

(様式 甲 5)

|         |  |
|---------|--|
| 氏 名     | 家 久 未 啓 吾  |
| (ふりがな)  | (かくらい けいご)   |
| 学位の種類   | 博士 (医学)  |
| 学位授与番号  | 甲 第 号  |
| 学位審査年月日 | 平成 26 年 1 月 29 日   |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当   |
| 学位論文題名  | Involvement of P2X <sub>7</sub> receptors in retinal ganglion cell death after optic nerve crush injury in rats<br>(ラット視神経挫滅による網膜神経節細胞死における P2X <sub>7</sub> 受容体の関与) |
| 論文審査委員  | (主) 教授 朝 日 通 雄<br>教授 宮 武 伸 一<br>教授 矢 野 貴 人   |

## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《目 的》

P2X<sub>7</sub>受容体はプリン受容体のサブタイプで、神経変性疾患や慢性炎症における神経細胞のアポトーシスに関与していることで知られる。同受容体はマクロファージやミクログリアに発現し、活性酸素、一酸化窒素、TNF $\alpha$ の産生を介した細胞死の誘導に関与している。また網膜神経節細胞にも存在し、P2X<sub>7</sub>受容体作動薬が網膜神経節細胞内のカルシウムイオン濃度の上昇を惹起すること、同薬の眼内投与がラット網膜神経節細胞の密度を著明に減少させることなどが報告されており、同受容体の活性化は網膜神経節細胞の細胞死に深く関与している。今回の研究では、P2X<sub>7</sub>受容体活性化の抑制が *in vitro* と *in vivo* において網膜神経節細胞の保護に関与しているかどうかを検討した。まずラット網膜の初代培養細胞を用いて、P2X<sub>7</sub>受容体拮抗薬および作動薬が網膜神経節細胞の生存におよぼす影響を調

べた。更にラットの視神経挫滅後、P2X<sub>7</sub>受容体拮抗薬の眼内投与が網膜神経節細胞の生存に与える影響について調べた。

#### 《方 法》

網膜の初代培養における P2X<sub>7</sub>受容体拮抗薬と作動薬の効果について調べた。生後 12 週の雄 Wister ラットの網膜神経節細胞を DAPI で逆行性標識し、P2X<sub>7</sub>受容体拮抗薬および作動薬を添加して 3 日間培養した。P2X<sub>7</sub>作動薬として 10、30、100、300 μM の Adenosine triphosphate (ATP) もしくは 10、30、100 μM の benzoylbenzoyl ATP (BzATP) を使用した。また P2X<sub>7</sub>受容体拮抗薬として 3、30、100、300 μM の oxidized ATP (OxATP) もしくは 0.1、1、10、100 μM の brilliant blue G (BBG) を使用した。生存している細胞の同定には calcein 染色を使用し、DAPI 陽性かつ calcein 陽性を示す細胞の数を、生存している網膜神経節細胞の数として計算した。

ついで *in vivo* の系においても、視神経挫滅によって生じる網膜神経節細胞の細胞死に対する P2X<sub>7</sub>受容体拮抗薬の効果をも、網膜神経節細胞の生存率で定量化した。具体的には、ラット視神経を球後 2 mm で挫滅した後、P2X<sub>7</sub>受容体拮抗薬を硝子体腔内に注射した。処置 7 日後にラットを 4 %パラホルムアルデヒドで灌流固定し、摘出眼球から網膜伸展標本作製した。網膜神経節細胞は抗 neuron-specific β-tubulin 抗体 (TUJ1) で免疫染色し、その細胞密度を計測した。

さらに視神経挫滅後のラット網膜において、P2X<sub>7</sub>受容体の発現の変化を免疫組織化学的に調べた。視神経挫滅 1、3、7 日後にラットを屠殺し、網膜での P2X<sub>7</sub>受容体の発現を TUJ1 との 2 重免疫染色で検討した。また視神経挫滅直後に 30 μM の OxATP または 0.3 μM の BBG を硝子体内投与し、これら P2X<sub>7</sub>受容体拮抗薬の影響についても検討した。

## 《結 果》

網膜神経節細胞の初代培養を用いた *in vitro* の実験では、P2X<sub>7</sub> 受容体拮抗薬は対照群と比較して有意に細胞保護作用を示した。一方、P2X<sub>7</sub> 受容体作動薬投与群では、生存している網膜神経節細胞は著明に減少した。

