

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19590089
 研究課題名（和文） 脳神経系細胞における無刺激状態及びストレス負荷時 P2X7 受容体
 活性制御機構の解明
 研究課題名（英文） Regulatory mechanism for P2X7 receptors expressed by brain
 neuronal cells under basal and stress-loaded conditions
 研究代表者
 長澤 一樹（NAGASAWA KAZUKI）
 京都薬科大学・薬学部・准教授
 研究者番号：30228001

研究成果の概要：

マウスアストロサイトに発現する P2X7 受容体の活性は、炎症反応に関与する核内受容体 PPAR γ によって負に制御されていることが明らかとなり、細胞を死に導く受容体として認識されていた P2X7 受容体が、生理的状态のみならず、病的状態においても脳内恒常性維持に重要な役割を担うことが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：受容体

1. 研究開始当初の背景

P2X7 受容体は ATP 感受性が極めて低いため生理的状态では機能していないと考えられている。我々はこれまでに、無刺激状態のマウスアストロサイトにおいても P2X7 受容体が活性化状態にあることを見出したが、その制御機構は不明であった。さらに、ATP 代謝物であるアデノシンは細胞間情報伝達物質として機能するが、その脳神経系における動態制御機構に関する情報は認められない。

2. 研究の目的

無刺激状態における P2X7 受容体の活性制御を司る分子機構を解明し、さらに脳神経細胞に発現する P2X7 受容体のストレス負荷時における機能調節機構を明らかにすること

である。

また、無刺激及びストレス負荷状態におけるアデノシンなどの核酸のクリアランス機構について精査し、脳神経系細胞における ATP・アデノシン・ネットワーク機構をその動態的観点から検討した。

3. 研究の方法

初代培養神経細胞及びアストロサイトを用いて、P2X7 受容体の活性化は YO-PRO-1 取り込み、活性酸素種産生は DCF や DHE の蛍光発光、細胞死は LDH 法により評価した。酸化ストレスは SIN-1 により負荷した。また、ATP 代謝物としての adenosine の細胞内取り込みは、³H 標識体を用いて inhibitor stop 法により解析した。

4. 研究成果

マウスアストロサイトに発現するP2X7受容体の活性は、少なくとも一部それは細胞分化やサイトカイン生成に関与する核内受容体PPAR γ によって負に制御されることが示された。しかしながら、その作用発現は極めて短時間で認められ、核内受容体の特徴とは異なるものであった。そこで、PPAR γ の細胞内発現局在を調べたところ、それは核のみならず細胞膜/細胞質にも発現することが分かり、これはその速やかな作用発現を説明するものと考えられた。本知見は、細胞を死に導く受容体と考えられてきたP2X7受容体の活性が、ATPのみならず炎症性反応に深く関与するPPAR γ によって制御され、生理的状态のみならず病的状態においても脳内恒常性維持に重要な役割を担うことを示唆する興味深いものである。

神経細胞におけるP2X7受容体の機能的発現の有無については未だ結論が得られていない状態にあるが、我々は培養神経細胞にもP2X7受容体の発現することをmRNA及びタンパク質レベルで確認し、それはATP刺激により活性化され、特徴的なポアを形成するとともに、神経細胞死を誘発することを明らかにした。このとき、ATP処理された神経細胞内に活性酸素種の産生が認められたが、それはこの神経細胞死に関与する可能性は極めて低いことが分かった。また、ATPによって誘発される神経細胞死は、P2X7受容体活性化に基づく細胞外Ca²⁺の流入、P2X7受容体にリンクするpannexin-1の活性化に起因しないが、細胞内外のNa⁺及びK⁺濃度の変化によって引き起こされる可能性が示された。これは神経細胞に機能的P2X7受容体が発現し、その活性化が細胞死を誘発することを見出した初めての知見である。

次に、脳神経系におけるアデノシンなどの核酸の脳内動態制御機構について検討した結果、それは神経細胞及びアストロサイトのいずれにおいても核酸トランスポータを介して取り込まれものの、その細胞あたりの活性はアストロサイトの方が有意に多いことを初めて定量的に証明し、アストロサイトによる細胞外核酸の除去が脳内恒常性維持に重要な役割を担うことを明らかにした。さらに、アストロサイトに対してSIN-1によって酸化ストレスを負荷したときの取り込み特性の変化の有無を検証した。アストロサイトによるアデノシン取り込みは、酸化ストレス負荷条件下において低下し、これはその取り込みに関与するマイナーなトランスポータの機能的変化に起因することが示された。こ

