

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700465

研究課題名(和文) 網膜で行われる「動きの予測」機能を生み出す神経回路の解明

研究課題名(英文) A retinal circuit provides a motion anticipation

研究代表者

星 秀夫 (HOSHI, Hideo)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：30568382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：網膜は「運動検出の予測」という高次機能を行っていることが既に報告されている。しかしその高次機能を作り出す機序はまだわかっていない。そこで私はヒトの視覚心理学実験でよく用いられる錯視を光刺激として利用し、網膜神経節細胞からそれに対する電気応答を記録し、同時に得た形態情報を解析することで、網膜神経回路内のギャップ結合がこの高次機能に寄与していることを明らかにした。さらに、同機能を行う神経節細胞は1種類の細胞だけでなく、いくつかのサブタイプの細胞でも同様に行われていたことが示唆された。これは『1サブタイプ=1機能』と考えられていた従来の通説とは異なる結果であった。

研究成果の概要(英文)：It had already been reported that the retina had performed the motion anticipation, like a visual cortex. However, the mechanism to cause the motion anticipation in retina, not a brain, is not identified yet. Here, I used the optical illusion movie that has been used in the visual psychological research as a light stimulation to identify the mechanism. My electrophysiological and anatomical data suggest that the gap junction in retinal circuit should contribute to cause the motion anticipation in the goldfish retina. Interestingly, the several subtypes of retinal ganglion cells showed the same function. Conventionally, we have believed that one retinal ganglion cell subtype had a one function. This research might provide the new concept in retina.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学，神経・筋肉生理学

キーワード：視覚 神経節細胞

1. 研究開始当初の背景

網膜における視覚情報処理過程は、単に高次視覚野に情報を送るためのプレフィルタ一としてとらわれがちであったが、実はそうではなかった。網膜は私たちが考えていたよりも高度な仕事をしていたのである

(Gollisch and Meister, *Neuron*, 2010). 網膜の最終出力細胞である神経節細胞は、その形態学的・機能的な性質の違いからいくつかのサブタイプに分類されている。そしてそのそれぞれが視覚に関する異なる側面を、違う「スパイク発火タイミング」や「スパイク発火頻度」などを巧みに利用して、別々の視覚情報を脳へ送っている(「1サブタイプ=1機能」説 (Masland, *Nat. Neurosci.*, 2001) と考えられている。

近年、網膜(無意識下)で、既に「動きの予測」という機能を持っていることが報告された (Berry et al. *Nature*, 1999). 網膜以降の高次中枢でもっばら行われていると思われていた「動きの予測」という仕事を、視覚情報処理の初期段階である網膜が行っていたことは非常に興味深い。しかし、この仕事を行っているのは、どのサブタイプの神経節細胞なのかかわかっていない。また、この先行研究が出てから15年以上になるが、そのメカニズムが全くわかっていない。

2. 研究の目的

本研究期間では、「動きの予測」を説明するために、再現実験(0)を除いて、次の3点に焦点を絞って実験を行う。

(0) 本当に網膜で「動きの予測」が行われるのかの再現実験

(1) 複数のサブタイプの神経節細胞が持つ機能なのか?

(2) 双極細胞間のギャップ結合が関与する現象が見られるのか?

(3) 双極細胞の働きを調節するアマクリン細胞の影響はこの機能に関与するのか?

代表者は、「動きの予測」を引き起こすためには、網膜神経回路内での効率の良い側方向への情報の伝播が鍵を握ると考えている。本研究では、双極細胞の持つギャップ結合を利用した興奮性シグナルの側方向への伝播に注目する。代表者が以前所属していた研究室から、ギャップ結合に関する新たな概念が報告されており (Arai et al., *J Neurosci*, 2010), この概念が網膜が行う高次機能に関連するものと考えている。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

本研究では、キンギョ(ワキン: *Carassius auratus*) の剥離網膜標本を用いて実験を行った。実験動物の使用方法については、東京大学実験動物プロトコールおよび、東邦大学実験動物プロトコールに従った。

(2) 細胞電気記録(ホールセルクランプ) 再現実験から本実験に際し、神経節細胞からの光刺激応答をホールセルクランプ法を用いて記録した。膜電流固定化で保持電流を0 pAに設定し、神経節細胞の活動電位を開始した。

