

機関番号：33916
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20500294
 研究課題名 (和文) 感覚器ニューロンのイオンチャネルと受容体の機能解析および発達・再生過程の機能発現
 研究課題名 (英文) Functional analyses of ion-channels and receptors in adult and developing mammalian sensory neurons.
 研究代表者
 宮地 栄一 (MIYACHI EI-ICHI)
 藤田保健衛生大学・医学部・教授
 研究者番号：90129685

研究成果の概要 (和文)：

視神経の細胞体である網膜神経節においてヒスタミン受容体の発現を免疫組織化学的に確認した。また、カルシウム・イメージング解析により、ヒスタミンが網膜ニューロンを調節していることが明らかになった。そして、心臓拍動など生体の様々な機能に重要な役割を演じている HCN(*h*)チャネルがヒト杆体にも存在し、ドーパミンが D2 受容体を活性化しサイクリック AMP を減少させることによって *h* 電流を減少させることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

Histamine and histamine H1 receptor exist in the gerbil retina, and that H2 and H3 receptors were expressed on developing gerbil ganglion cells.

In human rod photoreceptors, dopamine reduced *h* current (*I_h*) through a D2 receptor, and inhibited the gradual decay in the voltage response via a D2 receptor, indicating that dopamine slows the recovery phase of responses to light stimuli by inhibiting *I_h* in human rods.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：網膜、網膜発生、視細胞、網膜神経節細胞、ヒスタミン、ドーパミン、HCN チャネル、*h* 電流

1. 研究開始当初の背景

感覚器や神経系の機能を解明する上で、イオンチャネル、受容体、トランスポーターの特性や機能を明らかにすることは極めて重要である。ヒトを含む霊長類網膜では、視物質、免疫組織化学的研究、そして心理学的研

究は多くなされてきたが、パッチクランプ法などを用いたイオンチャネルの特性や機能に関する神経生理学的な研究はほとんどなされていない。われわれはヒト視細胞においてパッチクランプ法を用いて電位依存性 Na⁺チャネルを発見するなど、眼科学教室からヒ

ト網膜試料を得て大きな成果を上げた (Neuron, 2001; Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2005; Photochemistry and Photobiology, 2007)。

またわれわれは、心臓のリズムなど生体の様々なリズムの発生やその調節に関与している *h* チャンネルが、ヒトの視細胞に存在することを示唆した (Neuron, 2001; Brain Research, 2002; Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2005)。この *h* チャンネルは、われわれの予備的な実験からドーパミン等による調節を受けている可能性があり、視覚情報伝達に重要な役割を演じていると考えている。

網膜ではグルタミン酸、GABA、グリシン、アセチルコリンなど、代表的な伝達物質の受容体についての研究が進んでいるが、ドーパミンやヒスタミンについては不明な点が多い。テキサス大学の David W. Marshak ら (Journal of Comparative Neurology, 2006 等) により、サルを含む哺乳類網膜において、脳から網膜へのヒスタミン作動性遠心性神経線維の存在と近位網膜ニューロンにおけるヒスタミン受容体の存在が示唆されているが、ほとんど研究されていない。われわれも予備的な実験において、齧歯類の網膜にヒスタミン受容体の発現の変動を観察した。

2. 研究の目的

本研究では主にパッチクランプ法を用いた神経生理学および神経薬理学的手法と、細胞内 Ca^{2+} 測定などのイメージング解析法、そして免疫組織化学、分子生物学的手法を用いて、ヒトを含む脊椎動物の感覚器、特に網膜に発現している受容体とイオンチャンネルの特性と機能の解明を目指した。本研究ではイオンチャンネルと受容体の正常機能の解明と共に、ヒトを含む脊椎動物の網膜諸細胞の発生過程の受容体とイオンチャンネルの機能発現・変化を解析した。

