

平成21年 6月16日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006 -2008
 課題番号：18500312
 研究課題名（和文） マルチ電極法を用いたマウス網膜光応答に対するプリン受容体修飾効果の検討
 研究課題名（英文） Modulation of light responses by purinergic receptors in the mouse retina
 研究代表者 金田 誠(KANEDA MAKOTO)
 慶應義塾大学・医学部・准教授
 研究者番号：30214480

研究成果の概要：網膜にはOFF経路とON経路とよばれる二つの並列な情報処理経路が存在する。本研究ではATPで活性化されるP2X2型プリン受容体が、コリン作動性アマクリン細胞のOFF型には多く存在するが、ON型にはほとんど存在しないことを明らかにすることができた。網膜神経節細胞の光応答もON経路とOFF経路でP2X型プリン受容体を介して経路特異的に調節を受けていることが明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,600,000	0	2,600,000
2007年度	600,000	180,000	780,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	330,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学、神経・筋肉生理学

キーワード：感覚系神経生理学

1. 研究開始当初の背景

網膜ATP受容体の研究は、発生初期に網膜内を伝播するCa waveにP2Y型プリン受容体が関係することが注目され研究が進められてきた。このため発生期における網膜ATP受容体の役割については多くの知見が集められていた。一方成熟動物網膜におけるATP受容体の研究は、断片的な研究結果がいくつかの

学術誌に報告されたのみでP2X型受容体が神経伝達物質として関与するのかどうかについては研究がほとんど行われていなかった。このためわれわれがサルとマウスで行った系統的な網膜内P2X型受容体分布の免疫組織化学的検討(J. Comp. Neurol. 2003 & 2004)が、網膜においてもP2X型プリン受容体が神経伝達物質として機能する可能性を示す唯一の

形態学的データであった。実験開始当時われわれはパッチクランプ法を用いた実験で、P2X型プリン受容体を介する応答がコリン作動性アマクリン細胞に存在することを確認していたが、網膜から上位中枢への出力に対してATPが修飾をかけているのかどうかに関する報告は行われていなかった。

研究開始当時、網膜から上位中枢へ送られる情報解析を目的として、網膜神経節細胞の光刺激に対するマルチ電極法を用いた応答記録が導入され、tiger salamander等の冷血動物を用いた研究成果(Nature, 2005)が報告され始めていた。しかしながら、マウス網膜等の哺乳類網膜を用いた検討はほとんど行われていなかった。またマルチ電極法を用いて、網膜神経節細胞光応答がATPで修飾を受けるかどうかを検討した報告は存在しなかった。

2. 研究の目的

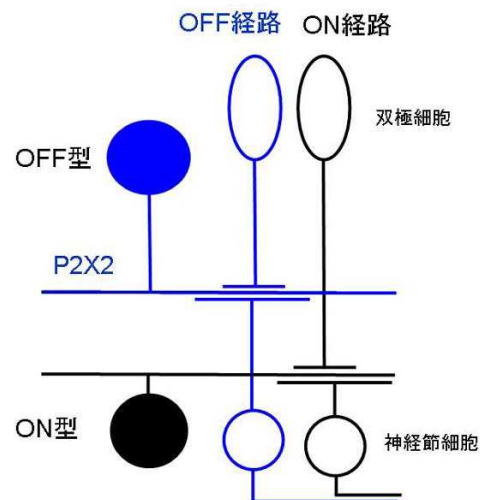
網膜の神経回路は光刺激で興奮が増加するON経路と興奮が減少するOFF経路に分けられる。ON経路とOFF経路のシグナルは網膜内で交じり合うことなく並列に処理され上位中枢に送られ、再合成されて視覚情報として認知される。近年われわれは理化学研究所・脳センター・神経構築部門ならびに京都大学医学部中西研究室との免疫組織化学的手法を用いた共同研究を通じて、サルならびにマウス網膜には広くP2X型プリン受容体が存在することを明らかにしてきた。またマウス網膜コリン作動性アマクリン細胞のP2X2型プリン受容体の研究から、P2X2型プリン受容体がON経路のコリン作動性アマクリン細胞にはほとんど存在せず、OFF経路のコリン作動性アマクリン細胞に特異的に存在していることを明らかにしてきた(J. Comp. Neurol., 2003 & 2004)。また研究を開始した頃に実施

