

視覚情報処理におけるアマクリン細胞の役割

名古屋大学 大学院創薬科学研究科 細胞薬効解析学分野

小坂田 文隆

1. 目的

網膜は、大きく分けて5種類の神経細胞（視細胞、双極細胞、網膜神経節細胞(RGC)、水平細胞、アマクリン細胞）と2種類のグリア細胞により構成される。視細胞は光情報を電気信号に変換し、その情報を双極細胞に伝達した後、RGCへ伝達し、視神経を通じて脳に伝える(Wassle, 2004)。アマクリン細胞は内顆粒層に存在する抑制性の神経細胞で、RGCの応答を調節すると考えられている。

しかし、これは非常に単純化された見方であり、実際には哺乳類の網膜中には60以上の細胞種が存在することが細胞の形態学的解析や遺伝子発現解析により明らかになっている。その中でもアマクリン細胞は、網膜細胞の中で最も種類が多く、約30種類のサブタイプが存在する(Masland, 2001)。これらアマクリン細胞の生理的な役割や病態形成における役割はサブタイプ毎に異なると考えられるが、これまでの研究から、スターバストアマクリン細胞は方向選択性の形成に、AIIアマクリン細胞は桿体視細胞の情報処理に重要な役割を担うことが分かっているものの、この2つのサブタイプ以外のアマクリン細胞種の役割は不明である。

その理由には、1) ほぼ全てのアマクリン細胞種が同じ抑制性の神経伝達物質であるGABAを使用しているために、特定の細胞種の機能を特異的に阻害する目的で、薬理的阻害薬が使用できないこと、2) アマクリン細胞がシナプス結合するRGCにも10種類以上のサブタイプが存在し、どのアマクリン細胞サブタイプがどのRGCサブタイプとシナプス結合をするのかが不明であること、が挙げられる。

しかし、特定細胞種を選択的に標識したり、機能を操作したりすることが可能になれば、特定の細胞種の機能を理解できると考えられる(Luo et al., 2008)。近年、いくつかのサブタイプにおいては特異的なマーカーが見出され、それらの遺伝子座にCreをKnock-Inした遺伝子改変マウスを用いることにより、サブタイプ選択的にターゲティングすることできると考えられる(Siegert et al., 2012; Siegert et al., 2009)。

そこで、本課題では、マウス遺伝学、ウイルスベクター、chemogeneticsおよび高密度多電極アレーを駆使することにより、アマクリン細胞サブタイプの視覚情報処理における役割を解明することを目的とした(図1)。

2. 方法

マウスは12時間毎の明暗のサイクルで飼育維持した。Genotypingは、マウスの尾からgenomeを抽出し、特異的なプライマーを用いたPCRにより判定した。動物より眼球を摘出し、角膜、水晶体などの前眼部および硝子体を取り除いた。網膜色素上皮と共に神経網膜を切り出し、5-7 mm四方の網膜断片を作製した。512個の電極を有する高密度多電極アレー上に網膜を静置し、視覚刺激に対するRGCの応答を記録した。視覚刺激にはwhite noiseを用い、逆相関法により網膜神経節細胞の受容野を同定した。ウイルスベクターにはChemogeneticsとしてPSAM/GlyRを、Cre陽性細胞にのみ発現するCre依存的AAVベクターを作製した。AAVは硝子体内腔内に微量注入した。PSAMのリガンドであるPSEMは化学合成した。

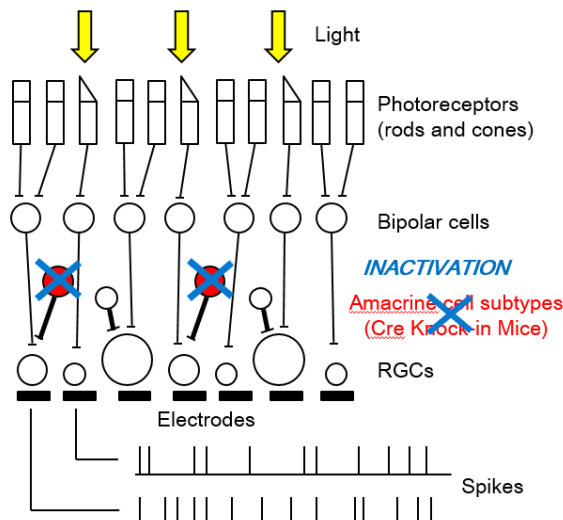


図1. 本研究の概略

特定のアマクリン細胞サブタイプに特異的にCreを発現するマウスの硝子体内腔内に新規人工カプシドを有するAAV-DIO-PSAM/GlyR-IRES-EGFPを投与し、Cre依存的にPSAM/GlyR-GFPを導入する。高密度多電極アレーを用いて網膜神経節細胞(RGC)の視覚応答を電気生理学的に記録する。White noise刺激によりRGC受容野を同定し、RGCサブタイプ毎に分類する。PSAM/GlyRのリガンドであるPSEMの投与によりアマクリン細胞サブタイプの神経活動を特異的に抑制し、RGCの応答の変化を解析する。

