

150. 桿体・錐体に次ぐ第三の光受容網膜細胞の機能解析

羽鳥 恵

慶應義塾大学 医学部 眼科学教室 時間生物学研究室

Key words : 光受容, メラノプシン, 概日リズム

緒 言

齧歯類を使用した研究により、数%の網膜神経節細胞 (RGC) に青色光感受性の光受容体であるメラノプシンが発現し (図1)、視細胞層の桿体・錐体に加えて第三の光受容細胞として機能することが明らかになってきた。メラノプシン発現網膜神経節細胞 (mRGC) は自身が感受した光のみならず、桿体・錐体からの光情報を集約して脳に伝達し、概日リズムの位相調節や瞳孔収縮、睡眠の調節や片頭痛の光による悪化などの視覚以外の光応答 (非視覚応答) を担う^{1, 2)}。そのため mRGC の機能障害は片頭痛や睡眠障害など全身にわたる不調の一因であると考えられる。パソコンのモニター画面のような人工的な光源から発せられるブルーライトや夜遅くまでの光照射環境はヒトの概日リズムを乱す原因であり、概日時計の乱れはメタボリックシンドローム、肥満、癌、冠状動脈性心臓病や認知症などの疾病を引き起こすことが知られている。このように、非視覚光応答は非常に重要な生理機能を担うにも関わらずその研究は視覚応答と比べ大幅に遅れている。特に、霊長類での研究は全世界的にほとんど行われていない。

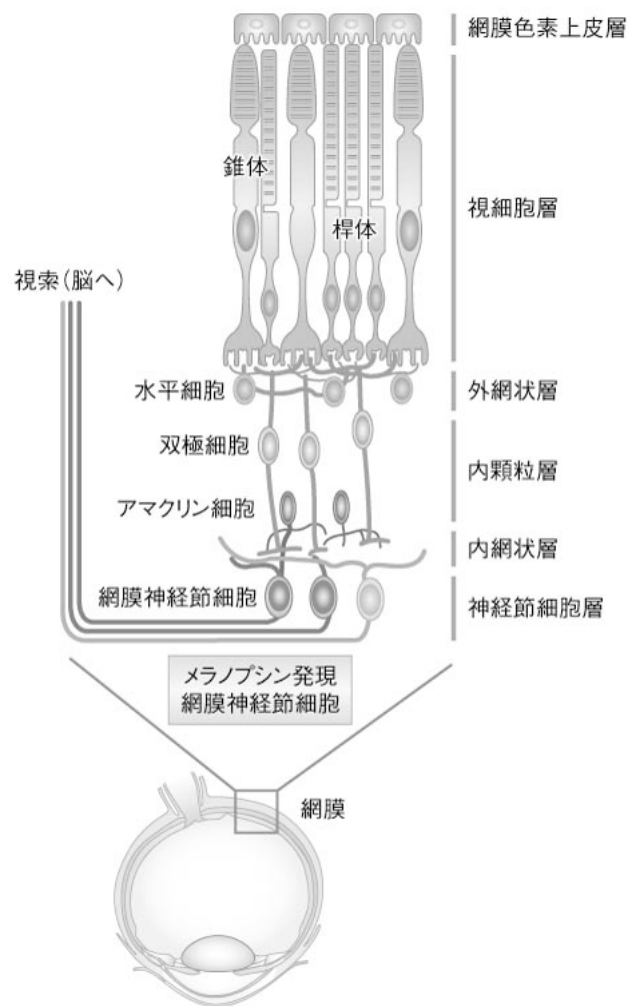


図1. 哺乳類の網膜と光受容細胞

桿体、錐体、メラノプシン発現網膜神経節細胞 (mRGC) という3種類の光受容細胞が発現している。桿体および錐体は主に視覚応答を、メラノプシン発現網膜神経節細胞は主に非視覚応答を担う。RGC: retinal ganglion cell, mRGC: melanopsin expressing RGC.

