

## 学内グラン特 報告書

## 平成27年度 学内グラン特終了時報告書

## 網膜ドーパミン作動性アマクリン細胞の自発活動に関わるイオンチャネルの解明

研究代表者 金子 優子（保健医療学部 看護学科）

研究分担者 青葉 香代\*, 菅 理江\*

## 緒 言

網膜は、色素上皮細胞、ミュラーグリア細胞と、5種類の神経細胞（視細胞、水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞、神経節細胞）からなり、各神経細胞にはさらにいくつものサブタイプがある。これらの網膜細胞すべてにドーパミン受容体が存在している<sup>1)</sup>。ドーパミンは暗順応-明順応の切り替えに重要であり、日周期にも関与している<sup>2,3)</sup>。一方、網膜においてドーパミンを産生・放出しているニューロンはドーパミン作動性アマクリン細胞（DA細胞）だけである。DA細胞は、広い出力範囲を持つが、無髓神経線維のみを持つ。近年の電気生理学研究により、DA細胞には自発的な電位依存性Na活動電位発生があり、ドーパミン放出は、この活動電位頻度で調節されていることが明らかにされた<sup>4-6)</sup>。電位依存性Naチャネル（Na<sub>v</sub>）は、α（Na<sub>v</sub>α）、及びβ（Na<sub>v</sub>β）サブユニットからなり、Na<sub>v</sub>の電気的特性は主にNa<sub>v</sub>αにより決定され、Na<sub>v</sub>βにより機能及び発現が修飾される。また、各サブユニットは、それぞれサブタイプ（Na<sub>v</sub>α: Na<sub>v</sub>1.1-1.9, Na<sub>v</sub>β: β1-β4）がある<sup>7)</sup>。抗体染色法を用いたNa<sub>v</sub>αタンパクの発現検出とin situ hybridization法（ISH法）やRT-PCR法を用いたmRNAの発現検出により、哺乳類網膜には、7種（TTX感受性Na<sub>v</sub>α: Na<sub>v</sub>1.1-1.3, Na<sub>v</sub>1.6-1.7; TTX抵抗性Na<sub>v</sub>α: Na<sub>v</sub>1.8-1.9）のNa<sub>v</sub>αサブタイプと、2種のNa<sub>v</sub>β（β1, β2）の発現が報告されている<sup>8-10)</sup>。TTX感受性のNa<sub>v</sub>活動電位を発生する網膜神経細胞には、神経節細胞（RGC）と、AIIアマクリン細胞、DA細胞がある。20種類以上に分類されているRGCの全てが同じ組み合わせのNa<sub>v</sub>αとNa<sub>v</sub>βを発現しているのかどうかは明らかでないが、ISH法によりRGC層に4種類のNa<sub>v</sub>α（Na<sub>v</sub>1.1-1.3, Na<sub>v</sub>1.6）と2種類のNa<sub>v</sub>β（β1, β2）の発現が確認されている<sup>8,9)</sup>。ISH法と抗体染色法を組み合わせた我々の研究によって、ラット網膜AIIアマクリン細胞については、主にNa<sub>v</sub>1.1が発現していることが明らかとなった<sup>9)</sup>。一方、DA細胞にどのような電位依存性Naチャネルが、どのような分布で発現しているのかについても明らかになっていない。我々は予備実験で、一部