また、哺乳類網膜発生過程における各種ヒスタミン受容体の発現と機能について、免疫組織化学的手法と Ca^{2+} イメージング解析などの蛍光画像解析法を用いて解析を行った。そしてヒスタミン受容体のサブタイプを調べ、局在部位、発現の変動を調べた。

本研究ではヒトを含む脊椎動物の網膜において、イオンチャンネルでは Na^{+} チャンネル、*h* チャンネル、 Ca^{2+} チャンネル、受容体ではドーパミン受容体とヒスタミン受容体、細胞内情報伝達系ではサイクリック AMP と Ca^{2+} に重点をおいて、それらの特性、動態、発現、および機能について、電気生理学的、免疫組織化学的、分子生物学的に解析した。

本研究の特色は、極めて貴重であるヒト網膜(破片)も用いたことによって、ヒト自身の

生理学的データも得られたことである。得られたデータは将来の医学・医療に有用な可能性が期待できると考える。

3. 研究の方法

(1) われわれはヒスタミンが網膜内の神経伝達物質として視覚情報処理において何らかの重要な役割を演じていると考えており、食虫目に属するスunks(ジャコウネズミ)と齧歯目であるスナネズミ (gerbil) の網膜を用いて、発生過程および成獣における各種ヒスタミン受容体の発現と局在について免疫組織化学的に解析した。

また、ヒスタミンの合成酵素であるヒスチジン脱炭酸酵素の免疫組織化学観察も行った。

(2) スナネズミ網膜のスライス標本と単離神経細胞について、カルシウム・イメージング法を用いてヒスタミンの効果を観察した。

(3) ヒトを含む哺乳類網膜について、双極細胞の様々なタイプ、および三次ニューロンであるアマクリン細胞と神経節細胞に存在する各種電位依存性チャンネルについて、パッチクランプ法を用いた電気生理学的解析と共に、免疫組織化学的手法を用いて調べ、各細胞におけるイオンチャンネルの有無、チャンネルのサブタイプの同定、特性および機能を解析した。ヒト網膜の研究では、本大学病院眼科での硝子体手術や網膜剥離患者から切除された網膜の破片 ($500\mu\text{m} \times 500\mu\text{m}$ 以内) から単離した細胞あるいは切片 (スライス) 標本を作成して実験を行った。

(4) 過分極で活性化する陽イオンチャンネル HCN チャンネル (*h* チャンネル) の発現の有無をヒト網膜で調べた。*h* チャンネルはサイクリック・ヌクレオチドにより調節を受けることが知られており、われわれの予備的な実験からもドーパミンやサイクリック AMP 等によって *h* 電流が変化することを観察している。本研究ではヒト網膜ニューロンの *h* 電流に対するドーパミンやサイクリック AMP のアゴニストおよびアンタゴニストの効果を、パッチクランプ法を用いて解析した。そして、網膜におけるドーパミン/サイクリック AMP 系の調節機構、役割を調べた。

(5) 脊椎動物網膜では脳からのドーパミン作動性遠心性線維とドーパミン作動性アマクリン細胞の存在が良く知られている。われわれは、Nagatsu(永津)により作製された抗 tyrosine hydroxylase を用いて、スナネズミにおいて tyrosine hydroxylase 免疫陽性を示す 2 種類のドーパミン作動性アマクリン細胞の発生過程を調べており、そのうちの 1 種

類が発生過程で細胞数が著しく増減するのを観察している (Anatomical Science International, 2003)。本研究では主にスナネズミ等の齧歯類の網膜を用いて、胎児から成獣までの様々な発生・成長過程における tyrosine hydroxylase 免疫陽性ニューロンの免疫組織化学解析を行った。

