

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18390

研究課題名(和文) P2受容体機能異常による緑内障性視神経症発症機構の解明

研究課題名(英文) Dysregulation of P2 receptor signals causes pathogenesis of glaucoma

研究代表者

篠崎 陽一 (SHINOZAKI, Youichi)

山梨大学・大学院総合研究部・講師

研究者番号：10443772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：緑内障は本邦における中途失明原因第一位の疾患である。本研究では、ATPなど細胞外ヌクレオチドに対する受容体の1つP2Y6受容体の異常が緑内障症状を誘導する事を発見した。P2Y6受容体は毛様体突起無色素上皮に発現し、眼房水産生を負に制御する事によって眼圧を下降させていた。P2Y6受容体欠損マウスは恒常的に高眼圧を示し、加齢に伴って視神経傷害や視覚機能低下などの緑内障症状を示す事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Glaucoma is an optic neuropathy characterized by progressive degeneration of retinal ganglion cells (RGCs) and visual loss. We report that the P2Y6 receptor is critical for lowering IOP and that ablation of the P2Y6 gene in mice (P2Y6K0) results in hypertensive glaucoma-like optic neuropathy. The P2Y6 receptor was expressed in nonpigmented epithelial cells of the ciliary body and controlled aqueous humor dynamics. P2Y6K0 mice exhibited sustained elevation of IOP, age-dependent damage to the optic nerve, thinning of ganglion cell plus inner plexiform layers, and a reduction of RGC numbers. In summary, our data show that dysfunctional purinergic signaling causes IOP dysregulation, resulting in glaucomatous optic neuropathy.

研究分野：神経薬理学

キーワード：緑内障 P2受容体 網膜 神経傷害

1. 研究開始当初の背景

緑内障は本邦における中途失明原因第一位の疾患である。緑内障における失明は、脳へと視覚情報を伝達する網膜神経節細胞(RGC)の障害や細胞死が原因である。最大のリスクファクターは、高眼圧と考えられており、実際、眼圧と緑内障発症率は高い相関がある。また、眼圧降下により治療効果が認められることから、眼圧が緑内障発症の最大のリスクファクターかつ治療標的であると言える。

過去の報告から、細胞外ヌクレオチドとその受容体(P2 受容体)が眼圧の制御に関わる可能性や、ヒト緑内障患者において眼房水内ATP 濃度が顕著に高いことなどが示されていた。

2. 研究の目的

本研究では、生理条件下における P2 受容体の眼圧制御メカニズムの解明、P2 受容体ノックアウトマウスを用いた緑内障発症機構の解明、並びに眼圧と RGC に対する P2 受容体作用を標的とした緑内障治療法の探索、の3点を目的とした。

3. 研究の方法

眼圧計測: リバウンド式トノメーター TonoLab を用い、麻酔下の眼圧を計測した。
P2 受容体リガンドの眼圧への作用: 全て点眼で投与した。

眼房水ダイナミクスの評価: *in vivo* フルオロフォトメトリー法を用いた。フルオレセインを i.p. 投与し、投与直後からの前房の蛍光強度の変化を cooled CCD カメラで経時的に撮影した。

網膜厚の計測: Optical Coherence Tomography(OCT)を用いて麻酔下の網膜厚を計測した。

RGC 数の変化: ホールマウント網膜を抗 Brn3a 抗体で染色し、RGC 数の変化を計測した。

視覚機能評価: RGC を中心とした視覚機能は multifocal ERG によって評価した。

4. 研究成果

本研究期間で以下の成果を得た。

- P2Y6 受容体は眼圧を負に制御する
P2Y6 受容体アゴニストUDPを点眼すると一過性に眼圧が下降する事を見出した。一方、アンタゴニストでは眼圧が上昇し、P2Y6K0 マウスではこれらの効果は消失した。
- P2Y6 受容体は毛様体突起からの眼房水産生を抑制する
P2Y6 受容体の発現部位を検討したところ、眼房水産生に関わる毛様体突起無色素上皮に発現することが明らかとなった。In vivo フルオロフォトメトリーの解析から、P2Y6 受容体の作用はチモロールに類似したものであると考えられた。
- P2Y6 受容体欠損により慢性の高眼圧となる P2Y6K0 マウスの眼圧を計測すると若齢(3

