

(別紙1)

論文の内容の要旨

論文題目：網膜の ON 型運動方向選択性細胞に関する研究

氏名：雁木 美衣

初期視覚システムでは、網膜に投影された外界の情景から明るさ、色、方位、運動など様々な特徴が抽出される。光はまず網膜の視細胞で受容され、その応答は双極細胞を介して網膜の出力細胞である神経節細胞へと伝達される。この神経節細胞の段階ですでに、運動方向を検出するものがあることが知られている。本論文では、運動方向選択性を示す ON 型神経節細胞の応答特性および応答の形成機構について神経科学的に検討した。

第 1 章では、網膜神経節細胞で観察される運動方向選択性に関する研究を概観した。運動方向選択性神経節細胞 (DSGC: Direction selective ganglion cell) は、ある方向に運動する光刺激に対してはよく応答するが、逆の方向に運動する光刺激に対してはほとんど応答しないという性質を持つ。網膜における DSGC には大きく分けて 2 種類ある。光刺激のオン時とオフ時に応答する ON-OFF 型 DSGC と、光刺激のオン時のみに応答する ON 型 DSGC である。両者共、非対称な抑制性入力によって運動方向選択性が形成される。DSGC がよく応答する運動方向を選好方向、その逆の方向を非選好方向というが、細胞内記録を行うと、刺激の運動方向が非選好方向の場合、選好方向の場合よりも大きな抑制性の入力が見られる。また、運動方向選択性は GABA 受容体の阻害剤により消失する。DSGC は、網膜の内網状層にのびた樹状突起において、双極細胞から興奮性入力を受け、アマクリン細胞から抑制性入力を受ける。アマクリン細胞には多くの種類があるが、ON-OFF 型 DSGC に抑制性入力を送るのは starburst amacrine cell (SAC) であると考えられている。一方、ON 型 DSGC についての研究はあまり進んでいない。そこで、本研究では、ON 型 DSGC がどの種類のアマクリン細胞とシナプス結合し、どのように運動方向選択性を実現

させているのかを検討することを目的とした。

第 2 章では、まずラット網膜における ON 型 DSGC の応答特性について検討した。これまでの DSGC の研究は主にウサギ網膜についてのものであり、ラット網膜に関しては報告が少ない。そこでまず、ラットにもウサギ網膜 ON 型 DSGC の投射先であるといわれている MTN (Medial terminal nucleus) に投射する ON 型 DSGC があることを確認し、どのような光刺激によく応答するのか検討した。ラットの MTN に逆行性のトレーサーを注入して網膜神経節細胞を可視化し、ホールセル記録を行った結果、運動方向選択性を示す神経節細胞の存在が確認できた。運動方向選択性を示す領域を推定するために、バー刺激を呈示する際に周辺にマスクを掛け、そのマスクの内径を変化させた。すると、ラット網膜の ON 型 DSGC では、受容野の直径 (平均 477 μm) よりも小さい、内径 200 μm の条件から運動方向選択性が出現し、それ以上マスクの内径を大きくしても運動方向選択性に変化がないことが分かった。一方、ON-OFF 型 DSGC では内径 500 μm 以上の領域を刺激する必要があった。次に、この ON 型 DSGC に様々な速度のバー運動刺激を呈示したところ、これまでウサギ網膜の ON 型 DSGC で報告されていたような遅い刺激に対する選択性は認められず、速い刺激にも応答できることが分かった。

第 3 章では、逆行性の越シナプス性トレーサーである狂犬病ウイルスを用いて、ON 型 DSGC に入力するアマクリン細胞のサブタイプを検討した。ON-OFF 型 DSGC は SAC から運動方向に依存した非対称な抑制性の入力を受けているが、ON 型 DSGC でも SAC が関与しているのかどうか検討した。まず、ON 型 DSGC の投射先である MTN に狂犬病ウイルスを注入して ON 型 DSGC を感染させた。ウイルスが ON 型 DSGC (1 次感染ニューロン) の細胞体内で増殖・出芽し、DSGC のシナプス前細胞 (2 次感染ニューロン) に到達するまで 2.5 日間待ってからこのラットを灌流固定し網膜切片を作製した。抗狂犬病ウイルス抗体で免疫染色した結果、狂犬病ウイルスに感染した細胞は、神経節細胞層に多く見られた。さらに網膜を多重免疫染色し、狂犬病ウイルスにどの種類の神経細胞が感染しているのか検討したところ、狂犬病ウイルスに感染した 2 次感染ニューロンは、主に、SAC 以外の GABA 作動性アマクリン細胞であることが分かった。つまり、ON 型 DSGC は、ON-OFF

型 DSGC とは異なり、SAC 以外の GABA 作動性アマクリン細胞から抑制性入力の多くを受けていることが示唆された。また、この細胞は細胞体が神経節細胞層に存在する異所性アマクリン細胞であった。

