

令和 4 年 5 月 21 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09939

研究課題名(和文) 網膜におけるP2X受容体の視覚情報伝達修飾機構の解明

研究課題名(英文) P2X receptors contribute visual information processing in the mouse retina

研究代表者

石井 俊行 (Ishii, Toshiyuki)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10643140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、網膜におけるP2X受容体の生理学的機能を明らかにすることを目的として研究を行ってきた。我々が同定したP2X受容体のうち、P2X3受容体について検討した。免疫組織化学、in situ hybridization、電気生理学的検討から、P2X3受容体は網膜神経節細胞やアマクリン細胞に発現が認められ、光の情報伝達においてP2X3受容体は、網膜神経節細胞の応答のS/N比を適切なレベルに調節していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、中枢神経系におけるP2X3受容体の機能の理解に貢献するとともに、眼内でATP濃度の上昇が報告されている緑内障や加齢黄斑変性症などの疾患の新たな治療薬の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：ATP acts as a neurotransmitter in the nervous system. All subtypes of P2X receptors (P2X1 - P2X7) have been identified in the mouse retina. However, the types of P2X receptors contributing the signal processing in the retina have not been well elucidated. In the present study, we focused on P2X3 receptors, and investigated the receptor localization and physiological function by immunohistochemistry, in situ hybridization and electrophysiological techniques. We found that P2X3 receptors were detected in amacrine cells and retinal ganglion cells, and the S/N ratio of the firing of retinal ganglion cells was regulated to the appropriate levels.

研究分野：神経科学

キーワード：P2X受容体 ATP 網膜 網膜神経節細胞 アマクリン細胞 視覚

## 1. 研究開始当初の背景

P2X 受容体は ATP の受容体として、生体内に広く発現が認められており、神経伝達、筋収縮、炎症反応、聴覚、嗅覚、痛覚及び味覚など多様な生理現象に関わることが知られている。それゆえ、P2X 受容体によるシグナル伝達は、数多くの疾患との関連が報告されている。P2X 受容体は、P2X1 から P2X7 までの 7 つのサブタイプが知られており、網膜内にすべてのサブタイプの発現が認められている。これらの P2X 受容体サブタイプのうち、P2X7 受容体は、失明の主要因とされる緑内障や加齢黄斑変性症において、硝子体内の ATP 濃度の増加に伴い活性化し、網膜内の細胞のアポトーシスに関わることが報告されている (Zhang et al. 2007, Natomi et al. 2013 他)。一方、P2X1 ~ P2X6 受容体についても、所属教室の先行研究により網膜内での発現を確認しており (Kaneda et al. 2004, Shigematsu et al. 2007)、これらの受容体の ATP に対する親和性は、P2X7 受容体と比べ 10 ~ 1000 倍高いことから、P2X1 ~ P2X6 受容体も上記の疾患や、網膜機能の維持発現等に関与している可能性が高い。そこで私たちは、これらの受容体が網膜内で生理学的に機能しているのかを調べるために、網膜の出力細胞である網膜神経節細胞の光刺激に対する応答が、P2X 受容体の非選択的アンタゴニストである PPADS (P2X1, 2, 3 及び 5 受容体を阻害) により修飾を受けること (Kaneda et al. 2008)、PPADS の眼内 (硝子体内) 注入により網膜電図の b 波の振幅に有意な減少が認められること (Ichinohe et al. 2017) を報告してきた。しかしながら、いずれの P2X 受容体サブタイプが網膜内で機能しているのかは不明であった。そこで予備的な検討として、明順応条件下において、P2X3 受容体アンタゴニストを眼内に注入し網膜電図を記録したところ、b 波や OP 波の振幅の減少が認められた。以上より本研究では、網膜における P2X3 受容体の生理学的機能を調べることを目的とした。