ヶ月)~中年齢(18ヶ月)のいずれの月齢でも高眼圧を示した。

- P2Y6K0 マウスは加齢による緑内障症状を呈する

上述の通り、P2Y6K0 マウスは若齢から高眼圧であるものの、RGC 傷害や視覚機能障害などは認められず、中年齢(12ヶ月)でこれらの障害が認められた。従って、P2Y6K0 マウスは自然発症型緑内障モデルマウスとなる事が明らかとなった。

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8件)

Ihara T, Mitsui T, Nakamura Y, Kanda M, Tsushiya S, Kira S, Nakagomi H, Sawada N, Kamiyama M, Hirayama Y, Shigetomi E, Shinozaki Y, Yoshiyama M, Nakao A, Takeda M and Koizumi S. The circadian expression of Piezo1, TRPV4, Connexin26 and VNUT, associated with expression levels of the clock genes in mouse primary cultured urothelial cells, *NeuroUrol. Urodyn.*, 査読有、37、2018、942-951. DOI: 10.1002/nau.23400.
Shinozaki Y, Kashiwagi K, Namekata K, Takeda A, Ohno N, Robaye B, Harada T, Iwata T and Koizumi S. Purinergic dysregulation causes hypertensive glaucoma-like optic neuropathy, *JCI Insight*, 査読有、2、2017、e93456. DOI: 10.1172/jci.insight.93456.

Katoh M, Wy B, Ngyen HB, Thai TQ, Yamasaki R, Ku H, Rietsh AM, Zorlu MM, Shinozaki Y, Saitoh Y, Saitoh S, Satoh K, Ikenaka K, Koizumi S, Ransohoff RM and Ohno N. Polymorphic regulation of mitochondrial fission and fusion modifies phenotypes of microglia in neuro- inflammation, *Sci. Rep.*, 査読有、7、2017、4942. DOI: 10.1038/s41598-017-05232-0

Shinozaki Y, Shibata K, Yoshida K, Shigetomi E, Gachet C, Ikenaka K, Tanaka KF and Koizumi S. Transformation of astrocytes to a neuroprotective phenotype by microglia via P2Y1 receptor down- regulation, *Cell Rep.*, 査読有、17、2017、1151-1164. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.047>

Ihara T, Mitsui T, Nakamura Y, Kanda M, Tsushiya S, Kira S, Nakagomi H, Sawada N, Kamiyama M, Hirayama Y, Shigetomi E, Shinozaki Y, Yoshiyama M, Nakao A, Takeda M and Koizumi S. Clock Genes Regulate the Circadian Expression of Piezo1, TRPV4, Connexin26 and VNUT in

an Ex Vivo Mouse Bladder Mucosa. PLoS One, 査読有、12、2017、e0168234. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168234>

Nakagomi H, Yochiyama M, Mochizuki T, Miyamoto T, Komatsu R, Imura Y, Morizawa Y, Hiasa M, Miyaji T, Kira S, Araki I, Fujishita K, Shibata K, Shigetomi E, Shinozaki Y, Ichikawa R, Uneyama H, Iwatsuki K, Nomura M, Groat WC, Moriyama Y, Takeda M and Koizumi S. Urothelial ATP exocytosis: regulation of bladder compliance in the urine storage phase. Sci. Rep., 査読有、6、2016、29761. DOI: 10.1038/srep29761

Ihara T, Mitsui T, Nakamura Y, Kanda M, Tsushiya S, Kira S, Nakagomi H, Sawada N, Kamiyama M, Hirayama Y, Shigetomi E, Shinozaki Y, Yoshiyama M, Nakao A, Takeda M and Koizumi S The Clock mutant mouse is a novel experimental model for nocturia and nocturnal polyuria. NeuroUrol. Urodyn., 査読有、36、2016、1034-1038. DOI: 10.1002/nau.23062.

