

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	善岡 尊文
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Role of Neuronal Nitric Oxide Synthase 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と神経由来一酸化窒素合成酵素の役割)</p> <p>共 著 者 名</p> <p>長岡泰司、宋勇錫、横田陽匡、谷智文、吉田晃敏</p> <p><i>Invest Ophthalmol Vis Sci.</i> 2015;56:3113-3120.</p> <p>研 究 目 的</p> <p>網膜にフリッカー光刺激（点滅光）を与えると、網膜局所の充血により網膜血流が増加することが知られている。これは網膜神経活動が血流や代謝と関係があること（Neurovascular coupling）を示している。この血流増加反応は、様々な眼疾患（糖尿病、高血圧、緑内障）において極早期の段階で低下していることが近年報告されている。しかし、フリッカー血流増加反応の分子メカニズムに関する報告は少ない。これまでに一酸化窒素合成酵素（NOS）の非選択阻害剤である L-NMMA を全身投与（静注）してフリッカー血流増加反応を評価した報告は複数あるが、一致した見解は得られていない。その一因として、L-NMMA の全身投与が血圧に影響し、網膜局所の血流が正確に評価されていなかった可能性が考えられる。</p> <p>NOS には 3 つのアイソザイム（eNOS、nNOS、iNOS）があり、nNOS と eNOS は定常状態でも持続的に少量の一酸化窒素（NO）を生成し、眼循環の生理的調節を行っていると考えられている。網膜において eNOS は網膜血管内皮に、nNOS はグリア細胞や神経細胞に発現していることが知られている。我々はこれまで網膜循環において eNOS がシェアストレスによる NO 生成に関与していることを報告した。しかし、網膜循環の調節における nNOS の役割については未解明であった。</p> <p>そこで我々は eNOS や nNOS がフリッカー血流増加反応に関与するか否かを検討し、さらに NOS 阻害剤の経静脈投与による全身血圧への影響を除くため、硝子体内投与による動物実験を行っ</p>			

た。

材 料 ・ 方 法

1. 実験動物

実験には成ネコ 80 匹 (体重 2.3-4.5kg)を用いた。気管切開後、セボフルランで全身麻酔し臭化パンクロニウムにて非動化し以下の実験を行った。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

我々が開発したレーザードップラー眼底血流計を用い、網膜動脈第一分枝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、2 時間の暗順応後に刺激周波数を 2, 4, 8, 16, 24, 32, 64Hz と変化させ、各周波数におけるベースラインからの最大血流増加率を算出した (各 n=6)。また、最大血流変化を得られる周波数を用い、刺激前の 5 分間をベースラインとして、フリッカー刺激後 3 分間と刺激終了後 5 分間に渡り、30 秒毎に血流測定し経時的変化を記録した (n=12)。

4. 薬物の硝子体内微量注入

NOS 非選択阻害剤である L-NAME (50 μ M, 500 μ M, 5mM, 50mM, 各 n=5)と nNOS 選択阻害剤である L-NPA(50 μ M, 500 μ M, 5mM, 50mM, 各 n=5)を 50 μ l 硝子体内に注入した。L-NAME と L-NPA はリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に溶解した。L-NAME と L-NPA は投与後 2 時間で効果が最大となるため、網膜血流測定の前 2 時間前に投与した。

5. L-NPA の血流変化における L-Arginine、D-Arginine の効果

L-NPA の血流変化は L-Arginine /NO pathway において立体特異的阻害であるかを評価するため、L-NPA (50mM) と L-Arginine (100mM, n=5) または D-Arginine (100mM, n=5) を同時に投与し、血流変化を評価した。

6. ブラジキニン (BK) による eNOS 依存性網膜血流増加反応

我々は以前に、ブタ網膜摘出血管系やネコ硝子体内投与実験系において BK が eNOS 依存性に血管を拡張させ、血流を増加させることを確認しており、L-NAME (500 μ M)、L-NPA (5 mM)、コントロールとして PBS を硝子体内投与後に BK (50 μ M, 各 n=5) をさらに硝子体内投与し、それぞれの eNOS 依存性血流増加反応を測定した。また、L-NPA の投与後 BK のかわりに NO ドナーである sodium nitroprusside (SNP, 5mM, n=5) を投与し同様のプロトコルで血流変化を測定した。