## 2. 研究の目的

本研究では、P2X3 受容体が網膜内の神経伝達にどのように関与しているのかを明らかにすることを目的とした。網膜内における P2X3 受容体の分布及び P2X3 受容体を発現する細胞の同定、同定された細胞への電流の入出力関係への P2X3 受容体による影響、P2X3 受容体による視機能への影響について検討し、これらの研究成果をもとに、網膜の光情報伝達機構における P2X3 受容体の役割を明らかにすることを目指した。

## 3. 研究の方法

P2X3 受容体を発現している細胞の位置を調べるため、*in situ* hybridization にて P2X3 受容体を発現している細胞の位置を調べ、免疫組織化学にて P2X3 受容体を発現している細胞種を調べた。また、発現している P2X3 受容体が生理学的に応答可能な状態であるかを調べるため、パッチクランプ法にて標的細胞に P2X3 受容体アゴニストを作用させ、応答の有無を検討した。P2X3 受容体がどのような条件で視覚情報の伝達に寄与するのかを調べるため、マルチ電極システムを用いて、*ex vivo* の網膜標本に光を照射し、それにともなって生じる網膜神経節細胞の応答への影響を検討した。また、ノックアウトマウスを用いて組織学的検討による P2X3 受容体の分布や、薬理的検討により認められた P2X3 受容体への影響を確認することとした。

## 4. 研究成果

P2X3 受容体を発現している細胞の位置を調べるため、*in situ* hybridization にて P2X3 受容体を発現している細胞の位置を調べたところ、神経節細胞層に発現が認められた。また、免疫組織化学においては、内網状層と神経節細胞に免疫反応が認められた。内網状層では、主に ON 型の視覚情報の処理にかかわる sublamina b に反応がみられ、神経節細胞層では、網膜神経節細胞およびアマクリン細胞のマーカーとの共局在が認められた。一方、細胞体が内顆粒層に位置する双極細胞やミュラーグリア細胞の突起との共局在はみられなかった。抗体の特異性は、抗原への抗体の吸着実験や、P2X3 受容体ノックアウトマウスにて確認した。さらに、網膜神経節細胞について電気生理学的検討を加えたところ、P2X3 受容体アゴニストによる応答が ON 型網膜神経節細胞では認められたが、OFF 型網膜神経節細胞ではみられなかった。この結果は免疫組織化学の結果と一致するものである。

次に、網膜神経節細胞でみられる活動電位の頻度について、P2X3 受容体による影響を、P2X3 受容体アンタゴニストを用いて検討した。暗順応条件下において 1 秒毎に明暗を繰り返す光を照射したところ、ON 型網膜神経節細胞の発火頻度は上昇し、OFF 型網膜神経節細胞の発火頻度は減少した。一方、明順応条件下において光刺激を十分な間隔を開けて照射した場合は、ON 型及び OFF 型網膜神経節細胞ともに、光刺激に伴う応答は減少する傾向が認められた。暗順応と明順応の条件は異なるが、ON 型網膜神経節細胞の P2X3 受容体アンタゴニストの影響の違いは、明刺激直前の双極細胞の伝達物質の貯蔵量に依存するものと考えられる。このとき、明刺激間の非光刺激条件下 (暗条件下) においては ON 型網膜神経節細胞で上昇し、OFF 型網膜神経節細胞では減少していた。そのため、光刺激に伴い発生した活動電位と非光刺激時に自発的に生じた活動電位の頻度を比較するため S/N 比を計算したところ、P2X3 受容体アンタゴニストに

より、ON型網膜神経節細胞のS/N比は減少したが、OFF型網膜神経節細胞のS/N比は増大していた。なお、P2X3受容体ノックアウトマウスを用いて網膜電図の記録を行ったところ、アンタゴニストの眼内投与でみられたような影響はみられなかったことから、生理学的検討にノックアウトマウスは利用しなかった。おそらく他のP2X受容体サブタイプが発現し、網膜機能を補償したものと考えられる。

