

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08242

研究課題名(和文) 網膜血管の構造構築および機能調節における網膜神経の役割

研究課題名(英文) Role of retinal neuronal cells in the architecture and functional regulation of retinal blood vessels

研究代表者

森 麻美 (Mori, Asami)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：80453504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、網膜における血管と血管周囲に存在する神経との相互作用について明らかにすることを目的とした。正常ラットに少量の NMDA を硝子体内投与すると、視神経節細胞及びアマクリン細胞に発現している神経由来 NO 合成酵素が活性化され、NOの産生・遊離が亢進し、それがグリア細胞に作用して網膜血管が拡張することが示された。一方、網膜神経傷害時には、NMDA による網膜血管拡張に、誘導型 NO 合成酵素由来の NO が関与することも示された。以上より、網膜血管拡張には、神経細胞及びグリア細胞から産生・遊離される NO が重要な役割を演じていることが示された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate interactions between blood vessels and neuronal cells in the retina. Intravitreal injection of low dose of NMDA (6 nmol) facilitated neuronal nitric oxide (NO) synthase-derived NO production in retinal ganglion and amacrine cells. NO released from neuronal cells acted on retinal glial cells, thereby dilating retinal blood vessels. Intravitreal injection of high dose of NMDA (200 nmol) induced damage to retinal neuronal cells and blood vessels. In the injured retina, NMDA (6 nmol)-induced vasodilation was mediated by inducible NO synthase-derived NO. These results suggest that NO released from neuronal and glial cells plays an important role in the vasodilatory mechanisms of blood vessels in the retina.

研究分野：薬理学

キーワード：微小循環 エンジン 緑内障 血管生物学 網膜血管 網膜神経 グリア 血管連関 一酸化窒素 プロスタグラ

## 1. 研究開始当初の背景

緑内障と糖尿病網膜症は、我が国の後天性失明原因の上位を占める疾患であり、外部情報の 8 割を視覚から取得するヒトにとって、これらの眼疾患は QOL を著しく低下させる原因となる。何れの疾患も、その発症・進行には網膜循環障害の関与が示唆されているが、近年、脳において、神経と血管の間に存在する相互作用が注目を集めている。網膜においても同様の相互作用が存在している可能性があるが、未だ十分な検討がなされていない。そこで当研究室では、網膜における神経と血管間の相互作用について検討を進め、網膜毛細血管の構造及び機能の維持に網膜神経が関与することを報告してきた。しかし、網膜への血流を担う網膜細動脈の機能維持に網膜神経が及ぼす影響についてなど、不明な点が多く残されている。

健常時の網膜循環調節機構における網膜神経の役割の全貌を明らかにし、さらに網膜循環障害の発症機序の詳細を解明することは、網膜循環障害に起因する種々の眼疾患に対する新たな予防・治療薬の開発に繋がるものと考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、我々が独自に構築した各種網膜循環評価法を用い、網膜血管と網膜神経との間に存在する相互作用の詳細を明らかにするとともに、それに関与する因子を同定し、最終的には網膜循環改善と神経保護の両作用を併せ持つ、新規緑内障ならびに糖尿病網膜症の予防・治療薬の探索を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 網膜血管反応性の評価：ラットの眼底を、独自に構築した小動物用眼底撮影デジタルマイクロスコープを用いて経時的に撮影した。実験終了後に撮影した眼底像の画像処理

を行い、網膜血管径を測定することにより薬物投与による網膜血管反応性を評価した。

(2) 網膜神経傷害ラットを用いた検討：麻酔下のラットの硝子体に 200 nmol/eye の大量の *N*-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) を投与し、7 あるいは 14 日後に各種検討を行った。

(3) 網膜の関連因子の発現分布と発現細胞の同定：実験終了後あるいは麻酔下のラットにおいて、全身性に 1% パラホルムアルデヒドを定圧灌流し組織固定を行った。眼球を摘出して網膜フラットマウント標本と網膜組織の凍結切片標本を作製した。

## 4. 研究成果

### (1) 網膜血管の構造および機能に及ぼす網膜神経の影響の解明

網膜神経傷害の程度と網膜血管拡張機能障害との関係：NMDA 誘発網膜神経傷害ラットでは、NMDA 投与 2-3 日後から視神経節細胞が脱落し始め、その傷害は 7 日後でほぼ最大となる。この時点の網膜血管機能を観察するため、網膜神経傷害処置 7 日後のラットを用いて検討したところ、内皮依存性のアセチルコリン誘発網膜血管拡張反応は対照群と同程度であることが示された。なお、網膜神経傷害処置 14 日後の網膜血管能が減弱することはすでに報告している。

