

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09838

研究課題名(和文)遊離D-グルタミン蓄積による網膜神経細胞および神経回路修飾の生理学的解析

研究課題名(英文)Physiological analysis of retinal neuronal modifications induced by D-glutamine accumulation

研究代表者

大熊 真人(OHKUMA, Mahito)

藤田医科大学・医学部・講師

研究者番号：50329710

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)：網膜神経細胞の情報修飾について、Dアミノ酸を軸に生理学的な測定を行った。アカハライモリ網膜の神経細胞においてDグルタミンの細胞外投与時に電位依存性内向き電流の振幅が減少し、閾値付近の小さな刺激では活動電位が発生しなくなる現象が見られた。一過性の内向き電流を持つ三次ニューロン(神経節細胞)において、Dグルタミンの細胞内への投与により遅延整流性の外向き電流の有意な増加が記録できた。また、その他の物質による網膜情報伝達への修飾効果も、シナプスでのグルタミン酸放出を指標として確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網膜の神経細胞において、Dグルタミンの存在下および細胞内投与により電位依存性電流に変化が見られた結果から、Dアミノ酸の細胞内蓄積による光情報伝達の修飾・抑制が示唆される。また、グルタミン酸の可視化法を応用して、修飾物質による情報伝達物質の放出の動向を直接調べることができた。この結果、妊娠中に性ホルモンにより網膜レベルで視覚情報伝達が修飾される可能性が示唆されたことは学術的のみならず社会的な意義もあると考えている。

研究成果の概要(英文)：I conducted physiological measurements to investigate how information processing in retinal neurons is affected by D-amino acids. In newt retinal neurons, perfusion of D-glutamine reduced the amplitude of voltage-dependent inward currents. Furthermore, small stimuli near the threshold no longer elicited action potentials. Intracellular administration of D-glutamine in retinal third-order neurons significantly increased the amplitude of delayed rectifier outward currents. Additionally, I performed an enzyme-linked fluorescent assay to visualize extracellular glutamate concentrations and confirmed the effects of other substances on retinal information transmission.

研究分野：神経生理学

キーワード：網膜細胞 パッチクランプ 画像解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アミノ酸には光学異性体であるL型とD型が存在する。生体はLアミノ酸で構成され、Dアミノ酸は存在しないと考えられていたが、近年 想定よりも多いDアミノ酸が体内及び食品内で検出されるようになってきた。また網膜ではグルタミン酸代謝経路の解明のため、組織内にDグルタミン酸を取り込ませ追跡する研究が行われ、代謝された遊離Dグルタミンが一部の神経節細胞や双極細胞で蓄積されることが報告されていた(文献)。組織に蓄積されたDアミノ酸の効果は不明のため、網膜をモデル系としてDアミノ酸の生理的効果の検証を計画した。また当時 研究室で確立していた、酵素反応を利用してグルタミン酸を可視化する enzyme-linked fluorescent assay 法を応用して、網膜スライス標本からのグルタミン酸の放出を指標とした情報修飾物質の検索や効果の確認も企画した。

### 2. 研究の目的

#### (1) Dアミノ酸による網膜神経細胞の興奮修飾効果の検討

網膜神経細胞の興奮に影響するDアミノ酸を探索し、その存在下ではどのような変化が起こるかを電気生理学的な手法により確認した。特にDグルタミンに着目し、細胞内外に存在する場合それぞれの検証を試みた。

#### (2) 網膜神経細胞のグルタミン酸放出に影響する物質の検索

網膜神経細胞の主な情報伝達物質はグルタミン酸である。電気生理学とは異なる グルタミン酸の可視化法を利用したアプローチで、実際のグルタミン酸放出に影響する修飾物質を確認した。網膜のシナプスが存在する内外網状層からのグルタミン酸放出の変化を検証した。

### 3. 研究の方法

#### (1) パッチクランプ

ホールセルパッチクランプ法で、電位固定条件での電位依存性電流記録および電流固定条件での活動電位記録を行った。測定試料は、細胞体が大きく種々の操作が容易なアカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*) の網膜細胞を用いた。摘出したイモリ網膜を Papain で酵素処理し、網膜細胞を単離した後、Concanavalin A により記録チャンバーに固定し測定した。ガラス電極を細胞膜に密着させ、ギガオームシール状態で陰圧により穴をあけて電気記録を行った。電位固定条件 (voltage-clamp) では膜電位を  $-100$  mV に保持し、 $+40$  mV までの脱分極刺激を加えてイオン電流を測定した。電流固定条件 (current-clamp) では、 $10$  pA 毎 段階的に電流を注入し、活動電位を記録した。Dアミノ酸刺激は、1) 濃度  $100$   $\mu$ M でLグルタミン, Dグルタミン酸, Dグルタミンを細胞外液に灌流投与、2)  $10$   $\mu$ M Dグルタミンを加えた細胞内液をガラス電極内に入れ、ホールセルになった時点から経時的に記録の、2つの方法で投与した。

