

研究マインド支援グラント 報告書

平成27年度 研究マインド支援グラント(若手) 報告書

網膜電図法による網膜における新規神経調節因子の機能の解明

研究代表者 平沢 統 (医学部 生理学)

緒 言

脊椎動物網膜は、その構造(神経回路網の構造や神経細胞の形態など)が比較的規則的であり、かつ、入力(光刺激)と出力(神経細胞の応答)の関係を定量的に解析できるユニークな神経系である。

多くの網膜細胞間の神経伝達は、傍分泌性神経調節因子であるドーパミンによって調節され、その結果として光応答の明順応(光のまぶしさに眼が慣れる現象)が引き起こされる¹⁾。そのドーパミンは、網膜の介在ニューロンのひとつであるドーパミン作動性アマクリン細胞(DA細胞)によって傍分泌様に放出される。そして、そのDA細胞は一般的に抑制性神経伝達物質として知られているγ-アミノ酪酸(GABA)をも合成し²⁾、そのGABAはドーパミンと共に共放出される³⁾。一方、代謝型GABA_B受容体(GABA_B-R)がさまざまな網膜細胞のシナプス外領域に発現しており、これらは傍分泌様に作用するGABAの標的と考えられている⁴⁾。したがって、網膜においてGABAはドーパミンと同様に傍分泌性神経調節因子としても役割を果たしていると考えられる⁵⁾。しかしながら、それが網膜組織の光応答においてどのような役割を果たすのかについては不明である。

網膜電図法は、光刺激によって誘発された網膜電位の変化を記録することにより、網膜の機能(2次ニューロンの機能や順応状態など)を大まかに評価するものである。網膜の光応答には、光の明るさを伝える応答(ON応答)と光の暗さを伝える応答(OFF応答)があり、それぞれ網膜電図上ではb波、d波としてあらわれる⁶⁾。

b波(ON応答)に関してはほとんどの動物から記録できるが、d波(OFF応答)に関しては霊長類および冷血脊椎動物などといった錐体系OFF経路が発達している動物に限られる⁷⁾。一方、網膜電図の研究において広く使われているマウスなどではd波は観測できない(錐体系OFF経路が発達していないため)。このため、b波と比べるとd波の詳細な成り立ちの理解は不十分である。このため、さまざまな視覚情報処理に関与するON経路とOFF経路間の相互抑制(Crossover inhibition)⁸⁾の効果が、どのようにして網膜電図のON・OFF応答の変化として現れるのかについ

ては十分に検討されていない⁹⁾。

本研究は、網膜組織の光応答に対するGABA_B-Rの役割について網膜電図法で検討し、新規神経調節因子としてのGABAの役割を明らかにすることを目指すものである。当年度においては、その基盤研究として、錐体系経路が発達しているイモリの網膜電図がどの神経回路由来で成り立っているのかについて明らかにするための研究を行った。当研究の結果を踏まえ、今後は、網膜の光応答に対するGABA_B-Rの役割、すなわち、GABA_B-Rに作用する新規神経調節因子としてのGABAの役割を明らかにすることを目指す。

材料と方法

本研究は埼玉医科大学実験動物委員会によって承認され、埼玉医科大学動物実験指針に基づいて実施された。

眼杯標本と薬物投与: 氷冷麻酔したアカハライモリ(*Cynops pyrrhogaster*)を断頭・脊髄穿刺した後に眼球を摘出し、角膜とレンズを取り除いて眼杯標本作製した。そして、酵素処理(ヒアルローニダーゼ: 15 U/ml)によって網膜を覆っている硝子体を取り除き、灌流液から投与する薬物が網膜組織に到達するようにした。投与する薬物として、ON経路神経伝達の阻害剤(L-APB: Tocris)、OFF経路神経伝達の阻害剤(CNQX: Sigma)およびGABA_A受容体の阻害剤(Bicuculline: Sigma)を使用した。

