GABAA と GABAC 受容体の HCO₃⁻ に対する透過性を電気生理学的手法で調べた結果、その透過性はほとんど変わりがなかった。

平成 29 年度は Cl⁻ トランスポーター阻害剤である Bumetanide (NKCC1) や VU0255011 (KCC2) を投与し、ON 型と OFF 型双極細胞でそれぞれの逆転電位の変化を記録し比較して見た。その結果、ON 型双極細胞で Bumetanide によって逆転電位が脱分極から過分極に変わり、VU0255011 では大きな逆転電位の変化が見られなかった。一方、OFF 型双極細胞では Bumetanide によって逆転電位の変化が見られず、VU0255011 で過分極から脱分極に変わった。



平成 30 年度は fluorescence in situ hybridization 方法を使って ON 型と OFF 型双極細胞で NKCC1 と KCC2 分布の違いを遺伝子レベルで確認した。その結果、ON 型双極細胞では NKCC1 の遺伝子発現レベルが高く、OFF 型双極細胞では低いという結果がでた。KCC2 は ON 型と OFF 型双極細胞の両方でほぼ同じ発現レベルを示した。これらの結果から、網膜双極細胞の受容野周辺部応答極性を反転させるのは細胞内の Cl⁻ 濃度であり、このような濃度差を起こすのは双極細胞の Cl⁻ トランスポーターである NKCC1 と KCC2 分布の違いだと考えられる。



	Number	Expression %
NKCC1/PKCα	26/38	68
KCC2/PKCα	35/35	100
NKCC1/NK3R	3/15	20
KCC2/NK3R	17/17	100

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 2件)

第41回日本神経科学大会

How do NKCC1 and KCC2 work in ON-and OFF-bipolar cells of the mouse retina?

第42回日本神経科学大会

NKCC1 and KCC2 determine the surround response of ON- and OFF-bipolar cells in the mouse retina

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 尹 成珠

ローマ字氏名: yin chengzhu

所属研究機関名: 日本医科大学

部局名: 医学部

職名: 助教

研究者番号(8桁): 30535430

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 金田 誠

ローマ字氏名: kaneda makoto

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。