

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592586

研究課題名(和文) 赤色・青色光刺激による家兔対光反射とメラノプシンの関与

研究課題名(英文) The pupillary light reflex induced by red and blue light stimulations, and melanopsin photoreception of the rabbit.

研究代表者

石川 均 (Ishikawa, Hitoshi)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号：80265701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 500,000円、(間接経費) 150,000円

研究成果の概要(和文)：家兔の光受容器と対光反射に関して評価を行った。家兔の対光反射は635nmの赤色光刺激と比較し470nmの青色光刺激にて持続的で大きな縮瞳を示した。硝子体内薬物注入家兔、もしくは変異型ロドプシン遺伝子トランスジェニック(Tg)家兔にて視細胞が萎縮した後も青色光刺激による対光反射のみ残存した。組織学的に家兔は視細胞の約95%は杆体で、網膜神経節細胞(RGC)中の超大型、多角で樹状突起が豊富なRGCは、メラノプシン含有RGCと考えられ、視細胞萎縮後も組織学的特徴を維持していた。以上の結果より家兔の対光反射は大部分が視細胞由来であるものの青色光刺激による反応の一部はmRGC由来であると結論した。

研究成果の概要(英文)：Recently, a new photosensitive pigment, melanopsin, was found in 1998. Later, melanopsin-containing retinal ganglion cells (mRGCs) were discovered and revealed that mRGCs would depolarize without input from the photoreceptors, meaning that these cells were photosensitive. The mRGCs mediate the pupillary light reflex. We investigated the mechanisms of photoreception by retinal photoreceptor cells, and to evaluate the relative contribution of pupil light response using the control, pharmacological blockade of neurotransmission (PB) model and a transgenic model of retinal degeneration (Tg) rabbit. Although rod and cone photoreceptors were disappeared in the PB and Tg model, miosis was still induced during exposure to blue light (470nm). Our study also indicated that some histologically-identified RGCs were consistent with the characteristics and structures of mRGC. The greater sustained constriction of pupils to blue light in eyes with outer retinal damage reflects mRGC activation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：メラノプシン 網膜神経節細胞 対光反射 変異型ロドプシン遺伝子トランスジェニック家兔

1. 研究開始当初の背景

これまで 100 年以上眼内の光感受性受容器は視細胞である錐体・杆体のみと考えられていた。しかし 1988 年 Provencio(Proc Natl Acad Sci USA 95:340-345, 1998)がアフリカツメガエルの皮膚から光感受性視物質であるメラノプシンを発見し、その後 2002 年にはこのメラノプシンが一部の網膜神経節細胞(Retinal ganglion cell: RGC)内に存在することが明らかとなった(Berson:Science 295:1070-1073,2002)。さらに RGC の中には視細胞からの刺激なくして脱分極する内因性光感受性網膜神経節細胞(melanopsin containing RGC: mRGC)が存在することが判明した。

これらの事実は網膜色素変性症等の視細胞疾患で完全に光覚を失っても対光反射が残存することやサーカディアンリズムが維持されることから、視細胞以外の光感受性受容器の存在が以前より推測されていた。

このメラノプシンに関する研究がわが国に伝えられたのは 2006 年の第 16 回国際神経眼科学会の瞳孔部門、及び 2007 年浜松にて開催された第 27 回国際瞳孔学会であった。この mRGC の電気生理学的特徴はサルでは 470nm の高輝度青色光に特に感受性が高く、光刺激に対して緩やかな脱分極性で刺激消失後も反応が持続することが知られている(Dacey:Nature 433:749-754, 2005)。その神経投射は視交叉上核を経て最終的に松果体に至りメラトニンの産生を抑制する。また他の一部は視蓋前域から Edinger-Westphal 核を経て対光反射調節に関与している(Berson:Trends Neurosci 26:314-320,2003)と考えられている。

視覚系は大きく image forming と non-image forming に分類され、本経路は後者に分類される。現在、mRGC は特定の波長かつ光の強さによってのみ単独で脱分極するが、一方で視細胞からの情報をもとに抑制的にも、促進的にも働くことも知られている。しかし、その詳細は不明な点が多い。