していたコリン作動性アマクリン細胞ATP応答のパッチクランプ法による解析においても、外来性にATPを投与するとOFF型コリン作動性アマクリン細胞のみに特異的にATPに対する応答が引き起こされることが観察されていた。

コリン作動性アマクリン細胞の出力は網膜神経節細胞を介して上位中枢に送られる。このことからわれわれはP2X型プリン受容体が網膜神経節細胞の出力情報を修飾しているのではないかと考えていた。しかしながら外来性にATPを投与したときに、網膜神経節細胞から高次中枢に送られる活動電位の発火パターンがATPで修飾されるのかどうか、また修飾されるならばON経路とOFF経路でその修飾様式に相違があるのかということについては明らかとなっていなかった。本研究では1)マルチ電極法を用いたマウス網膜神経節細胞の光応答に対するP2X型プリン受容体の修飾効果の検討と、2)パッチクランプ法を用いたOFF型コリン作動性アマクリン細胞P2X2型プリン受容体のイオン機構の検討を目的として実験を行った。

マウス網膜神経回路の模式図

ON経路は黒、OFF経路は青で示してある。P2X2受容体はOFF経路にのみ存在する。



網膜双極細胞には光刺激で脱分極するON型と過分極するOFF型があり、ON型双極細胞はON型神経節細胞に、OFF型双極細胞はOFF型神経節細胞に情報を伝達する。

塗りつぶしてあるのはコリン作動性アマクリン細胞で、ON経路で神経節細胞側に細胞体を持つコリン作動性アマクリン細胞が、OFF経路では双極細胞側に細胞体を持つコリン作動性アマクリン細胞が網膜神経節細胞の応答を修飾する。

ON経路とOFF経路の情報は網膜内の異なる神経回路で処理され上位中枢に送られるため、P2X2型プリン受容体はOFF経路の情報のみを修飾すると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変マウス網膜コリン作動性アマクリン細胞P2X型プリン受容体応答の電気生理学的解析

本研究課題を遂行するために必要な遺伝子改変マウスはすでに所有しているものを用いた。網膜スライス標本ならびに単離網膜神経細胞標本作製し、GFP陽性像を指標にしてコリン作動性アマクリン細胞からパッチクランプ法を用いてATP応答を記録した。スライス標本上では、網膜内のGFP陽性細胞の細胞体の位置を指標にしてON型とOFF型にコリン作動性アマクリン細胞を区別した。ATP等の薬物の投与には急速灌流法を用いた。ATPやP2X型プリン受容体のアゴニストやアンタゴニストを投与したときに得られるOFF型コリン作動性アマクリン細胞の電流応答の大きさを指標として、P2X型プリン受容体のATP濃度依存性や受容体サブタイプの検討を行った。

連携研究者は網膜全般に関する豊富な形態学的・生理学的知識をもとに、適切な助言と文献的知識を研究代表者に提供した。

(2) 野生型マウス網膜神経節細胞からのマ

ルチ電極法を用いた記録システムの開発

理化学研究所・脳センター・細谷研究ユニットの所有する冷血動物用記録システムをベースとして、哺乳類網膜神経節細胞からの記録用システムを共同開発した。哺乳類網膜は冷血動物網膜に比べて酸素要求度が高かった。そこで網膜の酸素化のシステムを中心に冷血動物用のシステムに改良を加え、哺乳類網膜から安定して記録できるシステムを開発した。また哺乳類網膜は冷血動物網膜に比べて厚いので、網膜をマルチ電極上に固定する際の電極と圧着用アダプターの間の距離を哺乳類網膜用に改良を加えた。理研での共同開発でシステムが稼働することを確認した後、光刺激を加えたときの光応答からマウス網膜神経節細胞をON型とOFF型に分類する基準を決定した。光刺激はコンピューターディスプレイを用い、ディスプレイの光刺激の強度、コントラスト、刺激頻度等の条件を種々に変化させ、ON型とOFF型を分類するのに適した光刺激の条件を決定した。こうした条件を設定した後、P2X型プリン受容体のアンタゴニストであるPPADSを用いて光刺激に対する網膜神経節細胞の応答をON型とOFF型に分けて検討した。

