

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月17日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010年度～2012年度

課題番号：22500317

研究課題名（和文）網膜神経細胞の3次元再構築による形態的分類とシナプス結合の解析

研究課題名（英文）Morphological classification and synaptic connectivity analysis of retinal neurons by three-dimensional reconstruction

研究代表者

塚本 吉彦 (TSUKAMOTO YOSHIHIKO)

兵庫医科大学・医学部・名誉教授

研究者番号：20104250

研究成果の概要（和文）：

(1) マウス網膜について、杆体視細胞→杆体双極細胞→AII型アマクリン細胞の経路におけるリボンシナプスの配置、AII型アマクリン細胞からON双極細胞へのギャップ結合、およびOFF双極細胞からOFF神経節細胞へのシナプス経路を解明し、30個の神経節細胞のマップを作成した。(2) サル網膜について、中心窩（偏心度0.25～0.45mm）と中心窩周辺野（同3.06～3.22mm）における錐体/杆体マップを作成し、杆体視細胞から直接に化学シナプスで杆体信号の入力を受ける型のOFF錐体双極細胞を発見した。

研究成果の概要（英文）：

(1) We analyzed the allocations of synaptic contacts in microcircuits from rods via rod bipolar to AII amacrine cells, the gap junctions between AII amacrine and ON cone bipolar cells, and the synaptic contacts from OFF bipolar to OFF ganglion cells in the mouse retina. We also made a map of 30 ganglion cells. (2) We made two maps of cones and rods in the fovea (Eccentricity: 0.25～0.45mm) and the peri-fovea (3.06～3.22mm) and discovered the direct chemical synaptic pathway from rods to OFF cone bipolar cells in the monkey retina.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2011年度	100,000	30,000	130,000
2012年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：ニューロン、網膜、神経回路、シナプス、マウス、サル、電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

申請者はかつて米国ペンシルバニア大留学中にサル(*Macaca fuscicularis*)網膜の連続切片作成(約 300 枚)を担当し、引き続きその解析に共同で従事し、その成果を数編の共著論文として公表した。帰国後、マウス網膜におけるシナプス結合と神経回路を、mGluR6 欠損型と野生型のマウスを比較する観点から、連続切片電顕法と免疫細胞化学を用いて研究した。この間、日本サル網膜の中心窩と中心窩周辺野の 2 か所におけるかなり規模の大きな連続切片電顕写真データを作成する作業も同時に進行させた。したがって、本プロジェクトが開始した 2010 年度には、マウス網膜シリーズ 1 セットとサル網膜シリーズ 2 セットがほぼ準備されていた。その後は写真データファイルの完成度を上げると共に、それらのシリーズから神経細胞を掘り起こし、シナプスを同定していく作業を進めていくことになった。

網膜神経回路の「標本化単位」とは、光受容器面に結像した光学画像からいろいろな特徴が並列的に異なる神経経路によって神経画像として抽出され、神経節細胞によって最終的な視覚符号として中枢に伝達されるまでの網膜における情報処理の構造上、機能上の単位である。標本化単位におけるシナプスの分布とその機能的意義を解明するためには、連続切片電顕法による神経回路の 3 次元再構築が不可欠である。本 3 年間は標本化単位を解析する長期目標を達成するための全過程(前、中、後期)の一環に属し、その前期に相当する。

2. 研究の目的

(1) マウス網膜の連続切片電顕写真からすべての型の双極細胞と狭い受容野をもつ型のアマクリン細胞の分類とシナプス結合に関する知見を集大成し、それらを公表する。

(2) サル(*Macaca fuscata*)網膜の中心窩と中心窩周辺野の 2 シリーズの連続切片電顕写真を追加撮影によって完成させ、錐体細胞、杆体細胞のマップ作りから始めて、すべての型の双極細胞、アマクリン細胞、神経節細胞の分類とシナプス結合を解析する。

(3) コンピューター・グラフィックスのツールを整備する。

3. 研究の方法

(1) マウス (C57Bl/6J) 網膜シリーズは 348

枚の連続切片を作成し、各切片につき 24 (3×4) 枚からなるモンタージュを EM 撮影したものである。杆体双極細胞および狭い樹状突起野をもつアマクリン細胞(グリシン作動性)が関係する神経回路を包括的に明らかにするために利用する。

(2) 日本サル網膜の中心窩(Fシリーズ;約 800 枚のネガフィルム、約 17,000 枚のプリント)と中心窩周辺野(Pシリーズ;約 600 枚のネガフィルム、約 15,000 枚のプリント)の 2 か所における連続切片電顕写真データを利用する。これらのネガフィルムは倍率 3000、プリントは引き伸ばし倍率 4 倍、最終倍率 12,000 倍である。