7. L-NAME (500 μ M) と L-NPA (5mM)、トロンボキサン (TXA₂) (50 μ M)、PBS (コントロ

ール) 投与後のフリッカー血流増加反応の測定

nNOS のフリッカー血流増加反応への関与を検討するため、L-NAME (500 μ M, n=5) と L-NPA (5mM, n=5)、PBS (n=5) 投与 2 時間後のフリッカー血流増加反応を測定した。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 分間に渡り測定し、ベースラインからの最大血流増加率を算出した。

L-NAME (500 μ M) と L-NPA (5mM) の硝子体内投与により定常網膜血流が減少し、フリッカー血流増加反応に影響を与える可能性があったため、血流のベースラインコントロールとして TXA2 (50 μ M, n=5) を投与して同様の実験を行った。

8. 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. フリッカー光刺激の周波数による網膜血流の経時的変化

16Hz の光刺激により最大の血流上昇が得られた。フリッカー刺激による血流の経時変化は、刺激後徐々に増加し、2 分以降でプラトーに達した。16Hz、3 分間の刺激でベースラインからの血管径は $7.6 \pm 0.9\%$ 、血流速度は $32.9 \pm 3.2\%$ 、血流量は $53.5 \pm 3.4\%$ 増加した。

2. NOS 阻害剤の硝子体内投与による網膜血流への影響

NOS 非選択阻害剤である L-NAME (50 μ M, 500 μ M, 5mM, 50mM) と nNOS 選択阻害剤である L-NPA (50 μ M, 500 μ M, 5mM, 50mM) の投与により網膜血流は濃度依存的に減少した。ベースラインからの血流減少率は L-NAME 500 μ M、L-NPA 5mM 投与でそれぞれ $21.9 \pm 4.3\%$ 、 $22.1 \pm 3.6\%$ であった。

3. L-NPA の血流変化における L-Arginine、D-Arginine の効果

L-NPA (50mM) 投与による血流減少は NOS の基質である L-Arginine (100mM) との同時投与により打ち消された一方、D-Arginine (100mM) との同時投与では変化はなく、L-NPA の血流変化は L-Arginine/NO pathway における立体特異的阻害であることが示された。

4. BK と SNP の血流増加反応に対する L-NAME (500 μ M)、L-NPA (5mM) の影響

L-NAME (500 μ M) 投与群では BK による血流増加反応が抑制されたが、L-NPA (5mM) 群では PBS 群と比べ有意差はなかった。また L-NPA (5mM) 群では、SNP による血流増加反応においても PBS 群と比べ有意差はなかった。

5. 定常網膜血流とフリッカー血流増加反応に対する L-NAME (500 μ M)、L-NPA (5mM)、TXA2

(50 μ M) の影響

L-NAME (500 μ M)、L-NPA (5mM)、TXA2 (50 μ M) 各群は硝子体内投与 2 時間後、ベースライン血流は同程度の血流低下を認めた (L-NAME 群 21.9 \pm 4.3%、L-NPA 群 20.3 \pm 3.7%、TXA2 群 21.8 \pm 6.9%、各 n=5)。フリッカー血流増加反応は L-NAME 群、L-NPA 群ではそれぞれ 14.8 \pm 3.6%、19.7 \pm 3.0%と PBS 群 54.7 \pm 2.8%に比べ有意に低下したが、TXA2 群は 49.1 \pm 4.7%と PBS 群と有意差はなかった。

考 案

フリッカー点滅光の刺激頻度によりフリッカー血流増加反応は変化し、16Hz の刺激頻度で血流増加率は約 60%と最大であった。フリッカー血流増加反応は点滅光の刺激頻度に影響されることが明らかとなった。様々な眼疾患の診断にフリッカー血流増加反応の応用が期待されるが、その際は点滅光の刺激頻度を考慮するべきであると考えられた。

神経由来 NO 合成酵素阻害剤の投与により網膜定常血流、フリッカー血流増加反応が減弱したことから、網膜定常血流、フリッカー血流増加反応の何れにおいても神経由来 NO 合成酵素が関与していることが判明した。