#### (2) Enzyme-linked fluorescent assay

網膜細胞の主要な情報伝達物質であるグルタミン酸を直接捉えるため、酵素反応を応用して蛍光測定を行う enzyme-linked fluorescent assay 法を網膜試料に適用した。酵素であるグルタミン酸デヒドロゲナーゼによりグルタミン酸は ケト-グルタレートに変換されるが、その際 NAD が NADH に変換される。この NADH は、 $360$  nm 付近の紫外線を照射されると  $500$  nm 付近の蛍光を発するため、この蛍光を指標にすることでグルタミン酸の放出を間接的に可視化できる(文献)。C57BL/6J マウスから単離した網膜を  $200$   $\mu$ m 厚でスライスし、測定チャンバー内で細胞外液を灌流させた。励起光は石英スライドの横から照射し、試料のうちスライドに接する部分が主に励起されるようにした。網膜試料の自家蛍光を退色させてから刺激を加え、蛍光変化を記録した。

### 4. 研究成果

#### (1) Dアミノ酸の細胞外投与による影響

網膜細胞に影響するDアミノ酸を調べるため、ホールセルパッチクランプ法による電位依存性電流の測定を行い、アミノ酸の効果を検証した。単離した網膜神経細胞は、脱分極刺激に対して内向き電流とその後の外向き電流の応答波形を示した。細胞外液にLグルタミンを投与しても神経興奮に関わる内向き電流には有意な変化は見られなかった。次にDアミノ酸の1つであるDグルタミン酸を投与すると、内向き電流の振幅は投与前よりわずかに減少する傾向を示した。さらに、末端アミノ基の異なるDグルタミンを投与したところ、内向き電流は有意に減少した(図1)。また、電流固

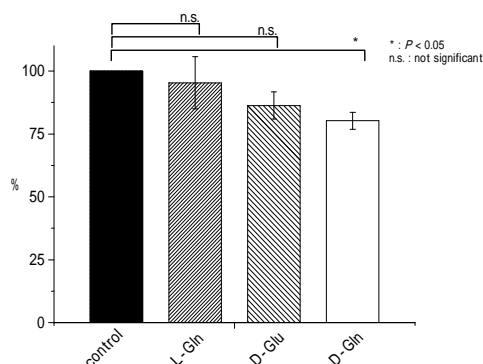


図1 内向き電流の変化率

定条件で、標準外液中で活動電位が発生する最小の電流刺激を確認し、Dグルタミン投与後に再度刺激したところ、同じ刺激では活動電位が発生しなくなった。遊離Dグルタミン存在下では網膜神経細胞の電気応答が修飾される可能性が示唆された。

#### (2) 網膜神経細胞へのDグルタミンの細胞内投与

Dグルタミンの網膜細胞内への蓄積効果を確認するため、Dグルタミンを加えた記録電極でのパッチクランプ測定を行った。ホールセルになった時点から脱分極刺激による電位依存性電流を経時的に記録し、細胞内にDグルタミンが蓄積された条件を模したところ、内向き電流を持つ網膜細胞では記録から1分程度で遅延整流性外向き電流の振幅が有意に増加した(13.0%; 図2)。しかし内向き電流が見られない試料では、有意な外向き電流の振幅変動は見られなかった(<10%)。イモリ網膜細胞では主に三次ニューロンにあたる神経節細胞が電位依存性内向き電流を持つ。Dグルタミンが神経節細胞に蓄積されると、抑制的に働く可能性が示唆された。

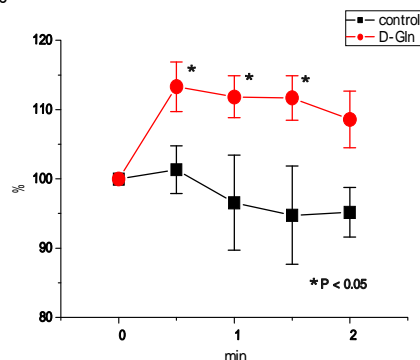


図2 Dグルタミンの細胞内投与による外向き電流の変化率

#### (3) グルタミン酸可視化法による網膜での性ホルモンの効果

電気生理学的なアプローチ以外で網膜における情報伝達の修飾効果を検証するため、また哺乳類網膜における情報修飾効果を確認するため、マウス網膜スライス試料を用いて enzyme-linked fluorescent assay 法による蛍光画像解析を試みた。しかし、グルタミン酸可視化法での測定にグルタミン酸などによる刺激を使用することは困難であった。そこで細胞内への蓄積効果を確認する例として性ホルモン(ステロイドホルモン)による刺激を試みたところ、黄体ホルモンであるプロゲステロンを雌マウス網膜試料に投与した際に蛍光の変化が検出できた。網膜においてシナプスが形成されている内網状層(IPL)および外網状層(OPL)の領域では1 μM プロゲステロンの投与に応じて蛍光強度が増加した(図3)。卵胞ホルモンであるエストロゲンや男性ホルモンであるテストステロンの投与では蛍光強度は増強されなかったが、TRPMチャンネルのアゴニストである pregnenolone sulfate の投与では蛍光強度の増強が確認された。また雄マウスの網膜試料でもプロゲステロンにより蛍光強度は増加したが、雌マウス試料ほど有意な効果は見られなかった。プロゲステロンは卵巣や副腎皮質で作られ、ヒトでの妊娠時の血中濃度は190 ng/mL (0.6 μM) に達する。ヒトでは妊娠中の視覚変化について報告がありそのメカニズムが不明であったが、本研究から妊娠中には性ホルモンにより網膜レベルで視覚情報伝達が修飾される可能性が示された。この成果は主目的のDアミノ酸によるものではないが、網膜での光情報伝達が修飾物質によって変化する内容から同種の研究として着目して進め、最終年度に双極細胞と神経節細胞の間のグルタミン酸作動性シナプスの活性をプロゲステロンが増加させる内容で、研究成果を公表できた(文献)。

