

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：	34401
研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2010～2012
課題番号：	22591972
研究課題名（和文）	緑内障モデルにおける P2X7 受容体活性化と網膜神経節細胞障害の関連性
研究課題名（英文）	Involvement of activated P2X7 receptor in disorder of retinal ganglion cells in animal models of glaucoma
研究代表者	
	杉山 哲也 (Sugiyama Tetsuya)
	大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：	20298764

研究成果の概要（和文）：ラット緑内障モデルにおける網膜神経節細胞（RGC）障害への P2X₇ 受容体の関与を明らかにした。まず、培養系および視神経挫滅（ONC）モデルにおいて本受容体拮抗薬が RGC を保護するかどうか調べた。ONC では本受容体が活性化され、培養系・ONC ともに同拮抗薬によって RGC は保護された。次に、急性眼圧上昇モデルにおける同拮抗薬の効果を評価した。眼圧上昇により本受容体が活性化され、同拮抗薬は用量依存的に RGC 密度を保った。以上、本受容体は緑内障モデルの RGC 障害に関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We aimed to determine whether P2X₇ receptor is involved in retinal ganglion cell (RGC) loss in rat models of glaucoma. In the first study, we investigated whether P2X₇ antagonists rescue RGCs in culture and after optic nerve crush (ONC) injury. *In vitro*, RGCs were preserved when treated with P2X₇ antagonists. *In vivo*, the retinal expression of the P2X₇ receptors was observed to be upregulated after ONC. RGCs were preserved when P2X₇ antagonists were applied after ONC injury. In the second study, we evaluated effects of P2X₇ antagonists in a rat model of acute intraocular pressure (IOP) elevation. P2X₇ receptor was activated after IOP elevation and administration of P2X₇ antagonists dose-dependently preserved RGC density. These results suggest that P2X₇ receptor may be involved in RGC loss in glaucoma models.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科（眼薬理学）

キーワード：P2X₇ 受容体、緑内障、視神経挫滅、眼圧上昇、網膜神経節細胞、ラット

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞内 ATP は細胞のエネルギー源であり、その枯渇が細胞死につながることは周知の事実である。一方、細胞内のみならず細胞外にも ATP が存在し、ATP と関連物質（アデノシンなど）が種々の生理作用（例えば血流調節など）をもつことがわかってきた¹⁾。

ATP やアデノシンの受容体（プリン受容体）には多くの種類があることが近年明らかとなったが、イオンチャネルを構成する P2X サブタイプのうち P2X₇ 受容体が最近医学のいくつかの領域で注目されている。すなわち、この受容体は炎症、疼痛、神経変性などに関わっていることが明らかにされてきた²⁾。

(2) P2X₇ 受容体活性化による作用メカニズムの中で特徴的なことは、細胞膜 pore (900Da もの巨大分子を透過させる) を形成することである。P2X₇ 受容体の炎症との関わりでは、その活性化が IL-1 などのサイトカインの遊離や細胞死の引き金となることが明らかにされており³⁾、中枢神経系との関連では脳梗塞・脊髄損傷・多発性硬化症・慢性神経変性疾患などとの関連が示唆されている⁴⁾。例えば、アルツハイマー病の病因において重要とされているβアミロイドのヒト・ミクログリアからの分泌に対して、この受容体の関与が示されている⁵⁾。

(3) 我々は、P2X₇ 受容体が網膜血流調節に関わっていること⁶⁾に加え、網膜微小血管の細胞死を引き起こすことを報告して来た⁷⁾。すなわち、正常ラットの網膜微小血管細胞に P2X₇ 受容体作動薬を作用させると、細胞膜 pore 形成、アポトーシスを惹起するが、糖尿病ラットの網膜微小血管細胞ではそれより著明に低い濃度（正常では作用しない濃度）でアポトーシスが起こる。さらに、P2X₇ 受容体活性化による網膜血管細胞死が通常は一