2. 研究の目的

サルの mRGC は視細胞である錐体、杆体からの刺激なくして脱分極し、サーカディアンリズム、対光反射調整に関与することが知られている。しかし、視覚実験で最もしばしば用いられる家兎の mRGC に関する知見、すなわち対光反射特性とその起源に関しては詳細な報告はない。そこで今回我々は家兎の対光反射の最適波長、光強度を *in vivo* で赤外線電子瞳孔計(iriscorder dual: 浜松ホトニクス)を用い測定し、その特性、その起源を明らかにする。さらにコントロール(wild type:WT)データ測定後硝子体内に神経伝達物質阻害剤を注入した家兎、遺伝子組み換え変異型ロドプシン遺伝子[P347L]トランスジ

エニック家兎(Tg)家兎(近藤峰夫:日眼 114:248-279, 2010)を用い、WT と同様の測定を行う。実験終了後は組織学的な評価を行い、機能的実験、組織学的実験を合わせて最終評価を行う。以下に具体的に目的を箇条書きにて記す。

家兎を用い mRGC の特性を調べる。

家兎では対光反射がどの波長かつ強さの光に最も選択性が高いか、視細胞の影響をどのように受けるのか、明順応下、暗順応下、すなわち背景輝度の違いにより対光反射はどのように変化するのか、対光反射のどの部分(初期相、持続相、散瞳相)に mRGC は影響を与えているかを確認する。WT の対光反射、組織所見を明らかにした後、薬理的に視細胞破壊後も対光反射は残存するか、さらに Tg 家兎を用い錐体の萎縮した家兎では対光反射が生ずるのか、生じた際にはどのような波長でどのような光強度によるものかを調べる。

臨床応用では、現在、サーカディアンリズム変調による不眠、うつ病は大きな社会問題となっている。さらに近年、片頭痛の原因が短波長で強い光刺激時に誘発され、特に mRGC の関与が大きくクローズアップされている(Nosedá R: Nat Neurosci 13:239-45, 2010)。本実験により、これらの疾患のメカニズムさらに有効な治療法が発見され、ヒトに還元されていくことが本実験の最終目的である。

3. 研究の方法

(1) 機能実験

実験 1

有色家兎(WT)を固定後、動物実験用に改良した赤外線電子瞳孔計(浜松ホトニクス)を用い、470nm(青色)、640nm(赤色)の光刺激を各々 10, 100, 250cd/cm²の強さで加える。刺激は明順応下、30 分の暗順応下両方で行う。刺激時間は 60 秒とし、刺激後の散瞳相の測定時間は 3 分とする。同様に暗順応 60 分にて網膜電図(ERG)を記録する。以上の条件でコントロールデータを収集する。

実験 2

L-2-amino-4-phosphonobutyrate(L-APB:50mM), 6-cyano-7-nitroquinoline-2,3-dione(CNQX:2mM), D-2-amino-5-phosphonovaleric acid(D-AP5:5mM)のカクテルを 28G 針にて硝子体内に注射し(Gamlin, Vision Research 2007,946-954,47)視細胞からの伝達をブロックし WT と同条件で対光反射を測定。さらに ERG を同時測定し視細胞の障害の程度を確認する。

実験 3

実験 1, 2 同様、Tg 家兎の対光反射、ERG を測定する。

実験 1 ~ 3 の対光反射の評価は以下の通りとする。

図1は光刺激を与え対光反射を記録した典型波形である。測定因子は ①:初期瞳孔径、②:光刺激後最少瞳孔径、③:光刺激直後瞳孔径を用い、その各々の因子より初期瞳孔径に対する光刺激による縮瞳の割合を示す縮瞳率と光刺激中の縮瞳持続の割合である持続率、縮瞳反応速度を算出する。それぞれの式については以下に示す。

1. 縮瞳率(%)=(初期瞳孔径-最小瞳孔径) / 初期瞳孔径 × 100
2. 持続率(%)=100-(光刺激後瞳孔径-最小瞳孔径) / (初期瞳孔径-最小瞳孔径) × 100
3. 縮瞳反応速度=(初期瞳孔径-最小瞳孔径) (mm/s) / 刺激後最小瞳孔径になるまでの時間