### (2) 網膜血管の構造および機能に影響を及ぼす神経由来因子の同定

健常ラットを用いた網膜神経刺激に伴う網膜血管拡張能の検討：少量の NMDA (6 nmol) の硝子体内投与により、著しい網膜細動脈拡張反応が観察された (図 1)。この反応は、非選択的 NO 合成酵素阻害薬 *N*<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methylester (L-NAME, 40 nmol) あるいは神経型 NO 合成酵素 (nNOS) 阻害薬 *N*<sup>ω</sup>-propyl-L-arginine (L-NPA, 400 nmol) により有意に抑制された。そこで、

網膜における nNOS の発現部位を観察した結果、nNOS は網膜神経節細胞及びアマクリン細胞に発現していることが示された。

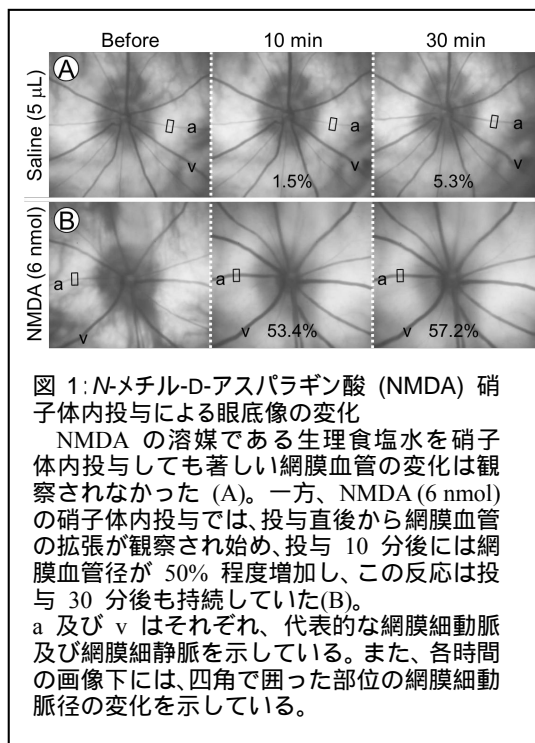


図 1: *N*-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 硝子体内投与による眼底像の変化

NMDA の溶媒である生理食塩水を硝子体内投与しても著しい網膜血管の変化は観察されなかった (A)。一方、NMDA (6 nmol) の硝子体内投与では、投与直後から網膜血管の拡張が観察され始め、投与 10 分後には網膜血管径が 50% 程度増加し、この反応は投与 30 分後も持続していた (B)。a 及び v はそれぞれ、代表的な網膜細動脈及び網膜細静脈を示している。また、各時間の画像下には、四角で囲った部位の網膜細動脈径の変化を示している。

また、NMDA あるいは NO 供与体の硝子体内投与による網膜血管拡張反応は、グリア細胞の機能を障害するグリア毒 disialoganglioside-GD1b (15 nmol) により有意に抑制された。

さらに、NMDA あるいは NO 供与体の硝子体内投与による網膜血管拡張反応は、シクロオキシゲナーゼ阻害薬 indomethacin (10 nmol) によっても有意に抑制された。

網膜神経傷害ラットを用いた網膜神経刺激に伴う網膜血管拡張能の検討：網膜神経傷害処置 7 日後のラットにおいて、NMDA (6 nmol) 硝子体内投与による網膜血管拡張反応は、対照ラットの反応と比較して著しく抑制された。この網膜神経傷害ラットにおける NMDA 誘発網膜血管拡張反応は、nNOS 阻害薬により抑制されず、誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) 阻害薬により抑制された。

以上の結果から、健常時には、1) NMDA は、視神経節細胞又はアマクリン細胞の nNOS を活性化することにより NO 産生 / 遊離を亢進させ、グリア細胞を刺激することによ

て網膜血管を拡張させること、2) NO はグリア細胞からエポキシエイコサトリエン酸 (EET) の産生・遊離を亢進すること、3) NMDA は、上述経路に加え、血管拡張性プロスタグランジン (PG) が関与する経路も活性化することが明らかになった。一方、網膜神経傷害時には、NMDA による網膜血管拡張には iNOS 由来の NO が関与するようになることが示唆された。

本研究より、網膜血管緊張性は、網膜血管の周囲に存在している神経細胞あるいはグリア細胞によって調節を受けている可能性が示された。網膜血管緊張性調節機序において、血管内皮細胞由来の NO や PG が寄与している報告は数多くあるが、本研究の結果から、網膜における神経細胞及びグリア細胞から産生・遊離される NO や PG も血管拡張に重要な役割を演じていることが示された。これらのことは、緑内障や糖尿病網膜症で生じる網膜循環障害に、網膜神経細胞あるいはグリア細胞の構造 / 機能変化が関与する可能性を示唆している。従って、これら眼疾患の予防や治療には、網膜における血管のみならず、神経及びグリアを含む、網膜全体を保護する薬物を標的として探索することが重要であるといえる。

