

別添1

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

副作用の発現メカニズムを考慮した対応方策に関する研究

(副題：ATP受容体を介する新しいインシュリン放出制御機構)

平成16～18年度 総合研究報告書

主任研究者 井上 和秀

平成19(2007)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

副作用の発現メカニズムを考慮した対応方策に関する研究

(副題：ATP受容体を介する新しいインシュリン放出制御機構)

平成16～18年度 総合研究報告書

主任研究者 井上 和秀

平成19(2007)年 3月

目 次

I. 総合研究報告	
副作用の発現メカニズムを考慮した対応方策に関する研究 (副題：ATP受容体を介する新しいインシュリン放出制御機構)	----- 1
井上 和秀	
II. 分担研究報告	
1. 副作用の発現メカニズムを考慮した対応方策に関する研究	----- 7
永松 信哉	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 10
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 14

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
（総合研究報告書）

副作用の発現メカニズムを考慮した対応方策に関する研究
（副題：ATP受容体を介する新しいインシュリン放出制御機構）

（主任研究者 井上 和秀 九州大学大学院薬学研究院）

研究要旨

臨床的に用いられるCaチャンネル拮抗降圧剤は、膵β細胞機能を抑制し、糖尿病治療薬であるスルフォニルウレア剤の効果を減弱させる可能性がある。従ってL型Caチャンネルを介さないインスリン分泌機構の検索が必要であり、ATP受容体を介した経路をその候補のひとつとして研究を行った。そのためのTIRFMシステムを用いた新しいインスリン開口放出測定系を確立した。臨床上頻繁に用いられているカルシウム拮抗降圧薬の膵β細胞における作用を検討した結果、ニフェジピンはグルコース刺激による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を完全に抑制し、インスリン分泌も同様に抑制した。グルコース誘発インスリン分泌に対するATP受容体の作用は2相性であり、低濃度（1 μ M）では増強し、高濃度（100 μ M）では逆に抑制した。受容体サブタイプの関与をアゴニストやアンタゴニストを用いて検討した結果、増強作用はP2X5およびP2X6の可能性が考えられ、抑制作用はP2Y1の可能性が高まった。この増強のかなりの部分は電位依存性Ca²⁺チャンネル依存性であったが、電位依存性Ca²⁺チャンネル以外の経路も関与すると考えられる。一方、P2Y1受容体を介するグルコース誘発インスリン分泌の抑制は著明であり、過剰なインスリン分泌を制御するという重要な役割をATPが担っている可能性が考えられる。このように、ATP受容体は様々な形で膵β細胞の機能維持において重要な役割を果たしていると考えられる。

分担研究者 永松 信哉
杏林大学・生化学教室・教授

A. 研究目的

我が国の高血圧症の患者802万人（1999年国民栄養調査）の95%は本態性高血圧であり、一般に中年以降に発症することが多い。糖尿病患者（現在潜在患者数を含めると約1620万人）が高血圧を併発した場合、心脳血管障害へ至る確率は格段と跳ね上がる。糖尿病はそれ自体が動脈硬化症を引き起こす主要な疾患であり、その結果、心・循環器系の病態も増悪し、脳梗塞や心筋梗塞の合併率が極めて高い。そこで、降圧剤による治療は特に糖尿病と高血圧症を併発している患者にとって必須であり、現在臨床ではカルシウム拮抗薬が広く用いられている。その作用メカニズムはL型電位依存性カルシウムチャンネルの抑制であり、結果として末梢血管拡張・降圧という治療効果をもたらす。一方、インシュリンを分泌する膵臓β細胞には同じくL型電位依存性カルシウムチャンネルが発現しており、インシュリン分泌の要として機能している。従って、カルシウム拮抗薬がインシュリン分泌を抑制しても不思議ではなく、高血

圧の患者が降圧剤を使用中に緩徐な慢性的インシュリン分泌低下およびマイルドな血糖上昇を来しているばかりではなく糖尿病患者の血糖コントロールに悪影響を及ぼす可能性がある。現在、副作用情報としてカルシウム拮抗薬の代表例であるニフェジピンやアムロジピンでは、0.1%未満の発生頻度で「高血糖」があると添付文書に出ている。糖尿病合併症患者ではさらに頻度は高くなる可能性もあるし、また、単に糖尿病が進行したと考えて副作用としなかったりするなど、成人病を併発しやすいという病態像に隠れて発現頻度が低く見積もられているのかもしれない。まずこの点を緊急に明らかにしなくてはならない。

