

令和元年5月22日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16990

研究課題名(和文) P2X受容体による網膜視覚情報処理への修飾機構の解明

研究課題名(英文) P2X receptor modulates visual information processing in the mouse retina

研究代表者

石井 俊行 (Ishii, Toshiyuki)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：10643140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：網膜の視覚情報処理において、いずれのP2X受容体サブタイプが、どのように寄与しているのかを明らかにすることを目的とし検討した。P2X受容体に対する非選択的アンタゴニストを用いた検討により、P2X3受容体の関与が推定された。そのため、P2X3受容体アンタゴニストを眼内へ投与し網膜電図を検討したところ、OP波の減少が認められた。また、網膜から脳への情報伝達を担う網膜神経節細胞の光刺激時の応答について、活動電位の発生頻度がP2X3受容体アンタゴニストにより変化した。以上の検討により、P2X3受容体がアマクリン細胞または網膜神経節細胞に発現しており、網膜内の視覚情報処理に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通じ、網膜内視覚情報処理にP2X3受容体に関与していることが明らかとなった。P2X3受容体の機能異常は、代償が起こらない限り視覚障害を導くものと推測される。そのため、P2X3受容体は、mGluR6受容体やTRPM1受容体と並び、先天性停止性夜盲症などといった先天性疾患に関わる新たな原因分子の一つとなる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：ATP acts as a neurotransmitter in the nervous system. All subtypes of P2X receptors (P2X1 - P2X7) exist in the mouse retina at the immunohistochemical level, and PPADS, a non-selective P2 receptor antagonist, modulates the responses of bipolar cells to light flash and the firing pattern of retinal ganglion cells (RGCs). However, the types of P2X receptors contributing the signal processing in the retina have not been well elucidated. In the present study, we focused on P2X3 receptors and tested whether P2X3 receptors are physiologically functioning by the electroretinogram and multi electrode array. Intravitreal injection of A317491, an antagonist of P2X3 receptor, had no effects on the amplitude of a and b-wave whereas the amplitude of oscillatory potentials was significantly decreased. In addition, application of A317491 modulated the firing rate of RGCs. These results suggest that the P2X3 receptors physiologically work for the signal processing in the mouse retina.

研究分野：神経科学

キーワード：P2X受容体 網膜 視覚 網膜電図

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

P2X 受容体は ATP の受容体として、近年、痛みや味覚の受容、脳におけるシナプス伝達機構などに重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。P2X 受容体は、P2X1 から P2X7 までの 7 つのサブタイプが知られており、視覚の受容を司る網膜において、いずれも広く発現が認められていることから、視覚においても P2X 受容体の関与が考えられた。これまでに研究代表者らは、網膜の出力細胞である網膜神経節細胞の光刺激に対する応答が、P2X 受容体の非選択的アンタゴニストである PPADS (P2X1,2,3 及び 5 受容体を阻害) により修飾を受けることなどを報告してきた (Kaneda et al., 2008 Eur. J. Neurosci., Ichinohe et al., 2017 Neurosci. Res.)。このことは、網膜における視覚情報処理に P2X 受容体が関与することを示唆するものである。しかしながら、いずれの P2X 受容体サブタイプが網膜内のどの部位で機能しているのかは不明であった。

研究代表者が予備的検討により、P2X3 受容体アンタゴニストである A317491 を眼内に投与したところ、網膜電図波形に影響がみられたことから、網膜における P2X3 受容体の機能を明らかにすることを目指し検討することとした。

2. 研究の目的

- (1) P2X3 受容体の網膜における発現部位を明らかにする。
- (2) P2X3 受容体がどのように視覚情報処理に寄与するのかを明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 網膜電図を用いた P2X3 受容体の網膜機能への影響の検討：予備的検討により認められた A317491 による網膜電図への影響を、サンプル数を増やして検討した。
- (2) 網膜内における P2X3 受容体の分布の調査：免疫組織化学及びパッチクランプ法により P2X3 受容体の網膜内における分布を検討した。
- (3) 網膜から脳へ伝達される情報への P2X3 受容体による修飾効果の検討：網膜神経節細胞の光応答時の活動電位の発生パターンが、P2X3 受容体の阻害時に、どのような影響を受けるのかを検討した。本検討には細胞外記録法を基としたマルチ電極システムを用いた。

