

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430041

研究課題名(和文) 神経回路から説明する網膜が行う高次視覚情報処理

研究課題名(英文) A retinal circuit explains the novel visual function

研究代表者

星 秀夫 (HOSHI, Hideo)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：30568382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：網膜で「運動検出の予測」を行う神経節細胞として、私たちは、大きな樹状突起を持つ楕円形の細胞がこの予測をしやすいと示唆する結果を得ていた。本研究では、この細胞を高確率で発見することに成功した。この神経節細胞は、隣り合う同種の細胞とギャップ結合でつながっており、そこでは、Cx35/36が局在していた。またドーパミン受容体の関与を示唆する結果も得た。最後に、この神経節細胞はOFF型神経節細胞の形態を持ちながら、OFF型双極細胞だけでなく、ON型の双極細胞とも異所性シナプスを作ることを明らかにした。以上のように本研究では、この神経節細胞が作る局所神経回路のいくつかを形態学的に明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：We identified one type of ganglion cell in the goldfish retina which had a large and elongated dendritic field. As a population, all of these ganglion cells were oriented in the horizontal axis and perpendicular to the dorsal-ventral axis of the goldfish eye in the central part of retina. The circuit elements which synapse with this ganglion cell are not yet characterized. We found that this ganglion cell was directly tracer coupled only with homologous ganglion cells. Cx35/36 may contribute to their gap junction. We further illustrated that the processes of dopaminergic neuron terminated next to intersections between processes of ganglion cells, close to where dopamine D1 receptors were localized. Finally, we showed that Mb1 ON bipolar cells had ribbon synapses in the axonal processes passing through the IPL and made ectopic synapses with this ganglion cell that stratified into stratum 1 of the IPL. Totally taken, we identified a new retinal ganglion cell and specific retinal circuit.

研究分野：神経解剖学

キーワード：神経節細胞 網膜

1. 研究開始当初の背景

近年、「運動検出の予測」という高次の視覚情報処理を、網膜神経節細胞のレベルで既に行っていることがわかってきた。このような予測現象をする細胞として、私たちは、これまでの研究で、楕円形で大きい樹状突起を持つ細胞が、「運動検出の予測」を顕著に行うだろうと示唆する結果を得ていた。

本研究では、脊椎動物のキンギョを実験に用いた。ヒトと同様に昼行性の動物であり、夜行性のげっ歯類よりも、光を用いて視覚機能を調べるための実験動物として利用価値の高い動物と考えられる。また、キンギョの網膜神経回路は一部を除いて、ヒトと類似した構造を持っている。魚類のキンギョの網膜から、新たな生命現象が理解することができれば、当然、遺伝子操作が可能なゼブラフィッシュにも同様に適用できるはずである。それだけでなく最終的にヒト網膜の未知の視覚情報処理機能を推定する実験モデルとしての有用性を提唱できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、標本作製方法の改善、目的の神経節細胞を高確率で同定し、それにつながる局所神経回路網を形態学的に明らかにすることを目的とする。そこで以下の3点に焦点を絞って研究を行う。酵素を用いずに粘性に富むキンギョ硝子体液を除去する方法を開発し、この標本を用いて、網膜が行う「運動検出の予測」をしていると推測される大きな楕円形の細胞を同定する方法を探し、そして、同定した神経節細胞とつながる双極細胞とアマクリン細胞との局所神経回路を形態学的に解析する。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

硬骨魚類のキンギョ (*Carassius auratus*, 体長 8-10cm) を実験動物として用いた。東邦大学実験動物取扱規定に従い、承認番号 (動承 16-54-250) を得たのちに、実験を行った。

(2) 逆行性輸送による神経節細胞の標識

目的の神経節細胞を同定するために、逆行性標識を行った。まず、麻酔下 (MS222) で眼球摘出をし、視神経を露出する。この視神経に蛍光色素 Po-pro-1 (PP1) を塗布した。その後、キンギョ用のリンガー液に浸漬し、6°C で一晩静置した。翌日、網膜を剥離した。ピンセットで硝子体液を除去し、神経節細胞側を上にしてメンブレンフィルターに載せた。この標本を灌流装置のある正立型の落射蛍光顕微鏡下に設置した。この灌流装置を用いて、95%O₂/5%CO₂ でバブリングしたリンガー液を実験中絶えず流した。