3. 結果

これまでに網膜内層に効率良く感染するカプシドを持つAAVが必要なため、複数のserotypeのAAVを作製し、成体マウスの硝子体内腔内に微量注入を行った。組織学的な解析を行ったところ、AAV1やAAV2は網膜神経節細胞層に存在するRGCには効率良く感染したが、網膜内層のアマクリン細胞や水平細胞への感染効率は極めて低かった。そこで、DNA ファックリングにより開発された新規人工カプシド7m8を検討した(Dalkara et al., 2013)。AAV7m8を作製して検討した結果、硝子体内投与でアマクリン細胞への感染が認められた。そこで次に、そのAAVを用いてchemogeneticsを導入し、化合物により標的細胞の神経活動を操作することを目指した。PSAM/GlyRはアセチルコリン受容体の変異型結合ドメインとグリシン受容体のポアドメインを持つキメラ受容体で、内因性アセチルコリンはPSAM/GlyRに結合せず、PSAM/GlyRのリガンドのPSEMは内在性アセチルコリン受容体には結合しない(Magnus et al., 2011)。そこで、新規人工カプシド7m8を用いてPSAM/GlyRをCre依存的に発現できるAAV(AAV-DIO-PSAM/GlyR-IRES-EGFP)を作製した。CreマウスをROSA locusにlox-STOP-lox-TdTomatoを持つマウスと交配させ、Cre陽性細胞をTdTomatoで標識し、そのマウスの硝子体内腔内にAAV-DIO-PSAM/GlyR-IRES-EGFPを微量注入した。その結果、Creを発現するTdTomato陽性細胞がGFPを発現し、Cre特異的にウイルス感染を起こすことが明らかになった。

次に、512個の電極からなる高密度多電極アレーを用いて、単離したマウス網膜のRGCから視覚応答を計測した。White noise刺激を用いて逆相関法からRGCの受容野を同定でき、受容野のサイズ、ON応答あるいはOFF応答など反応特性のパラメーターでRGCのサブタイプ毎に受容野を分類した。その結果、約10種類のRGCのサブタイプをタイル状に同定することができた。Cre knock-inマウスに新規カプシドAAV-DIO-PSAM/GlyR-GFPを硝子体内投与し、3週間後に網膜を単離し、多電極アレー上に網膜を静置し、RGCの神経活動を記録した。リガンドであるPSEMを投与してアマクリン細胞の活動を操作しながら、その出力先であるRGCサブタイプへの影響を調べた。PSEM非存在下および存在下での10種の異なるRGCサブタイプの受容野、モザイク形成、反応特性、発火パターンなどを比較した結果、1種類のRGCサブタイプOFF Type IIに特異的に変化が観察された。PSEMの投与により変化が観察され、PSEMのwashoutによりOFF Type II RGCの活動変化は回復した。

4. 考察

アマクリン細胞の中で、スターバストアマクリン細胞とAIIアマクリン細胞以外の機能を詳細に解析した論文はほぼ皆無である。一番の理由は、他の脳部位に比較して、網膜で特定の細胞種の神経活動を操作する技術が非常に遅れていることであろう。特定の細胞種の神経活動を制御する方法として最も普及しているのが、光感受性のチャンネルを使用したoptogenetics(光遺伝学)である(Yizhar et al., 2011)。しかし網膜では視細胞が内在性の光感受性チャンネルopsinを発現しているため、光を利用したoptogeneticsは不向きである。視細胞が変性・脱落した網膜に、channelrhodopsinやhalorhodopsinを発現させ、光応答性を再獲得させる試みは報告されているものの(Bi et al., 2006; Lagali et al., 2008)、内在性opsinが機能している正常網膜での生理機能は解析されていない。そこで、光を使用せずに、特異的な化合物で特定細胞の神経活動を制御するchemogeneticsが有用であると考えられる(Sternson and Roth, 2014)。ChemogeneticsのツールであるPSAM/GlyRをCre依存的なAAVを用いてCre Knock-Inマウスに発現させることにより、網膜の特定の細胞種を回路レベルで操作する研究が可能になる。さらに、機能解析にはこれまでは細胞をランダムにパッチする電気生理学手法が用いられ、同じ細胞種を繰り返し安定して記録するのは困難であった。しかし、多電極アレーは一度の記録で複数の細胞種を同定できるという利点を有し、アマクリン細胞の出力先のRGCサブタイプが不明な今回の場合は強力な手法と言える。

