

令和 5 年 5 月 8 日現在

機関番号：32653
研究種目：若手研究
研究期間：2021～2022
課題番号：21K16910
研究課題名（和文）視覚情報処理回路成熟化に対するコリン作動性アマクリン細胞のギャップ結合の役割
研究課題名（英文）Role of gap junctions in cholinergic amacrine cells on visual information processing maturation
研究代表者
丸山 拓真（Maruyama, Takuma）
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：90838103
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,600,000円

研究成果の概要（和文）：網膜の神経回路の成熟化に重要な役割を果たすコリン作動性アマクリン細胞によるギャップ結合が、マウス網膜の発達段階において生じるかどうかを明らかにすることを目的として研究を行ってきた。免疫組織化学、分子生物学、電気生理学的検討から、開眼前のコリン作動性アマクリン細胞は、隣接する異種の細胞と間でギャップ結合を形成す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、生後発達期の網膜におけるコリン作動性アマクリン細胞の機能の理解に貢献するとともに、網膜神経回路の成熟化におけるコリン作動性アマクリン細胞の役割の解明につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to determine whether cholinergic amacrine cells, which play an important role in the maturation of neural circuits in the retina, form gap junctions during the developmental stages of the mouse retina. Using immunohistochemical, molecular biological and electrophysiological analyses, I found that cholinergic amacrine cells form gap junctions with neighboring heterogeneous cells before the eye opens.

研究分野：網膜生理学

キーワード：コリン作動性アマクリン細胞 スターバーストアマクリン細胞 網膜 ギャップ結合 生後発達 コネキシン ドーパミン受容体 視覚経験

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

生後発達中の網膜におけるギャップ結合は、多くの機能的役割を担っている (Cook and Becker, 2009)。ギャップ結合の機能的な重要性は、神経回路形成 (Guldenagel et al., 2001; Deans et al., 2002)、網膜波を含む同期活動の発生 (Singer et al., 2001; Syed et al., 2004) において実証されている。コリン作動性アマクリン細胞は、アセチルコリンや GABA を近隣の細胞に放出し (O'Malley et al., 1992)、成体期の網膜における方向選択性の形成に重要な役割を果たす (Amthor et al., 2002)。

コリン作動性アマクリン細胞は生後発達段階から成体期に至るまで様々な網膜機能と深く結びついているため、コリン作動性アマクリン細胞の形態的な成熟についても研究が進められてきた。これまで、生後発達段階における方向選択的な回路形成の形態的基盤として、コリン作動性アマクリン細胞における特定の樹状突起層化の分子ガイダンス機構が検討されました (Sun et al., 2013; Whitney et al., 2014; Visser et al., 2015; Yonehara et al., 2016; Ray et al., 2018)。しかし、コリン作動性アマクリン細胞の形態学的特性が系統的に解析されているにも関わらず、コリン作動性アマクリン細胞におけるギャップ結合は未だ検出されていない (Xin and Bloomfield, 1997; Zhou, 1998)。

2. 研究の目的

従来、成体期においては形成されないと考えられていたマウス網膜のコリン作動性アマクリン細胞が、生後早期においてはギャップ結合を形成するかどうかを明らかにすることを目的とした。また、コリン作動性アマクリン細胞が形成するギャップ結合の構成分子、影響因子についても検討した。

3. 研究の方法

コリン作動性アマクリン細胞特異的に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現する遺伝子改変マウスの網膜において、コリン作動性アマクリン細胞 (ON 型および OFF 型) が生後発達の早期にギャップ結合を形成しているかどうかを、免疫組織化学的、分子生物学的、電気生理学的手法を用いて検討した。ホールセルパッチクランプ法を用いて、生後 3、10 日目 (ともに開眼する前) と生後 15、28 日目 (ともに開眼した後) のマウス網膜のコリン作動性アマクリン細胞の膜容量 (ギャップ結合の指標) を測定し、ギャップ結合の有無を検証した。次に、コリン作動性アマクリン細胞に Neurobiotin を注入し、トレーサー結合細胞の細胞腫と個数を解析した。また、コリン作動性アマクリン細胞が形成するギャップ結合の構成分子の検討も実施した。最後に、ドーパミン受容体や視覚経験がコリン作動性アマクリン細胞におけるギャップ結合に影響を及ぼすかどうかについても電気生理学的に検討した。