Kim SK, Hayashi H, Ishikawa T, Shibata K, Shigetomi E, Shinozaki Y, Inada H, Roh SE, Kim SJ, Lee H, Bae H, Moorhouse AJ, Mikoshiba K, Fukazawa Y, Koizumi S and Nabekura J. Cortical astrocytes rewire somatosensory cortical circuits for peripheral neuropathic pain. J. Clin. Invest., 査読有、126、2016、1983-1997. DOI: 10.1172/JCI82859.

[学会発表](計25件)

Takeda A, Shinozaki Y, Kashiwagi K, Ohno N, Eto K, Wake H, Nabekura J and Koizumi S. Retinal microglia mediate non-cell-autonomous RGC degeneration in glaucoma model. The 1st International Symposium for Frontend Brain Science of the University of Yamanashi, Feb 21-22, 2018, Tokyo, Japan.

Shinozaki Y, Kashiwagi K, Namekata N, Ohno N, Takeda A, Harada T, Iwata T and Koizumi S. Disordered P2 receptor signaling causes ocular hypertension and glaucoma-like phenotypes. The 1st International Symposium for Frontend Brain Science of the University of Yamanashi, Feb 21-22, 2018, Tokyo, Japan.

櫻井杏梨、酒井優、篠崎陽一、繁富英治、小泉修一、居島薫、堀裕和、小林潔、脳の高次機能解明に向けた脳神経系細胞の近接場光、第65回応用物理学会 春季学術講演会、2018年3月17日-20日、早稲田大学西早稲田キャンパス、東京

篠崎陽一、柏木賢治、行方和彦、武田明子、大野伸彦、原田高幸、岩田岳、小泉修一、眼内プリンシグナル異常による高眼圧及

び緑内障症状の誘発、第10回 Retinal Research Meeting、2017年12月9日、JPタワー ホール&カンファレンス、東京
櫻井杏梨、酒井優、篠崎陽一、繁富英治、小泉修一、居島薫、堀裕和、小林潔、脳の高次機能の解明に向けた脳神経系の近接場光イメージング、第24回ナノオプティクス研究グループ討論会、2017年11月30日-12月1日、富士フィルム株式会社 西麻布本社ホール、東京

篠崎陽一、吉田慶太郎、池中一裕、田中謙二、小泉修一、Microglia-mediated transformation of neuroprotective astrocytes、第22回グリア研究会、2017年12月2日、ミッドランドスクエアオフィスタワー5F ミッドランドホール、名古屋、愛知

篠崎陽一、細胞外ヌクレオチド/P2受容体の多様な機能(招待講演)、IGER Seminar, ニューロサイエンス研究センター・創薬科学研究科・環境医学研究所 Joint Seminar, 名古屋大学、2017年12月1日、名古屋、愛知

篠崎陽一、柏木賢治、行方和彦、武田明子、大野伸彦、原田高幸、岩田岳、小泉修一、P2受容体シグナルの異常は慢性的な高眼圧及び緑内障様の症状を誘導する、第9回若手神経保護の会(NMYR)、2017年11月4日、赤坂インターシティコンファレンス、東京

篠崎陽一、柴田圭輔、繁富英治、吉田慶太郎、池中一裕、田中謙二、小泉修一、Microglia induce neuro-protective astrocytes via down-regulation of P2Y1 receptors、第39回日本生物学的精神医学会/第47回日本神経精神薬理学会合同大会、2017年9月28-30日、札幌コンベンションセンター、北海道
篠崎陽一、柴田圭輔、繁富英治、吉田慶太郎、池中一裕、田中謙二、小泉修一、Microglia-induced astrocytic P2Y1 receptor down-regulation causes neuroprotective astrocyte scar formation

第60回日本神経化学学会年会、2017年9月7-9日、仙台国際センター、宮城

櫻井杏梨、酒井優、篠崎陽一、繁富英治、小泉修一、居島薫、堀裕和、小林潔、グリア細胞とシナプスの近接場光学顕微鏡観察()、第78回応用物理学会 秋季学術講演会、2017年9月5-8日、福岡

篠崎陽一、柴田圭輔、繁富英治、吉田慶太郎、池中一裕、田中謙二、小泉修一、マイクログリアは脳損傷後の神経保護的アストロサイトを誘導する

第136回日本薬理学会年会 2017年7月8日、東京

Choi YJ, Shinozaki Y, Takahashi K, Iwata T, Koizumi S, Sawada K. Cell analysis system using a filter-free fluorescence sensor. Transducers 2017, June 18-22,

Kaousiung, Taiwan.