本研究では、マウス遺伝学、ウイルス工学、電気生理学的手法を組み合わせることで、特定のアマクリン細胞を機能操作し、RGCサブタイプへの作用を解析できる新たな実験系を構築した。この独自の実験系を用いて、VIPアマクリン細胞サブタイプがOFF Type II RGCの受容野形成に関わることを見出した。今後、生理的な意義を解明するために、アマクリン細胞サブタイプの機能を操作した際の大脳皮質視覚野であるV1での応答を測定し、さらにアマクリン細胞サブタイプの機能を操作した際の行動レベルでの変化を解析する予定である。

網膜内層が変性する網膜疾患の理解は大幅に遅れている。ヒトでも実験動物でも、網膜内層の細胞種が形成する神経回路を詳細に解析する手法が存在しなかったためである。それら網膜疾患で内顆粒層において神経回路レベルでどのような変化が起こっているのかを明らかにできれば、網膜神経回路をターゲットとした新たな治療法の開発に繋がると期待する。さらに、網膜の再生治療において、現在は網膜色素上皮細胞および視細胞が再生の対象となっているが、今後は網膜内顆粒層の細胞も再生の対象になると期待され、本研究は多能性幹細胞を用いた新たな網膜再生医療の開発に資する重要な基礎的知見を提供するものである。

以上本研究は、今まで手つかずであったアマクリン細胞の機能を、独自の実験系を構築することで、解明することに成功した極めて先駆的な課題と言える。

5. 参考文献

- Bi, A., Cui, J., Ma, Y.P., Olshevskaya, E., Pu, M., Dizhoor, A.M., and Pan, Z.H. (2006). Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration. *Neuron* 50, 23-33.
- Dalkara, D., Byrne, L.C., Klimczak, R.R., Visel, M., Yin, L., Merigan, W.H., Flannery, J.G., and Schaffer, D.V. (2013). In vivo-directed evolution of a new adeno-associated virus for therapeutic outer retinal gene delivery from the vitreous. *Sci Transl Med* 5, 189ra176.
- Lagali, P.S., Balya, D., Awatramani, G.B., Munch, T.A., Kim, D.S., Busskamp, V., Cepko, C.L., and Roska, B. (2008). Light-activated channels targeted to ON bipolar cells restore visual function in retinal degeneration. *Nat Neurosci* 11, 667-675.
- Luo, L., Callaway, E.M., and Svoboda, K. (2008). Genetic dissection of neural circuits. *Neuron* 57, 634-660.
- Magnus, C.J., Lee, P.H., Atasoy, D., Su, H.H., Looger, L.L., and Sternson, S.M. (2011). Chemical and genetic engineering of selective ion channel-ligand interactions. *Science* 333, 1292-1296.
- Masland, R.H. (2001). The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci* 4, 877-886.
- Siebert, S., Cabuy, E., Scherf, B.G., Kohler, H., Panda, S., Le, Y.Z., Fehling, H.J., Gaidatzis, D., Stadler, M.B., and Roska, B. (2012). Transcriptional code and disease map for adult retinal cell types. *Nat Neurosci* 15, 487-495, S481-482.
- Siebert, S., Scherf, B.G., Del Punta, K., Didkovsky, N., Heintz, N., and Roska, B. (2009). Genetic address book for retinal cell types. *Nat Neurosci* 12, 1197-1204.
- Sternson, S.M., and Roth, B.L. (2014). Chemogenetic tools to interrogate brain functions. *Annu Rev Neurosci* 37, 387-407.
- Wassle, H. (2004). Parallel processing in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci* 5, 747-757.
- Yizhar, O., Fenno, L.E., Davidson, T.J., Mogri, M., and Deisseroth, K. (2011). Optogenetics in neural systems. *Neuron* 71, 9-34.