## 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

Mori A, Ishikawa E, Amano T, Sakamoto K, Nakahara T. Anti-diabetic drug metformin dilates retinal blood vessels through activation of AMP-activated protein kinase in rats. *Eur J Pharmacol.* 798: 66-71, 2017. Doi: 10.1016/j.ejphar.2017.01.003. 査読有

Mori A, Sekito A, Sakamoto K, Ishii K, Nakahara T. Stimulation of  $\beta_1$ - and

$\beta_2$ -adrenoceptors dilates retinal blood vessels in rats. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 390: 527-533, 2017. Doi: 10.1007/s00210-017-1349-4. 査読有

Someya E, Mori A, Sakamoto K, Ishii K, Nakahara T. Stimulation of  $\mu$ -opioid receptors dilates retinal arterioles by neuronal nitric oxide synthase-derived nitric oxide in rats. Eur J Pharmacol. 803: 124-129, 2017. Doi: 10.1016/j.ejphar.2017.03.043. 査読有

Mori A, Higashi K, Wakao S, Sakamoto K, Ishii K, Nakahara T. Probucol prevents the attenuation of  $\beta_2$ -adrenoceptor-mediated vasodilation of retinal arterioles in diabetic rats. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 390:1247-1253, 2017. Doi: 10.1007/s00210-017-1423-y. 査読有

Someya E, Mori A, Asano D, Morita A, Sakamoto K, Nakahara T. Role of glial cells in  $\mu$ -opioid receptor-mediated vasodilation in the rat retina. Curr Eye Res. 43:350-356, 2018. Doi: 10.1080/02713683.2017.1403631. 査読有

Akagawa M, Mori A, Sakamoto K, Nakahara T. Methylglyoxal impairs  $\beta_2$ -adrenoceptor-mediated vasodilatory mechanisms in rat retinal arterioles. Biol Pharm Bull. 41: 272-276, 2018. Doi: 10.1248/bpb.b17-00861. 査読有

[学会発表](計 8 件)

森 麻美, 牛久保 裕子, 坂本 謙司, 中原 努, 石井 邦雄 網膜における神経細胞を介する循環調節機構 第 133 回日本薬理学会関東部会 2015.10.10. 柏の葉カンファレンスセンター(千葉県柏市)

森 麻美, 滑川 諒, 長谷部公美, 斉藤 麻希, 牛久保裕子, 坂本謙司, 中原 努, 石井邦雄 NOはCOX-1/PGI<sub>2</sub>/IP受容体シ

グナル経路を介してラット網膜血管を拡張させる 第 89 回日本薬理学会年会 2016.03.10. パシフィコ横浜会議センター(神奈川県横浜市)

森 麻美, 牛久保 裕子, 坂本 謙司, 中原 努 視覚障害をもたらす眼疾患における網膜循環障害 生体機能と創薬シンポジウム2016 2016.7.26 東北大学 川内北キャンパス(宮城県仙台市)

森 麻美, 關戸 茜衣, 三輪 朋代, 牛久保 裕子, 坂本 謙司, 中原 努 ラット網膜血管における  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  および  $\beta_3$ -アドレナリン受容体刺激を介する拡張反応 第26回日本循環薬理学会 2016.12.2 信州大学医学部附属病院(長野県松本市)

染谷英理子, 森 麻美, 坂本謙司, 石井 邦雄, 中原 努 ラット網膜においてオピオイド  $\mu$  受容体刺激は神経由来のNO産生を介して血管を拡張させる 第 90 回日本薬理学会年会 2017.03.15 長崎新聞文化ホール(長崎県長崎市)

森 麻美, 石川衣里子, 天野智世, 坂本 謙司, 中原 努 抗糖尿病薬のメトホルミンはラット網膜血管を拡張させる 第 90 回日本薬理学会年会 2017.3.16 長崎新聞文化ホール(長崎県長崎市)

赤川真理, 森 麻美, 坂本謙司, 中原 努 ラット網膜において methylglyoxal はアドレナリン  $\beta_2$  受容体を介する血管拡張機序を障害する 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2017 2017.8.26 京都薬科大学 躬行館(京都府京都市)

森 麻美, 長谷川 茉美, 谷谷 歩美, 坂本 謙司, 中原 努 ラットにおいてアドレナリン  $\beta_2$  受容体刺激は Gi タンパク質-BK<sub>Ca</sub> チャネル経路の活性化を介して網膜血管を拡張させる 第 27 回日本循環薬理学会 2017.12.1 ウィンクあいち(愛知県名古屋市)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

森 麻美 (MORI, Asami)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：80453504