酸化窒素や P2Y₄ 受容体によって抑制されていることも報告した⁸⁾。何らかの原因でこの保護機構が機能しないと、P2X₇ 受容体を介した網膜血管細胞死が起こると考えられる。例えば糖尿病では、この受容体の活性化による循環障害が網膜症発症に関わっている可能性が示唆されている⁹⁾。

(4) ラットの脳梗塞モデルや培養脳細胞の虚血モデルにおいて P2X₇ 受容体の発現や感受性の亢進が報告されている^{10~12)}。さらに、ラット網膜神経節細胞において P2X₇ 受容体作動薬が細胞内 Ca²⁺ を上昇させ、ひいては細胞死を惹起することが報告されている¹³⁾。我々は培養ラット網膜神経節細胞を用いた実験により、虚血（低酸素）による網膜神経節細胞死への P2X₇ 受容体の関与を示すデータを得た¹⁴⁾。

<参考文献>

- 1) Hirao M, Oku H, Goto W, Sugiyama T, et al. *Exp Eye Res* 2004;79:729-735.
- 2) Romagnoli R, Baraldi PG, Cruz-Lopez O, et al. *Expert Opin Ther Targets*. 2008;12:647-661.
- 3) Chen L, Brosnan CF. *Crit Rev Immunol*. 2006;26:499-513.
- 4) Matute C. *Mol Neurobiol*. 2008;38:123-128.
- 5) Rampe D, Wang L, Ringheim GE. *J neuroimmunol*. 2004;147:56-61.
- 6) Kawamura H, Sugiyama T, Wu DM, et al. *J Physiol*. 2003;551:787-799.
- 7) Sugiyama T, Kobayashi M, Kawamura H, et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45:1026-1032.
- 8) Sugiyama T, Kawamura H, Yamanishi S, et al. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005;288: C568-C576.
- 9) Sugiyama T, Oku H, Komori A, Ikeda T. *Arch Ophthalmol*. 2006;124:1143-1149.
- 10) Franke H, Gunther A, Grosche J, et al. *J Neuropathol Exp Neurol*.

2004;63:686-699.

- 11) Wirkner K, Kofalve A, Fischer W, et al. *J Neurochem.* 2005;95:1421-1437.
- 12) Milius D, Sperlagh B, Illes P. *Neurosci Lett.* 2008;446:45-50.
- 13) Zhang X, Zhang M, Laties AM, Mitchell CH. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:2183-2191.
- 14) Sugiyama T, Fukuhara M, Oku H, et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:3236-3243.

2. 研究の目的

最近、細胞死や炎症との関連で注目されつつある P2X₇ 受容体の網膜神経節細胞 (RGCs) 障害については緑内障性視神経症への関与を明らかにし、ひいては新しい緑内障治療薬開発の糸口を得たいと考えた。

本研究では P2X₇ 受容体と緑内障性視神経症との関連性を明らかにするため、*in vitro* と *in vivo* の実験を行う。まず、培養ラット RGCs に対する P2X₇ 受容体の関与を明らかにする。次いで、ラット視神経挫滅モデルやラット眼圧上昇モデルにおける RGCs 障害への P2X₇ 受容体の関与を検討する。

3. 研究の方法

(1) ラット網膜初代培養

Nguyen ら¹⁵⁾ による既報の方法に従った。概略を述べると、DAPI によって RGCs を逆行性標識した 1 週間後にラットを屠殺し、網膜の細胞をパパイソ、DNase などによって分離した後、遠心分離で集め、さらに一定濃度で浮遊させたものをウェルに播種した。その上で、種々の濃度の P2X₇ 受容体拮抗薬 (OxATP, BBG)、ATP、P2X₇ 受容体作動薬 (BzATP) 添加溶液に暴露し、3 日後に生存 RGCs を計測した。生存を確認するためにカルセインで染色を施し¹⁶⁾、DAPI およびカルセインともに陽性を示す細胞のみを計数した。

