

## 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 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590107

研究課題名（和文）無刺激及びストレス負荷状態での P2X7 受容体を介した神経-アストロサイト機能連関

研究課題名（英文）P2X7 receptor-mediated crosstalk between neurons and astrocytes under resting and stress-loaded conditions

研究代表者

長澤 一樹（NAGASAWA KAZUKI）

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30228001

研究成果の概要（和文）：ファイティング傾向の強い SJJL 系マウス由来培養アストロサイトに発現する P2X7 受容体は、気性が穏やかな ddY 系マウスの場合と比較して、高い活性化状態にあり、それは少なくとも一部スプライスバリエーションの発現量の違いに起因することが示された。ストレス負荷されたアストロサイトにおいて、P2X7 受容体、核酸輸送系の機能的発現変動、さらに P2X7 受容体によるミクログリア活性制御の上流に位置する亜鉛の放出が認められた。これら知見は、グリア細胞と神経細胞との機能連関において P2X7 受容体が重要な役割を担うことを示す。

研究成果の概要（英文）：P2X7 receptors expressed by cultured astrocytes obtained from SJJL-mice, which is characterized by extreme aggression, were constitutively activated, and the activity was higher than the case of ddY mice, which have no aggression characteristics. This difference was demonstrated to be due, at least in part, to different expression profiles of P2X7 receptor splice variants. In stress-loaded astrocytes, in addition to alteration in functional expression of P2X7 receptors and nucleoside transporters, there was release of zinc, by which microglia was activated via ATP release and autocrine/paracrine activation of P2X7 receptors. These findings indicate that P2X7 receptors play important roles in crosstalk among neuronal and glial cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：薬学・生物系薬学

キーワード：神経生物学

## 1. 研究開始当初の背景

これまでに我々は、脳内情報伝達物質の 1 つである ATP をリガンドとするプリン受容体の中で、生理的状态では機能しないとされてきた P2X7 受容体が、無刺激状態の培養マウスアストロサイトにおいて活性化状態に

あることを見出し、P2X7 受容体が病的状態のみならず生理的状态においても、脳内恒常性維持に深く関与する分子であることを初めて指摘した。しかしながら、このような無刺激状態アストロサイトにおいて活性化状態にある P2X7 受容体の発現意義は不明であ

る。また、虚血などのストレス負荷状態のアストロサイト、ミクログリア及び神経細胞において、P2X7受容体の発現は増加するが、それらの機能解析はなされておらず、さらに神経細胞とグリア細胞間の機能的連関におけるP2X7受容体の役割並びにその活性制御機構に関する情報は皆無である。

## 2. 研究の目的

脳内恒常性維持におけるP2X7受容体の役割を明確にすることを目的に、P2X7受容体の機能的発現プロファイルを、(1) ストレス負荷されたアストロサイト、(2) アストロサイト、ミクログリア及び神経細胞間、(3) ファイティング傾向の強いSjL系マウス由来アストロサイト及び比較的気性が穏やかなddY系マウス由来アストロサイト間において比較検討し、さらに(4) P2X7受容体活性制御におけるスプライスバリエーションの関与、並びにそのマウス系統間における差異について精査した。

## 3. 研究の方法

アストロサイト、ミクログリア及び神経細胞は、定法に従いマウス又はラット大脳皮質から単離精製し、初代培養した。大脳皮質切片はピプラトームを用いて作製した。P2X7受容体の活性化は、細胞内Ca<sup>2+</sup>レベルの変動及び指標色素であるYO-PRO-1の取り込みにより評価した。細胞生存率はLDH法、そしてmRNA及びタンパク質発現はそれぞれreal time PCR及びwestern blot/免疫染色により調べた。DNA塩基配列はBigDye法により解析した。

## 4. 研究成果

(1) SjL系マウス由来培養アストロサイトにおいてP2X7受容体は恒常的に活性化状態にあるが、それに対するATPなどのリガンド負荷は、細胞死を誘発するもののP2X7受容体活性化の程度は低下した。また、より生体環境に近い脳切片実験系においても、アストロサイトに発現するP2X7受容体は無刺激条件下でも活性化状態にあることが分かった。一方、ストレス負荷により活性化したアストロサイトでは無刺激状態ではP2X7受容体の活性は低いが、ATP刺激によりその活性化状態が高くなり、アストロサイトへのストレス負荷の有無によりP2X7受容体の機能性が変化することが示された。また、低浸透圧ストレスを負荷されたアストロサイトにおいて、細胞内及び細胞外における遊離型亜鉛レベルは上昇することが明らかとなった。

