

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2017

課題番号：24390019

研究課題名(和文) コントラストを検出する初期視覚系の階層横断的解析と再生医療への戦略的展開

研究課題名(英文) From molecules to consciousness, the role of retinal ON bipolar cells in visual function.

研究代表者

小池 千恵子 (Koike, Chieko)

立命館大学・薬学部・教授

研究者番号：80342723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：視覚の本質は「ものの形を捉えること」であり、中心的な役割は双極細胞が担っている。研究者らは、網膜ON型双極細胞の機能を司る遺伝子TRPM1とmGluR6に注目し、各遺伝子欠損網膜を比較解析した結果、TRPM1欠損網膜でのみ周期性自発発火を検出した。軸索終末の特徴的な構造変化は、数理モデル解析結果から推定される自発発火の発生要因と一致した。変性網膜の自発発火は変性網膜における光視症の原因と考えられており、今回の分子・組織・機能解析・数理モデル構築といった一連の手法を駆使した研究は、総合的に機能的再構築に貢献できるツールに昇華することができる、重要な成果であったと考えている。

研究成果の概要(英文)：Retinal bipolar cells relay important visual information that enables, for example, contrast and edge detection. We focused on TRPM1 and mGluR6 that regulate retinal ON bipolar function by using mutant mice. We observed oscillatory spontaneous activity only in TRPM1 mutant mouse retina. The oscillations result from morphological changes in the ON bipolar cell synaptic terminal, consistent with a mathematical model. We also developed operant systems for studying visual acuity in mice. Altogether, we have established a general toolbox that can be used to study visual function from molecules to consciousness in an area of relevance to retinal regeneration.

研究分野：神経科学

キーワード：網膜 双極細胞 コントラスト マルチチャネルアレイ 視覚応答解析

1. 研究開始当初の背景

網膜疾患のみならず高年齢化に伴う視力の低下や失明は、生活の質に重篤な影響を及ぼす。近年、再生医療研究が急速に進み、網膜を含めた神経細胞の分化誘導は現実のものとなっている。しかしながら他の神経組織同様、網膜組織では移植された神経細胞が正しくシナプスを形成し、整然とした網膜回路の一部に組み込まれ機能しなければ視覚を取り戻すことはできない。一方、人工網膜研究において、自然な「視覚」を再構築するためには入力光情報からどのような刺激信号を生成すればよいのか明らかになっていない。すなわち、再生医療・人工臓器による代替医療のいずれにおいても、生体における網膜回路と視覚応答制御の解明が必要である。

脊椎動物網膜において、光刺激は視細胞において神経シグナルに変換され、中間ニューロンである双極細胞において ON 型・OFF 型経路に分解される(図 1)。光刺激下で ON 型双極細胞は脱分極し、OFF 型双極細胞は過分極する。ON 型・OFF 型双極細胞の応答性の違いは発現しているグルタミン酸受容体の違いによる。全ての ON 型双極細胞は代謝型グルタミン酸受容体である mGluR6 を発現しているが、mGluR6 の標的チャンネルは長い間謎であった。研究者らは、網膜 ON 型双極細胞の視覚伝達チャンネルが TRPM1(Transient Receptor Potential Melastatin1)であることを明らかにした(Koike, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 107(1) p332-7(2010); Koike, et al., *Cell Calcium*, 48 p95-101(2010))。研究者らはさらに、TRPM1 チャンネルの制御メカニズム、細胞膜局在メカニズムに加え、TRPM1 が夜盲症の原因遺伝子であることなどを明らかにした。

網膜において TRPM1 は ON 型双極細胞に特異的に発現している。研究者らは TRPM1 の上流転写因子が Otx2 であることを明らかにした(未発表)。プロモーターアッセイ、クロマチン免疫沈降法に加え、Otx2 の発現が杆体双極細胞で欠損するコンディショナルノックアウト(KO)網膜において TRPM1 mRNA の発現が消失することを確認した。本解析結果は研究者らが以前報告した Otx2 が ON 型双極細胞の機能に必須であるという結果と一致する(Koike, et al., *Mol. Cell. Biol.* 227(23), p8318 -29(2007))。研究者らは、