のことは、酸化ストレス負荷時の脳神経系細胞外におけるアデノシン濃度の上昇を説明するものであり、酸化ストレス負荷された脳神経系細胞に対するadenosineの細胞保護作用発現にトランスポータが重要な役割を担うことを明確に指摘する新たな知見である。

以上のことから、神経細胞及びアストロサイトに発現するP2X7受容体や核酸トランスポータは、生理的及びストレス負荷状態において異なった機能的役割を果たすことにより、脳内恒常性維持に寄与するものと推察される。さらに、ATPに加え、その代謝物であるadenosineの細胞外動態が、P2X7などのP2受容体やアデノシン受容体を介しての脳内恒常性維持において重要な役割を担っており、その制御がストレスによって誘発される有害事象回避に繋がることを示唆している。

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9件)

1. Kazuki Nagasawa, Jun Miyaki, Yuka Kido, Youichirou Higashi, Kentaro Nishida, Sadaki Fujimoto, Possible involvement of PPAR γ in regulation of basal channel opening of P2X7 receptor in cultured mouse astrocytes. *Life Sci*, *accepted*. (査読有)
2. Kazuki Nagasawa, Carole Escartin, Raymond A. Swanson, Astrocyte cultures exhibit P2X7 receptor channel opening in the absence of exogenous ligands, *GLIA*, **57**, 622-633, 2009. (査読有)
3. Tinna M. Kauppinen, Youichirou Higashi, Sang Won Suh, Carole Escartin, Kazuki Nagasawa, Raymond A. Swanson, Zinc triggers microglial activation, *J Neurosci*, **28**, 5827-5835, 2008. (査読有)
4. Kentaro Nishida, Eri Yasuda, Kazuki Nagasawa, Sadaki Fujimoto, Altered levels of oxidation and phospholipase C isozyme expression in the brains of theanine-administered rats, *Biol Pharm Bull*, **31**, 857-860, 2008. (査読有)
5. Eri Yasuda, Kazuki Nagasawa, Kentaro Nishida, Sadaki Fujimoto, Decreased expression of phospholipase C- β 1 protein in endoplasmic reticulum stress-loaded neurons, *Biol Pharm Bull*, **31**, 719-721, 2008. (査読有)
6. Katsuhito Nagai, Kazuki Nagasawa, Yukiko Kihara, Hiroto Okuda, Sadaki Fujimoto, Anticancer nucleobase analogues 6-mercaptapurine and 6-thioguanine are novel substrates for equilibrative nucleoside

- transporter 2, *Int J Pharm*, **333**, 56-61, 2007. (査読有)
7. Katsuhito Nagai, Kazuki Nagasawa, Yoji Kyotani, Natsuko Hifumi, Sadaki Fujimoto, Mouse equilibrative nucleoside transporter 2 (mENT2) transports nucleosides and purine nucleobases differing from human and rat ENT2, *Biol Pharm Bull*, **30**, 979-981, 2007. (査読有)
 8. Kazuki Nagasawa, Fumio Kawasaki, Akiko Tanaka, Katsuhito Nagai, Sadaki Fujimoto, Characterization of guanine and guanosine transport in primary cultured rat cortical astrocytes and neurons. *GLIA*, **55**, 1397-1404, 2007. (査読有)
 9. Kazuki Nagasawa, Taichi Kakuda, Youichirou Higashi, Sadaki Fujimoto, Possible involvement of 12-lipoxygenase activation in glucose-deprivation/reload-treated neurons. *Neurosci Lett*, **429**, 120-125, 2007. (査読有)

[学会発表] (計33件)