4. 研究成果

(1) 遺伝子改変マウス網膜コリン作動性アマクリン細胞P2X型プリン受容体応答の電気生理学的解析

ON型とOFF型の両サブタイプで見られるATP応答の大きさが免疫組織化学的観察で得られた免疫反応の強さの差を反映しているのかどうかについて検討を加えた。ATPを急速灌流法で投与し、GABA応答を用いてATP応答を正規化してON型とOFF型でATP応答の大きさを比較したところ、OFF型ではON型に比べて大きな電流応答が観察されることが明らかとなった。

またP2X型プリン受容体のアゴニストやアンタゴニストに対する応答から、P2X2型プリン受容体がOFF型コリン作動性アマクリン細胞特異的に発現していることが明らかとなった。

ATPを投与するとOFF型コリン作動性アマクリン細胞への抑制性シナプス入力が増大が同時に観察された。この抑制性シナプス入力が増大は単離細胞標本でも観察された。ATP投与で生じる抑制性シナプス入力が増大はGABA受容体のアンタゴニストで阻害されたことから、この抑制性シナプス入力はGABAergicなものであると結論した。またP2X型プリン受容体のアゴニストとアンタゴニストを用いたときに観察される抑制性シナプス入力の頻度を指標として受容体サブタイプの同定を行った。しかしながらアゴニストの選択性が低いため、候補として考えられる受容体を数種類に絞り込むことはできたが、受容体サブタイプの同定はできなかった。しかしながら薬理的挙動がP2X2型プリン受容体とは異なることから、OFF型コリン作動性アマクリン細胞へのシナプス前終末からのGABA入力は別のP2X型プリン受容体で制御されていることが考えられた。

(2) 野生型マウス網膜神経節細胞からのマルチ電極法を用いた記録システムの開発

マウス網膜神経節細胞にマルチ電極法を適用し、コンピューターディスプレイの明るさをコンピュータープログラム上で変化させ、網膜に光刺激を行うことでON型とOFF型網膜神経節細胞から光刺激に対する応答を記録することができた。またON型とOFF型からの光応答の記録システムと光応答の解析システムを確立することができた。光応答を記録しながら、P2X型プリン受容体の阻害薬であるPPADSを投与するとON型では発火頻度が減少したが、OFF型では発火頻度が上昇

しかつその発火パターンにも変化が見られた。このことから、網膜神経節細胞の光応答はP2X型プリン受容体を介して経路特異的に調節を受けていることが明らかとなった。

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4件)

1. Kaneda, M., Ishii, T., Hosoya, T. Pathway dependent modulation by P2-purinoceptors in the mouse retina. *Eur. J. Neurosci.*, 28:128-136, 2008. 査読あり
2. Kaneda, M., Ito, K., Morishima, Y., Shigematsu, Y., and Shimoda, Y. Characterization of voltage-gated ionic channels in cholinergic amacrine cells in the mouse retina. *J. Neurophysiol.*, 97:4225-4234, 2007. 査読あり
3. Shigematsu Y., Shimoda Y., Kaneda M. Distribution of immunoreactivity for P2X3, P2X5, and P2X6-purinoceptors in mouse retina. *J. Mol. Histol.*, 38: 369-371, 2007. 査読あり
4. Singh, B., Ogiwara, I., Kaneda, M., Tokonami, N., Mazaki, E., Baba, K., Matsuda, K., Inoue, Y., and Yamakawa, K. A Kv4.2 truncation mutation in a patient with temporal lobe epilepsy. *Neurobiol. Dis.* 24:245-53, 2006. 査読あり