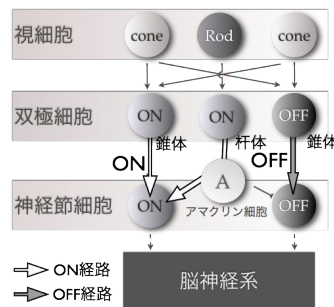


図 1 網膜 ON・OFF 回路モデル図
矢印は視覚情報経路を示す。

Otx2 が全ての双極細胞に局在していることを確認した。従って TRPM1 プロモーター上には、Otx2 による遺伝子発現を OFF 型双極細胞において抑制する機構が存在しているものと考えられる。

ところで TRPM1 チャンネルは ON 型双極細胞において、mGluR6 により抑制制御を受ける。TRPM1 と mGluR6 はともに ON 型双極細胞の視覚応答に必須であるが、研究者らは両 KO マウスにおいて予期しない相違点を見いだした。(1) 網膜最終出力細胞である神経節細胞において、TRPM1 KO 網膜では ON 型応答が消失するのみでなく、光刺激に無関係な異常な自発活性が検出される。(2) mGluR6 KO マウスでは神経節細胞の投射先である上丘において OFF 応答のみが検出されるが、TRPM1 KO マウスでは ON・OFF 応答ともに検出されない。(3) TRPM1 KO マウスは野生型マウスと比較して自発運動活性が高いが、mGluR6 KO マウスにはそのような異常は検出されない(以上、未発表データ)。TRPM1 チャンネルは視覚情報を伝え、mGluR6 は抑制することにより ON 型情報伝達を制御する(図 2)。

TRPM1 KO マウスにおいては ON 型情報入力そのものが欠落していることから、ON 型視覚情報が生体において「内在性の自発活性の抑制」、

「OFF 型経路の投射や情報伝達」、「異常行動の抑制」などに関与しているのか、解明すべき点が残されている。

2. 研究の目的

近年再生医療研究が進み、網膜神経細胞の分化誘導および移植による視覚再生が現実のものとなってきた。しかしながら網膜は整然とした回路構造を形成しており、本来の視覚を取り戻すためには網膜構造に基づいた機能的再構築が必要である。研究者らは網膜 ON 型双極細胞の視覚伝達チャンネルの本体が TRPM1 であることを明らかにした。視覚情報の ON・OFF 経路への分解はイメージのコントラスト形成に重要な役割を果たす。本研究では網膜 ON・OFF 分解の第一段階である双極細胞に注目し、その視覚情報経路・視

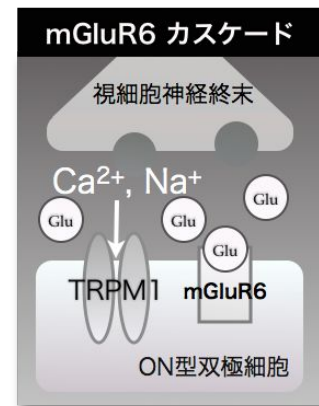


図 2 TRPM1 チャンネルは mGluR6 により抑制制御される

覚応答までを階層横断的手法を用いて解明することにより、網膜視覚応答のシミュレーションモデル作成による視覚再生や薬効評価に必要な情報基盤の確立を目指す。

3. 研究の方法

視覚 ON 型・OFF 型経路と視覚応答制御メカニズムを解析し、シミュレーションモデル作成を目指す。

具体的には、1) ON 型細胞特異的遺伝子欠損モデルマウス解析や OFF 型双極細胞機能欠損モデルマウス作製を行う。2) ON 型双極細胞機能欠損モデルとして TRPM1 KO マウスの網膜回路・投射経路・視覚応答解析を行い、結果を元にシミュレーションモデルを作製する。3) OFF 型双極細胞機能欠損モデルマウスにおいても同様の一連の解析を行う。