そこで、本研究の目的は、上市されているカルシウム拮抗薬が膵臓β細胞からのインシュリン分泌を抑制するか否かを明らかにし（新しい副作用とそのメカニズム・予防法の提唱）、ついで、L-type Ca Channelとは独立した新しいインシュリン放出メカニズムを探索し、それに基づく副作用治療法を提案することである。

B. 研究方法

1. 膵β細胞の調整・培養；麻酔下にWistar ラッ

トを開腹し、総胆管よりコラジネース液を注入し、膵摘出後、ラ氏島を回収し、Ca²⁺free溶液にて単一β細胞を採取、glass bottom dishにまき、RPMI1640溶液中にて培養した。

2. Fura-2AM負荷細胞を用いた細胞内カルシウムイメージング；[Ca²⁺]_iのイメージング・解析にはArugus/HiSCAを使用した。β細胞をFura-2AMにてincubation後、各種刺激物質にて15分間細胞を刺激し、励起光によりFura-2が発する510nm蛍光波長をCCDカメラにて測定し、340nm/380nmの蛍光波長強度比を測定することにより、細胞内Ca²⁺濃度を測定した。

3. 新たなインスリン分泌測定・解析法の開発；β細胞からのインスリン分泌を従来の様なRIA法を用いたmassとして測定解析するのではなく、単一インスリン顆粒の放出として捉え、これをナノスケールから解析するために、TIRFM(total internal reflection fluorescence microscopy)法を膵β細胞に導入応用した。インスリン顆粒をGFP標識するためにヒトプレプロインスリンのC末端にGFPを導入したcDNAを作製、更にそのrecombinant adenovirusを作製。ラットβ細胞にこのウィルスを感染させ、GFP標識単一インスリン顆粒の動態をTIRFMシステムを用いてCCDカメラにて0.1秒毎に取得し、メタモルフソフトウェアにて時間的・空間的解析を行った。

4. 膵β細胞のperifusionと分泌インスリン量の定量(RIA)；膵β細胞をペリスタポンプにより灌流し、1分毎の流出液を回収、回収液を¹²⁵I-インスリン、及び抗インスリン抗体を用いてRadio immuno assay (RIA)を行った。

5. MIN6細胞を、5 × 10⁵ cells / well となるよう24 well plate に播種し、DMEM medium を加えて全量 1 ml / well とし5-7 日間培養する。ほぼ90%程度に増殖が達した状態で medium を除去し、HBSS で wash 後、2.2 mM Glu / HBSS (3 ml / well) を加えて2 時間の pre incubation を行う。その後、medium を除き、各種刺激とする溶液を3 ml / well で添加し5 時間の incubation を行う。反応終了時にmedium 1 ml/well を回収し、その上清中のインシュリン濃度をELISA法により測定した。

C. 研究結果

1. カルシウム拮抗降圧薬の膵β細胞における影響；臨床上市すでに用いられている、ニフェジピンの膵β細胞における作用を検討した。10μMニフェジピンはグルコース刺激による[Ca²⁺]_iの上昇を完全に抑制し、1μMでも約50%の抑制がみられた。RIAにより測定したインスリン分泌も同様に抑制された。L型Caチャンネルにより選択的なIsradipineは、1μMにおいて完全に[Ca²⁺]_i上昇を抑制した。

2. ナノテクテクノロジーを用いた新しいインスリン分泌測定・解析法の開発；新たなインスリン分泌

機構の検索、及び新規糖尿病治療薬の開発には、単に放出されたインスリンをmassとして測定するのみではなく、β細胞内における単一顆粒の動態を時間的・空間的に解析出来るようなインスリン放出の新しい測定・解析システムを開発することが必須である。従って、本年度は単一インスリン顆粒の細胞膜へのdocking/fusionが0.1秒のオーダーで解析できるTIRFMシステムを確立した。まず、β細胞内のインスリン顆粒を標識するために、ヒトインスリンcDNAの3' 端にGFPcDNAを挿入、これをadenovirusへと変換した(pchi-GFP)、pchi-GFPを感染したβ細胞をTIRFMによって観察し、GFPの動きを0.1秒毎に、CCDカメラにより取得、メタモルフソフトウェアを用いて、インスリン顆粒動態を詳細に解析することに成功した。この方法を用いることにより、種々の物質のインスリン開口放出における分子機構、更には新たなインスリン分泌メカニズムを明らかにすることが可能となった。