(2) 亜鉛は神経伝達物質の1つであり、ミクログリアを活性化することが既に明らかにされており、今回その活性化へのATP及びP2受

容体の関与について検討した。その結果、ミクログリアに亜鉛を暴露すると、亜鉛は細胞内にZIP-1を介して取り込まれ、それに続いてミクログリアからヘミチャンネルを介してATPが放出され、それがオートクリン/パラクリン的にミクログリアに発現するP2X7受容体を活性化し、ミクログリアを活性化することが明らかとなった。

一方、P2X7受容体の機能的発現が明らかとなっていない神経細胞についても同様に検討した。その結果、培養神経細胞において、P2X7受容体の発現が認められ、それは無刺激では活性化状態にないが、リガンド刺激によりチャンネル及びポア機能を発現すること、すなわち機能的P2X7受容体が神経細胞にも発現することが確認された。さらに、その活性化によりポア開口に続いてNADPH oxidase活性化を介したO<sub>2</sub>の産生そしてPARP活性化が惹起されたが、このカスケードは細胞死に関係せず、チャンネル機能の活性化によるミトコンドリア機能異常に続くcaspase及びAIF経路の活性化が、神経細胞をアポトーシスに導くことが分かった。これらの結果から、アストロサイト、ミクログリア及び神経細胞においてP2X7受容体の機能的発現は異なることが示された。

(3) 無刺激状態において、SjL系マウスアストロサイトに発現するP2X7受容体は活性化状態にあるが、ddY系マウスアストロサイトではP2X7受容体の活性化状態は低く、拮抗剤に対する感受性もSjL系マウスの場合と異なっていた。一方、P2X7受容体及びそれにリンクして機能するとされるpannexin-1のタンパク質発現量に差はなく、さらにそれら遺伝子の全塩基配列も全く同じであり、SNPも認められなかった。

(4) P2X7受容体スプライスバリエーションによる3量体構成によってその活性が制御される可能性が示唆されているため、スプライスバリエーションのmRNA発現量を比較した。その結果、いずれのマウス由来アストロサイトにおいても、現在報告されているスプライスバリエーション4種の発現が認められ、中でもvariant 3及び4の発現はP2X7受容体の活性化状態の高いSjLマウス由来アストロサイトよりもその活性化状態の低いddYマウス由来アストロサイトにおいて有意に高いことが分かった。これらのことから、脳内恒常性維持におけるP2X7受容体の役割を理解するうえで、そのスプライスバリエーションが重要な分子群であることが示唆された。

以上の結果を総括すると、アストロサイト、ミクログリア及び神経細胞におけるP2X7受

容体の機能的発現、並びに P2X7 受容体のサブライスバリエーションの発現の変動が、神経細胞ーグリア細胞の機能的連関に重要な役割を担うことが示された。

#### 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 6 件)

1. Youichirou Higashi, Shohei Segawa, Takaaki Matsuo, Shogo Nakamura, Yukiko Kikkawa, Kentaro Nishida, Kazuki Nagasawa: Microglial zinc uptake via zinc transporters induces ATP release and the activation of microglia. *Glia*, 59(12), 1933-1945, 2011. (査読有)
2. Akiko Tanaka, Kentaro Nishida, Hiroto Okuda, Takeshi Nishiura, Youichirou Higashi, Sadaki Fujimoto, Kazuki Nagasawa: Peroxynitrite treatment reduces adenosine uptake via the equilibrative nucleoside transporter in rat astrocytes. *Neuroscience Letters*, 498(1), 52-56, 2011. (査読有)
3. Hiroto Okuda, Youichirou Higashi, Kentaro Nishida, Sadaki Fujimoto, Kazuki Nagasawa: Contribution of P2X7 receptors to adenosine uptake by cultured mouse astrocytes. *Glia*, 58(14), 1757-1765, 2010. (査読有)
4. Kazuki Nagasawa, Jun Miyaki, Yuuka Kido, Youichirou Higashi, Kentaro Nishida, Sadaki Fujimoto: Possible involvement of PPAR gamma in the regulation of basal channel opening of P2X7 receptor in cultured mouse astrocytes, *Life Sciences*, 84(23-24), 825-831, 2009. (査読有)
5. Miho Niitani, Kentaro Nishida, Hiroto Okuda, Katsuhito Nagai, Sadaki Fujimoto, Kazuki Nagasawa: Transport characteristics of mouse concentrative nucleoside transporter 1. *International Journal of Pharmaceutics*, 388(1-2), 168-174, 2010. (査読有)
6. Eri Suzuki, Hiroto Okuda, Kentaro Nishida, Sadaki Fujimoto, Kazuki Nagasawa: Protective effect of nicotinamide against poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated astrocyte death depends on its transporter-mediated uptake. *Life Sciences*, 86(17-18), 676-682, 2010. (査読有)