4. 研究成果

我々の視覚は明るさを絶対的に捉えず、相対的に捉えることにより、薄暗いところから明るい場所においてまで、ものの輪郭を検出することができる。すなわち、ものの輪郭を捉えるのはコントラスト形成が重要な役割を果たしているが、その中心的な役割は網膜の ON・OFF 回路が果たしている。網膜において視覚情報は、中間ニューロンである双極細胞において ON 経路と OFF 経路に分離される。すなわち視覚において、双極細胞は極めて重要な役割を果たす細胞である。明るくなったという情報は ON 型双極細胞によって、網膜最終出力細胞である神経節細胞に送り出されるが、この ON 型情報は、TRPM1 チャネルとそれを抑制制御する三量体 G タンパク質共役型受容体である mGluR6 により担われる。それぞれのノックアウト(KO)マウス網膜では、ON 型応答が消失していることが明らかとなっている。

我々はマルチチャンネルアレイ(MEA)解析により、TRPM1 KO および mGluR6 KO マウス網膜の応答の比較解析を行った。MEA 解析では、網膜出力細胞である神経節細胞から応答が検出されるが、1つの電極から複数の神経節細胞の応答が検出されることが多いため、得られたデータのソーティングを行う必要がある。我々はマルチチャンネルアレイ(MEA)解析により、TRPM1 KO および mGluR6 KO マウス網膜の応答の比較解析を行った。その結果、TRPM1 KO マウス網膜では、mGluR6 KO マウス網膜ではみられない、周期性の自発発火が存在していることを明らかにした。ところで MEA 解析では、網膜出力細胞である神経節細胞から応答が検出されるが、1つの電極から複数の神経節細胞の応答が検出されることが多いため、得られたデータのソーティングを行う必要がある。スパイクソーティングは、フィルタリング、スパイク検出、特徴抽出、クラスタリングの4つのステップからなる。

我々はまず、より確実なスパイクをできる限り多く、少ないパラメータによってソートできることを目標としてスパイクソーティングの手法を確立した。まず、特徴抽出として波形データ(spike の peak を 0 とし、-1~+2 ms)に対して主成分分析を行い、二次元の特徴量にした。その結果を Hierarchical Density-based Spatial Clustering of Applications with Noise(HDBSCAN)によってクラスタリングを行った。このアルゴリズムでは、クラスタ数を指定することなく、密度に基づいて複雑な形状のクラスタに対してもロバストにクラスタリングを行うことができる。このように確立した手法を用いて MEA 解析データを分析したところ、網膜 ON 型、OFF 型、ON-OFF 型神経節細胞において、特定のタイプの神経節細胞ではなく、全てのタイプの約半数の神経節細胞から周期性自発発火応答を検出した。そのメカニズムを明らかにするため、詳細な網膜組織解析を行ったところ、TRPM1 KO マウス網膜では、mGluR6 KO マウス網膜と比較し、杆体双極細胞の終末が有意に小さいことを明らかにした。網膜シミュレーションモデルを作成し周期性振動が発生する異常な網膜回路を形成する条件を検討した結果、AII アマクリン細胞への入力がいかなる特定の条件下で周期性振動が生じることが明らかとなった。杆体双極細胞の終末が小さければ、AII アマクリン細胞への入力低下することが推測されるため、組織解析から得られた TRPM1 KO マウス網膜の特徴的な変化が自発発火を誘発することが説明できる結果となった(Takeuchi, et al., in press)。さらに、杆体双極細胞でのみ TRPM1 を欠損する遺伝子改変マウスを作製したところ、自発発火の周波数の分散が相対的に小さいことが確認された。OFF 型双極細胞の遺伝子改変マウスは、解析まで至ることはできなかったが、モデル動物の作製までは終了したため、今後さらなる解析を行う予定である。

また、マウス視覚のイメージ形成応答を解析する目的で、視覚応答解析用オペラント実験装置を新規に開発した。本装置を用い、まず時間分解能(フリッカー値(CFF))を明らかにする目的でマウス視覚応答解析を行った。時間分解能の解析手法には極限法と恒常法があるが、マウスの場合には極限法においては上昇系列しか適用できない。上昇系列と下降系列では CFF にズレがあることが想定されるが、マウスを用いた極限法(上昇系列)で得られた CFF の値は恒常法とほぼ変わらないことが明らかとなった。さらに、CFF を超えた周波数で視覚トレーニングを行ったところ、より高い周波数でもマウスは一時的に弁別可能な個体もあった(投稿準備中)。