(2) ラット視神経挫滅 (ONC) モデル

左側視神経を既報¹⁷⁾ に従って挫滅し、ONC モデルを作製した。概略を述べると、ラットの後極から 2 mm 後方の視神経部分を撮子によって 10 sec の間挫滅した。直後に数濃度の P2X₇ 受容体拮抗薬 (OxATP, BBG) を硝子体内投与し、1 週間後にラットを屠殺して網膜のフラットマウント標本を作製した。RGCs を TUJ1 によって染色し、1 網膜あたり 12 領域で RGCs を計数し、平均密度を求めた。

さらに ONC モデルの RGCs における P2X₇ 受容体の発現を視覚化するため、P2X₇ 受容体および TUJ1 に対する免疫組織化学染色を施行した。ONC 作製の直後に OxATP, BBG を投与した標本についても同様に染色した。

(3) ラット眼圧上昇モデル

全身麻酔下でラットの前房に 30G 針でカニューレーションし、水圧負荷によって眼圧を 90 mmHg で 60 分間負荷した。負荷直後に生理食塩液、種々の濃度の OxATP, BBG を硝子体投与した。1 週間後にラットを屠殺し、眼球の組織標本を作製し、RGCs の密度を求めた。

さらに RGCs や microglia における P2X₇ 受容体の発現変化を調べるため、高眼圧負荷 1~7 日後にラットを屠殺し、P2X₇ 受容体と TUJ1/CD68 の免疫組織化学染色を施した。

加えて、P2X₇ 受容体、サイトカイン発現の定量的評価のため、高眼圧負荷後 1、2、3 日後にラットを屠殺し、網膜を摘出した。RNA の抽出・逆転写を行った上で、定量的 real-time PCR による測定を行った。

<参考文献>

- 15) Nguyen SM, Lieven CJ, Levin LA, J *Neuroscience Methods* 2007;161:281-284.
- 16) Schlieve CR, Tam A, Nilsson BL, et al. *Exp Eye Res* 2006; 83: 1252-1259.
- 17) Kurimoto T, Ishii M, Y. Tagami, M. et al. *Neuroreport* 2006;17:1525-1529.

4. 研究成果

(1) 培養 RGCs の生存

P2X₇ 受容体拮抗薬 (OxATP, BBG) 添加により濃度依存性に生存 RGCs が増加した (図 1 A)。一方、P2X₇ 受容体作動薬 (ATP, BzATP) 添加によって生存 RGCs は減少したが、OxATP を併用すると細胞数が維持された (図 1 B)。

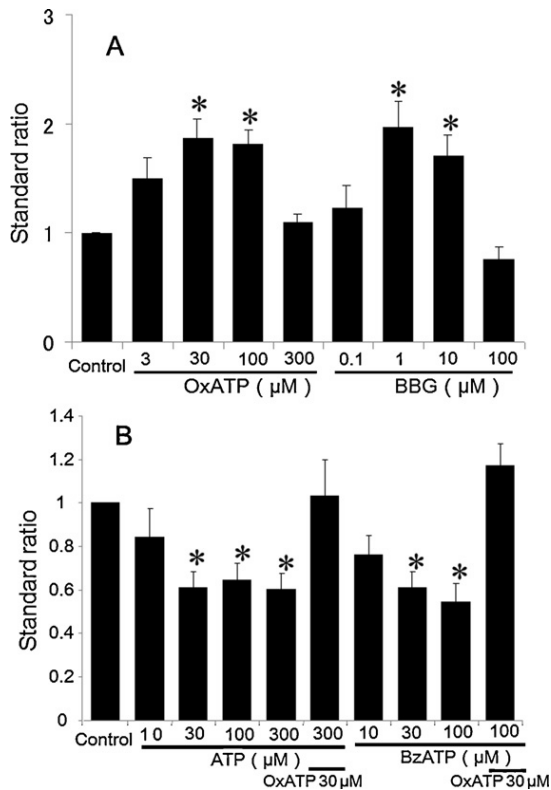


図1 P2X₇ 受容体拮抗薬および作動薬の RGCs 生存に及ぼす影響。平均+SEM で示す (asterisks は Control に対して有意差あり、Dunnett test, p<0.05)。