1. 長澤一樹, 木戸悠佳, 白山玲奈, 宮木純, 西田健太郎, 藤本貞毅, マウスアストロサイトにおける PPAR γ を介した P2X7 受容体活性制御, 日本薬学会第 129 年会 (京都), 2009.3.27
2. 瀬川将平, 大西美穂, 勝田優, 渡辺侑里子, 東洋一郎, 西田健太郎, 長澤一樹, 藤本貞毅, 亜鉛誘発性ミクログリア活性化への P2X7 受容体の関与, 日本薬学会第 129 年会 (京都), 2009.3.27
3. 中谷庸寿, 奥田浩人, 長澤一樹, 中西麻由香, 山谷香織, 西田健太郎, 藤本貞毅, 神経細胞に発現する P2X7 受容体の活性化による活性酸素種産生機構の解明, 日本薬学会第 129 年会 (京都), 2009.3.27
4. 奥田浩人, 木下さゆり, 大同映理佳, 西浦武志, 床谷祐香, 西田健太郎, 長澤一樹, 藤本貞毅, PARP-1 誘発性アストロサイト細胞死に対する NAD⁺の細胞保護機構について: NAD⁺及びその代謝物の細胞膜輸送特性に基づいた解析, 日本薬学会第 129 年会 (京都), 2009.3.27
5. 仁井谷実穂, 谷田朋未, 藤裕美, 長澤一樹, 藤本貞毅, マウス Concentrative Nucleoside Transporter (CNT) 1 は nucleoside 類似体に対してヒト CNT1 とは異なる認識特性を示す, BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会・合同大会) (神戸), 2008. 12. 9.
6. 田中晶子, 佐伯枝里子, 堀内麻衣, 長澤一樹, 藤本貞毅, 無刺激並びに酸化ストレス負荷条件下初代培養神経細胞及びアストロサイトにおけるヌクレオシド輸送特性の比較, BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会・合同大会) (神戸), 2008. 12. 11
7. 瀬川将平, 大西美穂, 勝田優, 渡辺侑里子, 東洋一郎, 長澤一樹, 藤本貞毅, 亜鉛によって惹起されるミクログリア活性化への P2X7 受容体の関与, BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会・合同大会) (神戸), 2008.12. 11.
8. 奥田浩人, 田中晶子, 木下さゆり, 大同映理佳, 西浦武志, 長澤一樹, 藤本貞毅, NAD⁺による PARP-1 誘発性アストロサイト細胞死抑制作用の分子機構について: 細胞膜輸送特性に基づいた解析, BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会・合同大会) (神戸), 2008. 12. 11.
9. 中谷庸寿, 奥田浩人, 長澤一樹, 白山怜奈, 中西麻由香, 山谷香織, 藤本貞毅, 神経細胞 P2X7 受容体を介した神経細胞死への Pannexin-1 関与の有無について, BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会・合同大会) (神戸), 2008. 12. 11.
10. 東洋一郎, 長澤一樹, 瀬川将平, 奥田浩人, 大西美穂, 勝田優, 渡辺侑里子, 水島徹, 藤本貞毅, P2X7 受容体を介した脳内亜鉛によるミクログリアの活性化, 第 51 回日本神経化学学会大会 (富山), 2008. 9. 12.
11. 奥田浩人, 鈴木恵理, 長澤一樹, 藤本貞毅, ニコチンアミドによる PARP-1 誘発性アストロサイト細胞死抑制にはトランスポータを介した取り込みが不可欠である, 第 51 回日本神経化学学会大会 (富山), 2008. 9. 11.
12. 中谷庸寿, 奥田浩人, 白山怜奈, 中西麻由香, 山谷香織, 長澤一樹, 藤本貞毅, 神経細胞に発現する P2X7 受容体を介した ATP 誘発性神経細胞死分子機構の解明, 第 51 回日本神経化学学会大会 (富山), 2008. 9. 11.
13. 仁井谷実穂, 一二三奈津子, 谷田朋未, 藤裕美, 長澤一樹, 藤本貞毅, マウス Concentrative Nucleoside Transporter (CNT) 1 はヒト CNT1 とは異なる基質特異性を示す, 第 30 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (札幌), 2008. 8. 8.
14. 奥田浩人, 鈴木恵理, 佐伯枝里子, 堀内麻衣, 長澤一樹, 藤本貞毅, ニコチンアミドの PARP-1 誘発性細胞死抑制過程においてトランスポータを介した取り込みが必須である, 第 30 回生体膜と薬物の相