「動きの予測」現象を確認するための光刺激のパターンはMATLAB(Mathworks)で作したものを使用した。本研究では、「動きの予測」現象を考慮した錯視を利用した。なお、光刺激の各種較正は、視覚心理学の研究で用いられるものに準じて行った。

(3) 形態観察

① 実験終了後、顕微鏡の落斜蛍光装置を使ってLucifer yellowによる形態観察を行い、細胞体の形、核の大きさ・位置、樹状突起の広がり、軸索・樹状突起がのびている位置・方向などの観察を行った。また、記録用電極にはLucifer yellowと同時に分子量の小さいNeurobiotinも混ぜ、組織固定後に細い細胞樹状突起の先端を詳細に確認した。

② 電気生理実験後の色素の広がりを確認する実験とは別に、細胞内色素注入法を行った。

(4) 解析

① 細胞電気応答の解析

本研究で行った電気生理学的実験によって得られたデータは、Igor Pro (Wavemetrics; ver 5.05) を用い解析した。

② 形態解析

共焦点顕微鏡(NikonA1, Zeiss 510META)を使用して記録細胞の形態写真を撮影した。記録した細胞の樹状突起の先端の層から細胞体の層まで観察深度を変え連続した画像を取り込み、重ね合わせた画像を記録細胞の形態写真として解析に用いた。写真はPhotoshop(Photoshop CS; Adobe)を用いて、コントラストと明るさを調整した。写真画像はコンピュータソフトウェア(Nikon; NIS-Elements)に取り込んで解析を行った。このソフトを用いて、細胞ごとに画像上の樹状突起の先端をプロットしていくことによって樹状突起の面積および相対的な直径などを算出した。

4. 研究成果

(1) 再現実験と神経節細胞の分類

最終的に現象を再現することに成功した。しかし、先行研究に準じて行った実験では全く再現することが出来なかった(N=76で再現例ゼロ)。そこで電気応答を記録した細胞の形態画像と電気記録を比較しなおし、さらに先行研究のデータ解釈方法を見直した。その結果、光刺激方法の改良が必要であるということを示唆するデータが得られた。キンギョ網膜神経節細胞の形態を詳細にみると、同一の細胞サブタイプでも、その細胞が存在する部位によって、様々な細胞形態を示すことがわかった。それを考慮した光刺激が必要であつ

た。また、キンギョでは従来報告されていなかった新規の神経節細胞も発見することができた。この細胞は代表者が以前、ウサギ網膜で発見していた新細胞 Diving cell (Hoshi et al., *J Neurosci* 2009; Hoshi et al., *J Comp Neurol* 2013,) と同様の形態をしており、まだ機能がわかっていないこの新規神経節細胞が種は違えども脊椎動物で共通して保持していることがわかった。本研究では、実験で記録した細胞の大きさを直径 400 μm 以下に限定した。なぜなら、ホールセルクランプで細胞を膜電位固定、膜電流固定したのだが、これ以上の大きさになると、膜電位・膜電流固定ができない状態（スペースクランプができない）となり、安定したデータが得られなかったからである。細胞の大きさを限定したことにより、安定した記録が可能となった。しかし、中心部では円形に樹状突起を広げていた神経節細胞が、網膜周辺部では大きく楕円形に樹状突起を広げることがわかっている。つまり、今回の研究では、樹状突起の張る面積が大きい、それらの細胞からの電気応答と形態のデータを得ることができず、神経節細胞の分類が不完全な状態となっている。早急に方法の改善が必要であった。そこでまず本研究期間中に新たに細胞内色素注入が行えるセットアップを完了した。すでにキンギョ網膜神経節細胞にこの方法を行うための各種パラメータを得ることに成功している。実際に、これまで代表者はウサギ網膜を用いて同方法を得意としていた。しかし、ウサギ網膜と同様のパラメータを用いることができず、最適なパラメータ値を得るのに時間がかかってしまった。今後の研究で詳細な形態分類を完成させたい。