(2) ONC モデルにおける RGCs への影響

ONC モデルにおける RGCs 密度の減少は P2X₇ 受容体拮抗薬 (OxATP, BBG) 硝子体投与により抑制された (図 2)。また、RGCs における P2X₇ 受容体免疫活性は ONC 3 日後をピークとして上昇し、拮抗薬投与によりその上昇が抑制されることが示された (図 3)。

(3) 眼圧上昇モデルにおける RGCs への影響

眼圧上昇モデルにおける RGCs 密度の減少は P2X₇ 受容体拮抗薬投与により濃度依存的

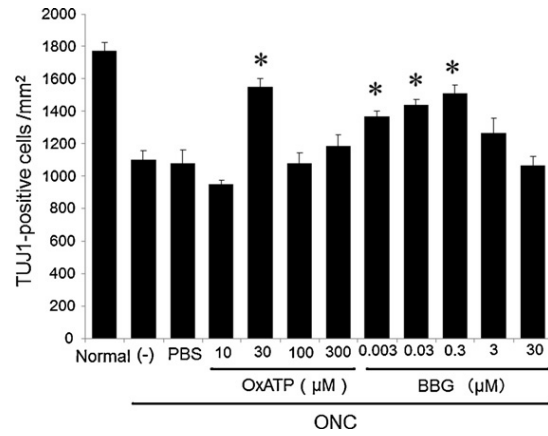


図2 P2X₇ 受容体拮抗薬の ONC モデル・RGCs 密度に及ぼす影響。平均+SEM で示す (asterisks は ONC+PBS に対する有意差、Dunnett test, p<0.05)。

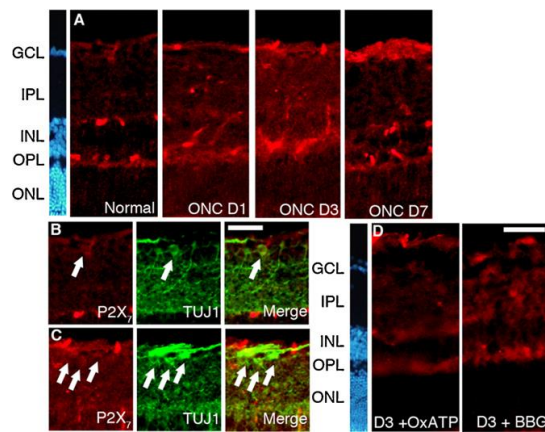


図3 P2X₇ 受容体免疫活性の経時的変化 (A: 正常と ONC モデル 1、3、7 日後)。TUJ1 との二重染色を施した正常網膜 (B) と ONC3 日後の網膜 (C)。30 μM OxATP, 0.3 μM BBG を投与した ONC モデルにおける P2X₇ 受容体免疫活性 (D)。

に抑制された (図 4)。また同モデルにおける RGCs や microglia の P2X₇ 受容体活性は 2 日後に上昇し、同受容体拮抗薬投与によりその上昇が抑制された (図 5、6)。さらに microglia における TNF-α や IL-1β の活性も上昇したが、同受容体拮抗薬によりそれらの上昇は抑制された (図 7)。

real-time PCR の結果、網膜の P2X₇ 受容体、TNF-α、IL-1β、IL-6 各遺伝子の発現は眼圧負荷 2 日後をピークに増加し、同受容体拮抗薬によりそれらの増加は抑制された (図 8~10)。

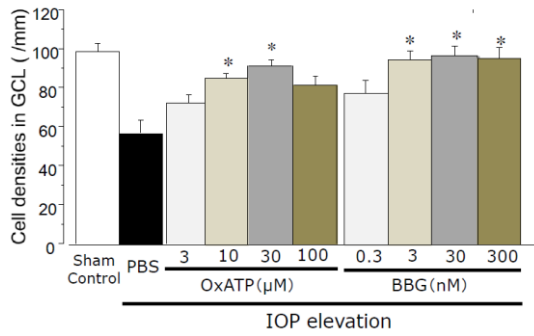


図4 P2X₇ 受容体拮抗薬の眼圧上昇モデル・RGCs 密度に及ぼす影響。平均±SEM で示す (asterisks は眼圧上昇+PBS に対して有意差あり、unpaired t-test, p<0.05)。

