

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06900

研究課題名(和文) 2種類の方位選択性網膜神経節細胞の機能における差異の同定を目指して

研究課題名(英文) Aiming to identify functional differences between two types of directionally selective retinal ganglion cells

研究代表者

星 秀夫 (Hoshi, Hideo)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：30568382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：方向選択性を示す2種類の神経節細胞を発見した。1つはギャップ結合を持つ神経節細胞で、もう1つはギャップ結合を持たないものであった。網膜では、これまで1つの視覚機能は1つの神経節細胞がその役割を担っていると考えられていた。これら2つの神経節細胞が作る局所神経回路を形態学的に解析した。両細胞とも同じON型双極細胞(Mb1)からの興奮性入力を受けていたが、抑制性入力するアマクリン細胞に違いがあることを示す知見を得た。さらに本研究で、両細胞とシナプス結合するMb1の新経路を示唆する知見を得た。本研究では、どのようにその機能を切り分けているのかはまだわかっていない。今後の課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シナプス結合には、化学シナプスと電気シナプスの2種類がある。神経細胞のギャップ結合は、発生過程で消失すると考えられているが、網膜神経細胞では成長後も豊富に存在し続けている。その生物学的意義は不明であった。本研究では、同じ機能を持つ2種類の細胞を発見した。これはギャップ結合を持つ細胞と持たない細胞という差異があった。外界の環境変化に柔軟に対応するために、網膜では同じ機能を持った2種類の細胞準備し、巧みに使用する細胞を使い分けている可能性を示唆するものであり、ギャップ結合の生物学的意義の1つとして非常に重要である。

研究成果の概要(英文)：We identified that two types of ganglion cells showed the directional selectivity: one with gap junctions and the other without gap junctions. In retina, one visual function had previously been thought to be served by a single ganglion cell. The local neural circuitry created by these two ganglion cells was analyzed morphologically. We found that both cells received excitatory input from the same ON-type bipolar cell (Mb1), but that there were differences in the amacrine cells that provide inhibitory input. Furthermore, our findings might suggest a new pathway for Mb1 to synapse with both cells.

研究分野：解剖形態学

キーワード：網膜 神経節細胞 双極細胞 アマクリン細胞 ギャップ結合

1. 研究開始当初の背景

方位選択性は、外界の視覚情報の中から、特定の傾きにのみ応答する性質であり、大脳や網膜などで確認されている。この機能の生成機序は、視覚情報処理のメカニズムを調べるための最適なモデルとして用いられているが、まだ不明な点が多い。

私たちは以前、脊椎動物のキンギョ網膜で、新規の ON-OFF 型神経節細胞を発見し、論文を報告した

(Hoshi and Sato. *J Comp Neurol*. 2018). 網膜神経節細胞の樹状突起が作り出す領域(樹状領域)は、網膜内のどの場所でも、大きな楕円形(長径約 2mm)を示し、かつ全てが同じ傾きを示していた(図 1)。しかし、この大きな楕円形の樹状突起を持つ神経節細胞の視覚機能はまだ明らかになっていない。

形は機能を現す。過去に私たちはこの大きな楕円形の神経節細胞と同様に、一定方向に樹状突起を広げる形態を持つ神経節細胞をウサギ網膜で発見した(Hoshi and Mills, *J Comp Neurol*, 2009)。その後、別のグループが、私たちが発見した神経節細胞と相同の神経節細胞をマウスで発見し、それが方位選択性を示すことを明らかにした(Nath and Schwartz, *Nat Commun.*, 2017)。このような研究の流れから、今回キンギョ網膜で発見した大きな楕円形の神経節細胞は方位選択性を示すだろうと推測できる。

私たちは、過去にウサギの網膜を用いて神経節細胞のギャップ結合をサブタイプごとに解析していた。その研究途中で、ON 型方向選択性を持つ 2 つの神経節細胞を発見した(Hoshi et al., *J Comp Neurol.*, 2011)。この 2 つの神経節細胞は形態学的に大きな違いを持っていた。それは 1 つはギャップ結合を持つ細胞で、もう 1 つはギャップ結合を持たない細胞であった。これはウサギ網膜だけに特有のものなのか、それとも種によらず共通したものなのかは不明であった。

一般的にギャップ結合は神経では発達に伴い消失するものと考えられているが、網膜では大人(アダルト)でもギャップ結合を豊富に保持し続けている。この生物学的意義は不明である。私たちがウサギ網膜で発見した ON 型方向選択性という同じ機能を持つ神経節細胞が 2 種類あることが違う動物種でも見られるのであれば、それはギャップ結合の未知の生物学的意義の解明につながる可能性がある。

私たちは最近、論文で報告した神経節細胞とは別の小さな細胞で、方位選択性を示した神経節細胞をキンギョ網膜で発見した。つまり、現在私たちはキンギョ網膜でも、2 種類の神経節細胞が方位選択性を示す可能性を考えている。