方法、結果および考察

mRGCは桿体・錐体とは全く異なるシグナル伝達系を介して光情報を伝達するため、メラノプシンを標的とした薬剤スクリーニングによって非視覚光応答の特異的な調節が可能となるに違いないと考え、8万個の化合物からメラノプシンのアンタゴニストを探索した。その結果メラノプシンに特異的に作用する拮抗薬としてスルホンアミド系化合物を同定し、オブシナマイドと命名した。オブシナマイドは桿体あるいは錐体由来する光応答には影響をあたえず、瞳孔の収縮や光回避行動などメラノプシンに依存する視覚以外の光応答のみを減弱させ、その効果は可逆的であった(図2)³⁾。生体においてもオブシナマイドは桿体あるいは錐体には影響をあたえず、メラノプシンに特異的に作用するのだろうか? 個体レベルでの実験を行うため、オブシナマイドが腹腔内投与のち体内にどの程度の時間にわたり存在するのか調べたところ、脳および網膜ともに、投与から30分後までは作用を示すのに十分な量が存在していたが、60分後には大幅に減少することがわかった。そこで、オブシナマイドの投与から30分以内に網膜電位を測定し、桿体および錐体への影響を解析した。その結果、オブシナマイドの投与は網膜電位に影響をあたえなかったことから、桿体および錐体には作用しないと考えられた。また、オブシナマイドの投与により、桿体に発現する光受容体であるロドプシンの吸収スペクトルにも変化はみられなかった。非視覚応答に対しオブシナマイドは影響をあたえるだろうか? 自然変

異により桿体および錐体のほぼすべてを失っているマウスを用いた。桿体・錐体変異マウスを暗黒下で順応させたのちオプシナマイドを腹腔内投与して青色光を照射して瞳孔の大きさを測定した。その結果、対照の溶媒を投与したマウスと比べ、オプシナマイドを投与したマウスの瞳孔の収縮は顕著に減少していた。また、メラノプシンノックアウトマウスに対照の溶媒あるいはオプシナマイドを投与した場合、青色光に対する瞳孔の収縮に差はみられなかった。以上の実験結果は、オプシナマイドがメラノプシンに特異的な阻害薬であることを強く支持した。

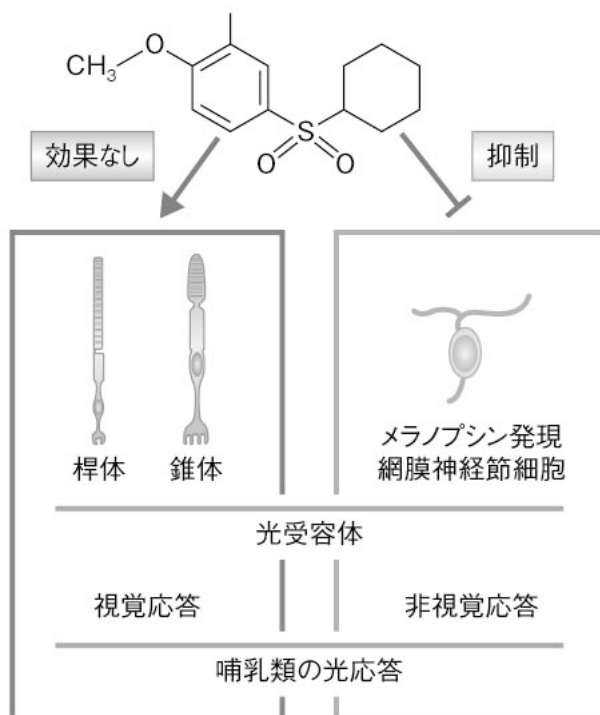


図2. メラノプシンに特異的に作用するアンタゴニスト

オプシナマイドはメラノプシンに作用する非レチノイド型阻害薬である。桿体および錐体に発現する光受容体および視覚応答には影響を及ぼさず、メラノプシン発現光受容細胞に由来する視覚以外の光応答を減弱させる。