また、入力層にあたる錐体・杆体のマップ、出力層にあたる神経節細胞のマップをまず作成するために最終 4,000 倍(400 倍のネガフィルム×10 倍の引き伸ばし)のプリントを用いて連続切片から 3 次元再構築した上でトップビューの分布図を作成する。

(3) 三次元再構築のためのソフトウェアとして RATOC 社(東京)の TRI/3D-SRF を利用する。一般的な画像処理のために ADOBE 社のフォトショップ、イラストレーターを使う。

4. 研究成果

(1) マウス網膜

① 杆体視細胞→杆体双極細胞→AII 型アマクリン細胞の経路の立体構築することによって、リボンシナプスの機能的配置を明らかにした(図 1 参照)。

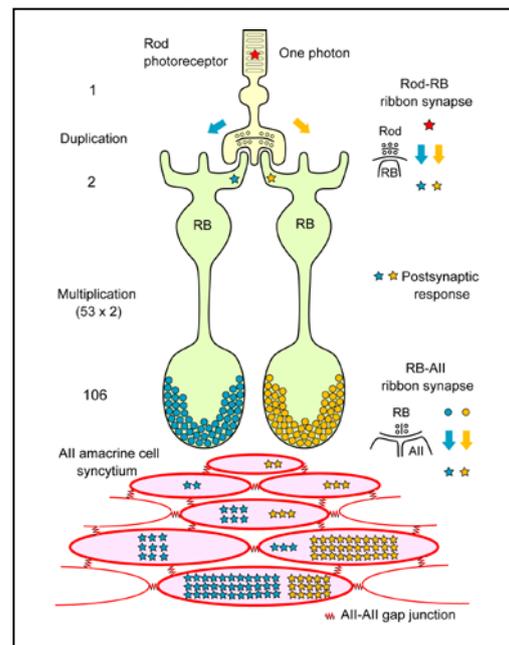


図 1

まず、杆体と杆体双極細胞の結合様式のマップを作成した（図2参照）。

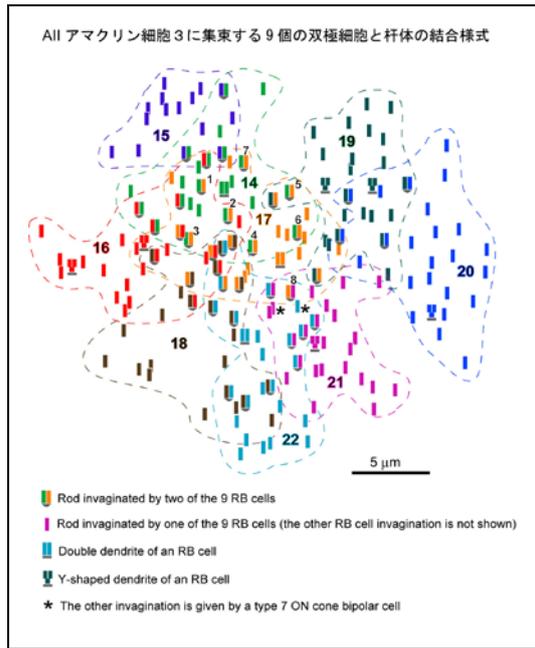


図 2

次に、杆体から出た同一信号が2個の杆体双極細胞に発散したあと、再び1個のAII型アマクリン細胞（グリシン作動性）に集束する現象（図3、4参照）、1個の杆体由来する信号のほとんどが2、3個のAII型アマクリン細胞に集束してから、互いにギャップ結合で連絡する現象などを明らかにした。