[学会発表] (計 39 件)

1. 深川愛未、鎌塚洋祐、寺井易子、松尾剛明、西田健太朗、長澤一樹：マウス大脳皮質切片を用いた P2X7 受容体機能的発現評価系の構

築. 日本薬学会第 132 年会, 2012. 3. 29 (札幌).

2. 土肥由香里、西田健太朗、宮田麻衣、山中優里、生川晃子、松尾剛明、長澤一樹：ラット有郭乳頭における adenosine 受容体の発現局在について. 日本薬学会第 132 年会, 2012. 3. 29 (札幌).
3. 松尾剛明、瀬川将平、谷美咲、西田健太朗、長澤一樹：亜鉛によるミクログリアの活性化はトランスポーターを介した亜鉛取り込みに依存する. 第 1 回 4 大学連携研究フォーラム(京都工芸繊維大学、京都府立医科大学、京都府立大学、京都薬科大学), 2011. 12. 9 (京都).
4. 谷美咲、西浦武志、大里侑希、古田能裕、瀬川将平、松尾剛明、西田健太朗、長澤一樹：ミクログリアの活性化におけるアストロサイト由来の亜鉛の寄与. 第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2011. 10. 22 (神戸).
5. 辰己奈穂、松尾剛明、水本果歩、麻野浩史、弘田恵美、回渕俊生、西田健太朗、長澤一樹：マウス大脳皮質アストロサイトにおける亜鉛取り込み機構について. 第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2011. 10. 22 (神戸).
6. 寺井易子、河原知世、木戸悠佳、深川愛未、松浦未工、宮本優里、松尾剛明、西田健太朗、長澤一樹：マウス P2X7 受容体活性制御におけるその variant の役割. 第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2011. 10. 22 (神戸).
7. 長澤一樹、木戸悠佳、河原知世、寺井易子、深川愛未、松浦未工、宮本優里、松尾剛明、西田健太朗：培養マウスアストロサイトにおける P2X7 容体活性制御への splice variant の関与 —マウス系統間における比較検討—。生理学研究所研究会『情報伝達物質としてのプリンの意義』, 2011. 10. 21 (岡崎).
8. 西田健太朗、中西真也、土肥由香里、宮田麻衣、山中優里、松尾剛明、長澤一樹：ラットの旨味感受性に対するオキサリプラチンの影響. 日本味と匂学会第 45 回大会, 2011. 10. 6 (金沢).
9. 西田健太朗、加藤淳貴、土肥由香里、久保田晃代、松本沙希、宮田麻衣、山中優里、松尾剛明、長澤一樹：ラット有郭乳頭におけるスクレオチド代謝酵素及び輸送担体の発現解析. 第 54 回日本神経化学学会大会, 2011. 9. 27 (加賀).
10. 長澤一樹、瀬川将平、中村庄吾、大里侑希、谷美咲、西浦武志、松尾剛明、西田健太朗：低浸透圧ストレス負荷アストロサイトから放出された亜鉛によるミクログリアの活性化. 第 54 回日本神経化学学会大会, 2011. 9. 28 (加賀).
11. 加藤淳貴、西田健太朗、久保田晃代、松本沙希、松尾剛明、長澤一樹：有郭乳頭におけるスクレオチド代謝酵素の発現解析. 第 84 回日本生化学学会大会, 2011. 9. 23 (京都).
12. 大石晃弘、吉川由希子、芝本真紀子、西田健

