

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24687010

研究課題名(和文) 網膜の機能的な神経回路生成を担う分子基盤の解明

研究課題名(英文) The molecular basis of the functional retinal circuitry

研究代表者

大西 暁士 (Onishi, Akishi)

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・研究員

研究者番号：70569102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウス網膜組織における視細胞(杆体・青錐体・緑錐体)と、二次ニューロン(水平細胞・双極細胞)との接続を担う分子の探索および機能解析を行った。杆体視細胞特異的に高い発現を示す一回膜貫通蛋白質であるSusd3を電気穿孔法による強制発現により、発現量依存的にシナプスの奇形および二次ニューロンへの接続が促進された。また、Aldh1a1、Cyp1b1のダブルノックアウトマウスは緑錐体の減少を示した。また、Aldh1a1ノックアウトマウスでは脈絡膜血管の低形成が観察され、加齢黄斑変性症との関連が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed functional screening of molecules that govern specific synaptic connection between photoreceptors (rod, S cone and M cone) and secondary neurons (horizontal cell and bipolar cells) in the mouse retina. When we electroporated Susd3 cDNA, a single transmembrane protein specifically expressed in rod photoreceptors in the mouse retinas, the photoreceptors showed branching synaptic terminals that targeted secondary neurons in a dose dependent manner. Next, we developed double knockout mice of Aldh1a1 and Cyp1b1, enzymes that synthesize ligands for Rxrg, and observed significant decrease of M cones. In addition, Aldh1a1 deficient mice showed choroidal hypoplasia.

研究分野：分子発生学

キーワード：網膜 視細胞 中心窩

1. 研究開始当初の背景

多くの哺乳類において網膜は外界の視覚情報を受容する唯一の中樞神経組織であり、視覚入力を電気信号に変換する視細胞、2次ニューロンである双極細胞、水平細胞、アマクリン細胞と、これらの神経細胞からの情報を統合して脳に伝達する神経節細胞により構成される。これまでに明暗・色彩等の映像要素は網膜で抽出される事が示されており、関与する神経細胞サブタイプの同定および生理機能の解析が精力的に進められている。例えば、明暗情報は視細胞のサブタイプの杆体視細胞により受容され、杆体双極細胞・AII型アマクリン細胞を経て神経節細胞に伝達される。色(波長)情報は色感受性の異なる錐体視細胞(赤錐体・緑錐体・青錐体)により受容され、それぞれのサブタイプに選択的に接続する双極細胞が様々な生物種より報告されている。しかしながら、これらの神経回路の構築のための分子機構の解析は少なかった。

2. 研究の目的

杆体の光受容蛋白質(ロドプシン)のみ錐体タイプに置換したノックインマウスでは杆体型双極細胞由来の有意な応答が認められる事より、杆体視細胞-杆体双極細胞間の神経接合が受容体の入力特性依存的(活動依存的)でなく遺伝的プログラムにより形成される事を示す。そこでまず明暗情報を伝達する杆体視細胞-杆体双極細胞間のシナプス接続に着目し、杆体視細胞シナプス末端に選択的に局在する1回膜貫通蛋白質 Susd3 の機能解析を行う。

また、我々は視細胞サブタイプ決定において、転写制御因子 Pias3(Protein Inhibitor of Activated Stat3)が中心的役割を担う事を見出し、関与する転写因子群の分子機序を報告している。そこで、杆体・錐体視細胞のサブタイプ決定および選択的回路形成に必須な分子群の同定を目指し、霊長類に特徴的な構造である中心窩の視覚形成を担う分子の探索および作用機序を解析する。

3. 研究の方法

研究室および公共データベースの網膜マイクロアレイより杆体および錐体視細胞選択的に発現が予想される遺伝子を選別した。このうち、杆体視細胞特異的に発現する Susd3 に着目し、GOF/LOF 解析により回路形成の変容を免疫組織化学的に追跡した。

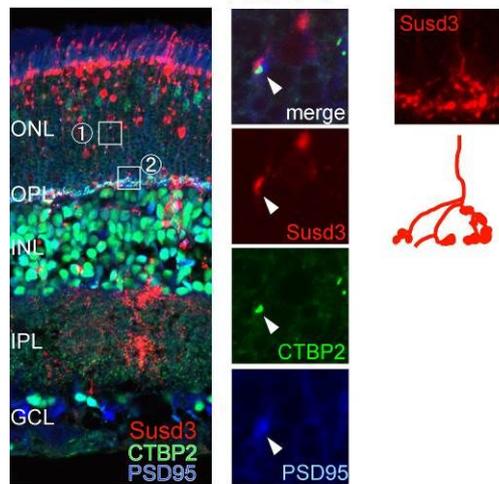
錐体視細胞特異的な分子の探索については、錐体視細胞サブタイプを決定する Pias3 の制御する因子を候補とした。錐体視細胞では Pias3 は Rxrg の転写活性により制御される。Rxrg はレチノイン酸依存的に活性化す