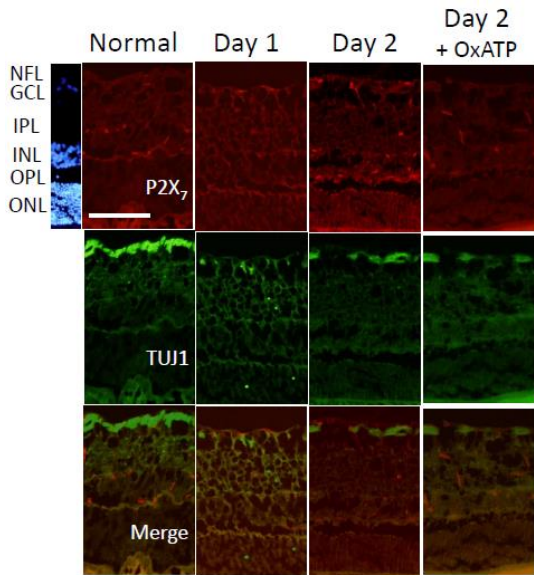


図5 眼圧上昇モデルにおける P2X₇ 受容体免疫活性 (TUJ1 との二重染色) の経時的変化。

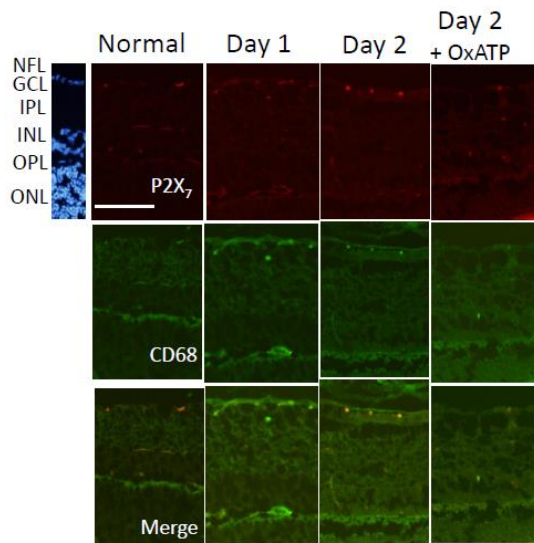


図6 眼圧上昇モデルにおける P2X₇ 受容体免疫活性 (CD68 との二重染色) の経時的変化。

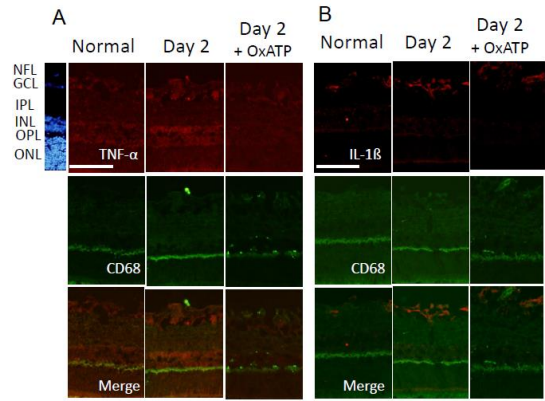


図7 眼圧上昇モデルにおける TNF- α (A)、IL-1 β (B) の免疫活性 (CD68 との二重染色) と P2X₇ 受容体拮抗薬の影響。

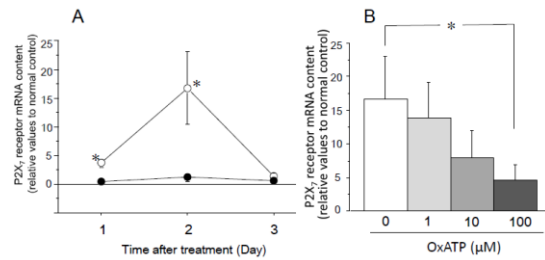


図8 眼圧上昇モデルにおける P2X₇ 受容体遺伝子発現の経時的変化(A) と P2X₇ 受容体拮抗薬の影響(B)。

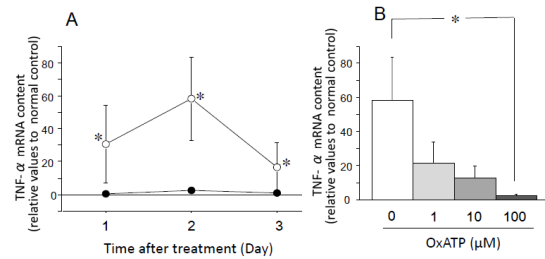


図9 眼圧上昇モデルにおける TNF- α 遺伝子発現の経時的変化(A) と P2X₇ 受容体拮抗薬の影響(B)。

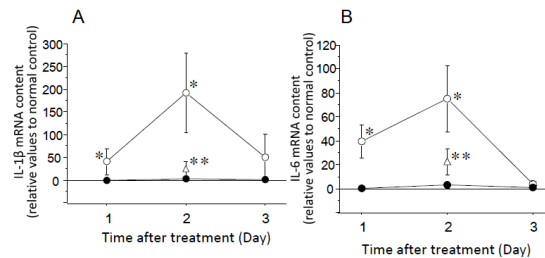


図10 眼圧上昇モデルにおける IL-1 β (A)、IL-6 (B) 遺伝子発現の経時的変化 (Δ は 10 μ M OxATP 投与)。

(4) まとめ

以上の結果から、P2X₇ 受容体はラット網膜培養系やラット緑内障モデル (視神経挫滅モデルや眼圧上昇モデル) における RGCs 障害

に関与しており、その機序として炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-1 β 等) の寄与が示唆された。また、本受容体の拮抗薬は緑内障性視神経症の治療薬となる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 9 件)

1. Kakurai K, Sugiyama T, Kurimoto T, Oku H, Ikeda T. Involvement of P2X₇ receptors in retinal ganglion cell death after optic nerve crush injury in rats. *Neurosci Lett*. 2013; 534: 237-41.

〔学会発表〕 (計 10 件)

1. 杉山哲也、栗本拓治、奥 英弘、柴田真帆、池田恒彦. ラット網膜神経節細胞死に対する P2X₇ 受容体拮抗薬の神経保護効果. 第 115 回日本眼科学会総会, 2011. 5. 12-15, 東京.
2. 栗本拓治、杉山哲也、中田聖月、小寫祥太、植木麻理、奥 英弘、池田恒彦. 急性高眼圧モデルを用いたタフルプロスト、チモロールの神経保護効果. 第 23 回日本緑内障学会, 2012. 9. 28-30, 金沢.
3. Sugiyama T. Protective effects of P2X₇ antagonists on retinal neurons and ganglion cells. 第 7 回 Glaucoma Summer Camp, 2012. 7. 19-20, 広島.

〔その他〕

ホームページ

大阪医科大学眼科学教室：教室で行っている研究内容の紹介

(<http://www.osaka-med.ac.jp/deps/opt/kenkyu.html>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 哲也 (Sugiyama Tetsuya)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：20298764

(2) 研究分担者

池田 恒彦 (Ikeda Tsunehiko)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号：70222891

奥 英弘 (Oku Hidehiro)
大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90177163

小寫 祥太 (Kojima Shota)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：10388259

高井 真司 (Takai Shinji)
大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号：80288703

嶋澤 雅光 (Shimazawa Masamitsu)
岐阜薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：80381721

栗本 拓治 (Kurimoto Takuji)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：50388815

(3) 連携研究者

原 英彰 (Hara Hideaki)
岐阜薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：20381717