のラットDA細胞にNa<sub>v</sub>1.2発現がみられるという結果を得ている<sup>11)</sup>。この結果はDA細胞では、RGCともAIIアマクリン細胞とも異なる組み合わせのNa<sub>v</sub>αが発現していることを示唆するだけでなく、DA細胞間で発現するNa<sub>v</sub>αサブタイプが異なる、あるいは、Na<sub>v</sub>活動電位を発生しないDA細胞が存在する、という可能性を示唆している。マウス及びラットDA細胞においては一部の細胞は網膜外網状層（OPL）に突起を伸ばしていないという報告<sup>12)</sup>や、マウスではDA細胞の一部にメラノプシン含有型RGCから入力を受けているものがあるという報告<sup>2)</sup>があり、さらに、DA細胞の自発的活動頻度は細胞間で大きく異なることが報告されている<sup>13)</sup>。これらのことから、我々はDA細胞には興奮性の違いにおいてsubpopulationが存在するであろうと考えている。そこで本研究では、DA細胞の自発的な活動電位発生を支える電位依存性Naチャネル分子を詳述するため、ラット網膜DA細胞におけるNa<sub>v</sub>αの発現を調べた。

## 材料と方法

本研究は埼玉医科大学動物実験委員会によって承認され（27M078-1649, 27H18-1543），埼玉医科大学動物実験指針に基づいて実施された。実験動物は成体の正常ラット（WisterまたはLong Evans, 4-8週齢）を用いた。実験動物は、エーテルで軽麻酔後、ペントバルビタールナトリウムによる深麻酔下で心臓灌流固定後、眼球摘出、または、過剰量のペントバルビタールナトリウム投与で安楽死後、眼球を摘出した。

**ISH法と抗体染色法を用いた二重染色：**心臓灌流固定後、眼球を摘出・固定し、凍結切片を作製した<sup>9)</sup>。ISH法で用いるプローブは、Na<sub>v</sub>α subunit type I (Na<sub>v</sub>1.1), type II (Na<sub>v</sub>1.2), type III (Na<sub>v</sub>1.3), NaCh6 (Na<sub>v</sub>1.6) と PN1 (Na<sub>v</sub>1.7) に対するDIG標識RNAプローブを作製した<sup>8,9)</sup>。凍結切片を用いてISH法にてmRNAの発現検出をおこなった後、DA細胞のマーカー抗体（anti-tyrosine hydroxylase antibody（抗TH抗体）、ABR）と蛍光標識二次抗体（Alexa 488, Molecular Probes）を用いて抗体染色をおこなった。観察・撮影後、カバーガラスを剥離し、

\*医学部 生理学

改めて抗TH抗体とビオチン化二次抗体、ABC Kit, DAB Substrate Kit (Vector) を用いて抗体染色をおこない、DA 細胞の見落としがないかの確認をおこなった。

**抗体染色法による二重染色:** ラットを安樂死後、眼球を摘出し、氷上で2時間固定し、凍結切片を作製した。切片を洗浄・ブロッキング後、抗Na<sub>v</sub>1抗体 (Na<sub>v</sub>1.1-1.9の共通抗体、PAN, clone K58/35, Sigma) と抗TH抗体、および蛍光標識二次抗体 (Alexa 488およびAlexa 546; Molecular Probes) を用いて二重染色をおこなった。

**単一細胞RT-PCR法:** ラットを安樂死後、眼球を摘出し、網膜を取り出し、パパイン (Worthington) で酵素処理をおこない網膜神経細胞を単離し、スライドガラス上に撒いた。固定後、抗TH抗体とアルカリフォスファターゼ標識二次抗体 (メルクミリポア) を用いて抗体染色をおこなった。抗TH抗体標識DA細胞を微小電極で吸引し、単一細胞RT-PCR法を試みた。PCRでは、Na<sub>v</sub>α特異的であり且つNa<sub>v</sub>1.1, Na<sub>v</sub>1.2, Na<sub>v</sub>1.3, Na<sub>v</sub>1.6, Na<sub>v</sub>1.7に共通な部分を増幅し、さらに各サブタイプに特異的なPCRプライマーを用いて増幅するnested-PCR法をもちいた<sup>14)</sup>。