4. 研究成果

1. コリン作動性アマクリン細胞における膜容量の生後発達に伴う変化

ON 型と OFF 型コリン作動性アマクリン細胞では、生後発生過程で膜容量の変化が観察された。ON 型コリン作動性アマクリン細胞では、で記録された膜容量は生後 3 日目で約 16.6pF だった。生後 9 日目では膜容量はピークに達し、その後、生後 28 日目までに約 3.4pF に減少した。OFF 型コリン作動性アマクリン細胞の膜容量は、ON 型と同様であった。したがって、生後 3 日目および生後 9 日目で膜容量が大きいということは、生後間もない段階でコリン作動性アマクリン細胞がギャップ結合を介して他の細胞と電氣的に結合していることを示唆した。

2. コリン作動性アマクリン細胞におけるギャップ結合の解剖学的識別

生後間もない段階でコリン作動性アマクリン細胞と他の細胞との間にギャップ結合が形成されるかどうかを調べるために、Neurobiotin トレーサーを ON 型コリン作動性アマクリン細胞に注入し、ON 型コリン作動性アマクリン細胞と結合する細胞種を、免疫組織化学的手法を用いて同定した。生後 9 日目では、トレーサー結合細胞はコリン作動性アマクリン細胞のマーカーである GFP との重なりを示さず、大部分は網膜神経節細胞のマーカーである RBPMS に対する免疫反応を示した。この結果から、生後 3 日目および生後 9 日目でみられたコリン作動性アマクリン細胞における大きな膜容量は、ギャップ結合を介した電氣的結合によるものであり、ON 型コリン作動性アマクリン細胞のトレーサー結合細胞は同種細胞ではなく異種細胞（特に RBPMS 陽性網膜神経節細胞）であることを示唆した。

3. コリン作動性アマクリン細胞の膜容量に対するギャップ結合阻害剤の影響

ギャップ結合阻害剤（メクロフェナム酸, MFA）は、生後 9 日目の ON 型コリン作動性アマクリン細胞の膜容量を有意に減少させた。MFA の膜容量に対する抑制効果は、刺激後 2 分以内にピークに達した。また、MFA の膜容量に対する抑制効果は、生後 3、15、28 日目でも観察された。

4. コリン作動性アマクリン細胞におけるコネクシン遺伝子の発現

コリン作動性アマクリン細胞におけるコネクシン遺伝子（Cx23、Cx36、Cx43、Cx45、Cx50）の発現量に生後変化が起こるかどうかを検討した。コリン作動性アマクリン細胞を FACS により GFP 陽性細胞として分離した。調べたすべてのコネクシン遺伝子は、生後 9 日目で検出された。（ただし、Cx50 は 8 検体中 2 検体で検出された。）Cx23 と Cx43 の相対発現量は、生後 28 日目の方が生後 9 日目より有意に少なかったが、Cx36 と Cx45 の相対発現量は生後 28 日目と生後 9 日目で有意差はなかった。

5. コリン作動性アマクリン細胞の膜容量に対するドーパミンの影響

脊椎動物の網膜では、ドーパミン D1 受容体(D1R)は網膜ニューロン間のギャップ結合を制御している(Bloomfield and Volgyi, 2009)。そこで、ドーパミンが ON 型コリン作動性アマクリン細胞のギャップ結合を制御しているかどうかを、電気生理学的手法を用いて検討した。D1R アゴニストである 10 μ M SKF38393 は、生後 9 日目の膜容量をわずかに減少させたが、生後 28 日目の膜容量には影響を及ぼさなかった。このことから、生後発達の早期では、コリン作動性アマクリン細胞が形成するギャップ結合が、網膜における他のギャップ結合と同様に、D1R によって制御されていることを示唆した(Hampson et al., 1992; Bloomfield and Volgyi, 2009; Yadav et al., 2019; Banerjee et al., 2020)。