次にラットの視神経挫滅後、網膜伸展標本において網膜神経節細胞の生存を調べる *in vivo* の実験では、視神経挫滅後 7 日後に網膜神経節細胞の数は 61 % まで減少すること、P2X<sub>7</sub> 受容体拮抗薬を投与すると 86.9 % (OxATP 投与群)、84.5 % (BBG 投与群) の網膜神経節細胞が保護されることが確認された。

視神経挫滅後のラット網膜において P2X<sub>7</sub> 受容体の発現を免疫組織化学的に調べたところ、網膜における P2X<sub>7</sub> 受容体の発現は視神経挫滅後に亢進し、視神経挫滅後 3 日目に発現がピークに達すること、一方 P2X<sub>7</sub> 受容体拮抗薬はこの発現亢進を抑制することが確認された。

## 《考 察》

今回の研究結果から P2X<sub>7</sub> 受容体拮抗薬が網膜の初代培養において網膜神経節細胞に対して保護的に作用し、さらに視神経挫滅による網膜神経節細胞の細胞死を有意に抑制することが明らかになった。また P2X<sub>7</sub> 受容体は視神経挫滅後にその発現が亢進し、P2X<sub>7</sub> 受容体拮抗薬の投与によって、その発現が抑制されるということが示された。したがって P2X<sub>7</sub> 受容体拮抗薬による網膜神経節細胞の保護作用は、網膜における P2X<sub>7</sub> 受容体の発現亢進を抑制することによって媒介されている可能性が示唆された。

視神経挫滅モデルでは、緑内障と同様にアポトーシスを介して網膜神経節細胞の細胞死が生じることが知られている。本研究結果より緑内障を含む慢性かつ進行性の網膜神経節細胞の減少に起因する眼疾患において、P2X<sub>7</sub> 受容体拮抗薬である OxATP や BBG が有力な神経保護薬になり得ることが示された。

(様式 甲 6)

## 論文審査結果の要旨

P2X<sub>7</sub>受容体はプリン受容体のサブタイプで、その活性化は網膜神経節細胞 (retinal ganglion cell、RGC) の細胞死を誘導することで知られている。今回申請者は P2X<sub>7</sub>受容体の抑制が *in vitro* と *in vivo* において RGC の保護に関与しているかを検討している。

まず、ラット網膜の初代培養細胞を用いて、P2X<sub>7</sub>受容体拮抗薬及び作動薬が RGC の生存に及ぼす影響を調べ、P2X<sub>7</sub>受容体拮抗薬投与群では RGC の保護を確認し、P2X<sub>7</sub>受容体作動薬投与群では RGC が著明に減少することを示した。次に、ラット視神経を挫滅後、P2X<sub>7</sub>受容体拮抗薬の眼内投与が RGC の生存に与える影響を調べ、対照群では視神経挫滅後 7 日後に RGC の数は 61%まで減少したが、P2X<sub>7</sub>受容体拮抗薬投与群では、86.9%

(OxATP 投与群)、84.5 % (BBG 投与群) の RGC の生存が確認され、RGC が保護されることを示した。さらに、ラット網膜における P2X<sub>7</sub>受容体の免疫組織化学では、視神経挫滅後にその発現が亢進し 3 日目にピークに達することを示し、この P2X<sub>7</sub>受容体の発現が P2X<sub>7</sub>受容体拮抗薬により抑制されることを明らかにした。

申請者は今回の研究結果によって、P2X<sub>7</sub>受容体拮抗薬が *in vitro*、*in vivo* において RGC の生存を保護することを明らかにしている。そして、視神経挫滅後に亢進している P2X<sub>7</sub>受容体の発現が、P2X<sub>7</sub>受容体拮抗薬の投与によって抑制されることを示し、その保護効果の機序の可能性を示唆している。視神経挫滅モデルでみられる RGC の減少は緑内障と病態が類似していることから、緑内障などの慢性進行性に RGC が減少する眼疾患において P2X<sub>7</sub>受容体拮抗薬が有力な神経保護薬になり得ると考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Neuroscience Letters 534: 237-241, 2013