4. 研究成果

網膜機能への P2X3 受容体の寄与を検討するため、A317491 を眼内に投与し網膜電図により P2X3 受容体の作用を検討したところ、a 波及び b 波の振幅には影響がみられなかった (図 1)。しかしながら、OP 波成分を抽出し、さらに検討を行ったところ、OP 波の振幅に減弱が認められた (図 2)。このことは、P2X3 受容体がアマクリン細胞または網膜神経節細胞にて発現していることを示唆するものである。

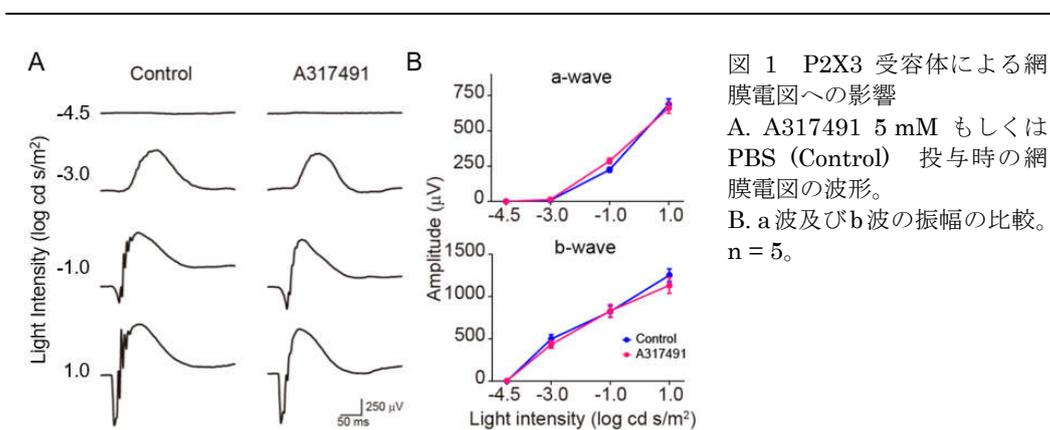


図 1 P2X3 受容体による網膜電図への影響
A. A317491 5 mM もしくは PBS (Control) 投与時の網膜電図の波形。
B. a 波及び b 波の振幅の比較。n = 5。

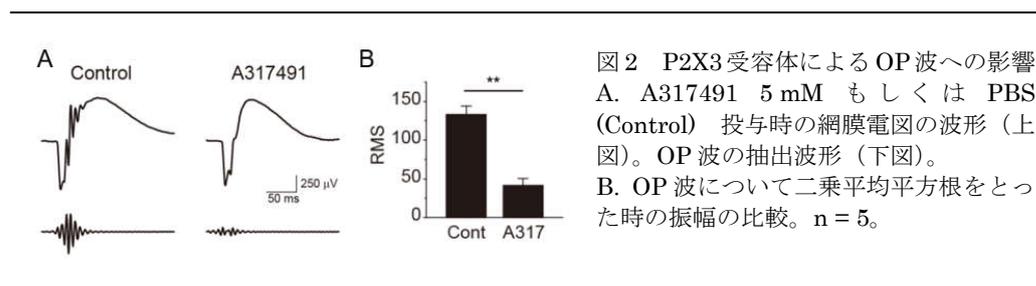


図 2 P2X3 受容体による OP 波への影響
A. A317491 5 mM もしくは PBS (Control) 投与時の網膜電図の波形 (上図)。OP 波の抽出波形 (下図)。
B. OP 波について二乗平均平方根をとった時の振幅の比較。n = 5。

