

Title	Serum-induced changes in the physiology of mammalian retinal glial cells : role of lysophosphatidic acid
Author(s)	日下, 俊次
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41290
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	くさ 日 下 俊 次
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 4 2 1 1 号
学位授与年月日	平成 10 年 12 月 4 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Serum-induced changes in the physiology of mammalian retinal glial cells : role of lysophosphatidic acid (網膜グリア細胞に対する血清の影響と lysophosphatidic acid の役割)
論文審査委員	(主査) 教授 田野 保雄 (副査) 教授 福田 淳 教授 倉智 嘉久

論文内容の要旨

[目的]

血清は血液網膜関門の破綻に伴い網膜神経系に侵入し、神経機能に障害を及ぼすと考えられている。このような状態は、糖尿病網膜症、網膜静脈閉塞症などで生じるが、これらの疾患における視力低下の機序は明確でなく、網膜内に漏出した血清が関与する可能性がある。しかしながら、これまで血清が網膜神経機能に与える影響は詳細に検討されておらず、また網膜グリア細胞への影響も不明である。そこで我々は、網膜の主要なグリア細胞であるミュラー細胞に対する血清の影響を電気生理学的手法を用いて検討した。

[方法および結果]

1) パッチクランプ法による検討

ヒトあるいは牛眼から papain を用いて新鮮分離したミュラー細胞に対してパッチクランプ法の一変法である perforated-patch 法を行い、全細胞電流を記録した。なお、通常の記録には以下の溶液を用いた。すなわち、bathing solution (mM) : NaCl 133, KCl 10, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 0.8, Na-Hepes 10, glucose 20, pH 7.4, 305-310 mosmol⁻¹, pipet solution (mM) : KCl 50, K₂SO₄ 65, MgCl₂ 6, K-Hepes 10, pH 7.4, 285 mosmol⁻¹ である。

2) 網膜電位図 (electroretinography : ERG) による検討

12時間以上暗順応させた白色ラットから感覚網膜を暗室内で摘出し、視細胞を上にした状態で、ERG を記録した。刺激光は持続時間0.5ミリ秒で、強さ3.6 log quanta rod⁻¹ flash⁻¹ とした。

[結果]

1) 血清による全細胞電流の変化

通常状態ではミュラー細胞の静止膜電位は -72 mV (平均値, n=32) で E_K (-74 mV) に近い値であった。10% 胎児牛血清 (FBS) の投与によって内向きおよび外向きの全細胞電流の増大がみられ、細胞は約 7 mV 脱分極した。細胞外液のイオン組成を様々に変化させて検討した結果、10% FBS による内向き電流の増大は Ca²⁺ 透過性の非選択性陽イオンチャネルの活性化によるものであることが示唆された。また、K⁺ チャネル阻害剤である種々のサソリ毒を用

いた検討から、10% FBS により増大した外向き電流は電位依存性 K^+ チャンネルの一種である $Kv 1.3$ の活性化によると思われた。また、これらのイオンチャンネルの活性化には時間差があり、10% FBS の投与後数秒以内に非選択性陽イオンチャンネルの活性化がみられ、その約40秒後に $Kv 1.3$ の活性化がみられた。 Ca^{2+} を含まない細胞外液中では非選択性陽イオンチャンネルの活性化はみられたが、 $Kv 1.3$ の活性化はみられず、細胞外からの Ca^{2+} の細胞内への流入が $Kv 1.3$ の活性化に必要である可能性が示唆された。また、一部(約20%)の細胞では10% FBS の投与によって内向き整流 K^+ チャンネル (Kir) が阻害された。なお、これらの反応は FBS に特異的なものではなく、ヒト血清、鶏血清にても同様の反応がみられた。

2) lysophosphatidic acid (LPA) の効果

次に我々は、血清中のどの成分がこれらの反応を担う物質であるかを検討した。lysophosphatidic acid (LPA) は血小板から産生され、血清中に約30 μM の濃度で存在する物質であるが、LPA の投与 (25 μM) によっても血清と同様の反応が惹起されることが判明した。LPA が血清のミュラー細胞に対する効果を担う物質の一つであると考えられた。

3) 血清による K^+ siphoning への影響

網膜への光刺激により内および外網状層では細胞外 K^+ 濃度が上昇し、逆に網膜下腔では細胞外 K^+ 濃度は低下するが、ミュラー細胞はこの細胞外 K^+ 濃度の不均衡を是正する機能 (K^+ siphoning) を持つとされている。これまでの検討で血清の投与によって、ミュラー細胞は脱分極し、 Kir は阻害されることが示されたが、これらの反応は K^+ siphoning を阻害すると考えられる。この点を検証するため白色ラットから摘出した感覚網膜から ERG を記録し、 K^+ siphoning を反映するとされる Slow P III に対する血清の効果を検討した。その結果、10% FBS の投与によって Slow P III の振幅は可逆的に約20%減少し、血清がミュラー細胞の K^+ siphoning を阻害する可能性が示された。

[総括]

本研究により、血液網膜柵の破綻によって網膜内に侵入する血清がミュラー細胞の種々のイオンチャンネルに影響を及ぼし、ひいてはミュラー細胞の重要な機能である K^+ siphoning を阻害することが示された。また、血清中の成分である LPA が血清のミュラー細胞に対する効果を担う物質の一つである可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本論文は血清が網膜グリア (ミュラー) 細胞に与える影響をパッチクランプ法、網膜電位図等の手法を用いて電気生理学的に検討したものである。血清はミュラー細胞の種々のイオンチャンネルに作用を及ぼすことが示された。すなわち、1) Ca^{2+} 透過性非選択性陽イオンチャンネルを活性化する、2) $Kv 1.3$ チャンネルを活性化する、4) 内向き整流性カリウムチャンネルを阻害することである。また、網膜電位図の slow PIII 成分を血清が減弱させることも明らかとし、血清がミュラー細胞の K^+ siphoning を阻害している可能性が示された。さらに、血清中の成分である lysophosphatidic acid (LPA) が血清と類似の反応を惹起することから、血清のミュラー細胞に対する上記のような作用を担う物質の一つが LPA である可能性が示された。これらの結果は糖尿病黄斑浮腫など、血清が網膜に侵入していると思われる疾患における視力低下のメカニズムを解明する一助となるものと考えられ、学位論文に値するものと認める。