4. 研究成果

(1) ① 齧歯目スナネズミの網膜で、多くの神経節細胞における H1, H2, H3 ヒスタミン受容体の発現を観察した。また、成長に伴って H2, H3 受容体の免疫陽性部位が減少するのを観察した。H1 受容体については減少は見られなかった。成獣では神経節細胞と比較するとかなり少ないが、約 10% のアマクリン細胞に H1 受容体陽性細胞が観察された。共焦点レーザー顕微鏡観察において、ヒスタミン合成酵素であるヒスチジン脱炭酸酵素の免疫陽性部位と、H1, H2, H3 それぞれの受容体の陽性部位との共局在 (colocalization) が見られた。

本研究成果は国内学会に加えて、国際学会においても発表を行った。

(英文)

In the central nervous system, histamine is known to act on three major types of G-protein-coupled receptors; histamine H1 receptor, histamine H2 receptor and histamine H3 receptor. We examined the localization of histamine and histamine receptors in the developing gerbil retina using immunohistochemical method. The gerbils were perfused intra-cardially with a mixture of 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer. The removed eyeballs were frozen with the liquid nitrogen. Then they were cut with section of 16 μm using a cryostat. The sections were examined using ABC (avidin-biotin-peroxidase complex) immunohistochemical staining method. In the adult retinal section, histamine positive line in the ganglion cell layer was observed. H1 receptor was labeled in the ganglion cells from p(postnatal day) 2 to p350 (adult) in the gerbil retinal sections. At p14, H1 receptor was strongly stained in the ganglion cell layer. The distal portions of the ganglion cell somata were more strongly stained than the proximal portions. The axon of each ganglion cell was weakly stained. H2 receptor was labeled in the ganglion cells after p8. After p26, the ganglion cells were hardly stained. And H3 receptor was labeled in the

ganglion cells after p6. After p70, the ganglion cells were weakly stained, and most of them were not stained at p350. H2 and H3 receptors were strongly stained at the distal portions of the ganglion cell somata at p14. These results suggest that histamine and histamine H1 receptor exist in the gerbil retina, and that H2 and H3 receptors were expressed on developing gerbil ganglion cells.

② 食虫目に属するスキウスの網膜においてもスナネズミ網膜と同様に、多くの神経節細胞で H1, H2, H3 ヒスタミン受容体の免疫陽性部位が観察され、またヒスチジン脱炭酸酵素の免疫陽性部位も見られた。

(2) スナネズミ網膜のスライス標本と単離神経節細胞について、カルシウム・イメージング法を用いてヒスタミンの効果を観察した。ヒスタミン、H1, H2, H3 ヒスタミン受容体のアゴニスト、アンタゴニストを様々な組み合わせで投与し、細胞内カルシウム濃度の変化を解析した。網膜神経節細胞においてヒスタミン投与により細胞内カルシウム濃度の上昇が観察され、網膜内の神経伝達にヒスタミンが重要な機能を有していることが強く示唆された。カルシウム・イメージング解析ではヒスタミンとそのアゴニストの投与によって網膜神経節細胞において細胞内 Ca^{2+} が著明に増加した。本成果により、網膜神経節細胞から放出されたヒスタミンが網膜ニューロンを調節し、視覚において重要な役割を演じていることが明らかになった。

本研究成果も国内学会に加えて、国際学会においても発表を行った。

(英文)

The fura-2 based calcium imaging was also performed at the gerbil retina. The preparations were superfused at 1 ml/min with 100 μM histamine-containing solution. Histamine increased intracellular Ca^{2+} in ganglion cells. And some retinal ganglion cells were excited by betahistidine, an agonist of the H1 receptor. Dimaprit, an agonist of the H2 receptor, also increased intracellular Ca^{2+} in the premature ganglion cells. These results suggest that histamine and histamine H1, H2 and H3 receptors expressed on gerbil retinal ganglion cells.