P2X3 受容体の分布を調べるため複数の抗体を用いて免疫組織化学を実施したが、特異的応を示す抗体はみられなかった。そのため、視細胞及び双極細胞へ ATP を作用させたときの電流応答をパッチクランプ法にて検討したが、検討した条件にて反応する細胞はみられなかった。一方、網膜神経節細胞の光刺激時の応答について、A317491 並びに、同じく P2X3 受容体アンタゴニストである RO-3 にて検討したところ、活動電位の発生頻度が P2X3 受容体アンタゴニストにより変化した (表 1)。以上の検討により、P2X3 受容体はアマクリン細胞または網膜神経節細胞に発現しており、網膜内の視覚情報処理に関与していることが示唆された。

	ON type	OFF type	ONOFF type	Total
Increase	0	9	8	17
Decrease	16	13	6	35
No change	14	9	6	29
Total	30	31	20	

表 1. 網膜に A317491 (20 μ M) を作用させたときの網膜神経節細胞の発火頻度への影響。数字は細胞数を表す。

5. 主な発表論文等

(研究代表者に下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Xu D., Robinson A., Ishii T., Duncan D., Alden T., Goings G., Ifergan I., Podojil J., Penaloza-MacMaster P., Kearney J., Swanson G., Miller S., and Koh S. (2018) Opposing Roles of Peripherally-Derived CD4+ α B Regulatory and γ δ T Cells in the Pathogenesis of Intractable Pediatric Epilepsy. *J. Exp. Med.* 215:1169-1186
DOI: 10.1084/jem.20171285
2. Ishii T., Yin C., Seko Y., Umezawa A., and Kaneda M. (2018) Variation in the phenotype of photosensitive cells produced from human fibroblast cell lines. *J. Nippon Med. Sch.* 85:110-116
DOI: 10.1272/jnms.2018_85-17.
3. Hedrick T.P., Nobis W.P., Foote K.M., Ishii T., Chetkovich D.M., and Swanson G.T. (2017) Excitatory synaptic input to hilar mossy cells under basal and hyperexcitable conditions. *eNeuro.* 4(6): ENEURO.0364-17.
DOI: 10.1523/ENEURO.0364-17.2017
4. Ishii T., Homma K., Mano A., Akagi T., Shigematsu Y., Shimoda Y., Inoue H., Kakinuma Y., and Kaneda M. (2017) Novel channel-mediated choline transport in cholinergic neurons of the mouse retina. *J. Neurophysiol.* 118:1952-1961.
DOI: 10.1152/jn.00506.2016
5. Ichinohe S., Ishii T.*, Takahashi H., and Kaneda M. (2017) Physiological contribution of P2X receptors in postreceptor signal processing in the mouse retina. *Neurosci. Res.* 115: 5-12.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2016.09.012>
* corresponding author

[学会発表] (計 4 件)

- 1) Ishii T., Stolz J.R., and Swanson G.T. Physiological characterization of AMPA receptor positive allosteric modulators PF-04958242 and LY-451395. 日本神経科学大会, 神戸 (2018.7.26)
- 2) Ishii T., Stolz J.R., and Swanson G.T. Functional characterization of AMPA receptor positive allosteric modulators PF-04958242 and LY-451395. World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018), Kyoto (2018.6.5).
- 3) Ishii T., Ichinohe S., Suzuki C., Takahashi H., and Kaneda M. Contribution of P2X3 receptor to light responses in the mouse retina. 日本神経科学大会, 千葉 (2017.7.21).
- 4) Stolz J.R., Ishii T., and Swanson G.T. Comparative studies of AMPA receptor positive allosteric modulators PF-04958242 and PF-04531686. Experimental Biology 2017 (ASPET), Chicago (2017.4.17).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 俊行 (ISHII Toshiyuki)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：10643140

※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、研究者個人に帰属されます。