## 結果

ラット網膜神経細胞の多くは直径8-10 μm程度である。そのため、通常、我々はISHに使用する網膜切片は12 μmの厚さで作製する。ラット網膜AIIアマクリン細胞にNa<sub>v</sub>1.1が発現していることを発見した我々の研究<sup>9)</sup>においても、12 μmの厚さの網膜切片を使用した。12 μm網膜切片に対し、TTX感受性Na<sub>v</sub>α (Na<sub>v</sub>1.1-1.3, Na<sub>v</sub>1.6-1.7)に対するDIG標識RNAプローブを用いたISHの結果、内顆粒層 (INL) に顕著な発現が見られたのはNa<sub>v</sub>1.1だけであった。非常にまれだが、Na<sub>v</sub>1.2とNa<sub>v</sub>1.6の発現も見られた。そこで、Na<sub>v</sub>1.1, Na<sub>v</sub>1.2, Na<sub>v</sub>1.6をDA細胞が発現するNa<sub>v</sub>αの候補としてISHと抗TH抗体染色との二重染色をおこなった。INLにおけるNa<sub>v</sub>1.1発現は、INLと内網状層 (IPL) の境界にある細胞で検出されたが<sup>9)</sup>、抗TH抗体染色と二重染色された細胞はなかった (INLで抗TH抗体染色された細胞数 = 278 cells / INLでISHシグナルが見られた細胞数 = 20,000 cells以上 / 抗TH抗体と二重染色された細胞数 = 0 cells / 試した切片数 = 72 sections)。また、INLにおけるNa<sub>v</sub>1.1を発現している細胞のほとんどは、抗TH抗体でラベルされるDA細胞 (長径約20 μm、短径約15 μm) に比べて小さかった。INLでNa<sub>v</sub>1.2とNa<sub>v</sub>1.6を発現している細胞は比較的大きく、そのうちのごく一部の細胞で抗TH抗体染色も検出されたが非常に数が少なかった (INLで抗TH抗体染色された細胞数 / INLでISHシグナルが見られた細胞数 / 抗TH抗体と二重染色された細胞数 / 試した切片数は、それぞれ、Na<sub>v</sub>1.2 : 288 cells / 28 cells / 2 cells / 86 sections, Na<sub>v</sub>1.6 : 349 cells / 13 cells / 1 cells / 96 sections、であった)。

ISHのシグナルは核付近に存在する。我々は、核を含まない部分の切片で抗TH抗体染色のみが検出

されたために二重染色される細胞が少ない可能性を考え、厚み18 μmの切片を作成し、同様の実験をおこなった。その結果、約10%のラットDA細胞にNa<sub>v</sub>1.2発現がみられるという結果が得られ、Na<sub>v</sub>1.6やNa<sub>v</sub>1.3においても二重染色された細胞がみられた (INLで抗TH抗体染色された細胞数 / INLでISHシグナルが見られた細胞数 / 抗TH抗体と二重染色された細胞数 / 試した切片数は、それぞれ、Na<sub>v</sub>1.2 : 287 cells / 75 cells / 27 cells / 64 sections, Na<sub>v</sub>1.6 : 97 cells / 25 cells / 4 cells / 21 sections, Na<sub>v</sub>1.3 : 24 cells / 8 cells / 4 cells / 4 sections、であった)。

上記の結果から、ラットDA細胞に発現している可能性のあるNa<sub>v</sub>αは、Na<sub>v</sub>1.2, Na<sub>v</sub>1.3, Na<sub>v</sub>1.6の3種類であることがわかった。これらのNa<sub>v</sub>αがそれぞれ単独で発現しているのか、あるいは、組み合わせて発現しているのかを、数種のプローブを用いたISH法と抗体染色法を用いた多重染色で調べることは非常に困難である。そこで我々は、網膜細胞を単離し、単一のDA細胞に対してRT-PCR法を試みる実験を計画した。単離DA細胞への単一細胞RT-PCR法の試みはすでに報告があるが、DA細胞を特異的に標識したトランスジェニックマウスで行われている<sup>4, 5)</sup>。この方法では、目的細胞ごとに変異動物を作成する必要がある。本研究では、より汎用性の高い手法を確立したいと考え、単離細胞を抗体染色で標識して同定した後、標識細胞を微小電極により吸引し、単一細胞RT-PCR法を試みた。しかし、現在のところこの試みは成功していない。