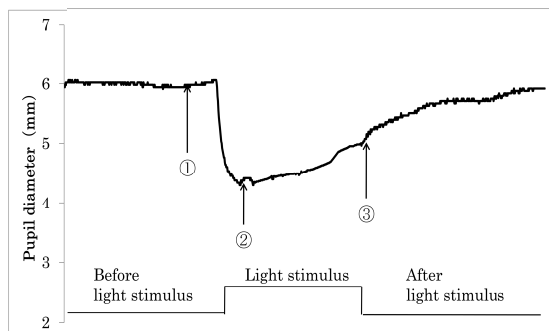


図1：光刺激によって生ずる瞳孔運動の変化

(2) 組織学的実験

WT, 硝子体内注射モデル、Tg 家兎共に対光反射計測後、眼球および附属器を光学顕微鏡、電子顕微鏡的に観察。さらに RGC は以下の2つの方法により詳細に検討する。深麻酔後、頭頂部より片側中脳被蓋に標識用トレーサーとして、25% horseradish peroxidase (HRP) を注入。48 時間後、還流固定し、眼球と脳を摘出、網膜標本を展開し、Mesulam tetramethylbenzidine ethanol (TMB) 法による酵素反応を行い、RGC を観察。さらに詳細に RGC の組織学的特徴を検討するため、網膜 whole mount 免疫組織染色を用いる。免疫染色には Neuronal class III β -Tubulin 抗体 (TUJ-1; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) を用い、共焦点顕微鏡 (488nm) にて観察。

4. 研究成果

(1) 機能実験結果

正常家兎 (WT) の対光反射、ERG 測定結果を図2に示す。ERG 結果より正常な網膜機能が示唆されるが、対光反射では赤色光刺激に比較して青色光刺激ではより大きな持続的な縮瞳が生じている。一方、硝子体内薬物投与家兎では ERG は平坦化し視細胞機能が極端に低下している。興味深いことに、この状態では赤色光刺激による反射は消失したものの、青色光刺激では、縮瞳率は低下しているものの、非常にゆっくりとした縮瞳が惹起され、かつ基線への完全な回復が測定範囲内では

認められない (図3)。

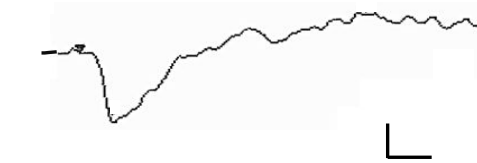
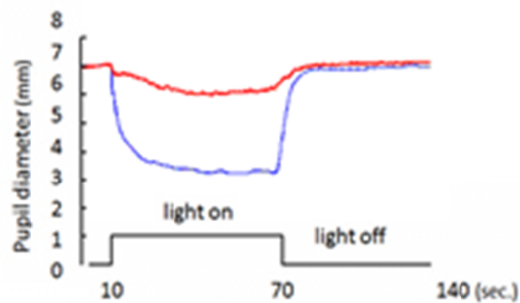


図2：WT 家兎対光反射 (上) と ERG

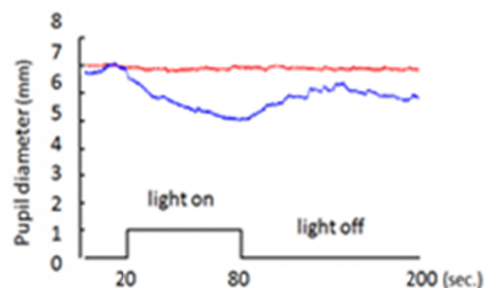


図3：硝子体内薬剤注入家兎対光反射 (上) と ERG

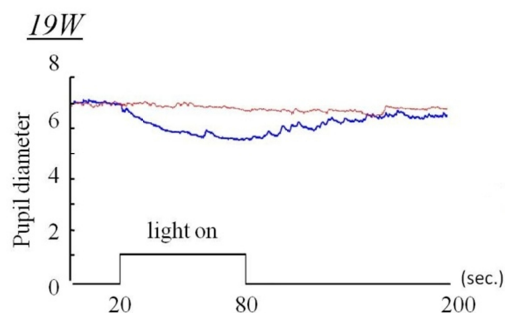


図4：Tg 家兎(19週)対光反射 (上) と ERG

さらに Tg 家兎を用い同様に対光反射、網膜電図 (ERG) を観察した。Tg 家兎では週齢と共に対光反射は減弱し、個体差はあるものの 20 週近くになると赤色光刺激では対光反射はほぼ消失した。一方、青色光刺激の縮瞳率は約 15%と僅かながら反応が残存(図 4)し、図 3 で示す薬物注入家兎とほぼ同様の特徴を持った対光反射が観察された。