本研究課題ではこのメラノプシンアンタゴニストを、進化的にヒトにより近く昼行性である非ヒト霊長類であるマーモセットに点眼もしくは注射して mRGC 機能の薬理的な調節を可能にすると共に、アンタゴニストを投与された動物を詳細に観察することによって mRGC の新規機能を見出し、霊長類での非視覚入力メカニズムを世界で初めて見出す足がかりとすることを目的とした。マーモセットのメラノプシンの配列は発表されていないため、ゲノム情報およびゲノム PCR を組み合わせてまずアミノ酸配列を決定した。決定したマーモセットのメラノプシン塩基配列に基づいてプローブを設計し、網膜切片に対する *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。その結果マーモセットの網膜にメラノプシン mRNA の発現を見出すことに成功した (未発表)。

メラノプシンは青色に吸収極大をもち、光の照射によりイノシトールトリリン酸経路が活性化され細胞内のカルシウム濃度が上昇する。哺乳類培養細胞にヒトのメラノプシンを安定的に発現させ、青色光を照射したのち細胞内のカルシウム濃度を測定してメラノプシンの活性化レベルの変化を評価する系を新設ラボにおいて立ち上げた。この系を用いて、マウス、マーモセットおよびヒトのメラノプシンを哺乳類培養細胞に発現させ、青色光照射による細胞内カルシウム量の変化を測定した。その結果、上記3種いずれの生物のメラノプシンでも青色光による活性化が観察され (図3、未発表)、測定系の妥当性が証明され、且つ、私たちがクローニングしたコモンマーモセットのメラノプシンが光受容体として作用しうる可能性を支持した。

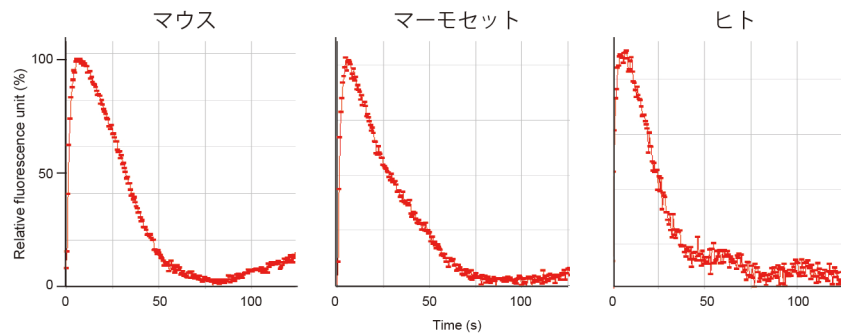


図3. 各種生物のメラノプシンの光応答性
青色光照射と同時にカルシウム量変化を Fluo-4 を用いて検出した。

現在、メラノプシンの生体レベルの機能を明らかにするため、概日リズム測定システムおよび瞳孔収縮を測定する系の立ち上げに取り掛かり、順調に進行中である。

本研究をご支援頂きました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Hatori M, Panda S. The emerging roles of melanopsin in behavioral adaptation to light. *Trends Mol Med.* 2010 Oct;16(10):435-46. doi: 10.1016/j.molmed.2010.07.005. PMID: 20810319.
- 2) Lucas RJ. Mammalian inner retinal photoreception. *Curr Biol.* 2013 Feb 4;23(3):R125-33. doi: 10.1016/j.cub.2012.12.029. PMID: 23391390.
- 3) Jones KA, Hatori M, Mure LS, Bramley JR, Artymyshyn R, Hong SP, Marzabadi M, Zhong H, Sprouse J, Zhu Q, Hartwick AT, Sollars PJ, Pickard GE, Panda S. Small-molecule antagonists of melanopsin-mediated phototransduction. *Nat Chem Biol.* 2013 Oct;9(10):630-5. doi: 10.1038/nchembio.1333. PMID: 23974117.