網膜電図測定法: アクリル板を加工し、専用の記録用チェンバーを自作した。眼杯標本をチェンバーにセットし、網膜側が灌流液に浸るようにした。眼杯標本の網膜側と強膜側は硬質塩化ビニール板とシリコングリースによって電氣的に絶縁し、光刺激によってそこに発生する電位差を網膜電図として計測した。

光刺激法: ハロゲンランプ光をバンドパスフィルター(620 nm: 緑色)に透過し、刺激光とした。その刺激光は正立顕微鏡(オリンパスBX50-WI)の投光管から標本に照射した。光強度(明視野レベル: $1 \times 10^{-9} \sim 5 \times 10^{-7}$ W/mm²)はハロゲンランプの出力とNDフィルターを変えることにより制御した。光刺激のタイミングと照射時間はPCコントロール下の電磁シャッターで制御した。

結 果

1. 網膜回路の神経伝達を阻害する薬物の効果

灌流液から投与した薬物が網膜組織に到達しているか確認するため、神経伝達の阻害剤の効果を検討した。コントロール時では光照射直後にON応答 (b波), 照射後にOFF応答 (d波) が現れた。神経伝達の阻害薬 (コバルト) を投与すると, その効果は網膜電図波形の大きな減衰として現れた (未発表データ)。この結果から, 外部から投与した薬物が網膜組織に到達していることが確認できた。

2. 特定の網膜回路に選択的に作用する薬物の効果

錐体系ON・OFF経路由来の光応答 (それぞれb波・d波) を計測し, それぞれの経路に特異的に作用する薬物の効果を確認した (図 1)。ON経路神経伝達の阻害薬 (L-APB) を投与すると, その効果はON応答 (b波) の選択的な消失として現れた (図 1A, B)。さらにOFF経路神経伝達の阻害薬 (CNQX) を加えると, その効果はOFF応答の減少として現れたが完全には消失しなかった (図 1C)。この残った応答は視細胞由来のものと考えられる。

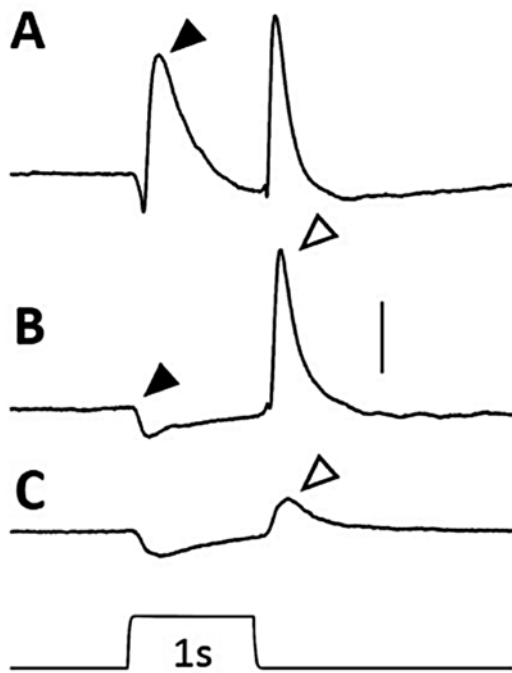


図 1. 網膜電図上でのON・OFF経路阻害薬の効果 A: コントロール時では光照射直後にON応答 (b波: 黒矢印), 照射後にOFF応答 (d波) が現れた。B: ON経路神経伝達の阻害薬 (L-APB) を投与すると, その効果はON応答の選択的な消失として現れた (黒矢印)。C: さらにOFF経路神経伝達の阻害薬 (CNQX) を投与すると, その効果はOFF応答の減少として現れた (白矢印)。残った応答は視細胞由来のものと考えられる。最下段は光刺激 (1秒) のタイミング。スケール: 20 μ V。

つぎに網膜における抑制性経路の作用が網膜電図上でどのようにして現れるのかについて検討を行った。抑制性経路阻害薬 (Bicuculline: GABA_A受容体の阻害薬) を投与したところ, その効果は主にON応答の増大として現れた