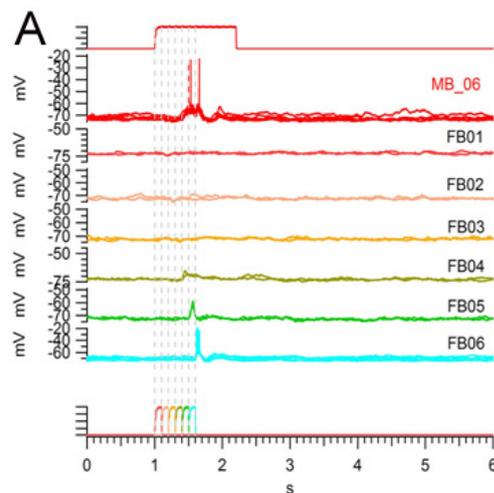
上述したことにより、改良した光刺激方法を用いることで、代表者の実験及び、先行研究に対する解釈方法の疑問が解決された。注目すべき点は網膜神経節細胞から脳へ送る際に利用される「スパイク列」の解釈方法である。先行研究では「スパイク発火頻度」に注目していたが、代表者は「スパイク発火タイミング」に注目した。先行研究の内容で「スパイク発火タイミング」に注目するとこの現象は得られないと示唆される。つまり、本研究により、より確実に網膜で「動きの予測」が行われていたことを証明できたことになると考えられる。

(2) 本研究の成果

① 運動刺激の方がフラッシュ刺激より早くスパイク発火した。

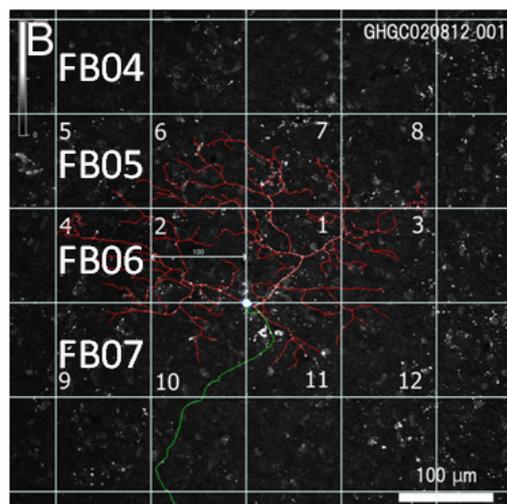
ホールセルクランプ法の膜電流固定下でスパイク発火を記録した。下図Aで、MB_06が運動刺激時の応答タイミングを示す。FB01からFB06がフラッシュした静止刺激時の応答タイミングを示す。静止刺激では、FB06からスパイク発火がみられた。FB04とFB05は閾値以下の脱分極だけがみられた。運動刺激時MB_06と静止刺激時FB06の発火タイミン

グを比較すると、同一部位の刺激であるにも関わらず、運動刺激のMB_06の方が早くスパイク発火していることがわかった。



② 受容野は双極細胞からの興奮性入力を作る領域より大きかった。

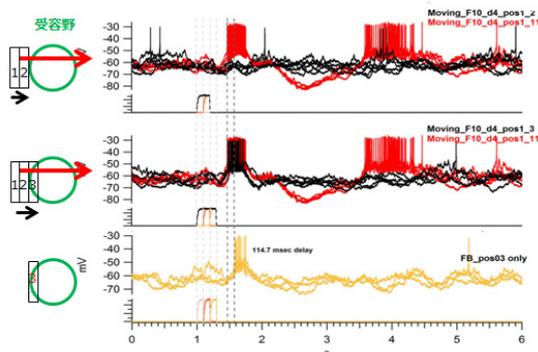
下図Bは図Aの記録と対応する。各グリッドは 100 μm の正方形である。この細胞の光刺激は縦 100 μm 横 400 μm の長方形のバー刺激を用いた。細胞の樹状突起がない（図中の赤線、細胞体が白丸、緑線が軸索を示す）。興味深いことに、下図Bでは、FB04には樹状突起が無い。それにもかかわらず、図AのFB04では既に脱分極が起こっていた。何も樹状突起がないFB04で脱分極が起こるといことは、神経節細胞に入力が入る前に既に脱分極しているということ、少なくとも約 50 μm ほど受容野が広がっていかなくてはならない。これはちょうど神経節細胞に入力する双極細胞二個ぶんの広さに相当する。尚、一つの双極細胞の受容野は 25 μm とした。実際の双極細胞間の距離を計測したところ、 20.9 ± 1.2 (N=8 サンプル) であった。



このことから、運動刺激が記録している網膜神経節細胞に入力する前にすでに受容野外の双極細胞が脱分極していて、それらがギャップ結合を介して記録している神経節細胞の受容野内に入力する双極細胞を脱分極させたものと考えられる。