第 4 章では、ラット網膜にどのような種類の異所性アマクリン細胞が存在するのかを検討した。異所性アマクリン細胞は GABA 作動性（抑制性）であるため、GABA 作動性の神経細胞が Venus という蛍光タンパク質で標識された遺伝子改変ラット（VGAT-Venus rat）を利用して実験を行った。蛍光を発している神経節細胞層の細胞体にホールセル・クランプ法を適用し、細胞の膜特性を調べるとともに、電極から Neurobiotin を細胞内に拡散させ、記録後に Neurobiotin に蛍光色素を結合させて可視化し、細胞形態を詳細に解析した。マウス網膜で行われた Müller らの研究（Müller *et al.*, 2007）を基に、ラット網膜で異所性アマクリン細胞の分類を試みた。その結果 Müller らが報告した 10 種類の異所性アマクリン細胞の内、8 種類がラットでも確認でき、そのうち 5 種類がスパイクを発生させるタイプであることが分かった。

第 5 章では、異所性アマクリン細胞のうち、ON 型 DSGC の運動方向選択性の形成に関わるアマクリン細胞を絞り込む実験を行った。スパイクを発生させるアマクリン細胞が運動方向選択性の形成に関わっているか否かを検討するために、スパイクの発生に必須であるナトリウムチャンネルを阻害する tetrodotoxin（TTX）を灌流投与した。SAC はスパイクを発生させないため、もし、TTX が運動方向選択性を失わせることになれば、SAC 以外のアマクリン細胞が運動方向選択性を形成していることになる。この実験では ON 型 DSGC を膜電位固定し、スパイク発火ではなくシナプス入力を観察した。バーを 8 方向に運動させたところ、特に応答の初期相において、抑制性入力、選好方向では小さく、逆方向では大きいという明確な運動方向選択性が観察された。次に、TTX を灌流投与すると、応答の初期相における抑制性入力がほぼ消失した。しかし、興奮性入力には大きな変化は無かった。この結果から、ON 型 DSGC に非対称な抑制性入力を直接送っているのはスパイクを発生させるアマクリン細胞であることが示唆された。また、TTX でスパイク発火を阻害した後でも応答の後期相における抑制性入力は存在したことから、スパイクを発生させな

いアマクリン細胞も ON 型 DSGC にシナプス結合していることが示唆された。

第 6 章では実験結果から想定される運動検出器について考察した。第 3 章の結果から、ON 型 DSGC に抑制性入力を送っているのは、SAC 以外の異所性 GABA 作動性アマクリン細胞が主であり、第 5 章の結果から、スパイクを発生させるアマクリン細胞が運動方向選択性を形成していることが分かった。したがって、ON 型 DSGC において運動方向選択性の形成に関与するのは、スパイクを発生させる異所性の GABA 作動性アマクリン細胞であることが示唆された。第 4 章で分類した異所性アマクリン細胞の中から、運動方向選択性の形成に関与するアマクリン細胞の候補となりうるものを検討すると、スパイクを発生させるアマクリン細胞の中でも、特定の神経節細胞に素早く入力する必要があるため、短い軸索を持っているものが適当であると思われる。また、樹状突起が非対称であれば、特定の運動方向に対して選択的に応答しうる。これらの条件を満たすアマクリン細胞として、MA-S1/S5 が候補に挙げられる。

ON-OFF 型 DSGC は外側膝状体や上丘に投射しており、サッケード等の眼球運動や対象に対する定位運動などに関与することが知られている。一方、ON 型 DSGC は視索から分かれて副視索系の核に投射している。副視索系の神経細胞は副動眼神経核、前庭神経核、下オリーブ核等に投射していることから、視運動性反応や前庭動眼反射に関与するといわれている。上丘が様々な網膜の神経節細胞の応答を統合し、かつ様々な感覚入力や高次皮質からの入力を受けるのに対して、副視索系の主な入力源は ON 型 DSGC である。したがってラットにおいて、ON 型 DSGC が ON-OFF 型 DSGC と比較して受容野内の小さな領域の運動に運動方向選択的に応答できる性質を持つということは、副視索系の関与する眼球運動が精度よく行われるということの意味している。上丘において他の神経節細胞等の情報と統合される ON-OFF 型 DSGC とは異なり、特定の眼球運動に必要な視覚情報の伝達という使命をもった ON 型 DSGC は、ON-OFF 型と異なるメカニズムで運動方向選択性が形成されている可能性が十分あると思われる。本研究により、ON 型 DSGC は ON-OFF 型 DSGC と異なり、SAC 以外のスパイクを発生させる GABA 作動性異所性アマクリン細胞の関与が示唆されたが、この結果は十分妥当性のあるものだと考えられる。