次に我々は、Na<sub>v</sub>αを発現するDA細胞において、Na<sub>v</sub>αタンパクがどのように分布しているのかをNa<sub>v</sub>1.1-1.9の共通抗体と抗TH抗体を用いた二重染色で調べた。各DA細胞からは多くの抗TH抗体ラベルされた神経突起 (TH-ir process) が出ており、そのほとんどがIPLにINLに沿う様に伸びていた。抗Na<sub>v</sub>1抗体の染色は主にRGC層に見られたが、IPLにも点在、あるいは~20 μmの突起様 (PAN-ir process) の染色像がみられた。PAN-ir processのほとんどはTH-ir processと重ならず、おそらくはAIIアマクリン細胞の神経突起と考えられる<sup>15)</sup>。4例のみ二重染色された突起 (TH-PAN-ir process) がみられた。二重染色された突起はいずれも1つのDA細胞に1本で、細胞体の付け根から~20 μmの部分までが二重染色されていた。4例のうち1例のDA細胞については、OPLに突起を伸ばしている1本のTH-ir processが見られ、これはTH-PAN-ir processとは異なる突起であった。この結果と、他の3例のコンフォーカル画像の3次元構築像から、TH-PAN-ir processは、IPLにINLに沿う様に伸びていることが示唆された。

## 考察

本研究では、DA細胞の自発的な活動電位発生を支える電位依存性Naチャネル分子を詳述するため、ラット網膜DA細胞におけるNa<sub>v</sub>αの発現を調べた。Na<sub>v</sub>αタンパクは神経突起に発現しているため、多くの網膜神経細胞の突起が存在する網状層における発現で網膜神経細胞の

種類を特定するのは難しい。そこで我々は核付近に存在するmRNA発現を検出するISH法を中心に研究を進めてきた。本研究で、 $\text{Na}_v1.1$ はDA細胞が発現する主要な $\text{Na}_v\alpha$ ではないことは明らかであり、DA細胞に発現している可能性のある $\text{Na}_v\alpha$ は、 $\text{Na}_v1.2$ 、 $\text{Na}_v1.3$ 、 $\text{Na}_v1.6$ の3種類であることがわかった。また、これらの $\text{Na}_v\alpha$ は、DA細胞からIPLに伸びる神経突起の1本に発現し、細胞体に近い部分に局在していることがわかった。このような局在からは、RGCのAxon initial segment (AIS)部に $\text{Na}_v1.1$ 、 $\text{Na}_v1.6$ 発現が局在している<sup>16)</sup>ことが想起される。DA細胞におけるAIS様構造の報告はこれまでないが、検証が必要であろう。今回の研究では、 $\text{Na}_v1.2$ 、 $\text{Na}_v1.3$ 、 $\text{Na}_v1.6$ がそれぞれ単独で発現しているのか、あるいは、組み合わせて発現しているのかについては明らかにすることが出来なかった。本研究期間では成功しなかったが、今後も酵素処理時間、增幅条件などを検討し、単離DA細胞への単一細胞RT-PCR法の試みを続けていきたい。

近年、パーキンソン病における視覚への影響<sup>17)</sup>や、糖尿病性網膜症におけるドーパミン作動性アマクリン細胞の欠失<sup>18)</sup>についての報告がなされている。DA細胞の興奮性の違いにおけるsubpopulationが明らかになれば、網膜情報処理における暗順応－明順応の切り替えや、日周期の形成や調節についての新たな知見が得られるだけでなく、疾病的治療に役立つ基礎的知見が得られると期待される。