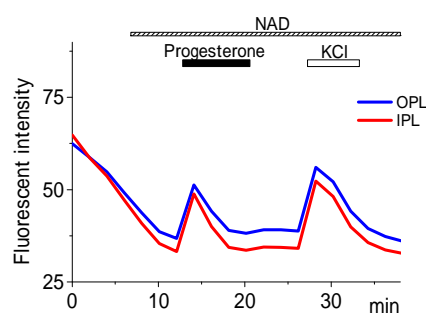


図3 グルタミン酸可視化結果

#### (4) その他

本研究での手法・機器を応用して、ヒト網膜双極細胞や虹彩培養細胞などでの生理学的測定を行い、電位依存性ナトリウムチャンネルの発現確認や機能解析を得た。本研究の技術や知見を網膜研究における種々の課題に活用できたと考えている。

#### <引用文献>

- D V Pow, D K Crook, Direct immunocytochemical evidence for the transfer of glutamine from glial cells to neurons: use of specific antibodies directed against the d-stereoisomers of glutamate and glutamine. *Neuroscience*. 1996; 70(1):295-302. doi: 10.1016/0306-4522(95)00363-n.
- M Ohkuma, M Kaneda, S Yoshida, A Fukuda, E Miyachi, Optical measurement of glutamate in slice preparations of the mouse retina. *Neurosci Res*. 2018; 137:23-29. doi: 10.1016/j.neures.2018.03.001.
- M Ohkuma, T Maruyama, T Ishii, N Igarashi, K Azuma, T Inoue, R Obata, E Miyachi, M Kaneda, Effects of Progesterone and Other Gonadal Hormones on Glutamatergic Circuits in the Retina. *J Nippon Med Sch*. 2023; 90(4):333-345. doi: 10.1272/jnms.JNMS.2023\_90-405.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ohkuma Mahito, Maruyama Takuma, Ishii Toshiyuki, Igarashi Nozomi, Azuma Keiko, Inoue Tatsuya, Obata Ryo, Miyachi Ei-ichi, Kaneda Makoto	4. 巻 90
2. 論文標題 Effects of Progesterone and Other Gonadal Hormones on Glutamatergic Circuits in the Retina	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Nippon Medical School	6. 最初と最後の頁 333 ~ 345
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1272/jnms.JNMS.2023_90-405	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Hiramatsu Noriko, Yamamoto Naoki, Ohkuma Mahito, Nagai Noriaki, Miyachi Ei-ichi, Yamatsuta Kumiko, Imaizumi Kazuyoshi	4. 巻 55
2. 論文標題 Iris-derived induced pluripotent stem cells that express GFP in all somatic cells of mice and differentiate into functional retinal neurons	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 292 ~ 303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00795-022-00330-z	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Kawata Miho, Kodani Yu, Ohkuma Mahito, Miyachi Ei-ichi, Kaneko Yoko S., Nakashima Akira, Suga Hidetaka, Kameyama Toshiki, Saito Kanako, Nagasaki Hiroshi	4. 巻 17
2. 論文標題 Long-range axonal projections of transplanted mouse embryonic stem cell-derived hypothalamic neurons into adult mouse brain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0276694
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0276694	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kawai Fusao, Ohkuma Mahito, Horiguchi Masayuki, Ichinose Hiroshi, Miyachi Ei-ichi	4. 巻 202
2. 論文標題 A subset of cone bipolar cells expresses the Na <sup>+</sup> channel SCN2A in the human retina	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Eye Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exer.2020.108299	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Yamamoto Naoki, Hiramatsu Noriko, Ohkuma Mahito, Hatsusaka Natsuko, Takeda Shun, Nagai Noriaki, Miyachi Ei-ichi, Kondo Masashi, Imaizumi Kazuyoshi, Horiguchi Masayuki, Kubo Eri, Sasaki Hiroshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Novel Technique for Retinal Nerve Cell Regeneration with Electrophysiological Functions Using Human Iris-Derived iPS Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10040743	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大熊真人, 金田誠, 宮地栄一
2. 発表標題 Enzyme-linked photo-assayによる性ホルモン投与時のマウス網膜グルタミン酸動態の解析
3. 学会等名 第69回中部日本生理学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------