3. 新しいインスリン分泌メカニズムの検索；現在、糖尿病治療に於いて最も一般的に使用されている糖尿病治療薬・スルホニルウレア剤は、K_{ATP}-チャンネルを閉じ、L型カルシウムを開くことによってインスリンの分泌を促進する。従って、前述したCaチャンネルブロッカーを降圧剤として用いている高血圧を併発している糖尿病患者にとっては、スルホニルウレア剤は必ずしも最適の血糖降下剤ではないと考えられる。そこで、K_{ATP}-チャンネル→L型カルシウムチャンネル系の活性化を介さない様な血糖降下剤の開発が必要である。よって、ATP受容体刺激により、インスリン分泌にどのような影響がでるかを検討した。100μM ATPを用いて膵β細胞のperifusionを行い、インスリン分泌量を測定したところ、第1相、第2相のインスリン分泌を明らかに増強する場合と、全く影響のない実験データが得られた。ATPが培養液中にて分解されている可能性があるため、P2Y受容体の選択的アゴニストであるADPβS、更には非水解型ATPγSを用いて、検討したところ、ATP受容体の活性化はインスリン分泌を促進する可能性が強いdataを得ることができた。

ついで、種々の濃度のブドウ糖にATPを加えたラ氏島batch実験を行った。その結果、低濃度グルコース存在下にてはATPのインスリン分泌促進反応は見られなかったが、200mg/dlグルコース存在下においてのみATPはインスリン分泌をATP非存在下の約30%増強した。

次に、ヒト2型糖尿病のモデル実験動物であるGKラット膵β細胞を用いてATPの効果を検討した。GKラット膵ラ氏島においては200mg/dlグルコース存在下でのATPの効果はみられなかった。更に、定量的PCR法を用いてATP受容体の遺伝子発現をGKラット膵ラ氏島を用いて検討したところ生後5週齢、6週齢ど

ちらに於いても、P2X1、P2Y1のmRNAの発現は対照群ラットラ氏島での約半分以下にまで低下していた。

4. グルコース刺激によるMIN6細胞からのインシュリン放出：基礎的検討

ATP受容体の関与を検討する前に、MIN6細胞からのグルコース刺激によるインシュリン放出に関して、グルコース濃度依存性および刺激時間依存性について検討した。その結果、グルコース濃度(0.44~22 mM)に依存したインシュリン放出が認められた。ヒト血清中のグルコース濃度との対比から、グルコース22mMでのインシュリン濃度とグルコース0.44mMでのそれを差し引いたものをグルコース誘発インシュリン分泌とした。また時間依存性に関しては、検討した時間経過では刺激後5時間目がもっともインシュリン分泌量が多くて安定していた。なお、グルコース無添加でATP刺激した場合にはインシュリン放出は認められなかった。そこで以下の実験では、5時間目のグルコース誘発インシュリン分泌に対するATP受容体関連化合物の作用を検討した。

5. ATP受容体アゴニスト

ATPがグルコース誘発インシュリン分泌に影響を及ぼすとすれば、それはどのP2受容体サブタイプであるのか特定しなければならない。そこで、様々なP2受容体アゴニスト(ATP, ADP, UTP, UDP)ならびにアデノシンを用いてインシュリン分泌に対する影響を検討した。その結果、ATP、ADPは低濃度(1 μ M)ではグルコース誘発インシュリン分泌を増強し、高濃度(100 μ M)では逆に抑制するという2相性の作用を引き起こした。一方、UTPやUDPではグルコース誘発インシュリン分泌作用に対してほとんど影響が見られなかった。アデノシンもまたほとんど効果を示さず、ATPやADPが分解されてアデノシンとして作用することはないと考えられる。

次に、ADPとATPがほぼ同様な効果を示したことから、両アゴニストに親和性の高いP2受容体サブタイプP2Y1受容体の関与が考えられる。そこで、強力なP2Y1受容体の選択的アゴニストである2-MeSADPを用いて検討した。その結果、グルコース誘発インシュリン分泌作用は2-MeSADPの10~1000 nMの範囲で有意に抑制され、ATP高用量(100 μ M)で認められたような増強作用はみとめられなかった。ATPの2相性の作用の内P2Y1受容体が抑制系を担っていると考えられる。

6. ATP受容体アンタゴニスト

グルコース誘発インシュリン分泌に対するATPの作用がどの受容体を介したものであるのかを次にP2受容体のアンタゴニスト3種類(TNP-ATP、PPADSおよびsuramin)を用いて検討した。

TNP-ATPはP2X1、2、3、4、7のアンタゴニストとして知られているが、今回用いた用量(0.1~5 μ M)ではATPの作用に影響を及ぼさなかった。ATPのイン