- 太朗、長澤一樹：亜鉛トランスポータ ZIP1 強制発現系の構築とその機能評価。日本薬学会第 131 年会，2011. 3. 30 (静岡)。
13. 北田剛士、西田健太郎、久保田晃代、松本沙希、宮田麻衣、山中優里、加藤淳貴、土肥由香里、長澤一樹：ラット有郭乳頭におけるヌクレオシド輸送担体の発現局在。日本薬学会第 131 年会，2011. 3. 30 (静岡)。
  14. 河原知世、木戸悠佳、寺井易子、深川愛未、松浦未工、宮本優里、奥田浩人、西田健太郎、長澤一樹：培養マウスアストロサイトに発現する P2X7 受容体活性制御機構における系統差について。日本薬学会第 131 年会，2011. 3. 30 (静岡)。
  15. 長澤一樹、西浦武志、麻野浩史、古田能裕、大里侑希、谷 美咲、中村庄吾、西田健太郎：低浸透圧処理アストロサイトから放出された亜鉛によるミクログリアの活性化。日本薬学会第 131 年会，2011. 3. 30 (静岡)。
  16. 奥田浩人、床谷祐香、宮島由紀奈、松島瑞慧、溝田佳奈、安田江里、西田健太郎、長澤一樹：NAD<sup>+</sup>の PARP 誘発性アストロサイト細胞死抑制作用発現における connexin 43 及び pannexin 1 の関与について。第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 BMB2010，2010. 12. 7 (神戸)。
  17. 木戸悠佳、河原知世、寺井易子、深川愛未、加藤淳貴、土肥由香里、奥田浩人、安田江里、西田健太郎、長澤一樹：培養マウスアストロサイトに発現する P2X7 受容体活性制御機構における系統差について。第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 BMB2010，2010. 12. 7 (神戸)。
  18. 西田健太郎、吉川奈都子、明石悠助、坪井香保里、安田江里、長澤一樹：末梢神経系細胞における oxaliplatin による poly-(ADP-ribose) polymerase 活性化について。第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 BMB2010，2010. 12. 7 (神戸)。
  19. 長澤一樹、西浦武志、大里侑希、谷 美咲、中村庄吾、瀬川将平、安田江里、西田健太郎：低浸透圧処理アストロサイトから放出された亜鉛によるミクログリアの活性化。第 2 回メタロミクス研究フォーラム，2010. 11. 2 (京都)。
  20. 西田健太郎、西浦武志、瀬川将平、大里侑希、谷美咲、吉川由希子、中村庄吾、安田江里、東洋一郎、長澤一樹：トランスポータを介した亜鉛取り込みによるミクログリアの活性化，2010. 11. 2 (京都)。
  21. 北田剛士、西田健太郎、加藤淳貴、土肥由香里、安田江里、長澤一樹：ラット有郭乳頭におけるヌクレオシドトランスポーター ENT1 の発現局在。第 60 回日本薬学会近畿支部総会・大会，2010. 10. 30 (枚方)。
  22. 西田健太郎、北田剛士、加藤淳貴、土肥由香里、安田江里、長澤一樹：ラット有郭乳頭における equilibrative nucleoside transporter の発現局在について。日本味と匂学会第 44 回大会，2010. 9. 9 (北九州)。
  23. 奥田浩人、床谷祐香、西田健太郎、長澤一樹：NAD<sup>+</sup>による PARP 誘発性アストロサイト細胞死抑制作用発現におけるヘミチャネルの役割について。第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会 合同大会 Neuro2010，2010. 9. 3 (神戸)。
  24. 西浦武志、瀬川将平、中村庄吾、大里侑希、谷美咲、西田健太郎、東洋一郎、長澤一樹：亜鉛誘発性ミクログリア活性化における亜鉛トランスポータ系の関与。第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会 合同大会 Neuro2010，2010. 9. 2 (神戸)。
  25. 木戸悠佳、河原知世、寺井易子、深川愛未、加藤淳貴、土肥由香里、奥田浩人、西田健太郎、長澤一樹：培養マウスアストロサイトに発現する P2X7 受容体活性制御機構における系統差について。第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会 合同大会 Neuro2010，2010. 9. 2 (神戸)。
  26. 奥田浩人、床谷祐香、西田健太郎、藤本貞毅、長澤一樹：NAD<sup>+</sup>の PARP 誘発性アストロサイト細胞死抑制作用発現におけるヘミチャネルの役割について。日本薬学会第 130 年会，2010. 3. 28 (岡山)。
  27. 東洋一郎、Suh Sang Won、長澤一樹、清水恵司：ミクログリアにおける脳内亜鉛の役割。日本薬学会第 130 年会，2010. 3. 28 (岡山)。
  28. 木戸悠佳、寺井易子、深川愛未、河原知世、西田健太郎、藤本貞毅、長澤一樹：ATP 誘発性アストロサイト細胞死への P2X7 受容体の関与。日本薬学会第 130 年会，2010. 3. 28 (岡山)。
  29. 中谷庸寿、奥田浩人、辰巳奈穂、水本果歩、大石晃弘、西田健太郎、藤本貞毅、長澤一樹：神経細胞 P2X7 受容体活性化を介した神経細胞死への NADPH oxidase 及び PARP の関与の有無について。日本薬学会第 130 年会，2010. 3. 28 (岡山)。
  30. 中谷庸寿、奥田浩人、大石晃弘、西田健太郎、藤本貞毅、長澤一樹：神経細胞に発現する P2X7R 活性化を介した活性酸素種産生への NADPH oxidase の関与。第 82 回日本生化学会大会，2009. 10. 23 (神戸)。
  31. 瀬川将平、東洋一郎、中村庄吾、西田健太郎、藤本貞毅、長澤一樹：亜鉛誘発性ミクログリア活性化における細胞内遊離型亜鉛濃度の役割。第 82 回日本生化学会大会，2009. 10. 23 (神戸)。
  32. 西浦武志、宮島由紀奈、田中晶子、西田健太郎、藤本貞毅、長澤一樹：酸化ストレス負荷