哺乳類のウサギ網膜と同様に、キンギョ網膜でも方位選択性を持つものにギャップ結合の有無の形態学的違いを持つのかは不明である。本研究では、それを明らかにしたい。

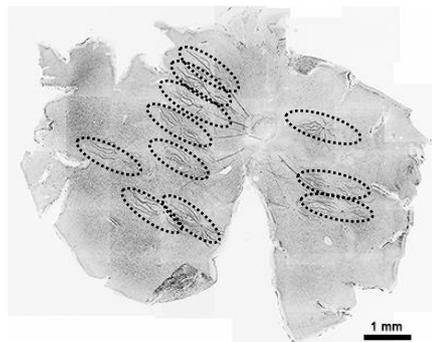


図 1 細胞内色素注入した神経節細胞の樹状突起が大きな楕円形の領域(点線)を示した。全ての樹状領域が同じ傾きを示し。スケールバーは 1mm。

The morphological characterization of orientation-biased displaced large-field ganglion cells in the central part of goldfish retina. (Cover)

Hoshi H(責任筆者), Sato F *J Comp Neurol* 526(2) 243-261 (2018)

Two distinct types of ON directionally-selective ganglion cells in the rabbit retina. (Cover)

Hoshi H, Tian LM, Massey SC, Mills SL. *J Comp Neurol* 519 2509-2521 (2011).

2. 研究の目的

- 1) 私たちが発見した大きな楕円形の神経節細胞が方位選択性を示すのかを明らかにする.
- 2) ウサギ網膜と同様に違う動物種 (キンギョ) でも同じ機能を持つ細胞が 2 種類存在するのだろうか. そしてそれはギャップ結合を持つものと持たないものに切り分けられるのだろうかを明らかにする.
- 3) 2 種類の神経節細胞が方位選択性という視覚機能においてどのように使い分けされているのかを明らかにする. ギャップ結合の生物学的意義の解明につながる可能性がある.

3. 研究の方法

1) 実験動物

キンギョ (*Carassius auratus*, 体長 8-10cm) を実験動物として使用した. 東邦大学実験動物取扱規定に従い, 承認番号 (動承 23-529) を得た後に実験を行った.

2) 逆行性輸送による神経節細胞の標識とアマクリンと双極細胞の同定

2種類の神経節細胞を同定するために逆行性標識を行った. 麻酔下 (MS222) で眼球を摘出し, 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. キンギョ用リンガー液に浸漬し静置した. 浸漬後, 硝子体液を除去し, 網膜を剥離した. 神経節細胞側を上にしてメンブレンフィルターに載せ, 95%O₂/5%CO₂ でバブリングしたリンガー液灌流装置のある正立型の落射蛍光顕微鏡下 (Olympus 51, Olympus) に設置した. 逆行性標識では神経節細胞のみが標識される. 顕微鏡にIR-CCDカメラを設置し, 神経節細胞よりも深層にあるアマクリン細胞や双極細胞を細胞の輪郭から同定した. これはトレーニングで成功率が高くなる.

3) 細胞内色素注入

2種類の色素 Lucifer Yellow と Neurobiotin を混合して用いた. 電流 (IE-251A, Warner) を流して色素を注入した. 色素注入後, 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 : 500 Cy3-streptavidin に一晚浸漬した. 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 VECTORSHILD (VECTOR) を塗布し封入した.

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, LSM880 ; Zeiss) を用いて画像の取得を行った. 画像は ImageJ (FIJI) で定量解析した.

6) パッチクランプによる機能解析

大きな楕円形の神経節細胞の活動電位を、パッチクランプ法を用いて、膜電流固定下で記録する。まず光刺激として、スポット光のサイズを変えて神経節細胞に呈示し、受容野サイズを決める。次に、受容野サイズに合わせて、45度ずつ、8方向から(45度×8=360度)、細胞体を通過するように、動く光刺激 bar を呈示するか、または細長い光刺激 bar を45度ずつ回転させて呈示して、方位選択性を示すのかを明らかにする。

4. 研究成果

1) 発見した大きな神経節細胞の機能

パッチクランプ法を用いた実験でこの神経節細胞が方位選択性を示す所見を得た(N=3)。私たちのこれまでの実験で、この大きな楕円形の神経節細胞はギャップ結合を通過する色素である Neurobiotin を注入すると、この神経節細胞は、同じサブタイプの神経節細胞同士とトレーサーカップリング(ギャップ結合の証明)でつながることがわかっている(Hoshi and Sato, *J Comp Neurol*, 2018)。