(図 2 灰色線上の矢印)。このことから, GABA_A受容体依存性の抑制性経路は主にON経路を持続的に抑制していると考えられる。

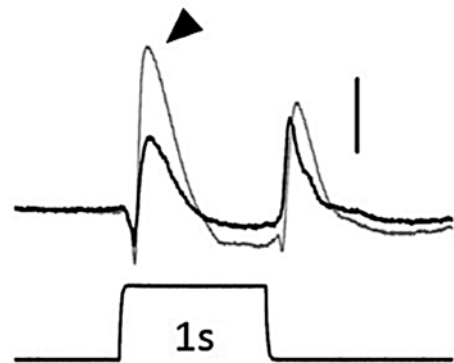


図 2. 網膜電図上での抑制性経路阻害薬の効果 コントロール (黒線) と比べ, 抑制性経路阻害薬 (Bicuculline: GABA_A受容体の阻害薬) を投与すると, その効果は主にON応答の増大として現れた (灰色線上の矢印)。下段は光刺激 (1秒) のタイミング。スケール: 20 μ V。

考 察

当研究において, これまで未報告であったイモリの網膜電図はON・OFF経路, および視細胞由来の応答からなり, とくにON経路がGABA_A受容体依存性の抑制性経路によって制御を受けていることが分かった。次のステップとして, ON・OFF経路および抑制性経路に作用する薬物を組み合わせて投与することにより, ON・OFF経路間の相互抑制 (crossover inhibition)⁸⁾の効果が, どのようにして網膜電図の変化として現れるのかについて検討を行う。これら一連の実験により, イモリ網膜電図のON・OFF応答の成り立ちのしくみを体系的に理解する。さらに以上の結果を踏まえた上で, 網膜の光応答に対するGABA_B-Rの役割, すなわち, GABA_B-Rに作用する新規神経調節因子としてのGABAの役割を網膜電図法で明らかにすることを目指す。具体的には, GABA_B-Rの抑制剤や増強剤の作用を網膜電図上で評価し, GABA_B-Rに作用する内在性GABAの役割を検討する。将来的にはよりヒトに近い哺乳類を用いた研究に発展させていきたい。

引用文献

- 1) Witkovsky P. Dopamine and retinal function. *Doc Ophthalmol* 2004; 108: 17-40. Review
- 2) Kosaka T, Kosaka K, Hataguchi Y, Nagatsu I, Wu JY, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Hama K. Catecholaminergic neurons containing GABA-like and/or glutamic acid decarboxylase-like immunoreactivities in various brain regions of the rat. *Exp Brain Res* 1987; 66: 191-210.
- 3) Hirasawa H, Betensky RA, Raviola E. Corelease of dopamine and GABA by a retinal dopaminergic neuron.

- J Neurosci 2012; 32: 13281-91.
- 4) Koulen P, Malitschek B, Kuhn R, Bettler B, Wässle H, Brandstätter JH. Presynaptic and postsynaptic localization of GABA(B) receptors in neurons of the rat retina. Eur J Neurosci 1998; 10: 1446-56.
 - 5) Hirasawa H, Contini M, Raviola E. Extrasynaptic release of GABA and dopamine by retinal dopaminergic neurons. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2015; 370. Review
 - 6) Dowling JE. The Retina: Cambridge (Massachusetts) The Belknap Press of Harvard University Press; 2012.
 - 7) Frishman IJ. Origins of the electroretinogram. In: Principles and Practice of Clinical Electrophysiology of Vision. Heckenlively JR, Arden GB, editors; London: MIT press, 2006, pp. 139-183.
 - 8) Werblin FS. Six different roles for crossover inhibition in the retina: correcting the nonlinearities of synaptic transmission. Vis Neurosci 2010; 27: 1-8. Review
 - 9) Popova E. ON-OFF Interactions in the Retina: Role of Glycine and GABA. Current Neuropharm 2014; 12: 509-26. Review

研究成果リスト

本研究における研究成果の学会・出版物への発表はまだなされていない。