

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007 年度～2008 年度
 課題番号：19592035
 研究課題名（和文）
 ATP 受容体サブタイプの機能的連関による網膜神経上皮細胞の増殖制御機構
 研究課題名（英文）
 Functional cooperation of P2 purinoceptors in the regulation of cell proliferation in retinal neuroepithelial cells
 研究代表者
 杉岡 美保 (SUGIOKA MIHO)
 奈良県立医科大学・医学部・助教
 研究者番号：90322370

研究成果の概要：

網膜変性疾患治療に極めて重要である網膜神経節細胞の機能的再生を念頭におき、網膜神経上皮細胞の増殖制御に、G タンパク共役型 ATP 受容体の活性化に加えてイオノトロピック型 ATP 受容体の持続的な活性化が必要であるかについて明らかにすることを目的とした。鶏胚網膜神経層の器官培養液に ATP を添加して DNA 合成量を測定したところ、DNA 合成の促進が認められた。しかしその促進効果は、両 ATP 受容体を活性化させる ATP では認められるが、増殖期 S 期細胞で顕著にカルシウム動員及び容量性カルシウム流入を生じさせた G タンパク共役型 ATP 受容体のみを活性化させる UTP では認められなかった。以上の結果は網膜神経上皮細胞の増殖制御に、G タンパク共役型受容体のみならずイオノトロピック型受容体との機能的連関が必要である可能性を示唆している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：神経眼科学

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は一旦分化すると二度と増殖しない。視覚情報伝達系においても、特に網膜神経細胞の中で最も早く分化を開始する網膜神経節細胞の機能的再生は困難を極めるが、網膜変性疾患治療に極めて重要である網膜神経節細胞の再生を念頭においた神経幹細胞移植法の開発のためには、分化制御機構と並行して、神経上皮細胞の増殖制御機構を解

明する必要がある。

申請者はこれまでに、神経発生期の網膜神経層において、G タンパク共役型 ATP 受容体の活性化による細胞内カルシウムストアからのカルシウムイオンの放出（カルシウム動員）及びストアの枯渇により活性化される細胞外からのカルシウムイオンの流入（容量性カルシウム流入）が、細胞増殖期の神経上皮細胞（特に細胞周期上の S 期細胞）で顕著に

生じ、分化した細胞（網膜神経節細胞）では痕跡的であること、イオントロピック型受容体の活性化による細胞外からのカルシウムイオンの流入が、網膜神経細胞の分化が進行した後に認められることを報告しており、網膜神経上皮細胞の増殖制御に、G タンパク共役型 ATP 受容体の活性化（及びストア依存的な一連のカルシウムシグナル）が必要であると予想しているが、G タンパク共役型 ATP 受容体の活性化のみで十分であるのか、イオントロピック型 ATP 受容体との間に機能的連関はあるのか、については明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では

・網膜神経上皮細胞の増殖制御に、G タンパク共役型 ATP 受容体の活性化に加えてイオントロピック型 ATP 受容体の持続的な活性化が必要であるか
について明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

細胞増殖効果については、器官培養後の鶏胚網膜神経層を単離して血球計算板で全細胞数をカウントする、或いは、トリチウムチミジンを経験液中に添加して DNA 合成中の細胞に取り込ませた後、シンチレーションカウンターでトリチウムをカウントすることで評価した。

また分化した各種網膜細胞の数・割合に対する効果については、器官培養後の鶏胚網膜神経層を単離し、網膜神経節細胞・アマクリン細胞・双極細胞・杆体視細胞を認識する抗体による免疫染色を行い、陽性細胞をカウントすることで評価した。

4. 研究成果

ATP 受容体アゴニストの細胞増殖への影響を検討するため、網膜神経層の器官培養液に ATP を添加して DNA 合成量を測定したところ、DNA 合成の促進が認められた。しかしその促進効果は、G タンパク共役型 ATP 受容体及びイオントロピック型 ATP 受容体の両者を活性化させる ATP では認められるが、カルシウム測光の結果から予想される傾向に反して、G タンパク共役型 ATP 受容体のみを活性化させる UTP では DNA 合成促進効果は認められなかった（投稿準備中）。

以上の結果は神経上皮細胞の増殖制御に、G タンパク共役型受容体のみならずイオントロピック型受容体との機能的連関が必要である可能性を示唆している。

現在はさらに引き続いて、細胞増殖に関与する ATP 受容体のサブタイプの同定を試みている。また細胞増殖と表裏一体である細胞分化についても、その効果の評価方法を確立済みであるので、ATP 受容体のサブタイプ毎に検討している。このように神経上皮細胞の増殖制御機構と分化制御機構を並行して解明す

ることは、困難を極める網膜神経節細胞の機能的再生のメカニズム解明の一助となると期待している。

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 0 件）

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉岡 美保 (SUGIOKA MIHO)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：90322370

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし