

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861430

研究課題名(和文) 神経-血管連関応答下における網膜血流と神経活動の相互調節作用の解明

研究課題名(英文) Investigation of association between the blood flow and the neuron in Neurovascular coupling in the retina

研究代表者

宋 勇錫 (SONG, Youngseok)

旭川医科大学・大学病院・その他

研究者番号：00726341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：網膜の血のめぐり(網膜血流)は色々なものにより調節されているが、これを網膜循環の自己調節機構と呼ぶ。その一つとして神経血管連関があげられる。これは神経の働きによって網膜血流がコントロールされるという概念である。しかしその機序は明らかとなっていなかった。本研究では、神経血管連関に神経だけでなく、網膜グリア細胞の働きが重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Retinal blood vessels have the potential to maintain adequate and suitable retinal blood flow (RBF), which is called retinal autoregulation. It is known that the Neurovascular coupling, one of the retinal autoregulation, is in the retina though the mechanisms of NVC was uncertain. In the current study, we revealed that the retinal glial cells had important role in regulating retinal blood flow.

研究分野：網膜循環

キーワード：網膜循環 網膜グリア細胞 神経血管連関

## 1. 研究開始当初の背景

網膜循環においてはこれまで、血管病変と神経病変は独立したものとして扱われ、研究が為されてきた。代表例として、糖尿病網膜症が挙げられる。糖尿病は持続する高血糖とそれに引き続く慢性炎症などにより血管障害や神経障害を来す疾患であり、その三大合併症の一つに眼病変である糖尿病網膜症がある。糖尿病網膜症は眼底出血や血流障害により失明に至り得る重篤な網膜疾患であり、現在では我が国における中途失明原因の第二位を占めるまでになっている。

これまでに我々は、糖尿病患者において、網膜症の発症前から既に網膜血流量が低下していることを報告したが (IOVS 2012)、古くから網膜電図 (ERG) での神経活動評価においても特有の異常を来すことが知られている。しかし、血流と神経は独立した因子として捉えられ、両者間の相互作用について詳しい検討はなされていない。

一方、網膜血管は神経細胞の中に浮かぶ構造物であり、両者間には何らかの相互作用があるとの示唆もある。そこで、**神経-血管連関 (Neurovascular-coupling)** の概念に注目した。これは脳循環で提唱された概念で、神経活動の活性化時に局所脳血流量を増加させ、脳機能を維持させるという重要な循環調節機序であり、神経により循環が制御されると考えられている。

臨床研究の結果から、網膜にも同様の機構が存在することが示唆されているが、その詳細なメカニズムについて、基礎研究においてこれまでに実証した報告はない。

## 2. 研究の目的

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、<sup>1)</sup>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<sup>2)</sup>、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。

そこで我々は、Gliotoxin として知られる L-2-aminoadipic acid (LAA)<sup>3)</sup>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。

## 3. 研究の方法

### 1. 実験動物

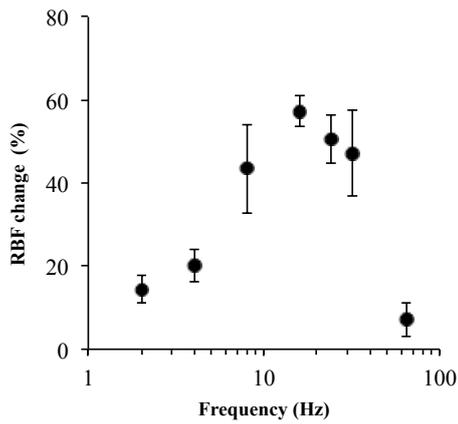
成ネコ 36 匹 (体重 2.6-3.2kg) を用いた。気管内挿管後、セボフルランで全身麻酔し臭化パンクロニウムで非動化し実験を行った。実験中は、平均血圧、心拍数、眼圧を継続的にモニターし、動脈血ガス分析を適宜行った。

### 2. 網膜循環の評価

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

LED 光源を用い、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

Glutotoxin 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、網膜血流測定の前 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・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)

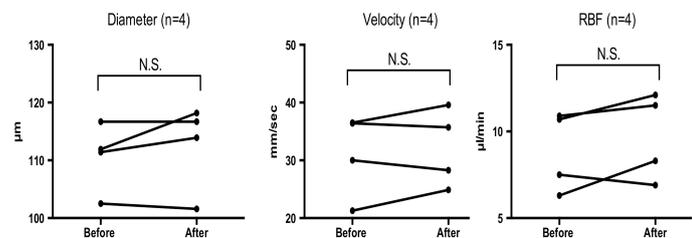
#### 9. 統計学的処理

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。

#### 4. 研究成果

##### 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。



• RBF: retina blod flow

• Before: LAA 投与前

• After: LAA 投与後

##### 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 ではないずれの濃度においても有意に抑制された ( $0.4 \text{ mM}: 37.1 \pm 5.4\%$ ,  $1.2 \text{ mM}: 19.6 \pm 2.4\%$ )。

Figure 2A.

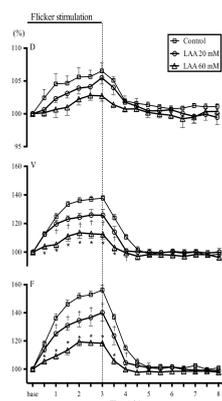
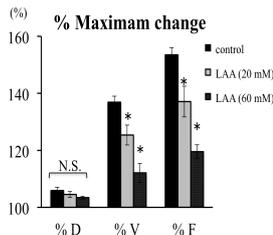


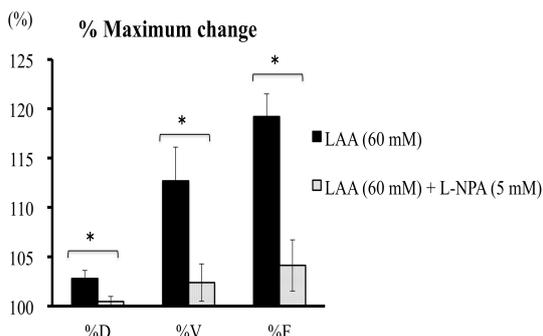
Figure 2B.



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。

Figure 3.



<総括>

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.  $1.2 \text{ mM}$  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  $1.2 \text{ mM}$  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  $E_2$  ( $PGE_2$ ) 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。

糖尿病網膜症においてこの血流増加反応が減弱することが知られているが、その機序はわかっていない。今後は疾患モデル（糖尿病ネコ）などを用いて、この点について解明したい。

<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.

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 1 件)

Song YS, Nagaoka T, Yoshioka T, Nakabayashi S, Tani T, Yoshida A. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015Nov;56(12):7551-9. 査読あり  
DOI:10.1167/IOVS.15-17676

[学会発表] (計 2 件)

- ① 宋 勇錫, The Role of Glial Cells in the Regulation of Retinal Microcirculation in Response to Modulations of Systemic Oxygen Tension in Cats, ARVO, 2015 年 5 月 7 日、Denver (USA)
- ② 宋 勇錫, 第 119 回日本眼科学会総会、2015 年 4 月 16 日、札幌市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宋 勇錫 (SONG, Youngseok)  
旭川医科大学・大学病院・医員  
研究者番号：00726341