- された初代培養アストロサイトにおける adenosine 輸送機構の機能的発現変動について. 第 82 回日本生化学会大会, 2009. 10. 23 (神戸).
33. 木戸悠佳、河原知世、宮木純、西田健太郎、藤本貞毅、長澤一樹：培養マウスアストロサイトに発現する P2X7 受容体活性制御機構における系統差について. 第 82 回日本生化学会大会, 2009. 10. 23 (神戸).
34. 奥田浩人、床谷祐香、西田健太郎、藤本貞毅、長澤一樹：NAD<sup>+</sup>の PARP 誘発性アストロサイト細胞死抑制作用発現におけるヘミチャネルの役割について. 第 82 回日本生化学会大会, 2009. 10. 23 (神戸).
35. Kazuki Nagasawa, Hiroto Okuda, Akiko Tanaka, Takeshi Nishiura, Sadaki Fujimoto, Kentaro Nishida: Nucleoside transport system expressed by astrocytes has a major role in extracellular adenosine clearance and its activity is diminished under oxidative stress-loaded conditions. Fukuoka Purine 2009, 2009. 7. 23 (Fukuoka).
36. Hiroto Okuda, Kentaro Nishida, Sadaki Fujimoto, Kazuki Nagasawa: P2X<sub>7</sub> receptors contribute to adenosine uptake by cultured astrocytes: Extracellular fate of exogenous NAD<sup>+</sup> and transport characteristics for NAD<sup>+</sup> and its metabolites. Fukuoka Purine 2009, 2009. 7. 23 (Fukuoka).
37. 奥田浩人、田中晶子、西田健太郎、長澤一樹、藤本貞毅：無刺激及び酸化ストレス負荷条件下での神経細胞及びアストロサイトによるアデノシン取り込み特性について. 第 52 回日本神経化学会大会, 2009. 6. 24 (伊香保).
38. Kentaro Nishida, Kazuki Nagasawa, Jun Miyaki, Yuuka Kido, Sadaki Fujimoto: Possible involvement of PPAR $\gamma$  in regulation of basal channel opening of P2X<sub>7</sub> receptor in cultured mouse astrocytes. 第 52 回日本神経化学会大会, 2009. 6. 24 (伊香保).
39. Kazuki Nagasawa, Jun Miyaki, Yuuka Kido, Youichirou Higashi, Kentaro Nishida, Sadaki Fujimoto: Possible involvement of PPAR $\gamma$  in regulation of basal channel opening of P2X<sub>7</sub> receptor in cultured mouse astrocytes. 4<sup>th</sup> International Conference on Phospholipase A<sub>2</sub> and Lipid Mediators, 2009. 5. 27 (Tokyo).

## 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・教授  
研究者番号：30228001

### (2) 研究分担者

西田 健太郎 (NISHIDA KENTARO)