(2) 組織実験結果

対光反射測定と同時に網膜の組織学的評価を行った(図 5)。WT 家兎では視細胞の 95% は杆体で 5%の錐体が混在していた。その他双極細胞、RGC の配列も規則的である。一方薬物注入家兎では視細胞は完全に萎縮している。しかしその時点でも網膜外層の RGC は残存し、かつ大型、多角で樹状突起の豊富な細胞が確認できた。

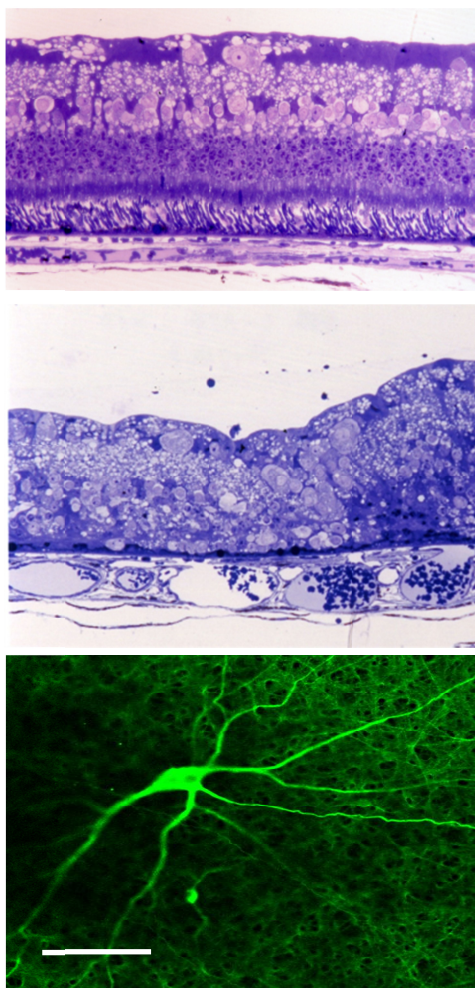


図 5 : 上 : 正常家兎網膜所見 (光学顕微鏡)
中 : 薬物注入家兎網膜所見
下 : 免疫組織染色後レーザー顕微鏡にて観察された薬物注入後の RGC
(bar は 100 μ m)

以上、『赤色・青色光刺激による家兎対光反射とメラノプシンの関与』に関する生理学的、組織学的実験の結果をまとめると、家兎の対

光反射はその大部分が視細胞由来である。しかし視細胞を薬理的、または遺伝学的に完全に破壊した状態でも極僅かではあるものの青色光刺激による対光反射は残存した。またその反応のパターンは、既報の mRGC の電気生理学的特徴と一致するうえ、残存した RGC の組織学的特徴も既報の mRGC の特徴と一致した。すなわち家兎で 470nm, 100cd/m² 以上の短波長の青色光刺激では mRGC を刺激しメラノプシンの作用により対光反射が生じていると結論した。

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 7 件)

石川均, 清水公也, 宇賀茂三, 吉富健志, 浅川賢, 真下紀美代, 後関利明, 池田哲也, 庄司信行, 市邊義章, 近藤峰生, 寺崎浩子, 奥英弘, 仲泊聡, Patil Popat N, 丸山茂善, 中山茂信: 第 116 回日本眼科学会総会評議員会指名講演 神経眼科の進歩 瞳孔とメラノプシンによる光受容. 日本眼科学会雑誌. 査読有 117 (3) 246-269, 2013
<http://www.nichigan.or.jp/member/journal/nggz/index.jsp>

石川均, 浅川賢: 対光反射の起源・経路と中枢-近年の対光反射の考え-. 神経内科. 査読有 78 (2) 163-167, 2013

<http://www.kahyo.com/item/S201302-782h>

中山実, N. Wioletta, 石川均: 瞳孔対光応答の波形特徴による眼疾患の推定に関する検討. 信学技法. 査読有 111 175-180, 2012

<http://ci.nii.ac.jp/naid/110009546205>

浅川賢, 石川均: 有色家兎の光受容器に対する機能的評価と組織学的観察. 日本眼科学会誌. 査読有 116 (3) 348-349 2012

<http://www.nichigan.or.jp/member/journal/nggz/index.jsp>

Ishikawa H, Onodera A, Asakawa K, Nakadomari S, Shimizu K: Effects of selective-wavelength block filters on pupillary light reflex under red and blue light stimuli. Jpn J Ophthalmol 56(2):181-186 2012