糖尿病患者においてフリッカー血流増加反応の低下が報告されている。これまで、この反応は血管内皮から放出される NO によるものであり、糖尿病により内皮機能が障害されているため減弱すると考えられていた。しかし、本研究によりフリッカー血流増加反応では血管内皮由来 NO 合成酵素 (eNOS) 以上に、神経由来 NO 合成酵素 (nNOS) が重要な役割を担っていることが判明した。nNOS は網膜において神経細胞やグリア細胞に発現している。それ故、フリッカー刺激による網膜血流の調節は主に血管内皮ではなく神経組織やグリア細胞に依存しており、糖尿病によるフリッカー血流増加反応の低下は、網膜血管の支配領域である網膜内層の状態を反映している可能性が示唆された。

本研究で、網膜に neurovascular unit が存在し、nNOS がその mediator であることが判明した。

結 論

神経由来 NO 合成酵素阻害剤である L-NPA の投与により、定常網膜血流とフリッカー血流増加反応が減少したことから、定常網膜血流の調節とフリッカー血流増加反応の両方に神経由来 NO 合成酵素が関与していることが判明した。




引 用 文 献

1. Riva CE, Logean E, Falsini B. Visually evoked hemodynamical response and assessment of neurovascular coupling in the optic nerve and retina. *Prog Retin Eye Res.* 2005; 24: 183–215.
2. Nagaoka T, Sakamoto T, Mori F, Sato E, Yoshida A. The effect of nitric oxide on retinal blood flow during hypoxia in cats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43: 3037–3044.
3. Nagaoka T, Kuo L, Ren Y, Yoshida A, Hein TW. C-reactive protein inhibits endothelium-dependent nitric oxide-mediated dilation of retinal arterioles via enhanced superoxide production. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008; 49: 2053–2060.

参 考 论 文

1. Tani T, Nagaoka T, Nakabayashi S, Yoshioka T, Yoshida A. Autoregulation of retinal blood flow in response to decreased ocular perfusion pressure in cats: comparison of the effects of increased intraocular pressure and systemic hypotension. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014 Jan 20;55(1):360-367.

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	善岡 尊文
<p>審査委員長 柏柳 誠 </p> <p>審査委員 鎌田 恭輔 </p> <p>審査委員 廣川 博之 </p>			
<p>学位論文題目</p> <p>Role of Neuronal Nitric Oxide Synthase 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と神経由来一酸化窒素合成酵素の役割)</p>			
<p>網膜にフリッカー光刺激を与えると、網膜血流が増加することが知られている。近年、様々な眼疾患において極めて早期の段階でこの血流増加反応が低下していることが報告されている。しかし、どのような分子機構で、フリッカー光刺激で血流増加反応が引き起こされるかは不明であった。一方、NO合成酵素の非選択阻害剤であるL-NMMAを全身投与すると、フリッカー光刺激による血流増加反応が変化することが報告されているが、一致した見解は得られていない。NO合成酵素には、3つのアイソザイムが存在する。提出者は、網膜神経細胞に発現している神経由来NO合成酵素がフリッカー血流増加反応に関与するか否かを検討した。</p> <p>実験にはネコを用い、レーザードップラー眼底血流計により絶対血流量を計測した。フリッカー光刺激は、LED光源を用い、各種薬物は硝子体内に微量を注入した。</p>			

様々な周波数のフリッカー光で刺激すると 16 Hz で最大の血流上昇が見られた。血流は、刺激後徐々に増加し、2 分以降でプラトーに達した。神経由来 NO 合成酵素を選択的に阻害する L-NPA は、血流増加を抑制した。L-NPA は網膜定常血流の減少も引き起こすが、神経由来 NO 合成酵素の基質である L-arginine を同時投与すると減少が抑制された。さらに、内皮型 NO 合成酵素を活性化するブラジキニンや NO ドナーの sodium nitroprusside により産生した NO による血流増加は、実験で用いた濃度の L-NPA では全く影響を受けなかった。これらの結果は、L-NPA は神経由来 NO 合成酵素を特異的に阻害することにより、フリッカー光刺激による血流増加を抑制したことを示した。

本研究は、フリッカー血流増加反応および網膜定常血流の調節に神経由来 NO 合成酵素が関与していることを初めて示した。従来は、糖尿病患者におけるフリッカー血流増加反応の低下は血管内皮から放出される NO によるものと考えられてきたが、神経由来 NO 合成酵素が重要な役割を担っていることを明らかにした。

論文内容と関連領域についての各審査委員による試問に対しても適切な回答が得られ、提出者はこの領域において十分な知識を有することが示された。以上の審査結果から、本審査委員会は、本論文が博士（医学）の学位に値するものであると判定した。