(3) ヒト杆体視細胞における *h* (HCN) チャネルのパッチクランプ法解析では、HCN チャネルがヒト杆体にも存在することと、ドーパミンがヒト杆体の D2 受容体を活性化しサイクリック AMP を減少させることによって

h 電流を減少させることを明らかにした。そして、*h* 電流が視細胞の膜電位の安定に寄与し、ドーパミンが *h* 電流を減少させることによって杆体における光応答からの回復過程を遅延させることも明らかにした。

本研究結果はヒト網膜におけるドーパミンの作用の重要な役割を示唆し、”Dopamine modulates voltage response of human rod photoreceptors by inhibiting *h* current.” のタイトルで国際雑誌 *Investigative Ophthalmology & Visual Science* (10.1167/iovs.10-6983, 2011) に論文発表した。

(英文)

The *h* current (*I_h*) is a hyperpolarization-activated current that plays important roles in the physiological functions of different types of cells. In the retina of lower vertebrates, *I_h* contributes to the rod responses to light stimuli by bringing the membrane potential back to the dark level in the presence of continuous light. This study shows that in human rod photoreceptors, dopamine reversibly decreased the amplitude of the *I_h* induced by hyperpolarizing voltage steps from a holding potential of -60 mV. At a voltage step of -100 mV, 20 μM dopamine decreased the amplitude of *I_h*. The D2 dopamine agonist, quinpirole, inhibited *I_h*, but the D1 agonist, SKF-38393, had no effect. The dopamine-induced reduction of the *I_h* amplitude was blocked by the D2 dopamine antagonist, sulpiride. Under current-clamp conditions, an injection of hyperpolarizing current steps to rods produced voltage responses that exhibited a gradual decay. Adding dopamine to the superfusate inhibited the decay in the voltage responses. Quinpirole also inhibited the voltage decay, whereas SKF-38393 was ineffective. These results suggest that dopamine reduced *I_h* through a D2 receptor, and inhibited the gradual decay in the voltage response via a D2 receptor, indicating that dopamine slows the recovery phase of responses to light stimuli by inhibiting *I_h* in human rods.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Fusao Kawai, Masayuki Horiguchi, E. Miyachi: Dopamine modulates voltage response of human rod photoreceptors

by inhibiting *h* current. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 査読有、10.1167/iovs.10-6983, 2011.

- ② 河合房夫, 宮地栄一: 食品の香りの感覚情報処理機構における神経生理学的解析. (A neurophysiological study of mechanism underlying sensory information processing on the smell of food.) *Aroma Research*, 査読有、10(2): 123-127, 2009.
- ③ 下村敦司, 大熊真人, 向後晶子, 野村隆士, 宮地栄一, 千田隆夫: APC は後シナプスへの PSD-95 と AMPA 受容体のクラスターリングを促進する. *藤田学園医学会誌*, 査読無, 32(1): 1-5, 2008.

[学会発表] (計18件)

- ① 今田英己, 酒井一由, 大熊真人, 加藤寿章, 宮地栄一: スナネズミ網膜の発達過程におけるヒスタミン作動性神経節細胞. 第88回日本生理学会大会 第116回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会, 2011年3月29日, 横浜.
- ② M. Ohkuma, H. Imada, E.-I. Miyachi: Histamine modulates membrane currents in the gerbil retinal ganglion cells. Neuroscience 2010 (the 2010 annual meeting of the Society for Neuroscience), November 17, 2010. San Diego.
- ③ 河合房夫, 堀口正之, 宮地栄一: ドーパミンはヒト杆体視細胞の膜電位応答を修飾する. 第57回中部日本生理学会, 2010年10月15日, 豊明.
- ④ 大熊真人, 今田英己, 宮地栄一: スナネズミ網膜神経節細胞におけるヒスタミンの影響. 第57回中部日本生理学会, 2010年10月15日, 豊明.
- ⑤ 大熊真人, 今田英己, 宮地栄一: スナネズミ網膜におけるヒスタミンによる電位依存性チャンネルの修飾. 第33回日本神経科学大会, 2010年9月2日, 神戸.
- ⑥ 藤田公和, 芳本信子, 今田英己, 松本岳, 稲熊隆博, 加藤寿章, 永田豊, 宮地栄一: 脳虚血・再灌流負荷後の海馬における SOD と GPx 活性の変化に及ぼすニコピン摂取量の影響. 第33回日本神経科学大会, 2010年9月2日, 神戸.
- ⑦ 今田英己, 小久保正博, 大熊真人, 加藤寿章, 宮地栄一: スナネズミ網膜神経節細胞におけるヒスタミンの免疫組織化学とカルシウムイメージング解析. 第87回日本生理学会大会, 2010年5月19日, 盛岡.

