

主論文の要旨

Pikachurin Protein Required for Increase of Cone Electroretinogram B-Wave during Light Adaptation

〔 Pikachurin タンパクは明順応時における
錐体網膜電図 b 波の増加には不可欠 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻
頭頸部・感覚器外科学講座 眼科学分野

(指導：寺崎 浩子 教授)

長屋 匡俊

【背景と目的】

錐体網膜電図 (electroretinograms :ERG) ERG は網膜疾患のある患者の錐体細胞機能の評価に使用される。錐体 ERG の波形は主に 1 次ニューロンである視細胞と 2 次ニューロンである双極細胞の電位の重なりによって成り立っている。この錐体 ERG において明順応していく過程で錐体 ERG の最大の陽性波である b 波の振幅は時間とともに徐々に増加することが知られているが、この増加現象の原因はいまだ解明されていない。いくつかの説があり、有力な説の一つは、暗順応条件下では杆体系経路が錐体系経路を抑制しており、明順応条件下になると抑制が解除され錐体の ERG の b 波が増大するというものである。この杆体による錐体への抑制の経路として、双極細胞や水平細胞といった 2 次ニューロンを介した経路や、杆体から錐体へ gap junction を介した直接的な相互作用も提唱されている。もう一つの説として、明順応時の錐体 ERG の a 波の振幅が増加していることから、錐体細胞の反応増加のシグナルが伝わり b 波も増大しているというものもある。その他、2 次ニューロンに存在する水平細胞は、脱分極されたときに γ -aminobutyric acid (GABA) を放出し、GABA-A 受容体を介して双極細胞と視細胞に影響を与え、明順応にかかわっているという報告もある。

以前より、pikachurin ノックアウト (Pika^{-/-}) マウスという視細胞と双極細胞のシナプス異常をきたすマウスを利用して、視細胞と双極細胞のシナプスが ERG に与える影響を研究してきた。pikachurin は細胞外マトリックス蛋白で主に視細胞とリボンシナプスに存在している。欠損したマウスは双極細胞の樹状突起と視細胞のリボンシナプス間に間隙ができ、その結果、部分的にシグナル伝達が障害され、錐体 ERG の b 波の振幅が正常なものに比べて小さくなっていることが報告されている。

本研究の目的は、明順応中の ERG の増加反応が視細胞の電位の影響なのか、2 次ニューロン以降の相互作用なのか、また GABA が関わっているのかを調べることである。そのために、2 次ニューロン以降の伝達阻害されている Pika^{-/-}マウスの ERG を測定した。

【対象と方法】

生後 8~10 週間の野生型 (wild type : WT) のマウスと Pika^{-/-}マウスを研究に使用した。WT と Pika^{-/-}マウスを 3 つの群に分けた。硝子体内注射を行わない群、片眼に PBS、他眼に 2 次ニューロン以降の反応をブロックする薬剤 (on 型双極細胞をブロックする L-2-amino-4-phosphonobutyric acid (APB) と off 型双極細胞をブロックする cis-2,3-piperidine-dicarboxylic acid (PDA)) をそれぞれ濃度が 1mM、5mM になるように硝子体内注射した群、片眼に PBS、他眼に GABA - A 受容体拮抗薬である bicuculline を濃度が 100 μ M になるように硝子体内注射した群とした。

眼内注射を行わない群のマウスは 12 時間以上の暗順応後、錐体 ERG を測定した。錐体 ERG の記録条件は、背景光 40cd/m²、光刺激強度は 0.4 と 1cd-s/m²/flash の 2 種類で測定し、1 分ごとに測定した。30 秒間測定、1 秒に 1 回測定し計 30 回分の波形を平均化したものを 1 分間のデータとした。同様の事を 1 分おきに 0~9 分間、計 10 回行

った。硝子体内注射を行った群の ERG は、注射後の約 2 時間後に光刺激強度のみ $1\text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2/\text{flash}$ で、その他は同様の条件で測定した。PBS を硝子体内注射した波形から APB と PDA をブロックして得られた波形を差し引くことにより、2 次ニューロン以降の反応の波形とした。