他に、TRPM1KO マウスの視覚以外の異常を多角的に解析し、興味深い結果を得ることができた。TRPM1 のエンハンサー配列を特定することができた。

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9件)

Takeuchi, H., Horie, S., Moritoh, S., Matsushima, H., Hori, T., Kimori, Y., Kitano, K., Tsubo, Y., Tachibana, M and Koike, C. Different activity patterns in retinal ganglion cells of TRPM1 and mGluR6 knockout mice. BioMed Research International 2018.2963232 (2018) <https://doi.org/10.1155/2018/2963232> 査読有

Suiko T, Kobayashi K, Aono K, Kawashima T, Inoue K, Ku L, Feng Y, Koike C. Expression of Quaking RNA-Binding Protein in the Adult and Developing Mouse Retina. PLOS ONE vol.11, e0156033 (2016) 10.1371/journal.pone.0156033 査読有

Nishiyama S, Hosoki Y, Koike C, Amano A. Reproducing retinal rod bipolar cell light response by mathematical model including neurotransmitter receptors. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. 6116-9 (2014) 査読有

〔学会発表〕(計58件)

Chieko Koike, Kanago Taniguchi, Haruki Takeuchi, Yasuhiro Tsubo, Katsunori Kitano
Different activity patterns in retinal ganglion cells of TRPM1 and mGluR6 knockout mice. ARVO2017,2017

小池千恵子視機能再生を評価する新規視認知機能解析装置 イノベーション・ジャパン 2016,2016

Chieko Koike Katsunori Kitano Yasuhiro Tsubo The differential activities of retinal ganglion cells between TRPM1 and mGluR6 knockout mice. FASEB/Retinal Neurobiology and Visual Processing,2016

Yuichiro Nomura, Jumpei Mita, Shingo Takizawa, Takuma Arimura, Shinichiro Suzuki, Syohei Ikuta, Akira Amano, Kazuhiro Shimonomura, Yasuhiro Seya, Yasuhiro Tsubo, Chieko Koike Touchscreen-based visual temporal discrimination task in the behaving mouse by the constant method. ARVO2016,2016

Shingo Nishiyama, Yukari Hosoki, Chieko Koike, Akira Amano Reproducing Retinal Rod Bipolar Cell Light Response by Mathematical Model Including Neurotransmitter Receptors. 日本生理学会大会 2015,2015

〔図書〕(計2件)

小池千恵子 東京化学同人 生物系薬学スタンダード薬学シリーズ 11-4 日本薬学会編 2015年「300-303」

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称: 実験動物の視機能評価装置
発明者: 小池千恵子、天野晃、下ノ村和弘
権利者: 立命館大学
種類: 本学単独
番号: 特願 2014-165505

出願年月日: 2014年8月15日

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等
立命館大学総合科学技術研究機構・システム視覚科学研究センター
<http://ivrc.jp>
立命館大学薬学部神経発生システム研究室
<http://www.ritsumei.ac.jp/pharmacy/koike/koikelab/Home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小池 千恵子(Koike, Chieko) (代表)
立命館大学・薬学部・教授
研究者番号: 80342723

(2) 研究分担者

下ノ村 和弘(Simonomura, Kazuhiro)
(分担)

立命館大学・理工学部・准教授
研究者番号: 80397679
天野 晃(Amano, Akira) (分担)
立命館大学・生命科学部・教授
研究者番号: 60252491

(4) 研究協力者

北野 勝則(Katsunori, Kitano) (共同研究者)
坪 泰弘(Tsubo, Yasuhiro) (共同研究者)
立花 政夫(Tachibana, Masao) (共同研究者)
松本 彰弘(Matsumoto, Aikihiro) (共同研究者)
森藤 暁(Moritoh, Satoru) (共同研究者)
瀬谷 安弘(Seya, Yasuhiro) (共同研究者)
Yue Feng (共同研究者)