(3) 細胞内色素注入

2つの色素、Lucifer Yellow と Neurobiotin を混合して用いた。Lucifer Yellow はマイナ

ス電荷を、一方 Neurobiotin はプラス電荷を保持している。そこで、±0.25-0.5 nA の電荷を交互に与え (IE-251A, Warner), 反発電流で色素を注入した。なお、一つの標本で複数の細胞に色素注入を行うが、最後に色素注入した細胞にも十分に色素が充填する目的で、最後の細胞へ色素注入したのち、最低 30 分間リンガー液を灌流し続けた。その後、この標本は、4%パラフォルムアルデヒドで室温 1 時間固定した。固定後、リン酸緩衝液 (PBS) で複数回洗浄し、Neurobiotin を可視化するために、1:200 Cy3-streptavidin に一晩浸漬した。翌日、洗浄し、検鏡した。

(4) 免疫組織化学

色素注入した神経節細胞を検鏡した後、組織はブロッキング処理し、各種 1 次抗体の溶液に 7 日間 4°C で浸漬した。多重染色をするために、Alexa488 または Alexa647 蛍光色素を結合した 2 次抗体を使用した。1 次抗体と 2 次抗体に用いる動物種は、最適な組み合わせを選択した。洗浄した後、全載標本は蛍光褪色防止剤の VECTORSHIELD を塗布し、スライドガラスに封入した。

(5) 画像取得からデータ解析

共焦点顕微鏡による画像取得
東邦大学医学部の共通機器利用施設に整備されている共焦点顕微鏡 (LSM510, Zeiss; A1, NIKON) を用いて画像の取得を行った。

樹状突起が作る領域サイズの計測

共焦点画像を取得後、複数枚からなる焦点深度の異なる画像は ImageJ を用いて重ね合わせ、一枚の画像にした。本研究で注目した大きい樹状突起を持つ神経節細胞は、低倍率で画像を取得しても複数回撮影をする必要があった。複数枚の焦点のあった画像を Photoshop (Adobe) で重ね合わせ、最終的に一枚の写真にした。その重ね合わせた画像を、再び ImageJ で開き、スケールバーを設定した後、樹状突起の遠位端を結んでポリゴン様の図形を作成し、その面積を計測した。また、神経節細胞の面積が視神経乳頭からの距離によってどのように変化するかを調べるために、各神経節細胞の細胞体と視神経乳頭までの距離を A1 顕微鏡付属の NISELEMENT (NIKON) を用いて計測した。

4. 研究成果

(1) 硝子体液の除去

全載標本で網膜神経回路を詳細に研究するために、本研究ではまず目的の神経節細胞に色素を注入する。この際、キンギョ網膜の全載標本は粘性のある分厚い硝子体液があるため、電極を硝子体側からアプローチすることが困難であった。この硝子体液を除去するためには、実験前にキンギョ網膜をコラーゲンやヒアルロン酸などの分解酵素液に数分間浸漬する必要があった。しかし、この方

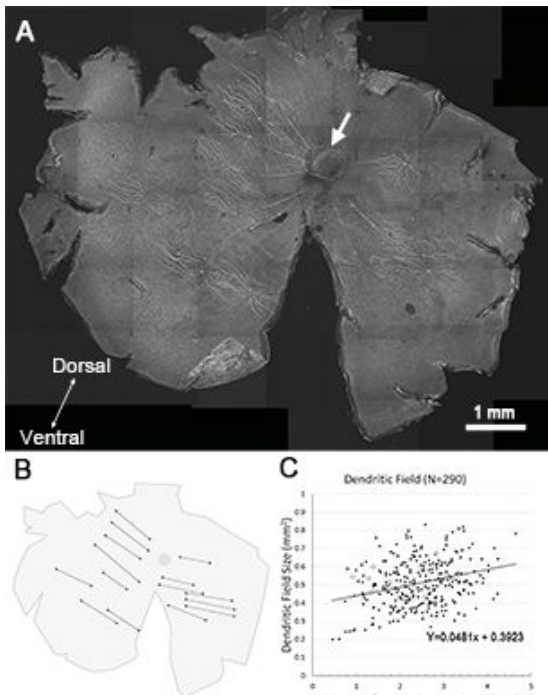
法では酵素によって副次的な作用を標本に与えることも考えられる．そこで，本研究では酵素を用いずにピンセットで硝子体液を除去することを目指し，幸運にも硝子体液除去に成功した．