- 相互作用シンポジウム (札幌), 2008. 8. 8.
15. 長澤一樹, 中谷庸寿, 西上亜由美, 原香織, 宮野友希, 藤本貞毅, ATP 誘発性神経細胞死に關与する P2 受容体アイソフォームの解析, 日本薬学会第 128 年会 (横浜), 2008. 3. 27.
 16. 奥田浩人, 長澤一樹, 安立詩史, 今本愛子, 藤本貞毅, Nucleoside Transporter 阻害剤及び P2X7 受容体アンタゴニストの特異性について, 日本薬学会第 128 年会 (横浜), 2008. 3. 27.
 17. 山田真聡, 東洋一郎, 釜田千鶴, 瀬川将平, 長澤一樹, 藤本貞毅, Peroxynitrite による細胞内亜鉛遊離を介したドパミン神経細胞死の機序の解明, 日本薬学会第 128 年会 (横浜), 2008. 3. 27.
 18. 奥田浩人, 長澤一樹, 東洋一郎, 藤本貞毅, NAD⁺による PARP-1 誘発性細胞死抑制機構の解明: NAD⁺又はその代謝物の細胞膜透過における P2X7 受容体の関与, 難病克服をめざした創薬科学合同研究成果発表会 (京都), 2008. 1. 26.
 19. 東洋一郎, Sang Won Suh, Tiina M. Kauppinen, Raymond A. Swanson, 長澤一樹, 藤本貞毅, 脳内亜鉛によるミクログリアの活性化, 難病克服をめざした創薬科学合同研究成果発表会 (京都), 2008. 1. 26.
 20. 鈴木恵理, 長澤一樹, 藤本貞毅, Nicotinamide による PARP-1 誘発性細胞死抑制機構の解明, 難病克服をめざした創薬科学合同研究成果発表会 (京都), 2008. 1. 26.
 21. 宮木純, 長澤一樹, 藤本貞毅, Arachidonic acid 代謝物による P2X7 受容体活性制御機構, 難病克服をめざした創薬科学合同研究成果発表会 (京都), 2008. 1. 25.
 22. 東洋一郎, Sang Won Suh, Tiina M. Kauppinen, Raymond A. Swanson, 長澤一樹, 藤本貞毅, 脳内亜鉛によるミクログリアの活性化, BMB2007 (第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会・合同大会) (横浜), 2007. 12. 11.
 23. 長澤一樹, 宮木純, 東洋一郎, 藤本貞毅, 無刺激状態のマウスアストロサイトに発現する P2X7 受容体の活性制御機構の解明, BMB2007 (第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会・合同大会) (横浜), 2007. 12. 11.
 24. 奥田浩人, 長澤一樹, 東洋一郎, 藤本貞毅, Involvement of P2X7 receptors in adenosine uptake by mouse astrocytes, BMB2007 (第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会・合同大会) (横浜), 2007. 12. 11.
 25. 鈴木恵理, 長澤一樹, 藤本貞毅, Transport mechanisms for nicotinamide in cultured mouse astrocytes, BMB2007 (第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会・合同大会) (横浜), 2007. 12. 11.
 26. Kazuki Nagasawa, Jun Miyaki, Raymond A. Swanson, Sadaki Fujimoto, Regulatory mechanisms for P2X7 receptor activation in mouse cultured astrocytes under resting conditions, Society for Neuroscience 2007 (San Diego, CA), 2007. 11. 7.
 27. Youichirou Higashi, Kazuki Nagasawa, Hiroto Okuda, Raymond A. Swanson, Sadaki Fujimoto, P2X7 receptors contribute to adenosine uptake in cultured mouse astrocytes, Society for Neuroscience 2007 (San Diego, CA), 2007. 11. 7.
 28. 長澤一樹, 角田大智, 藤本貞毅, グルコース枯渇/再還流誘発性神経細胞死における NADPH oxidase の関与, 第 30 回日本神経科学大会・第 50 回日本神経化学学会大会・第 17 回日本神経回路学会大会・合同大会 (横浜), 2007. 9. 12.
 29. 奥田浩人, 長澤一樹, 藤本貞毅, P2X7 受容体を介したアデノシンの細胞内取り込み, 第 30 回日本神経科学大会・第 50 回日本神経化学学会大会・第 17 回日本神経回路学会大会・合同大会 (横浜), 2007. 9. 10.
 30. 東洋一郎, Sang Won Suh, Raymond A. Swanson, 長澤一樹, 藤本貞毅, 脳内亜鉛によるミクログリアの活性化, 第 30 回日本神経科学大会・第 50 回日本神経化学学会大会・第 17 回日本神経回路学会大会・合同大会 (横浜), 2007. 9. 10.
 31. 鈴木恵理, 長澤一樹, 藤本貞毅, アストロサイトにおけるニコチンアミドの輸送特性の解明, 第 30 回日本神経科学大会・第 50 回日本神経化学学会大会・第 17 回日本神経回路学会大会・合同大会 (横浜), 2007. 9. 10.
 32. 宮木純, 長澤一樹, 藤本貞毅, 無刺激状態マウス培養アストロサイトにおけるアラドキン酸及びその代謝物を介した P2X7 受容体活性制御, 第 30 回日本神経科学大会・第 50 回日本神経化学学会大会・第 17 回日本神経回路学会大会・合同大会 (横浜), 2007. 9. 10.
 33. Kazuki Nagasawa, Taichi Kakuda, Sadaki Fujimoto, NADPH oxidase is activated, but not directly involved in neuronal death induced by hypoglycemia-glucose reperfusion, Brain '07 & BrainPET '07 (Osaka), 2007. 5. 21.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長澤 一樹 (NAGASAWA KAZUKI)
京都薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：30228001

(2) 研究分担者

藤本 貞毅 (SADAKI FUJIMOTO)
京都薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：80090182

東 洋一郎 (YOUICHIROU HIGASHI)
京都薬科大学・薬学部・PD
研究者番号：80380062

(3) 連携研究者

該当なし