以上の結果より、P2X3受容体は、網膜内の神経節細胞層に分布する網膜神経節細胞及びアマクリン細胞に発現しており、光の情報伝達においてはS/N比を適切なレベルに調節し、脳への伝達に寄与していることが示唆された。今回の研究により、網膜におけるP2X3受容体の生理学的機能の一端が明らかとなった。この結果は、緑内障や加齢黄斑変性症などの新たな治療法の鍵となるばかりでなく、P2X3受容体は中枢神経系にも広く発現が認められていることから、てんかん等の精神疾患の治療への糸口となることも考えられる。今後は本研究で得られた成果を元に、これらの疾患への影響や治療の研究へと力を注ぎたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Maneshi M.M., Toth A.B., Ishii T., Hori K., Tsujikawa S., Shum A.K., Shrestha N., Yamashita M., Miller R.J., Radulovic J., Swanson G.T., Prakriya M.	4. 巻 33
2. 論文標題 Orai1 Channels Are Essential for Amplification of Glutamate-Evoked Ca <sup>2+</sup> Signals in Dendritic Spines to Regulate Working and Associative Memory.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.108464	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Ishii T. and Hosoya T.	4. 巻 16
2. 論文標題 Interspike intervals within retinal spike bursts combinatorially encode multiple stimulus features.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS Comput. Biol.	6. 最初と最後の頁 e1007726
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pcbi.1007726	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yin C., Ishii T., and Kaneda M.	4. 巻 440
2. 論文標題 Two types of Cl transporters contribute to the regulation of intracellular Cl concentrations in ON- and OFF-type bipolar cells in the mouse retina.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurosci.	6. 最初と最後の頁 267-276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2020.06.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishii T., Stolz J.R., and Swanson G.T.	4. 巻 97
2. 論文標題 Auxiliary proteins are the predominant determinants of differential efficacy of clinical candidates acting as AMPA receptor positive allosteric modulators.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol. Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 336-350
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/mol.119.118554	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Rai D., Akagi T., Shimohata A., Ishii T., Gangi M., Maruyama T., Wada-Kiyama Y., Ogiwara I., and Kaneda M.	4. 巻 158
2. 論文標題 Involvement of the C-terminal domain in cell surface localization and G-protein coupling of mGluR6.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Neurochem.	6. 最初と最後の頁 837-848
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15217	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maruyama T., Mano A., Ishii T., Kakinuma Y., and Kaneda M.	4. 巻 12
2. 論文標題 P2X2 receptors supply extracellular choline as a substrate for acetylcholine synthesis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio.	6. 最初と最後の頁 250-257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.13332	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計24件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Ishii T., Homma K., Maruyama T., Mano A., Kakinuma Y., and Kaneda M.
2. 発表標題 Novel transporter-independent acetylcholine synthesis in the mouse retina.
3. 学会等名 日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yin C., Ishii T., and Kaneda M.
2. 発表標題 Two types of Cl transporters contribute to the intracellular Cl concentrations in ON- and OFF-type bipolar cells in the retina.
3. 学会等名 日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akagi T., Rai D., Shimohata A., Ishii T., Gangi M., Maruyama T., Wada-Kiyama Y., Ogiwara I., and Kaneda M.
2. 発表標題 The roles of the intracellular C-terminal domain in mGluR6 cell surface localization.
3. 学会等名 日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yin C., Ishii T., and Kaneda M.
2. 発表標題 2種類のClトランスポーターがマウス網膜ON型及びOFF型双極細胞における細胞内Cl濃度の調節に関与する.
3. 学会等名 日本医科大学医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ishii T., Akagi T., and Kaneda M.
2. 発表標題 Localization of novel ATP permeable channel, CALHM2, in the mouse nervous system.
3. 学会等名 日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ishii T., Akagi T., and Kaneda M.