(2) 神経節細胞の標識と細胞の同定と分布
 蛍光色素 Po-pro-1 で神経節細胞を逆行性標識した結果，大きさや形の異なる様々な神経節細胞の細胞体が標識された．その中から，大きい樹状突起を持つ神経節細胞を訓練で同定し，ほぼ 100% の確率で目的の細胞を同定することに成功した．この細胞に Neurobiotin を注入することで，この細胞の網膜全体での分布様式，Tracer coupling の様式，またこの神経節細胞と特定の双極細胞とのシナプス結合を形態学的に調べた．

目的の神経節細胞 OFF 型神経節細胞

神経節細胞が双極細胞やアマクリン細胞とシナプス結合する内網状層 (IPL) のどこに樹状突起を伸ばすかということは，その細胞の機能を知るうえで非常に重要である．OFF 層に樹状突起を伸ばす細胞は，光を消した時に活動電位を出すことがわかっている (光をつけたときに活動電位を出す細胞は ON 型細胞)．本研究で注目した神経節細胞の樹状突起の遠位端は，IPL の深さマーカーとして用いられている ChAT 抗体との二重染色で，cholinergic a-band よりも上に樹状突起を伸ばしており，OFF 型神経節細胞であることがわかった．

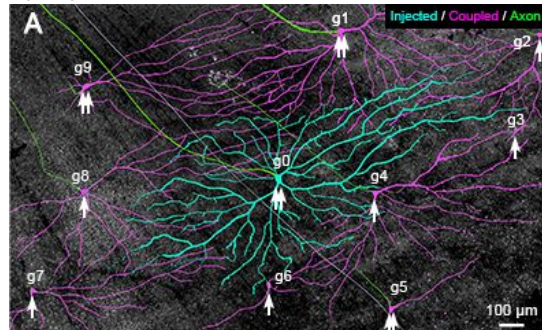
一方向性



神経節細胞の網膜内分布を調べるために，1 つの全載標本ごとに，同じサブタイプの神経節細胞に複数色素注入を行った．その結果，色素注入した全ての神経節細胞が伸ばした

樹状突起が，同じ方向に傾いていた．この方向は，キンギョの視線方向に一致している可能性がある (上図 A, B)．また，この神経節細胞は，視神経乳頭から距離が離れるごとにその樹状突起が作る領域の面積は大きくなる傾向があった (上図 C)．

(3) 神経節細胞同士のギャップ結合



神経節細胞同士がギャップ結合

Neurobiotin を色素注入することでこの神経節細胞のギャップ結合を介した Tracer coupling がわかった (細胞内に直接 Neurobiotin を注入した細胞を Cyan で，Tracer coupling で標識された神経節細胞を Magenta で識別した (上図 A)．この目的の神経節細胞は，アマクリン細胞とは一切 Tracer coupling せず，専ら同サブタイプの神経節細胞と Tracer coupling することがわかった．網膜の神経節細胞は約 20-30 種類あり，その 70% がギャップ結合をもつが，アマクリン細胞を介さず，神経節細胞だけで Tracer coupling する細胞というのは非常に数が少なく，稀な細胞である．マウスやウサギではこのような細胞は方向選択性の神経節細胞でしか発見されていない．しかし，私たちも方位選択性を持つ神経節細胞をキンギョ，ウサギで発見しているが，はるかに細胞の大きさが小さく，この細胞とは別物と考えられる．今後この細胞の機能を詳細に調べる必要がある．

Cx35/36 がギャップ結合タンパクとして Tracer coupling に貢献

この Tracer coupling をもたらすギャップ結合タンパクを調べる目的で，Cx35/36 抗体を用いた．Cx35/36 は網膜で豊富に分布するギャップ結合タンパクであり，本研究でも同様に用いた．本研究で，Neurobiotin を直接注入した神経節細胞と Tracer coupling した神経節細胞の樹状突起の交叉部位で Cx35/36 の局在を調べた．その結果，交叉部位で Cx35/36 の陽性が見られた．このことから，Cx35/36 が他の網膜でも見られるようにギャップ結合タンパクとして Tracer coupling に貢献していた．なお，他のギャップ結合タンパクは試していない．他に可能性のあるギャップ結合タンパクとして Cx45 があるが，魚類網膜では，これまでこの Cx45 を用いた報告が全くないため，可能性が低いと考えられる．

