

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	宋 勇 錫
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Role of Glial Cells in Regulating Retinal Blood Flow during Flicker-Induced Hyperemia in Cats</p> <p>(フリッカー光刺激後の網膜血流増加反応における Glia 細胞の役割)</p> <p>共 著 者 名</p> <p>長岡 泰司, 善岡 尊文, 中林 征吾, 谷 智文, 吉田 晃敏</p> <p><i>Invest Ophthalmol Vis Sci. in press.</i></p> <p>研 究 目 的</p> <p>神経活動に応じて適切な組織血流量を維持・調節する神経-血管連関機構の存在が古くから脳血流研究において知られているが、¹⁾以前我々はフリッカー光刺激後の網膜神経興奮後に網膜血流量が約 60%増加することを報告し、同じ中枢神経系である網膜においてもその存在が明らかとなった。さらにこの血流増加反応の一部に強力な血管拡張因子である神経由来の一酸化窒素が関与していることを明らかにしたが、それ以外の血管拡張因子については未解明であった。近年、脳の神経-血管連関において、神経と血管に加えて Glia 細胞が重要な役割を担っていることが明らかとなり ²⁾、網膜においても、フリッカー光刺激後の網膜血流増加反応に Glia 細胞の関与が考えられるが、これまで詳細な検討はなされていなかった。</p> <p>そこで我々は、Gliotoxin として知られる L-2-aminoadipic acid (LAA)³⁾を硝子体内に局所投与して網膜 Glia 細胞の働きを特異的に阻害し、フリッカー光刺激後の網膜血流増加反応を指標として、網膜における神経-血管連関における網膜 Glia 細胞の役割について検討した。</p> <p>材 料 ・ 方 法</p> <p>1. 実験動物</p> <p>実験には成ネコ 36 匹 (体重 2.6-3.2kg)を用いた。気管内挿管後、セボフルランで全身麻酔し臭化パンクロニウムで非動化し実験を行った。実験中は、平均血圧、心拍数、眼圧を継続</p>			

的にモニターし、動脈血ガス分析を適宜行った。

2. 網膜循環の評価

我々が開発したレーザードップラー眼底血流計を用い、網膜動脈の血管径と絶対血流速度を同時に測定して絶対血流量を算出した。

3. フリッカー光刺激

光源としてLEDを用い、刺激頻度はネコ網膜で最大の血流増加を示す16Hzで行った。

4. 薬物の硝子体内微量注入

GlutathioneであるLAA (0.4 mM, 1.2 mM, n=6)を硝子体に注入した。LAAは0.01規定の塩酸に、に溶解し、基剤のみ投与したものを対照群 (n=6)とした。LAAは投与後24時間で効果が最大となるため、網膜血流測定の24時間前に投与した。

5. LAAの定常網膜血流への影響

LAA投与前後の網膜血流を測定し、定常状態の網膜血流へのLAAの影響を検証した。(n=4)

6. フリッカー光刺激による網膜血流量の変化

網膜血流はフリッカー光刺激前の5分間(ベースライン)と刺激後3分間測定し、ベースラインからの最大血流増加率を算出した。

7. LAAとL-NPAの重複投与後のフリッカー血流増加反応の測定

LAA投与22時間後に神経由来NO合成酵素の選択的阻害剤であるL-NPAを重複投与し、フリッカー血流増加反応を測定した。(n=5)

8. LAAの網膜細胞の形態・機能への影響

高濃度のLAAはGlia以外の細胞も障害するため、1.2 mM LAA投与後に下記の実験を行いcontrol群とLAA群間で比較した。

a) 網膜ホルマウント免疫染色後に画像解析ソフトでGFAP expressionを定量 (n=5)

b) 血管内皮由来一酸化窒素依存性血管拡張因子Bradykinin投与後の網膜血流測定を行い、血管内皮機能を評価 (n=5)

c) 網膜組織切片(HE)を作成し、神経厚(神経節細胞・内顆粒層・外顆粒層)を評価 (n=5)

d) 網膜電図(ERG)で神経機能を評価 (n=7)

9. 統計学的処理

2群間の比較には、Mann-Whitney U-testもしくはWilcoxon signed-rank testを行った。同一群の比較には反復分散分析(one-way ANOVA for repeated measurements)後、Bonferroni multiple range testを行った。危険率5%未満を統計学的有意とした。

成 績

1. LAA の定常網膜血流への影響

LAA 投与前と投与後の定常状態の網膜血流量に有意な差はなかった。

2. LAA の網膜細胞の形態・機能への影響

a) 免疫染色

GFAP expression (3×3 mm あたり)は、control 群に比べ LAA 群では有意に減少していた。

b) Bradykinin 投与後の網膜血流量の変化

Bradykinin 投与後、control 群、LAA 群のどちらも投与前に比べ網膜血流量が約 2 倍に増加し、両群間に有意な差はなかった。

c) 組織切片

神経節細胞層、内顆粒層、外顆粒層の各層の厚みは、control 群と LAA 群間で有意な差はなかった。

d) ERG

LAA 投与前に比べ投与 24 時間後において、a, b 波の潜時の延長や振幅の減少は認めなかった。

3. フリッカー光刺激後の網膜血流量の変化

フリッカー光刺激後の網膜血流量の最大変化率は、control 群 ($53.5 \pm 2.5\%$)に比べ、LAA 群ではいずれの濃度においても有意に抑制された(0.4 mM: $37.1 \pm 5.4\%$, 1.2 mM: $19.6 \pm 2.4\%$)。