DOI:10.1007/s10384-011-0116-1

Kobashi H, Kamiya K, Ishikawa H:

Daytime Variation in Pupil size under Photopic Conditions. Optometry and Vision Science. 査読有 89 (2) 197-202 2012

DOI:10.1097/OPX.0b013e31824048a9

中山実, Nowak W, 石川均: 両眼の瞳孔対光応答波形とその特徴分析に関する一検討 信学技法. 査読有 110 (460) 1-6 2011

<http://ci.nii.ac.jp/naid/110008689274>

〔学会発表〕(計 14 件)

浅川賢,石川均,宇賀茂三,Erwin Palisoc,真下紀美代,清水公也,近藤峰生,寺崎浩子:変異型ロドプシン遺伝子トランスジェニック家兎における網膜光受容器の機能的・組織学的評価.第51回日本神経眼科学会総会 J A NOS2013,2013年11月23日,秋田.

Asakawa Ken, Ishikawa Hitoshi, Erwin Palisoc, Mashimo Kimiyo, Uga Shigekazu, Shimizu Kimiya, Kondo Mineo, Terasaki Hiroko: Functional and histological characterization of retinal photoreceptor cells in transgenic rabbit with rhodopsin-induced P347L mutation. (poster) 7th Asia Neuro-Ophthalmology Society Meeting, 2013, Bali. (poster)

第7回アジア神経眼科学会

2013年9月27日 インドネシア・バリ

浅川賢:瞳孔とメラノプシン(シンポジウム)第49回日本眼科学会総会

2013年9月9日 京都

浅川賢、石川均:健康者における瞳孔動揺の日内変動と自然光との関連性

第50回日本神経眼科学会総会

2012年11月16日 京都

池田哲也、石川均:新生児と幼児における赤青光刺激による対光反射とサーカディアンリズム形成

第50回日本神経眼科学会総会

2012年11月16日 京都

石川均:眼の自律神経

第65回日本自律神経学会総会(招待講演)

2012年10月26日 東京

K Asakawa, H Ishikawa, M Kondo: Mechanism of photoreception in transgenic rabbit with rhodopsin P347L mutation. (Poster). 19th International Neuro-Ophthalmology Society Meeting in conjunction with 28th Singapore-Malaysia Joint Meeting in Ophthalmology, 2012.6.17-18, Singapore.

Ishikawa H: Pupil Pathology. Instruction course Neuro-ophthalmology, APAO, 16th (招待講演)

2012年4月16日 Busan Korea.

石川均:第116回日本眼科学会総会評議員会指名講演 瞳孔とメラノプシンによる光受容.第116回日本眼科学会総会(招待講演) 2012.4.7 東京.

浅川賢,石川均,宇賀茂三,真下紀美代,清水公也:有色家兎の光受容器に対する機能的評価と組織学的観察.第49回日本神経眼科学会総会・第6回アジア神経眼科学会合同学会,2011.11.27,神戸.

石川均,宇賀茂三,浅川賢,真下紀美代,清水公也:正常家兎網膜組織学的所見と対光反射の関係.第49回日本神経眼科学会総会・第6回アジア神経眼科学会合同学会,2011.11.27,神戸.

石川均:近年の対光反射に対する考え.第64回日本自律神経学会(招待講演) 2011年10月27日 秋田.

Asakawa K, Ishikawa H, Uga S, Kimiyo M, Shimizu K: Functional characterization of melanopsin-containing retinal ganglion cells on rabbit pupil responses.

The 29th International Pupil Colloquium, 2011.9.27, Tübingen.

石川均,浅川賢,真下紀美代,清水公也:有色家兎における異なった色刺激による対光反射の差異.第115回日本眼科学会総会,2011.5.12,東京.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 均 (ISHIKAWA, Hitoshi)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号: 80265701

(4) 研究協力者

浅川 賢 (ASAKAWA, Ken)

北里大学・医療衛生学部・助教

研究者番号: 60582749