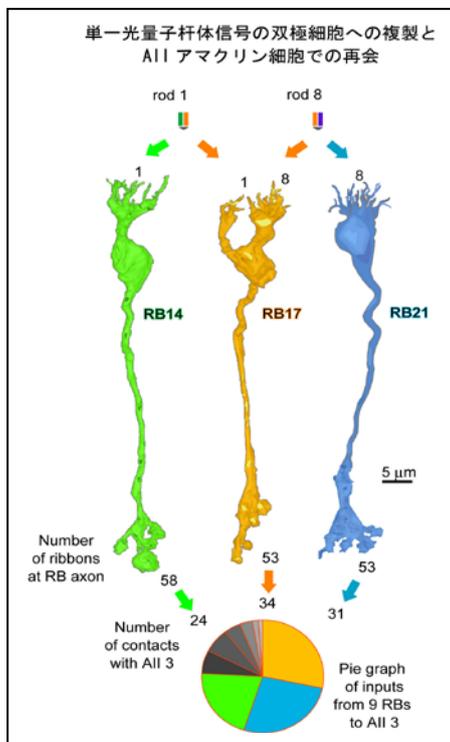


図 3

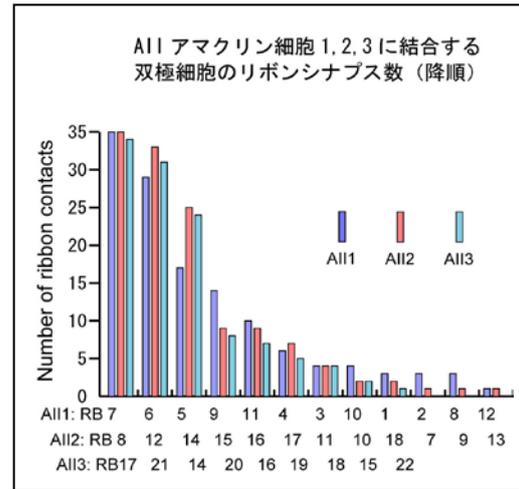


図 4

「マウス網膜の杆体視細胞から杆体双極細胞を介するAII型アマクリン細胞への微小神経路におけるシナプス結合部位の機能的分布」と題する論文にまとめてJ. Comparative Neurologyに投稿したところ2013年5月に印刷に向けて受理された。

② AII型アマクリン細胞からON双極細胞へのギャップ結合、OFF双極細胞とOFF神経節細胞へのシナプス経路を解明した。とくにAII型アマクリンと全ての型(5α,6,7,8,9)のON型双極細胞とのギャップ結合の撮影に成功した。

③ 30個の神経節細胞のマップを作成した。そのうち10個の神経節細胞については双極細胞とアマクリン細胞の各型からの入力の組み合わせを明らかにした。

④ 杆体と錐体のリボンシナプス形成がmGluR6受容体の有無によって影響を受けることを解明した。

(2) サル網膜

① 追加撮影を終えて連続切片電顕像の写真ファイルを完成させた結果、Pシリーズは全684枚から817枚に増加した。

② 立体構築のための準備作業として網膜全体の組織像を大判(110cm×150cm)のプリント紙に印刷し、透明紙にグリッド線とともに大きな目標物やニューロンの輪郭を写し取って図合わせのためのフレームを作成した。Pシリーズ用116枚、Fシリーズ用134枚をそれぞれ完成させた。さらに、錐体マップ、杆体マップを作成した。

③ PシリーズとFシリーズの予備的観察を進めた。とくに、青錐体→青双極細胞→二層性神経節細胞と赤、緑錐体→ON/OFFミゼット双極細胞→ON/OFFミゼット神経節細胞の経路について最初の例を解析した。

④ サル網膜において杆体視細胞から直接に化学シナプスで杆体信号の入力を受ける

OFF 錐体双極細胞の存在を発見した。従来 DB2 型に分類されていた OFF 錐体双極細胞がさらに a 型と b 型に細分された。各 3 個ずつ立体再構築したところ、a 型が錐体と並んで杆体からも入力を受けることが証明された。この神経路の存在はヒトの心理物理学的データから想定されていたもので、その仮説に実証的根拠を与えるものである。

(3) コンピューター・グラフィックスのツール

① 現在使用しているソフトウェア TRI/3D-SRF-R (ラトック社) に特注によって SLT 形式(CAD 分野の標準的なファイル形式で汎用性が極めて高い)のファイル生成機能をもたせることができた。

② Adobe CS2 から CS6 (Photoshop, Illustrator, 等)への更新によって作業の効率化を図った。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

① Tsukamoto, Y. and Omi, N. (2013)
Functional Allocation of Synaptic Contacts in Microcircuits from Rods via Rod Bipolar to AII Amacrine Cells in the Mouse Retina. *J. Comp. Neurol.* 査読有、(印刷中)
DOI: 10.1002/cne.23370 (Open Access)

[学会発表] (計 4 件)

① 塚本吉彦、臣尚子、サル網膜において杆体・錐体双方から基底型シナプス結合を介して入力する双極細胞型とマウス網膜における相当する細胞型との比較、第 36 回日本神経科学大会、2013 年 6 月 20 日、京都

② 塚本吉彦、臣尚子、マウス神経節細胞とその双極細胞入力の三次元再構築と分類、第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 19 日、名古屋

③ 塚本吉彦、臣尚子、マウス網膜における同一杆体信号の杆体双極細胞への発散を介する AII アマクリン細胞への再集束、第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 16 日、横浜

④ 塚本吉彦、臣尚子、マウス網膜の杆体双極細胞と AII アマクリン細胞を経由する杆体信号経路、第 33 回日本神経科学大会、2010 年 9 月 1 日、神戸

[図書] (計 1 件)

① 日本色彩学会編、大田、他約 200 名分担執筆 (塚本)
東京大学出版会、新編色彩科学ハンドブック 第 3 版、第 8 章・色の生理—3・色覚の情報処理—3.3・網膜、2011、362-363

6. 研究組織

(1) 研究代表者
塚本 吉彦 (TSUKAMOTO YOSHIHIKO)
兵庫医科大学・医学部・名誉教授
研究者番号：20104250

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：