双極細胞 2 個ぶんのギャップ結合というのは、すでに Arai et al (2010) によって示された双極細胞の伝播と一致している。尚、神経節細胞同士のギャップ結合も考えられるが、残念ながら隣の神経節細胞で生じたスパイクが隣の細胞にスパイクとして伝わることはない。これはギャップ結合を構成している膜の特性実験で既に分かっている。

③ 双極細胞の入力が段階的な加算を生み、神経節細胞はスパイク発火しやすくなった。



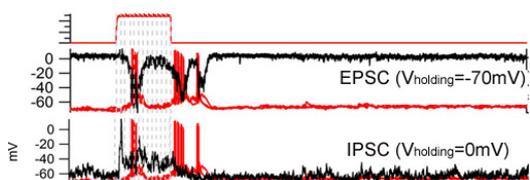
図の赤は運動刺激時のバーの動き (左) とその記録応答を示す (右)。一番上は受容外 1 と 2 を連続して刺激した時の応答を示す。加算した脱分極が見られたが、スパイクは見られなかった。真ん中の図は受容野外 1, 2 そして受容野内 3 の連続した 3 つの刺激を呈示すると、運動刺激と同じタイミングでスパイクが出現した。一番下は受容野内 3 だけを刺激したものである。受容野内なのでスパイクは見られたが、運動刺激 (赤) や加算して呈示したものよりもスパイクの発火タイミングが遅かったのがわかる。つまり、受容野外の双極細胞からの入力が段階的な加算を生み、神経節細胞がスパイク発火しやすくなったことがわかった。

④ 樹状突起の形態を考慮した刺激をすることが、錯視現象を生み出すのに重要であった。また、遅延のある膜電位の加算は、神経節細胞の樹状突起の張り方で決まった。

これは次の研究につながるために、図の提示を省く。

ただやみくもに神経節細胞を光刺激するだけでは上述したように錯視現象は再現することが出来なかった。ただし、細胞形態を考慮した光刺激を呈示することで錯視現象をスパイク発火タイミングの違いで証明することが出来た。

⑤ 閾値を超えるか否かは興奮性・抑制性入力加算で決まるが、発火タイミングは興奮性入力のタイミングのみで決まった。



図中の赤は運動刺激時の神経節細胞のスパイク発火を示したものである。これは膜電流固定下で記録を行った。同じ細胞を膜電位固定下で保持電位を変えて記録すると、双極細胞からの興奮性入力応答 ($V_h = -70\text{mV}$) とアマクリン細胞からの抑制性入力応答 ($V_h = 0\text{mV}$) を得ることが出来る。これらの結果 (両図とも黒) と運動刺激時のスパイク発火タイミング (赤) の結果を比較してみると、双極細胞からの入力で得られる上図 EPSC で得られたスパイク発火のタイミング (上図黒) と全く同じタイミングで出ていたのに対し、下図 IPSC で得られたスパイク発火タイミングは運動刺激時よりも早くスパイクが見られた。これは、IPSC のタイミングが反映されないことを示唆するものであった。ただし、これはまだ実験数が足りないために、更なる実験を必要とする。

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 Mills SL, Tian LM, Hoshi H, Whitaker CM, Massey SC, Three distinct blue-green color pathways in a mammalian retina, J Neurosci, 査読有, 1760-1768, DOI:

10.1523/JNEUROSCI.3901-13.2014.

② 星秀夫, 目玉親父と網膜研究, 臨床検査 (医学書院), 査読無, 57(9), 2013

<http://www.igaku-shoin.co.jp/journalPortal.do?journalPortalId=542>

③ Hoshi H, Tian LM, Massey SC, Mills SL, Properties of the ON bistratified ganglion cell in the rabbit retina, J Comp Neurol, 査読有, 521(7), 2013: 1497-1509, DOI:

10.1002/cne.23237

④ Hoshi H, Tian LM, Massey SC, Mills SL, Two distinct types of ON directionally selective ganglion cells in the rabbit retina, J Comp Neurol, 査読有, 519(13), 2011: 2509-2521, DOI: 10.1002/cne.22678

[学会発表] (計 1 件)

① 星秀夫, 川島友和, 村上邦夫, 高柳雅朗, 酒井真, 石川陽一, 佐藤二美, 立花政夫, キンギョ網膜が行う高次視覚情報処理を生み出す神経回路網の解析, 日本解剖学会総会, 2014年3月29日, 自治医科大学 (栃木県下野市)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星 秀夫 (HOSHI, Hideo)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：30568382

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し