

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 20 日現在

機関番号：87105  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23791991  
 研究課題名（和文） P2X7 レセプター選択的阻害剤 BBG を用いたアポトーシス抑制による網膜神経保護  
 研究課題名（英文） The neuroprotection for photoreceptor apoptosis via selective antagonist, BBG  
 研究代表者  
 久富 智朗（HISATOMI TOSHIO）  
 国立病院機構九州医療センター 眼科科長  
 研究者番号：50404033

研究成果の概要（和文）：網膜においても P2X7 レセプター依存的に視細胞がアポトーシスを起こしていた。細胞死刺激により細胞内への Ca イオン流入は細胞死のかなり早い時期に既におこり始め、この過程で細胞膜の透過性亢進、Caspase や cytochrome c、AIF 等アポトーシス関連シグナル伝達分子の挙動を確認した。P2X7 レセプター knockout マウスを用いて検討し、P2X7 レセプターの選択性の裏付けを進めた。これら細胞死や細胞内シグナル伝達は選択的阻害剤 BBG で抑制された。

研究成果の概要（英文）：The retinal cells developed apoptosis via P2X7 receptor dependent pathways. Cell death developed via rapid Ca<sup>++</sup> intake into the cells and followed by apoptotic molecular signals such as membrane permeabilization, caspase activation, cytochrome c and AIF translocation. P2X7 receptor knockout mice showed decreased cell death without P2X7 receptor. The cell death and following molecular signal transduction were reversed by selective antagonist, BBG.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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・眼科学

キーワード：眼細胞生物学

## 1. 研究開始当初の背景

近年、神経細胞障害において障害部位では神経細胞内から ATP が大量に遊離し、直接神経細胞死を引き起こしたり炎症細胞浸潤による 2 次的神経細胞死を惹起していることが報告された(Nature 2006)。この細胞外に遊離した ATP により、細胞膜に存在する ATP 選択的チャンネル型受容体 P2X7 が活性化し、チャンネルが開くことで、細胞外から細胞内への Ca イオンの流入がおきて神経細胞は死に至ることが解ってきた(Physiol Rev 2002)。昨年この P2X7 受容体の非生理的選択的阻害薬である Brilliant Blue FCF 及びその修飾物である Brilliant Blue G が、

脊髄損傷モデルにおいて神経細胞死及び炎症細胞浸潤を抑制することが始めて報告された。

一方我々は、これまで眼科領域、特に神経細胞の細胞死および神経保護について研究を行ってきた。網膜の神経細胞は、通常状態では分裂・増殖せず、網膜細胞の脱落は不可逆的な減少であり、細胞死のメカニズムは大変重要な意義を持つ。我々は網膜疾患で神経細胞がアポトーシスを起こして脱落することを示し、このシグナル経路を解析した(Am J Pathol 2001)。ミトコンドリアに含まれるアポトーシス促進因子、AIF は中心的な役割を果たして、アポトーシス刺激によりミト

コンドリアから放出され、核内へ移行し、DNA の切断に関わることを、網膜剥離疾患モデル動物で世界に先立って報告した(Am J Pathol 2001&2003)。緑内障モデルではミクログリアが活性化し、TNF- $\alpha$  等の因子を放出し神経節細胞にアポトーシスを促進していることを報告した(PNAS 2007)。アポトーシスの過程ではミトコンドリア脂質二重膜の透過性亢進と前後して細胞膜の透過性が起こる。またこの細胞死を抑制するためにミトコンドリアの膜透過性を維持するという治療戦略をたて、有効な薬物を検討した(J Clin Invest. 2008)。しかしアポトーシスの細胞内シグナル伝達には不可逆のプロセスも多く、アポトーシスを初期段階で抑制する必要がある。ATP による選択的チャンネル型受容体 P2X7 の活性化を抑制できれば、アポトーシスの初期段階での抑制に大変有効である可能性がある。

また我々は網膜硝子体疾患における網膜硝子体界面の研究も精力的に進めており、トリアムシノロンアセトニドによる硝子体可視化に加えて、安全な基底膜染色剤の開発を行ってきた。我々の着目した Brilliant Blue G (BBG)は食用色素として使われており、卓越した生体適合性を持ち a わせている。我々が発明者となり BBG の眼内染色剤としての利用法は九州大学の知的財産としては欧州、日本で特許成立、米国にて審査中である。2010 年 8 月には欧州にて眼内染色剤として認可市販が始まった。今回 BBG の眼内の良好な生体適合性を踏まえ、新たな P2X7 受容体抑制によるアポトーシス抑制・神経保護効果の検討、及び将来の神経保護薬としての可能性を探る。

## 2. 研究の目的

まず網膜神経細胞において P2X7 受容体依存的を介した神経細胞死が起こるかを確かめ、BBG による抑制試験を行い、他の P2X7 受容体阻害剤、knock out マウスを用いて裏付けをする。このために in vitro、in vivo の実験系での評価モデルを確立する。