【結果】

・硝子体注射を行わない群 (図 1A,B)

WT マウスの b 波の振幅は 2 種類の光刺激強度に対して、明順応の時間経過とともに徐々に増加した。一方、Pika^{-/-}マウスの b 波の振幅はどちらの刺激強度でも明順応の時間経過とともに減少した。

・PBS、APB+PDA を硝子体内注射した群 (図 2A,B)

PBS 注射後の ERG は両マウスともに非注入の眼 (図 1B) のものよりわずかに小さかったが、注射していない ERG (図 1A) と同様の特性を有していた。APB / PDA を注入群では、Pika^{-/-}マウスと WT マウスともに正の波が完全に消失し、陰性波成分のみとなりそれぞれのマウスの陰性波の振幅は同程度であった。APB / PDA を投与したあとの陰性波は、視細胞由来の波形となる。WT および Pika^{-/-}マウスにおける a 波 (負の波形) の振幅は、明順応の間に WT マウスで 1.4 倍、Pika^{-/-}マウスで 1.6 倍に増加したが両マウスの間で有意差はなかった。

次に PBS の注射後から得られた ERG を APB と PDA を注射した ERG 波形から差し引くことにより 2 次ニューロン以降の波形を抽出した (図 3A)。波形のうち錐体 ERG の b 波にあたる部分の最大の陽性成分の振幅を測定した (図 3B)。WT マウスの陽性波の振幅は、明順応開始直後にわずかに減少した後、徐々に増加し、7~8 分後約 1.7 倍に増加してプラトーに達した。Pika^{-/-}マウスでは正の波の振幅は明順応直後から減少し、そのまま 3~4 分後に約 0.7 倍程度となりプラトーに達した。

・GABA-A 受容体拮抗薬の効果 (図 4A,B)

WT および Pika^{-/-}マウス両者において波形の特徴に変化はなかった。図 4B に示す通り、a 及び b 波の振幅は、WT、Pika^{-/-}マウスともに PBS を注射したものより減少した。Pika^{-/-}マウスの b 波の振幅は PBS を注射したものと比べて有意差が見られた。

【考察】

多くの研究がこの現象を錐体細胞の電位増加が原因としているが、今回の結果では WT マウス、Pika^{-/-}マウスともに明順応時の錐体細胞の電位は保たれていたため、それでは説明がつかない。明順応時の錐体 ERG の b 波の振幅は WT マウスにおいて最初の 1 分間にわずかに減少していた。APB と PDA を硝子体内注射した実験の結果より、この最初の 1 分の減少は 2 次ニューロン以降の成分が原因であることがわかる。明順応時、2 次ニューロン以降の成分は、WT マウスにおいては最初の 1 分は減少し、

その後増加したのに対して、Pika^{-/-}マウスは3~4分で徐々に減少し、増加しなかった。Pika^{-/-}マウスはWTマウスにあるような1分後から始まる2次ニューロン以降の増加の成分が欠如していると推測される。我々の結果は、杆体の錐体抑制は2次ニューロン以降の相互作用が原因であるという仮説を支持する。またbicucullineを投与した群のb波の振幅は、明順応中に0.8倍ほど減少していたが、PBS投与のものも同様であるため、bicucullineが明順応に大きく関与しているとは言いがたい。bicucullineはWTマウス、Pika^{-/-}マウスの両方で明順応中のERGに大きな影響を与えなかった。

【結論】

我々は実験結果より3つの結論を出した。1つは、pikachurinは明順応時の錐体ERGのb波増加に必要不可欠であること。次にこの現象が視細胞の反応ではなく、2次ニューロン以降で起こる反応であること。最後に、水平細胞のGABAを介した経路は明順応中のb波の増加の主な原因ではないということである。

我々が知りうる限り明順応中のERGが減少するという報告は人間においても動物においても存在しない。明順応におけるPika^{-/-}マウスを解析することにより、明順応におけるERGの増加のメカニズムの一部の解明をすることができた。