ドーパミン D1R が存在
 ギャップ結合の開閉調節にドーパミンが働いているという報告がこれまでにある (Mills et al., 2007). さらに, ドーパミンが神経節細胞の活動電位を抑制するという報告もある (Hayashida et al., 2009 JNS). 本研究で注目した神経節細胞は IPL の stratum 1 に樹状突起を伸ばしていた. ドーパミンを放出する Dopaminergic neuron も同様に IPL の stratum 1 に樹状突起を伸ばす. このことから, 本研究で注目した神経節細胞もドーパミンによって影響を受けているのではないかと推測した. そこで, ギャップ結合タンパクである Cx35/36 の陽性標識が見られた, 色素を注入した神経節細胞と Tracer coupling でつながった神経節細胞の樹状突起の交叉部位付近で Dopaminergic neuron のプロセスを追跡したところ, 交叉部位に接するように Dopaminergic neuron のプロセスが存在していた. さらに, ドーパミン D1R の抗体を含めた三重蛍光染色を行ったところ, D1R が交叉部位の近傍に局在していることを明らかにした. ドーパミンは直接シナプスに働くというよりはむしろ, Volume transmission という伝達様式で神経を調整しているのではないかと考えられている. 実際に, これまでドーパミン受容体の局在を精確に調べた報告が無かった. 最近, 中脳のドーパミン受容体を調べた研究で (Uchigashima et al., 2016 PNAS), Dopaminergic neuron のシナプス直下には GABA 受容体があり, ドーパミン受容体はその近傍に局在をすることが明らかになった. 以上のことから, 今回私たちが明らかにしたドーパミン D1R の局在もシナプス直下というよりも, GABA 受容体の隣 (近傍) に局在しているものではないかと示唆した.

なお, 哺乳類の網膜では, ドーパミンを放出する細胞は 1 種類の Dopaminergic amacrine cell だけであるが, 魚類ではそれ以外にもう一種類を含めた 2 種類あることが知られている. このことから, 本研究では, この 2 種類のドーパミンを放出する細胞を Dopaminergic neuron と定義した. ただし, これら 2 種類の Dopaminergic neuron とともに IPL の stratum 1 にプロセスを伸ばす.

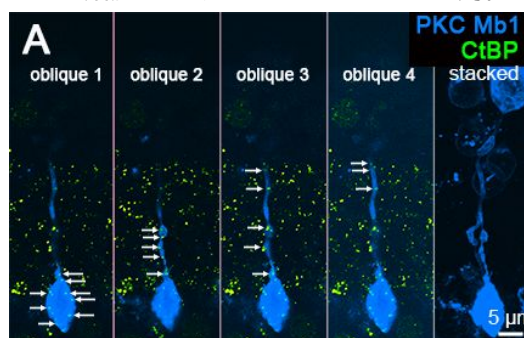
実際に, ドーパミン D1R のアゴニストとアンタゴニストが Tracer coupling に影響するか否かを予備実験として調べたが, 今のところ顕著な差は得られていない. 今後光条件などを考慮して, 正確に解析する予定である.

(4) 異所性シナプス

本研究で注目した神経節細胞は, 30 年以上前に同定されていた細胞であったが, この神経節細胞とつながる局所神経回路網などはわかっていない. ただ 1 例, 高抵抗のガラス電極を用いて, 盲目下での細胞内記録が行われた (Vallerga and Djamgoz, 1977). この記録では, この細胞は OFF 型神経節細胞であ

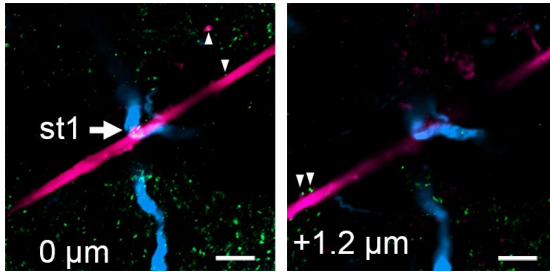
りながら, 光を照射中に delayed depolarization が見られた. 最近の報告で, このような delayed depolarization が見られたアマクリン細胞が発見された (Newkirk et al., 2015). 彼らは桿体を経由した応答であることを示唆した. 以上のことから私たちは, この細胞にも桿体を経由した応答が入っているのではないかと推測した. キンギョ網膜では, 桿体は ON 型双極細胞に入力する. そこで, この ON 型双極細胞と本研究で注目している OFF 型神経節細胞とのシナプス結合を形態学的に調べた. 通常, ON 型の双極細胞は ON 型の神経節細胞と, OFF 型の双極細胞は OFF 型の双極細胞とシナプス結合することが古典的なルールである. しかし最近のウサギ網膜を用いた私たちの報告で, 一部 OFF 層に樹状突起を伸ばす神経節細胞でも ON 型双極細胞と異所性にシナプス結合することが明らかになっている (Hoshi et al., 2009 JNS). そこで同様の異所性シナプスがあるのではないかと着目した. キンギョ網膜の ON 型双極細胞は Mb1 から Mb3 の 3 種類ある. その中で最もよく研究されてきている細胞は Mb1 細胞である. この細胞は, 桿体と赤錐体からの混合入力を受けることが既に明らかにされている. そこで, この Mb1 細胞と注目している OFF 型神経節細胞と異所性シナプスを形態学的に解析した. PKC 抗体を用いると Mb1 から Mb3 の全ての ON 型双極細胞が標識されることがわかっている. しかし, 最適濃度を用いると, Mb1 細胞のみが同定される.