るため、網膜発生期(回路形成期)で発現するレチノイン酸合成酵素 Aldh1a1, Cyp1b1 の機能解析を行った。

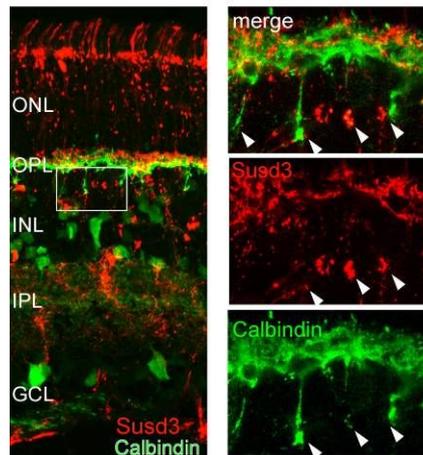
4. 研究成果

まず、電気穿孔法により Susd3 の蛍光融合タンパク質を発生期の視細胞に導入したところ、強い蛍光シグナルが視細胞-双極細胞のシナプスを形成する外網状層に観察された。また、通常の杆体視細胞シナプス末端は球状の染色像を示すが、蛍光の強い(Susd3 の発現量の高い)シナプスでは枝分かれするなどの奇形を示した。さらに蛍光の強いシナプスには杆体視細胞に接続する神経細胞(杆体双極細胞および水平細胞)の樹状突起マーカーの強い共染色が観察され、Susd3 が杆体視細胞と杆体双極細胞・水平細胞のシナプス接続を促進する事が示唆された(下図)。

①異所的 Susd3 に Ctbp2, Psd95 が共局在する
②視細胞末端の異常な枝分れ



異所的に発現する Susd3 に水平細胞が投射



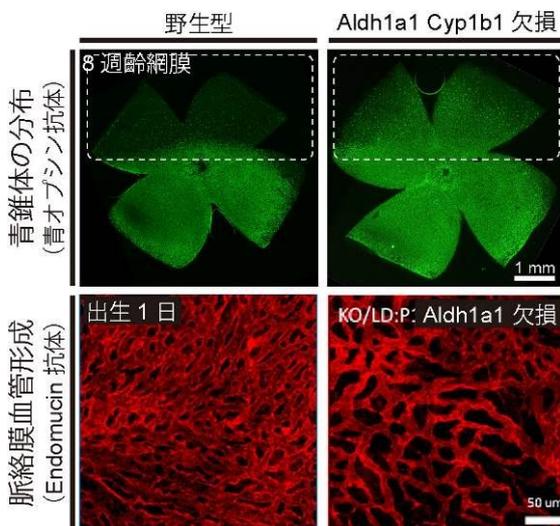
ノックアウトマウスの解析を行ったが野生型マウスと比べて網膜電図およびシナプス形態において有意な差は認められなかった。本研究期間において、1回膜貫通型蛋白質 Elnf1 (leucine rich repeat and

fibronectin type III, extracellular 1)が、杆体視細胞 = 杆体双極細胞シナプス形成の責任分子であることが他機関より報告された(引用文献)。

次に、錐体視細胞のサブタイプ分化を担う Pias3 の発現を制御する Rxrg の活性化に関与する分子を探索・解析して以下の結果を得た。

まず、レチノイド X 受容体のリガンド供給分子として Aldh1a1 および Cyp1b1 を特定した。In situ ハイブリダイゼーションによる発現解析の結果、これらの分子はマウス網膜において発生期の背側ミューラー細胞で高い発現を示した。またこれらの分子とレチノイド受容体を培養細胞に共発現させると、レチノイド X 受容体の転写活性が有意に上昇した。即ち、背側網膜において Aldh1a1, Cyp1b1 の2つの分子がレチノイド X 受容体を活性化することが示唆された。また、マウス背側網膜における Aldh1a1 の発現が、ミューラー細胞および一部の背側アマクリン細胞で観察され、発生期および成体のマーモセット網膜において Aldh1a1 の発現を免疫組織化学的に解析したところ、中心窩部分のミューラー細胞に強い染色像が観察された。

次に、Aldh1a1, Cyp1b1 のノックアウトマウスを作製し、錐体視細胞サブタイプ分化およびシナプス等形態変化を追跡した。リガンドの受容体である Rxrg ノックアウトマウスでは、背側青錐体の増加が観察される。シングルノックアウトマウスでは青錐体視細胞の有意な増加は認められなかったが、ダブルノックアウトマウスでは青錐体の有意な増加が観察された(下図・青オプシン染色)。補足として、現在 Rxrg ノックアウトマウスやマウス幹細胞からの自己組織化網膜培養系を用いて形態変化の比較解析を進めている。