### 1) in vitro 実験系

我々は網膜由来神経細胞初代培養を用いたアポトーシスの観察系を樹立した(PNAS 2007, JCI 2008)。この系では動物より採取した新鮮な初代培養を無血清、神経栄養因子添加 Neurobasal A medium B27 添加培養液を用いる。視細胞、双極細胞、神経節細胞等の神経細胞およびミューラー細胞やアストロサイト等のグリア細胞を含む混合培養系となる。この条件を最適化して視細胞、神経節細胞等目的の細胞が実験期間に安定して生存できる培養系を確立する。栄養因子除去および腹腔より採取したマクロファージを用いて神経細胞死を誘導し、全体の細胞数のな

かで一定の割合で安定してアポトーシスを誘導する系を確立する。実験系を確立した上で、培養細胞での P2X7 レセプターの発現を確認し、培養液中の ATP 濃度を測定する。両者が確認できた上で BBG による視細胞、神経節細胞の保護効果を検討し、至適薬物濃度、投与条件を決める。この過程で細胞膜の透過性亢進、Caspase や cytochrome c、AIF 等アポトーシス関連シグナル伝達分子の挙動を確認する。同様の実験を P2X7 knockout マウスを用いて検討し、P2X7 レセプターの選択性を裏付けする。また逆に P2X7 レセプターのより選択性の高い非生理的アゴニストである BzATP を用いて実験の再現性および P2X7 レセプターの選択性を裏付けする。

### 2) in vivo 実験系

我々はラット硝子体にあらかじめ空気を注入し硝子体の液化を促進させ、均一で安定した眼内へのドラッグデリバリー法を考案した。この方法を用いて非生理的 P2X7 レセプターアゴニストである BzATP を用いて網膜神経細胞に安定した割合で神経細胞死を誘導する系を確立する。またこの神経細胞死を BBG を用いて抑制し、投与条件、至適濃度を探る。同様に P2X7 knock out マウスおよび control wild type マウスを用いて実験の選択性および再現性を確認する。至適条件が明らかになったところで、我々の開発した網膜剥離視細胞アポトーシス誘導モデルを始め、高眼圧や軸索障害死細胞誘導疾患モデルなどを用いて BBG の神経保護効果を検討し、将来の臨床での使用を視野に入れた薬物療法の可能性を探る。

③ 当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義  
我々は網膜疾患の病理学や分子生物学を背景として基礎的研究を行い、様々な細胞死、特にアポトーシスシグナル伝達分子の関与を明らかにしてきた。また臨床ではトリアムシノロンや BBG を用いて手術時に硝子体や内境界膜を染色する方法を世界に先駆けて報告し、この分野で先端を進んでおり ChromoVitreotomy という分野を確立しつつある。今回はこれら二つの分野を効果的に結びつけることで現実的かつ理想的なトランスレーショナルリサーチを目指す。

BBG は既に我々により preclinical trial および clinical trial を経て臨床応用され、欧州では平成 22 年 8 月より内境界膜染色剤として発売となった。また米国では FDA 指導のもと臨床試験および評価中であり、国内での評価がまたれる所である。今回 BBG の神経保護効果が評価でき、臨床応用の可能性が充分担保できれば、硝子体内投与薬剤をして期待され、また脳梗塞や出血などその中枢神経疾患への神経保護応用の可能性が期待されうる。

### 3. 研究の方法

我々の開発した網膜由来神経細胞初代培養系および網膜剥離視細胞死誘導モデル等疾患モデル動物を組み合わせて、細胞レベルから組織・臓器レベルでP2X7 レセプター依存性の細胞死の重要性を評価する。この過程で組織中に生理的もしくは病的に存在するATPにより細胞外から細胞内へのCaイオン流入を契機とした細胞死が起こり得ることを確認する。また非生理的選択的P2X7 レセプターアゴニストであるBzATPによりこの細胞死へのレセプター選択性を確認し、我々の着目する非生理的選択的P2X7 レセプターアンタゴニストBBGによるレセプターの活性化抑制および神経保護効果を評価する。またP2X7 レセプターknock out マウスを用いて

in vivo、in vitro でのレセプター選択性を裏付けする。我々が行ってきたBBGを用いた臨床研究に基づき基礎研究と効果的に結びつけることで現実的かつ理想的なトランスレーショナルリサーチを目指す。

<網膜由来神経細胞初代培養系を用いた in vitro の実験>  
我々はマウス網膜由来の神経細胞初代培養法を作製しており、網膜細胞死における薬剤の効果判定に使用している(PNAS2007, JCI 2008)。この系では動物より採取した新鮮な初代培養に無血清、神経栄養因子添加 Neurobasal A medium B27 添加培養液を用いる。今回まずは網膜の細胞における、P2X7 受容体の発現を確認し、細胞の種類による発現差を比較する。

細胞死の刺激としては神経培養液中の神経栄養因子 B27 supplement を除去した低栄養刺激と腹腔より誘導したマクロファージを添加する細胞傷害刺激を用意し、P2X7 レセプターを介してCaイオンの流入により細胞死が誘導されることを確かめる。

この過程で細胞膜の透過性亢進、Caspase や cytochrome c、AIF 等アポトーシス関連シグナル伝達分子の挙動を確認する。同様の実験をP2X7 knockout マウスを用いて検討し、P2X7 レセプターの選択性を裏付けする。