- ⑧ H. Imada, M. Ohkuma, M. Kokubo, T. Kato, E. Miyachi: Immunohistochemical and physiological analyses of histamine and histamine receptors on ganglion cells in the developing gerbil retina. Neuroscience 2009 (the 2009 annual meeting of the Society for Neuroscience), October 20, 2009, Chicago.
- ⑨ 河合房夫, 堀口正之, 宮地栄一: ドーパミンは D2 レセプターを介してヒト杆体視細胞の h 電流を減少させる. 第 32 回日本神経科学大会, 2009 年 9 月 18 日, 名古屋.
- ⑩ 今田英己, 大熊真人, 宮地栄一: スナネズミ網膜におけるヒスタミン H2 受容体の局在. 第 32 回日本神経科学大会, 2009 年 9 月 18 日, 名古屋.
- ⑪ 藤田 公和, 芳本 信子, 今田英己, 松本岳, 稲熊隆博, 永田豊, 宮地栄一: 脳虚血再灌流負荷後のスナネズミの海馬組織における抗酸化物質としてのリコピンの効果. 第 32 回日本神経科学大会, 2009 年 9 月 16 日, 名古屋.
- ⑫ Kaori Iwata, Masatika Takagi, Hideki Imada, Ei-ichi Miyachi, Shunji Nagaoka, Akira Takabayashi: Vestibulo-ocular responses in flat fish for the changes of acceleration. International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009), Kyoto, August 1, 2009.
- ⑬ Hideki Imada, Masahiro Kokubo, Mahito Ohkuma, Toshi-aki Kato, Ei-ichi Miyachi: The postnatal expression of histamine receptors in the gerbil retina. International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009), July 28, 2009, Kyoto.
- ⑭ Mahito Ohkuma, Fusao Kawai, Ei-ichi Miyachi: Acetylcholine affects the signal encoding in newt olfactory receptor cells. International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009), Kyoto, July 28 1, 2009.
- ⑮ F. Kawai, M. Horiguchi, E.-I. Miyachi: Modulation by dopamine of an h current in human rod photoreceptors. Neuroscience 2008 (the 2008 annual meeting of Society for Neuroscience), November 19, 2008, Washington, DC.
- ⑯ H. Imada, M. Ohkuma, M. Kokubo, T.-A. Kato, E. Miyachi: Histamine receptors in the gerbil retina. Neuroscience 2008 (the 2008 annual meeting of Society for Neuroscience). November 18, 2008, Washington, DC.

- ⑰ 大熊真人, 三村英也, 今田英己, 内藤健晴, 宮地栄一: 嗅覚情報処理におけるヒスタミンの影響. Neuroscience 2008 (第 31 回日本神経科学大会) 2008 年 7 月 10 日, 東京.
- ⑱ 今田英己, 小久保正博, 加藤寿章, 大熊真人, 宮地栄一: スナネズミ網膜の発達過程におけるヒスタミンレセプターの分布と局在. (ポスター発表) Neuroscience 2008 (第 31 回日本神経科学大会) 2008 年 7 月 9 日, 東京.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮地 栄一 (MIYACHI Ei-ichi)
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号：90129685

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

大熊 真人 (OHKUMA Mahito)
藤田保健衛生大学・医学部・講師
研究者番号：50329710

今田 英己 (IMADA Hideki)
藤田保健衛生大学・医学部・助教
研究者番号：70387710