さらに、霊長類の黄斑/中心窩形成において視細胞サブタイプ決定は中心視野の視覚形

成において重要な役割を担う。上記のノックアウトマウスの形態を詳細に検討した所、網膜色素上皮層裏側の脈絡膜血管の低形成が認められた。この部分では Aldh1a1 の発現は観察されないため、網膜細胞から供給されるレチノイン酸が遠心的に作用すると考えられる。脈絡膜血管の破綻は加齢黄斑変性症による失明の原因となるため、視細胞シナプス維持を含む網膜形態の観察を継続する。

<引用文献>

Cao Y., et al. (2015) Mechanism for Selective Synaptic Wiring of Rod Photoreceptors into the Retinal Circuitry and Its Role in Vision. *Neuron*. 87:1248-60.

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2件)

Maekawa, Y., Onishi, A., Matsushita, K., Koide, N., Mandai, M., Suzuma, K., Kitaoka, T., Kuwahara, A., Ozone, C., Nakano, T., Eiraku, M., Takahashi, M. (2016) Optimized Culture System to Induce Neurite Outgrowth From Retinal Ganglion Cells in Three-Dimensional Retinal Aggregates Differentiated From Mouse and Human Embryonic Stem Cells. *Current eye research* 41, 558-568. 査読あり doi: 10.3109/02713683.2015.1038359.

Katoh, K., Yamazaki, R., Onishi, A., Sanuki, R., Furukawa, T. (2012) G9a histone methyltransferase activity in retinal progenitors is essential for proper differentiation and survival of mouse retinal cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 17658-17670. 査読あり doi: 10.3109/02713683.2015.1038359. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1869-12.2012.

[学会発表](計11件)

Maekawa Y., Onishi A., Koide N., Suzuma K., Mandai M., Kitaoka T., Takahashi M. Extracellular matrices preferable to neurite outgrowth from retinal organoids differentiated from mouse embryonic stem cells. Annual meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2016.5.1-5. シアトル

Kobayashi W., Onishi A., Takihara Y., Inatani M., Nakazawa T., Takahashi M. Culture of retinal ganglion cells (RGCs) purified from 3D retinal organoids differentiated from human induced pluripotent stem (iPS) cells. Annual

meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2016.5.1-5. シアトル

Goto S., Onishi A., Ito H., Sakaguchi H., Nishida K., Takanashi M. Neural retina-derived retinoic acids control choroidal vascular development. Annual meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2016.5.1-5. シアトル

後藤聡、大西暁士、伊藤裕美、坂口裕和、西田幸二、高橋政代. 神経網膜由来のレチノイン酸による脈絡膜発達制御機構. 第 120 回日本眼科学会総会. 2016.4.7-10. 宮城県仙台市.

伊藤晋一郎、大西暁士、高橋政代、児玉徹也、角谷俊文. マウス iPS 細胞より分化した 3 次元網膜におけるサプリメントの視細胞保護効果の検討. 第 120 回日本眼科学会総会. 2016.4.7-10. 宮城県仙台市

前川有紀、大西暁士、松下恵三、小出直史、万代道子、鈴間潔、桑原篤、大曾根親文、中野徳重、永楽元次、北岡隆、高橋政代. マウス及びヒト胚性幹細胞からの 3 次元分化培養網膜を用いた網膜神経節細胞からの神経突起伸長. 日本組織細胞化学学会. 2015.10.3-4. 大阪府高槻市

大西暁士. iPS/ES 細胞より分化した立体網膜による網膜変性疾患の病態解析および創薬利用. ライプセルイメージングセミナー 2015. 2015.11.26 東京都千代田区

Ito M., Onishi A., Iraha S., Takahashi M. Chemically-induced photoreceptor degeneration in 3D retinal aggregates from mouse iPS cells. The International Society for Stem Cell Research. 2015.6.24-27. ストックホルム

Maekawa Y., Onishi A., Matsushita Y., Koide N., Mandai M., Suzuma K., Kitaoka T., Kuwahara A., Ozone C., Nakano T., Eiraku M., Takahashi M. Neurite outgrowth from retinal ganglion cells in self-organizing mouse and human retinal tissues differentiated from embryonic stem cells. The International Society for Stem Cell Research. 2015.6.24-27. ストックホルム

大西暁士. iPS 細胞より分化誘導した立体網膜組織を用いての網膜疾患の病理モデルおよび治験系の確立. 第 4 回細胞再生医療研究会. 2014.7.27 兵庫県神戸市

伊藤晋一郎、大西暁士、伊良波諭、高橋政代. マウス iPS 細胞を用いた 3 次元立体網膜における視細胞変性の誘導とその評価方法の確立. 第 118 回日本眼科学会総会. 2014.4.5 東京都千代田区

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
大西暁士 (ONISHI AKISHI)
理化学研究所
多細胞システム形成研究センター
研究員
研究者番号：70569102

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：