また逆にP2X7 レセプターのより選択性の高い非生理的アゴニストであるBzATPを用いて実験の再現性およびP2X7 レセプターの選択性を裏付けする。

<P2X7 knock out マウス用いた in vivo 実験>

P2X7KO マウスの網膜細胞におけるP2X7 発現抑制を確認した上で実験に使用する。網膜由来神経細胞初代培養系を用いて knock out マウス及びwild type マウスとの細胞死の起こり方を比較する。TUNEL 法や電子顕微鏡による細胞死の確認、重要なアポトーシスシグナル伝達分子 (AIF, caspase, etc) の働きを裏付ける。これらの過程でP2X7 受容体の

神経細胞死における重要度及びシグナル伝達の分子機構を明らかにする。

<疾患モデル動物を用いた in vivo 実験>  
ラット硝子体空気注入法を用い硝子体の液化を促進させ、均一で安定した眼内へのドレッジデリバリーを実現する。

この方法を用いて非生理的P2X7 レセプターアゴニストであるBzATPを用いて網膜神経細胞に安定した割合で神経細胞死を誘導する系を確立する。

またこの神経細胞死をBBGを用いて抑制し、投与条件、至適濃度を探る。同様にP2X7 knock out マウスおよびcontrol wild type マウスを用いて実験の選択性および再現性を確認する。至適条件が明らかになったところで、我々の開発した網膜剥離による視細胞アポトーシス誘導モデルを始め、高眼圧や、軸索障害死細胞誘導疾患モデルなどを用いてBBGの神経保護効果を検討し、将来の臨床での使用を視野に入れた薬物療法の可能性を探る。

① 本研究を遂行する上での具体的な工夫  
当施設は組織・病理学の共同研究施設として、中央形態分析室を運営しており、我々は先駆的な技術開発・解析法を報告している室長、金丸孝昭先生と共同研究であり、技術開発面でのノウハウ、問題解決に大いに貢献すると考える。

また久留米大学解剖学教室、中村桂一郎教授とは解剖学的、病理学的研究支援を受けており、細胞内分子局在の解釈及び免疫組織科学などソフト面での支援が期待できる。

② 研究計画を遂行するための研究体制について、研究代表者及び必要に応じて研究協力者代表研究者は2005年9月より2008年3月までHarvard Medical School(USA)の眼科学部門であるMassachusetts Eye and Ear Infirmaryにおいて病院長Dr. Joan W. Millerの指導のもとresearch fellowを修了し、当該分野の多数の報告をしており、今後も効果的な研究支援が期待できる。また海外研究者ではInstitut Gustave Roussy (France)のミトコンドリア研究の第一人者、Dr. Guido Kroemerと2000年より共同研究を継続しており、当該分野で多数の報告をしており、今後も共同研究を継続している。

また代表研究者は昨年度より九州大学医学研究院、臨床大学院の指導研究者として、博士課程大学院生、納富昭司先生(医師)を共同研究者として指導しており、この研究に十分な人的支援を提供することが期待される。

### 4. 研究成果

<P2X7レセプター選択的阻害剤BBGを用いたアポトーシス抑制による網膜神経保護>

我々は様々な網膜疾患で、神経細胞がアポト

ーシスを起こし、ミトコンドリアに局在するアポトーシス促進因子の核内移行が重要な役割を果たすことを報告したが、この実行過程を効果的に抑制することは困難である。臨床研究において近年 BBG には P2X7 受容体の非生理的阻害作用があることが解ってきた。今回、神経細胞のアポトーシスのより初期の過程である細胞表面チャンネル抑制による染色剤 BBG の神経保護効果について検討をすすめた。

<網膜由来神経細胞初代培養系を用いた in vitro の実験>

細胞死の刺激としては神経培養液中の神経栄養因子 B27 supplement を除去した低栄養刺激と腹腔より誘導したマクロファージを添加する細胞傷害刺激を用意し、P2X7 レセプターを介して Ca イオンの流入により細胞死が誘導されることを確かめた。細胞内への Ca イオン流入は細胞死のかなり早い時期に既におこり始めることを発見した。この過程で細胞膜の透過性亢進、Caspase や cytochrome c、AIF 等アポトーシス関連シグナル伝達分子の挙動を確認した。同様の実験を P2X7 knockout マウスを用いて検討し、P2X7 レセプターの選択性を裏付けを進めている。また阻害剤 BBG を用いることで P2X7 受容体を阻害し、細胞内への Ca イオン流入、caspase 8 の活性化、DNA 断片化、いずれも減少させることを証明できた。

## 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 5 件)

久富智朗、The regulatory roles of apoptosis-inducing factor in the formation and regression processes of ocular neovascularization.、Am J Pathol.、査読有、181(1)、2012、pp 53-61

〔学会発表〕(計 9 件)

- ①第 116 回日本眼科学会総会
- ②The 27th APAO Congress

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

久富 智朗 (HISATOMI TOSHIO)  
九州医療センター・その他部局等・その他  
(眼科科長)

研究者番号：50404033