### 引用文献

- 1) Witkovsky P. Dopamine and retinal function. *Doc Ophthalmol* 2004; 108: 17-40.
- 2) Zhang DQ, Wong KY, Sollars PJ, Berson DM, Pickard GE, McMahon DG. Intraretinal signaling by ganglion cell photoreceptors to dopaminergic amacrine neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 14181-6.
- 3) Ribelayga C, Cao Y, Mangel SC. The circadian clock in the retina controls rod-cone coupling. *Neuron* 2008; 59: 790-801.
- 4) Gustincich S, Feigenspan A, Wu DK, Koopman LJ, Raviola E. Control of dopamine release in the retina: a transgenic approach to neural networks. *Neuron* 1997; 18: 723-36.
- 5) Feigenspan A, Gustincich S, Bean BP, Raviola E. Spontaneous activity of solitary dopaminergic cells of the retina. *J Neurosci* 1998; 18: 6776-89.
- 6) Puopolo M, Hochstetler SE, Gustincich S, Wightman RM, Raviola E. Extrasynaptic release of dopamine in a retinal neuron: activity dependence and transmitter modulation. *Neuron* 2001; 30: 211-25.
- 7) Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* 2005; 57: 397-409.
- 8) Fjell J, Dib-Hajj S, Fried K, Black JA, Waxman SG. Differential expression of sodium channel genes in retinal ganglion cells. *Brain Res Mol Brain Res* 1997; 50: 197-204.
- 9) Kaneko Y, Watanabe S. Expression of Nav1.1 in rat retinal AII amacrine cells. *Neurosci Lett*. 2007; 424: 83-8.
- 10) O'Brien BJ, Caldwell JH, Ehring GR, Bumsted O'Brien KM, Luo S, Levinson SR. Tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channels Na(v)1.8 and Na(v)1.9 are expressed in the retina. *J Comp Neurol* 2008; 508: 940-51.
- 11) Kaneko Y, Watanabe S. Voltage-gated sodium channel expressed in the rat retina. *J Physiol Sci* 2013; 63(Suppl): S141.
- 12) Witkovsky P, Schütte M. The organization of dopaminergic neurons in vertebrate retinas. *Vis Neurosci* 1991; 7: 113-24.
- 13) Newkirk GS, Hoon M, Wong RO, Detwiler PB. Inhibitory inputs tune the light response properties of dopaminergic amacrine cells in mouse retina. *J Neurophysiol* 2013; 110: 536-52.
- 14) Chabbert C, Mechaly I, Sieso V, Giraud P, Brugeaud A, Lehouelleur J, Couraud F, Valmier J, Sans A. Voltage-gated  $\text{Na}^+$  channel activation induces both action potentials in utricular hair cells and brain-derived neurotrophic factor release in the rat utricle during a restricted period of development. *J Physiol* 2003; 553: 113-23.
- 15) Wu C, Ivanova E, Cui J, Lu Q, Pan ZH. Action potential generation at an axon initial segment-like process in the axonless retinal AII amacrine cell. *J Neurosci* 2011; 31: 14654-9.
- 16) Van Wart A, Trimmer JS, Matthews G. Polarized distribution of ion channels within microdomains of the axon initial segment. *J Comp Neurol* 2007; 500: 339-52.
- 17) Bodis-Wollner I, Miri S, Glazman S. Venturing into the no-man's land of the retina in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2014; 29: 15-22.
- 18) Gastinger MJ, Singh RS, Barber AJ. Loss of cholinergic and dopaminergic amacrine cells in streptozotocin-diabetic rat and Ins2Akita-diabetic mouse retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 3143-50.

### 研究成果リスト

#### 学会発表

- 1) 金子優子, 青葉-藤牧香代, 渡辺修一. ラット網膜のドーパミン作動性アマクリン細胞における電位依存性 $\text{Na}^+$ チャネルの発現パターン, 第93回日本生理学会大会, 平成28年3月, 札幌