

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：34315

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20698

研究課題名（和文）Afadinを介した網膜における神経回路形成メカニズムの解明

研究課題名（英文）Adhesion molecule Afadin affects ganglion cell response

研究代表者

上野 明希子（Ueno, Akiko）

立命館大学・薬学部・助教

研究者番号：20962393

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,900,000円

研究成果の概要（和文）：脳や網膜などの中枢神経系では緻密な神経回路が形成されており、正確な神経回路形成は中枢神経系が高次機能を発揮するうえで重要である。しかし、そのメカニズムはほとんど解明されていない。代表者らはマウスを用いた細胞間接着因子であるAfadinが網膜神経回路の機能に寄与することを見出した。さらにAfadin cKOマウス網膜ではOFF経路の中核を担うカニン酸型グルタミン酸受容体Grik1が異所的に局在、発現していたことから、Afadinがシナプス伝達における主要因子の正確な発現および局在を介して網膜神経回路の形成および機能に必須の役割を果たしていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
OFF経路の異常

Afadinは様々な組織で発現・機能することが知られており、その分子メカニズムについても解明が進んでいる。その様に細胞全般に発現し、かつ分子メカニズムも知られた因子が特定の神経回路形成に寄与するという観察結果は意外性が高く、これまでほとんど報告例がない。このことから、これまで知られていなかった新しい神経回路形成メカニズムが明らかになる可能性が期待される。本研究により選択的神経回路形成メカニズムの一端が明らかになれば、神経回路形成異常によって引き起こされる疾患の治療法の確立にもつながり、社会的な貢献も見込まれる。

研究成果の概要（英文）：Precise neural circuits that are formed in the central nervous system, such as the brain and the retina, are important for the function of the central nervous system. However, the mechanism is poorly understood. We found that Afadin, an intercellular adhesion factor, contributes to the function of retinal neural function. Furthermore, one of the key factors in the light signaling pathway in the retina was ectopically localized and expressed in the retina in Afadin cKO mice. These results indicate that Afadin is required for the formation and function of retinal neural circuits through the accurate expression and localization of key factors in synaptic transmission.

研究分野：神経科学

キーワード：網膜 OFF経路 細胞接着因子

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

網膜や脳といった中枢神経系では精密な神経回路が形成されており、その破綻は自閉症などの様々な疾患につながる(Crabtree et al., *Front Synaptic Neurosci* 2014)。しかし、神経回路形成の基盤となる分子メカニズムについては未だに不明な部分が多く、研究の進展が期待されている。中枢神経系に属する網膜には光刺激時に発火する ON 経路と光刺激の非存在下で発火する OFF 経路が存在し、どちらも視覚形成において重要である。目に入った光は視細胞で受容され、双極細胞で ON 経路と OFF 経路に分けられてから神経節細胞へ伝達されてから、脳へと伝えられる。

代表者らは細胞間接着因子 Afadin を網膜特異的に欠損させた *Afadin* cKO マウスで OFF 型神経節細胞の応答が消失していることを見出した。さらに、*Afadin* cKO マウスでは網膜におけるシナプス形成領域である内網状層の一部の厚みが減少していることを示すデータが得られたことから、*Afadin* が網膜における神経回路形成に寄与することが示唆された。これらに加え、*Afadin* cKO マウスでは視細胞の数が減り、双極細胞が増加していたことから、*Afadin* が双極細胞や視細胞の正常な分化および遺伝子発現にも必須である可能性が考えられた。本研究は中枢神経系における正確な神経回路形成メカニズムに迫るべく、*Afadin* を介した網膜神経回路形成メカニズムの解明を目指す。

2. 研究の目的

本研究は細胞接着因子 *Afadin* を介した網膜神経回路形成メカニズムの解明を目的とした。*Afadin* cKO マウスで観察された表現型はこれまでほとんど報告がないことから、これまで知られていなかった神経回路形成メカニズムが明らかになる可能性が期待された。さらに、本研究による神経回路形成メカニズムの解明は、神経回路形成異常を原因とする疾患の治療法の確立への貢献が期待できる。