4. LAA と L-NPA の重複投与後のフリッカー血流増加反応の測定

LAA に加えて L-NPA を投与した群では、フリッカー血流増加反応はほぼ完全に消失した。

考 案

LAA 投与前後の定常状態の網膜血流に変化は無かった。この結果に対しては、1. 定常網膜血流の調節に Glia 細胞は関与しない 2. LAA で抑制された Glia 細胞の働きを他の血流調節機構が補完した 3. 1.2 mM の LAA では定常血流が変化するほど Glia 細胞を抑制しない、の 3つの可能性が考えられた。この点に関しては今後さらなる検討が必要と考えられた。

網膜ホールマウント免疫染色において LAA 群は control 群に比べて、GFAP expression が有意に抑制された一方、Bradykinin による内皮細胞由来の血管拡張反応、網膜組織切片での各神経細胞層の厚み、網膜電図波形の何れの結果も両群間に有意な差はなかった。本研究で用いた 1.2 mM の LAA はネコ網膜において、血管機能には直接影響せず、Glia 細胞の働きのみを特異的に抑制する濃度と考えられた。

以前我々は、神経系 NO 合成酵素阻害剤である L-NPA の投与によりフリッカー血流増加反応

が3分の1に抑制されることを報告した(参考文献1)。本研究ではLAA投与によりフリッカー血流増加反応が同様に3分の1に抑制され、さらに、L-NPAとLAAの重複投与によりこの反応が消失した。以上の結果から、フリッカー血流増加反応には神経細胞由来のNO、Glia細胞由来のNO、Glia細胞由来のNO以外の因子の3つの血管拡張因子が関わっていることが考えられた。

本研究でフリッカー血流増加反応の3分の2にGlia細胞が関与していることが明らかとなり、その一部はGlia細胞由来のNOによるものと考えられたが、それ以外のGlia細胞由来血管拡張物質については未解明のままである。網膜Glia細胞は血管拡張物質としてNOの他にプロスタグランジンE₂(PGE₂)やエポキシエイコサトリエン酸(EET)を有していることが知られており、今後はそれらNO以外の血管拡張因子について、さらなる検討を行いたい。

結 論

1. GliotoxinであるLAAの硝子体注入により、フリッカー光刺激後の網膜血流増加反応が一部抑制されたことから、Glia細胞がフリッカー血流増加反応に関与していることが判明した。
2. LAAと神経系NO合成酵素阻害剤であるL-NPAの重複投与により、フリッカー血流増加反応がほぼ完全に消失したことから、フリッカー血流増加反応におけるGlia細胞の関与は、グリア細胞由来のNOとNO以外の血管拡張物質によるものと示唆された。

引 用 文 献

1. Roy CS, Sherrington CS. On the Regulation of the Blood-supply of the Brain. *J Physiol.* 1890;11:85-158 117.
2. Attwell D, Buchan AM, Charpak S, Lauritzen M, Macvicar BA, Newman EA. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature.* 2010;468:232-243.
3. Shibata M, Sugiyama T, Kurimoto T, et al. Involvement of glial cells in the autoregulation of optic nerve head blood flow in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53:3726-3732.

参 考 論 文

1. Yoshioka T, Nagaoka T, Song YS, Yokota H, Tani T, Yoshida A. Role of neuronal nitric oxide synthase in regulating retinal blood flow during flicker-induced hyperemia in cats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56(5):3113-20

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	宋 勇錫

審査委員長 高草木 薫



審査委員 船越 洋



審査委員 廣川 博之



学位論文題目

Role of glial cells in regulating retinal blood flow
during Flicker-induced hyperemia in cats

フリッカー光刺激後の網膜血流増加反応におけるグリア細胞の役割

Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2015; 56. 7551-7559

古くから、脳循環には局所の神経活動に対応して局所血流を調節するメカニズムが存在すると考えられてきた。宋氏は、この作業仮説を網膜の循環動態において検証すると共に、局所循環調節に関与する網膜グリア細胞の役割について検討した。実験にはネコ in vivo 標本を用い、網膜グリア細胞の活動を特異的に阻害する Gliotoxin (L-2-aminoadipic acid; LAA) を硝子体内に微量注入し、神経細胞・グリア細胞・網膜血流の変化を解析した。LAA 投与はグリア細胞の機能を特異的に抑制した。しかし、定常的網膜血流ならびに神経細胞の機能構造を変化させなかった。一方、LAA 投与によって Flicker 刺激に伴う血流増加反応は抑制された。さらに、この抑制反応にはグリア細胞ならびに神経細胞由来の一酸化窒素 (NO) が関与することも明らかとなった。これらの成績に基づいて、宋氏らは、網膜血流の局所調節には、グリア細胞—一酸化窒素連関を介するメカニズムが存在することを証明した。

宋氏は学位論文の審査において上記の研究成果を十二分に説明するとともに、その発表態度と内容は極めて秀逸であった。また、各審査員の質問に対して真摯かつ的確な返答と考察を行った。各審査員は、査問過程において、宋氏が本領域における知識のみならず、周辺領域に関する知識を十分に備えていることを確認した。よって、各審査員は宋氏が本学における博士(医学)の取得に相応しいと判断した。