2) ウサギ網膜と同様に方位選択性を持つギャップ結合を持たない細胞は存在するのか

パッチクランプ法を用いた実験で、この大きな楕円形の神経節細胞とは全く形態が異なる別の小さな樹状領域(直径約 300 μ m)を持つ神経節細胞から、方位選択性を示す所見を得た(N=15)。この結果は、同じ方位選択性を持つ神経節細胞が2種類存在し、その2種類がウサギ網膜と同様に、一方はギャップ結合を持つもの、もう一方はギャップ結合を持たないものであった。つまり、ウサギ網膜だけでなくキンギョ網膜でも同様の結果を得たことになり、種によらず共通したものだと考えられる。これはアダルトでもギャップ結合を豊富にもつ網膜の重要な生物学的意義につながる可能性がある。

3) 2種類の神経節細胞が方位選択性という視覚機能において、どのように使い分けされているのか

これは本研究では明らかにすることができなかった。今後の課題である。

私たちは、この2種類の神経節細胞と局所神経回路を作る双極細胞とアマクリン細胞を形態学的に調べた。

大きな楕円形の神経節細胞は ON 型双極細胞(Mb1)が異所性にシナプス結合するだろうという所見を共焦点顕微鏡で得ており、既に報告済みである(Hoshi and Sato, *J Comp Neurol*, 2018)。方位選択性を示した小さな神経節細胞も同様に Mb1 の入力があるのかを形態学的に調べた。PKC 抗体を用いて、Mb1 を標識し、リボンシナプスをシナプスマーカーとして用いた結果、異所性ではなく、軸索末端でシナプス結合していること示す知見を得た(未発表のため Data not shown)。

次にアマクリン細胞からの入力様式を形態学的に調べた。大きな楕円形の神経節細胞と小さな神経節細胞の両方に ChAT 抗体で標識されたスターバーストアマクリン様細胞(キンギョでは詳細な報告はまだないため、「様」とした)との近接様式をみると、大きな楕円形の神経節細胞は、接触はしているものの、一部分のみの接触にとどまっており、他のアマクリン細胞からの入力があることを推測させるものであった。一方、小さな神経節細胞の方は、ChAT で標識されたプロセスと密接に接触していた。

大きな楕円形の神経節細胞に他のアマクリン細胞が接触するのかを調べるために、過去に方

向選択性アマクリン細胞と報告されていたアマクリン細胞に直接色素を注入し、接触様式を確認すると、大きな神経節細胞と接触している所見を得た（図2）。さらに、別のアマクリン細胞とも大きな楕円形の神経節細胞は接触している所見を得た。この細胞はとても大きな樹状突起の領域（1mm以上）を持つ、放射状に広がるプロセスを保持しているアマクリン細胞であった（未発表のため Data not shown）。

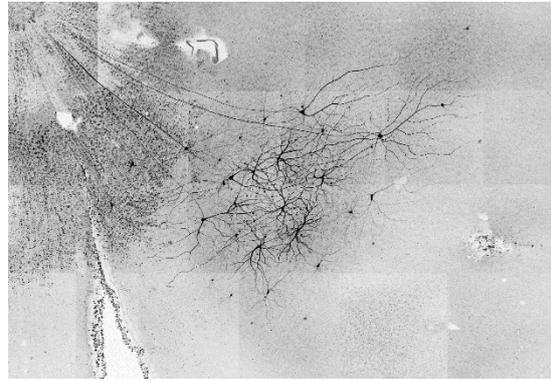


図2 細胞内色素注入した方向選択性アマクリン細胞

4) 2種類の神経節細胞とシナプス結合様構造を持つ Mb1 の新経路

ON型双極細胞（Mb1）は樹状突起側で周囲の Mb1 とギャップ結合を介してつながっていることが報告されている（Arai et al., J Neurosci 2010）。この報告の中で、Mb1 は軸索末端ではギャップ結合を持たないとされている。

私たちは、今回新たに Mb1 が軸索末端側に経路を作り出していることを示唆する所見を得た（未発表のため Data not shown）。これを論文化し、上記の結果と総合して網膜神経回路の柔軟な変化を解析する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 星秀夫、狩野修、佐藤二美	4. 巻 100
2. 論文標題 網膜はParkinson病の早期診断に利用できるのか	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 脳神経内科	6. 最初と最後の頁 274-279
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 星秀夫、須藤則広、川島友和、佐藤二美
2. 発表標題 共焦点顕微鏡を用いたキングヨ網膜双極細胞のシナプス様構造の解析
3. 学会等名 第128回 日本解剖学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 須藤則広、藤枝弘樹、加藤万希、星秀夫、佐藤二美
2. 発表標題 網膜ミュラー細胞におけるp27Kip1の転写制御機構の解析
3. 学会等名 第128回 日本解剖学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 星秀夫、清水一彦
2. 発表標題 共焦点顕微鏡で新たに発見したキングヨ網膜双極細胞の軸索末端構造
3. 学会等名 第157回東邦医学会例会， 東邦大学医学部（大森、日本）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 星秀夫、狩野修、佐藤二美	4. 発行年 2022年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 7
3. 書名 Annual Review 神経2022	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	狩野 修 (Kano Osamu) (20459762)	東邦大学・医学部・教授 (32661)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------