6. コリン作動性アマクリン細胞の膜容量に対する視覚経験の影響

視覚経験は網膜の機能的・形態的成熟に重要な役割を果たすことが報告されているため(Sernagor and Grzywacz, 1996; Zhang et al., 2005; Tian, 2008)、視覚経験の剥奪が、コリン作動性アマクリン細胞が形成するギャップ結合に影響を及ぼすかどうかを検討した。生後 9 日目(開眼する前)と生後 15 日目(開眼した後)の正常明暗サイクル飼育マウスと暗黒飼育マウスの ON 型コリン作動性アマクリン細胞の膜容量を、電気生理学的手法を用いて比較した。同一齢の正常明暗サイクル飼育マウスと暗黒飼育マウスの間で膜容量に有意差は認められなかった。このことから、視覚経験の剥奪は、コリン作動性アマクリン細胞が形成するギャップ結合の消失過程を遅らせることは無いということを示唆した。

7. 網膜波に対するコリン作動性アマクリン細胞が形成するギャップ結合の関与

生後 9 日目の網膜にギャップ結合阻害剤(MFA)を暴露すると、ON 型コリン作動性アマクリン細胞における網膜波の頻度が減少した。この結果は、ON 型コリン作動性アマクリン細胞が形成するギャップ結合が網膜波のドライバーとして機能することを示唆した。

以上の結果から、生後発達早期のコリン作動性アマクリン細胞は、異種細胞(一部の細胞は網膜神経節細胞)との間にギャップ結合を形成し、同種の細胞間ではギャップ結合を形成しないことを明らかにした。このギャップ結合は生後 9 日目から生後 15 日目にかけて消失し始め、生後 28 日目までにほとんど消失した。生後発達早期のギャップ結合の消失過程は、視覚経験の影響を受けなかった。発生初期において、ギャップ結合はシナプス形成だけでなく、神経回路の形成や網膜の成熟にも重要な役割を果たす(Cook and Becker, 2009; Arroyo et al., 2016)。従って、網膜の神経回路形成には、生後発達の初期段階におけるコリン作動性アマクリン細胞によるギャップ結合が必要である可能性

が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Maruyama Takuma, Mano Asuka, Ishii Toshiyuki, Kakinuma Yoshihiko, Kaneda Makoto | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 P2X ₂ receptors supply extracellular choline as a substrate for acetylcholine synthesis | 5. 発行年 2021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 - |

| | |
|---|----------------------|
| 1. 著者名 Takuma Maruyama, Toshiyuki Ishii, Makoto Kaneda | 4. 巻 17 |
| 2. 論文標題 Starburst amacrine cells form gap junctions in the early postnatal stage of the mouse retina | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience | 6. 最初と最後の頁 現時点で不明 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncel.2023.1173579 | 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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Takuma Maruyama, Asuka Mano, Toshiyuki Ishii, Yoshihiko Kakinuma, Makoto Kaneda |
| 2. 発表標題 The role of P2X ₂ receptor for Acetylcholine synthesis pathway |
| 3. 学会等名 The Society of Neuroscience Meeting 2021（国際学会） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Takuma Maruyama, Toshiyuki Ishii, Asuka Mano, Yoshihiko Kakinuma, Makoto Kaneda |
| 2. 発表標題 P2X ₂ receptor-mediated novel acetylcholine synthesis pathway |
| 3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Takuma Maruyama, Toshiyuki Ishii, Sumiko Usui, Masumi Shimizu, Makoto Kaneda |
| 2. 発表標題 Starburst amacrine cells in the early postnatal development form gap junctions |
| 3. 学会等名 第99回 日本生理学会大会 |
| 4. 発表年 2022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 |
|---------|---------|
|---------|---------|