Shinozaki Y, Kashiwagi K, Takeda A, Ohno N, Koizumi S. Dysregulation in purinergic signaling causes hypertensive glaucoma-like optic neuropathy. ARVO2017, May 7-11, 2017, Baltimore, USA.

崔容俊、篠崎陽一、高橋一浩、岩田達哉、小泉修一、澤田和明、フィルタフリー蛍光センサを用いた標識細胞の蛍光検出、第64回応用物理学会春季学術講演会2017年3月14-17日、神奈川

篠崎陽一、柏木賢治、行方和彦、大野伸彦、武田明子、柏木賢治、原田高幸、小泉修一、緑内障発症におけるP2受容体異常の役割、第90回日本薬理学会年会、2017年3月15-17日、長崎

武田明子、篠崎陽一、柏木賢治、小泉修一、ミクログリア由来TNFは緑内障モデルマウスにおけるRGC傷害を誘導する、第90回日本薬理学会年会、2017年3月15-17日、長崎

櫻井杏梨、酒井優、篠崎陽一、繁富英治、小泉修一、居島薫、堀裕和、小林潔、SNOMを用いた脳神経系の観察、日本工学会ナノプティクス研究グループ第23回研究討論会2016年11月28日、29日大阪大学吹田キャンパスコンベンションセンター、大阪

篠崎陽一、柏木賢治、武田明子、小泉修一、P2Y6受容体の異常は緑内障発症を誘導する、第20回Japan Purine Club Meeting、2016年10月26、27日、東京慈恵会医科大学、東京

篠崎陽一、武田明子、柏木賢治、小泉修一、Dysregulated P2 receptor signaling causes optic neuropathy via elevation of intracocular pressure、第59回日本神経化学会/第38回日本生物学的精神医学会合同年会、2016年9月7-10日、福岡

②①武田明子、篠崎陽一、柏木賢治、小泉修一、Pathogenic role of retinal microglia in excitotoxicity-induced optic neurodegeneration、第59回日本神経化学会/第38回日本生物学的精神医学会合同年会、2016年9月7-10日、福岡

②②篠崎陽一、田中謙二、繁富英治、柴田圭輔、池田一裕、小泉修一、Microglia induce neuroprotective phenotype of reactive astrocytes via P2Y1 receptor down-regulation、新学術領域「グリアアセンブリ」夏のワークショップ、2016年7月15-16日、山形国際ホテル、山形

②③篠崎陽一、田中謙二、繁富英治、柴田圭輔、池田一裕、小泉修一、P2受容体は眼房水産生調節を負に制御する、第134回日本薬理学会関東部会、2016年7月9日、栃木

②④武田明子、篠崎陽一、柏木賢治、小泉修一、NMDA誘発緑内障モデルにおけるミクログリア依存的RGC傷害メカニズムの解明、第

134回日本薬理学会関東部会、2016年7月9日、栃木

②⑤篠崎陽一、Glial roles in brain injury/pathology" (招待講演)、Summer Seminar of Biosensor groups in Toyohashi University of Technology、September 5, 2016, Shizuoka, Japan

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 緑内障モデル、評価対象薬剤の緑内障予防乃至治療効果の評価方法、及び眼圧調整剤

発明者: 小泉修一、篠崎陽一、柏木賢治

権利者: 国立大学法人山梨大学

種類: 特許権

出願番号: 特願2016-173485

取得年月日: 2016年9月6日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ccn.yamanashi.ac.jp/~yshinozaki/Home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠崎 陽一 (SHINOZAKI, Youichi)

山梨大学・大学院総合研究部・講師

研究者番号: 10443772