〔学会発表〕(計16件)

1. Ogiwara, I. (他8名) Mutation analysis of the voltage-gated sodium channel β gene in patients with early childhood intractable epilepsies. 38th Annual Meeting of Neuroscience, 2008 Nov. 15-19, Washington DC, USA
2. 荻原郁夫 (他7名) 電位依存性ナトリウムチャンネル β 遺伝子変異を認められたてんかんで発症し難治全般てんかんに変容した1例、日本てんかん学会 2008年10月18-19日、東京
3. 金田 誠 P2X2受容体活性化で発生するマウス網膜コリン作動性アマクリン細胞のコリン電流 平成20年度生理学研究所研究会『病態と細胞外プリン - 治療標的としての可能性を探る』2008年9月4-5日、岡崎市
4. 霜田幸雄 (他2名) マウス網膜P2X2受容体で見られる特異な生後発達様式 平成20年度生理学研究所研究会『病態と細胞外プリン - 治療標的としての可能性を探る』2008年9月4-5日、岡崎市
5. 荻原郁夫 (他9名) 難治性乳幼児てんかんに認められた電位依存性ナトリウムチャンネル β 遺伝子変異、日本人類遺伝学会、2008年9月27-30日、横浜市
6. 金田 誠 (他2名) マウス網膜 P2X2 プリン受容体の発達は視覚入力非依存性である、第31回日本神経科学学会大会、2008年7月9-11日、東京
7. 伊藤 公一 (他5名) 低頻度刺激による海馬苔状線維LTP誘導、第31回日本神経科学学

会大会、2008年7月9-11日、東京

8. 荻原 郁夫 (他4名) ナトリウムチャンネル β 1型サブユニット遺伝子の選択的プロモーター、第31回日本神経科学学会大会、2008年7月9-11日、東京
9. 金田 誠 (他2名) マウス網膜P2X型プリン受容体の生後発達、第85回日本生理学会大会、2008年3月25-27日、東京
10. 霜田 幸雄 (他2名) マウス網膜P2X受容体の生後発達、第30回日本神経科学学会大会、2007年9月10-12日、横浜市
11. 金田 誠 (他4名) プリン受容体を介するマウス網膜 OFF 経路特異的なシナプス出力調節機構、第84回日本生理学会大会シンポジウム、2007年3月20-22日、大阪市
12. Kaneda, M. (他4名) Pathway Specific Signal Modulation by P2X-Purinoreceptors in the mouse retina., 36th Annual Meeting of Neuroscience, 2006 Oct. 14-18, Atlanta, Georgia, USA
13. 金田 誠 (他4名) P2X受容体を介したマウス網膜における経路特異的な応答の修飾、平成18年度生理研研究会「Neuro-glio-vascular interactionにおけるプリン作動性シグナリングの病態生理的機能」、2006年9月7-8日、岡崎市
14. Kaneda, M. (他4名) Pathway Specific Signal Modulation by P2X-Purinoreceptors in the Parallel Processing System of the Mouse Retina., 4th Asian Conference of Vision, 2006. July 28-Aug. 1, Matsue, Shimane pref.

15. 金田 誠 (他4名) プリン受容体を介した
並列信号処理系における経路特異的な調節、
第29回日本神経科学学会大会、2006年7月
19-21日、京都市

16. 山川 和弘 (他8名) 側頭葉てんかん患
者で見いだされたAタイプカリウムチャンネル分断
変異、第29回日本神経科学学会大会、2006年
7月19-21日、京都市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金田 誠 (KANEDA MAKOTO)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：30214480

(2) 研究分担者

金子 章道 (KANEKO AKIMICHI)
(平成19年度まで)
畿央大学大学院・健康科学研究科・教授
研究者番号：00051491

(3) 連携研究者

霜田 幸雄 (SHIMODA YUKIO)
東京女子医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00051871