2. 発表標題 The analysis of novel ATP release channel in the mitochondria.
3. 学会等名 日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shimohata A., Rai D., Akagi T., Ishii T., Gangi M., Maruyama T., Kiyama Y., Ogiwara I., and Kaneda M.
2. 発表標題 Involvement of the C-terminal domain in cell surface expression and G-protein coupling of mGluR6.
3. 学会等名 日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yin C., Ishii T., and Kaneda M.
2. 発表標題 Contribution of bicarbonate permeability to the reversal potential of GABA responses in bipolar cells of the mouse retina.
3. 学会等名 日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Maruyama T., Ishii T., and Kaneda M.
2. 発表標題 The developmental change of gap junction in starburst amacrine cells of the mouse retina.
3. 学会等名 日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 赤木巧、石井俊行、荻原郁夫、金田誠
2. 発表標題 代謝型グルタミン酸6型受容体の細胞膜発現におけるC末端領域の役割.
3. 学会等名 日本医科大学医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ishii T. and Hosoya T.
2. 発表標題 Interspike intervals within retinal spike bursts combinatorially encode oscillatory light sequences.
3. 学会等名 日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yin C., Ishii T., and Kaneda M.
2. 発表標題 NKCC1 and KCC2 determine the surround response of ON- and OFF-bipolar cells in the mouse retina.
3. 学会等名 日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Gangi M., Ishii T., and Kaneda M.
2. 発表標題 Asymmetric properties of ON and OFF starburst amacrine cells in the retina.
3. 学会等名 日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akagi T., Rai D., Shimohata A., Ishii T., Gangi M., Maruyama T., Ogiwara I. and Kaneda M.
2. 発表標題 Roles of the C-terminal domain in cell surface expression of mGluR6.
3. 学会等名 日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maneshi M., Toth A.B., Ishii T., Radulovic J.M., Swanson G.T., Prakriya M.
2. 発表標題 Store-operated Orai1 channels regulate Ca <sup>2+</sup> signaling in dendritic spines, synaptic plasticity, and cognition.
3. 学会等名 Society for neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maruyama T., Ishii T., Mano A., Kakinuma Y., and Kaneda M.
2. 発表標題 P2X2 receptor-mediated novel acetylcholine synthesis pathway.
3. 学会等名 日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ishii T., Shimohata A., Suzuki C., Shimogori T., and Kaneda M.
2. 発表標題 Modulation of visual information via P2X3 receptors in the mouse retina.
3. 学会等名 日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Gangi M., Ishii T., and Kaneda M.
2. 発表標題 網膜におけるアセチルコリンの役割の検討.
3. 学会等名 日本医科大学医学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Maruyama T., Ishii T., Usui S., Shimizu M., and Kaneda M.
2. 発表標題 Starburst amacrine cells in the early postnatal development form gap junctions.
3. 学会等名 日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Gangi M., Maruyama T., Ishii T., and Kaneda M.
2. 発表標題 Acetylcholine release from ON and OFF starburst amacrine cells are regulated by different feedback mechanisms.
3. 学会等名 日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ishii T., Shimohata A., Suzuki C., Shimogori T., and Kaneda M.
2. 発表標題 Contribution of P2X3 receptors to visual information processing in the retina.
3. 学会等名 日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shimohata A., Rai D., Akagi T., Ishii T., Gangi M., Maruyama T., Wada-Kiyama Y., Ogiwara I., Kaneda M.
2. 発表標題 The C-terminal domain is required for mGluR6 cell-surface localization.
3. 学会等名 Experimental Biology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Maruyama T., Ishii T., Mano A., Kakinuma Y., Kaneda M.
2. 発表標題 The role of P2X2 receptor for acetylcholine synthesis pathway.
3. 学会等名 Society for neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ishii T., Shimohata A., Suzuki C., Shimogori T., Kaneda M.
2. 発表標題 Contribution of P2X3 receptors to visual information processing in the retina.
3. 学会等名 Society for neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関