Mb1 細胞におけるリボンシナプスの局在



まず, Mb1 細胞の中でのリボンシナプスの局在を CtBP 抗体を用いた二重染色で調べた. 従来通り, 双極細胞の軸索末端にリボンシナプスの局在を確認することができた (上図, oblique 1, arrows). さらに, 軸索末端だけでなく, 軸索途中にも多数リボンシナプスの局在が見られた (oblique 2-4, arrows). 今回注目している IPL の stratum 1 部位にもリボンシナプスの局在が確認できた (oblique 4, arrows). この図の撮影は, スライス切片ではなく, 全載標本を用いて行った. 全載標本のエッジ部分では, z 軸の深さが, xy 平面に現れることがある. このような写真を共焦点顕微鏡で撮影したため (oblique 1-4), 上図は全て同じ一つの細胞から得られたものである.

目的の神経節細胞とのシナプス結合
次に、目的の OFF 型神経節細胞と Mb1 細胞



との間に、異所性シナプスがあるのかを調べるために、色素注入した細胞に PKC 抗体と CtBP 抗体の三重蛍光染色を行った。その結果、注目した OFF 型双極細胞（上図、赤）と Mb1 細胞（上図、Cyan）の交叉部位にリボンシナプスの局在が見られた（上左図、緑）。リボンシナプスは OFF 型神経節細胞のスパイン部位に隣接して局在していた。このスパイン部位は興奮性シナプスがあるところにみられる特徴的な構造物であるため、この異所性シナプスの存在はかなり強く主張できると考えられる。また、この神経節細胞は OFF 型神経節細胞であるため、OFF 型双極細胞からの入力があるはずである。同様に Mb1 が無い部位で、さらに神経節細胞の樹状突起のスパイン上にリボンシナプスがあるのかどうかを調べた。その結果、OFF 型双極細胞からの入力とみられるリボンシナプスが確認された（上右図）。

以上（1）～（5）の結果から、当初の研究目的であった、酵素を用いずに粘性に富むキングヨ硝子体液を除去する方法を開発、この標本を用いて、網膜で行う高次機能の【歩調とり】をしていると推測される大きな楕円形の細胞を同定する方法を探し、そして、同定した神経節細胞とつながる双極細胞とアマクリン細胞との局所神経回路を形態学的に解析する。ということの大部分が達成された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

星秀夫，川島友和，高柳雅朗，上條中庸，酒井真，石川陽一，佐藤二美：網膜神経回路研究のための新しいキングヨ硝子体液除去方法の検討。第 122 回日本解剖学会全国学術集会，長崎大学（長崎県，長崎市），2017/03/29

星秀夫，川島友和，上條中庸，酒井真，石川陽一，村上邦夫，高柳雅朗，佐藤二美：Neurobiotin 細胞内注入が明らかにしたキングヨ網膜神経節細胞とその局所神経回路。第 121 回日本解剖学会 総会・全国学術集会，ビッグパレット福島（福島県郡山

市），2016/03/30

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星秀夫 (HOSHI, Hideo)
東邦大学・医学部・助教
研究者番号：30568382

(2) 研究分担者

狩野修 (KANO, Osamu)
東邦大学・医学部・講師
研究者番号：20459762

(3) 連携研究者

佐藤二美 (SATO, Fumi)
東邦大学・医学部・教授
研究者番号：60205961

立花政夫 (TACHIBANA, Masao)
東京大学・大学院人文社会系心理学・名誉教授
研究者番号：60132734

田丸文信 (TAMALU, Fuminobu)
埼玉医科大学・医学部・助教
研究者番号：70337541

海野修 (UMINO, Osamu)
東邦大学・理学部・教授
研究者番号：70119907