3. 研究の方法

Afadin による網膜神経回路形成メカニズムを、(1)シナプス形成異常と(2)神経細胞の分化・成熟異常の 2 つの可能性を主に検証しながら解明する。これらに加え、より詳細な光照射条件でマルチ電極アレイ(MEA)を用いて *Afadin* cKO マウス網膜の光応答解析および網膜電図測定を行い、視細胞-双極細胞間、双極細胞-神経節細胞間でのシナプス伝達状態を解析した。

(1)シナプス形成異常

Afadin cKO マウス網膜のシナプス構造に異常がないかを調べるために、PSD95 や Bassoon などのシナプスのマーカーに対する抗体を用いた免疫蛍光染色を行った。

(2)神経細胞の分化・成熟異常

Afadin cKO マウス網膜を用いて RNA-seq を行い、シナプス伝達にかかわる因子の発現量解析を行った。さらに、シナプス伝達関連因子の局在パターンに異常がないかを明らかにするために、Grik1 や mGluR6 などを対象として免疫蛍光染色を行った。

4. 研究成果

代表者らは免疫蛍光染色を行い、*Afadin* が網膜のシナプス形成領域である外網状層および内網状層に局在することを確認した。続いて、より多様な光照射条件で *Afadin* cKO マウス網膜の光応答解析を行ったところ、*Afadin* cKO 網膜では OFF 型神経節細胞と ON 型神経節細胞の応答が共に減少しており、*Afadin* が OFF 経路に加えて ON 経路の機能にも必須であることが示唆された。これらに加え、*Afadin* cKO 網膜ではコントロールに比べて受容野の数と大きさも減少していたことから、*Afadin* が正常な網膜の光応答および伝達に必須であることが明らかになった。さらに、*Afadin* cKO 網膜を用いていくつかのシナプス形成・機能に関連する因子の局在を解析したところ、*Afadin* cKO 網膜では複数のシナプス形成・機能関連因子の異所的な局在および発現が観察された。この結果から、*Afadin* がシナプス形成・機能関連因子の正常な局在に必須だけでなく、それらの発現制御にも寄与していることが示唆された。また、これらの発現・局在異常が *Afadin* cKO マウスで観察された神経節細胞応答の異常を引き起こした可能性が考えられる。以上の結果から、*Afadin* は複数のシナプス形成・機能関連因子の正確な発現・局在に必須であり、*Afadin* cKO 網膜ではそれらの異所的発現・局在によって網膜 ON 経路と OFF 経路の両方の機能が大きく損なわれている可能性が示唆された。これらに加えて *Afadin* cKO 網膜では細胞運命決定異常および細胞死の増加が観察されたことから、*Afadin* が網膜細胞の分化・生存においても必須であることが明らかになった。これらの研究結果をまとめ、現在論文を執筆中である。本研究による網膜神経回路形成メカニズムの一端の解明は、神経回路形成メカニズムの理解に加

え、神経回路形成異常を原因とする疾患の治療法の確立への貢献が予想される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 Akiko Ueno, Rin Sawada, Naho Baba, Yusuke Inoue, Takuya Ishibashi, Kazunori Akimoto, Shigeo Ohno, Chieko Koike
2. 発表標題 Loss of progenitor cell polarity causes cell fate change in the mammalian retina
3. 学会等名 Joint French-Japanese Scientific Seminar (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上野 明希子、澤田 綾、井上 祐介、西村 勇輝、前嶋 千瀬都、石橋 拓也、秋本 和憲、大野 茂男、小池 千恵子
2. 発表標題 中枢神経系網膜の細胞極性と細胞運命決定
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 澤田 綾(発表者)、上野 明希子、井上 祐介、西村 勇輝、前嶋 千瀬都、秋葉 唯、秋本 和憲、大野 茂男、小池 千恵子
2. 発表標題 網膜層構造形成における細胞接着因子Afadinの果たす役割
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023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
---------	---------