シュリン分泌促進作用にP2X1、2、3、4、7受容体が関与する可能性は低い。

次いで、P2X1、2、3、5、6、7のアンタゴニストとして知られているPPADSを用いて検討したところ、1~10 μ Mの濃度ではATPの作用に影響を認めなかったが、100 μ Mの濃度ではATPのグルコース誘発インシュリン分泌増強作用を完全に抑制した。PPADS単独では、1~100 μ Mの範囲内で22 mMグルコースのインシュリン分泌作用には何の影響もないことを確認している。

なお、非選択的なATP受容体アンタゴニストsuraminについては、50 μ Mのsuramin自体にインシュリン分泌抑制作用が見られたためにそれ以上の検討はできなかった。

7. 電位依存性Ca²⁺チャネルの関与

グルコース誘発インシュリン分泌に対するATPの2相性の作用の内、増強作用はP2X5および6の可能性が指摘された。これらイオンチャネル型P2X受容体はCa²⁺およびNa⁺を通し、脱分極や細胞内Ca²⁺上昇を引き起こすことができる。脱分極を介する場合には電位依存性Ca²⁺チャネルの関与があることになる。それを確認するために、電位依存性Ca²⁺チャネル阻害剤nifedipineを用いてグルコース誘発インシュリン分泌に対するATPの増強作用への影響を検討した。まず、nifedipine単独の作用を検討した。その結果、22 mMグルコースによるインシュリン分泌作用に対して0.1 μ M nifedipineはほとんど影響を及ぼさなかったが、1および10 μ Mのnifedipineは完全に抑制してしまった。このことは、22 mMグルコースによるインシュリン分泌は電位依存性Ca²⁺チャネル依存性であることを示している。

次に、グルコース誘発インシュリン分泌に対するATPの増強作用へのnifedipineの影響を検討した。その結果、nifedipine 1 μ M存在下、1 μ M ATPによるグルコース誘発インシュリン分泌増強作用は大きく減少した。しかし、nifedipine 1 μ M単独時のインシュリン分泌に比較して、有意差を持ってインシュリン分泌は増加していた。

D. 考察

臨床上頻繁に用いられているカルシウム拮抗降圧薬の腓β細胞における作用を検討した結果、ニフェジピンはグルコース刺激による[Ca²⁺]_iの上昇を完全に抑制し、インスリン分泌も同様に抑制した。L型Caチャネルにより選択的なIsradipineは、1 μ Mにおいて完全に[Ca²⁺]_i上昇を抑制した。この様に、降圧剤として用いられているカルシウム拮抗薬は腓β細胞における[Ca²⁺]_i上昇を抑制し、その結果としてインスリン分泌に抑制的に作用するが、臨床的に用いられる濃度(〜100nM)では、必ずしも明らかな抑制はみられない。しかしながら、糖尿病状態における

作用がいかに変化しているかについては定かではない。

現在、糖尿病治療に於いて最も一般的に使用されている治療薬はスルホニルウレア剤は、KATP-チャンネルを閉じ、L型カルシウムを開くことによってインスリンの分泌を促進する。従って、上記のCaチャンネルブロッカーを降圧剤として用いている高血圧を併発している糖尿病患者にとっては、スルホニルウレア剤は必ずしも最適の血糖降下剤とは言い難い。そこで、KATP-チャンネル→L型カルシウムチャンネル系の活性化を介さない様なインシュリン放出メカニズムを明らかにし、そのメカニズムを基本とした血糖降下剤の開発が必要である。その一つがATP受容体を介する経路であり、ATP刺激によりインスリン分泌が活性化されるか否かについて検討した。その結果、P2Y受容体の選択的アゴニストであるADP β S、更には非水解型ATP γ Sはインスリン分泌を促進する可能性が示唆された。インシュリン分泌に対するATPの効果は条件次第で多様に変化してしまう。また、血液中ブドウ糖濃度がATPのインシュリン放出に対する効果を変化させている可能性も考えられる。そこで、グルコース誘発インシュリン分泌に対するATP受容体刺激効果についてモデル細胞MIN6を用いて詳細に検討した。その結果、グルコース誘発インシュリン分泌に対するATP受容体の作用は2相性であることが判明した。ATPおよびADPは低濃度（1 μ M）ではグルコース誘発インシュリン分泌を増強し、高濃度（100 μ M）では逆に抑制するという2相性の作用を引き起こした。受容体サブタイプの間を調べるためにアゴニストやアンタゴニストを用いて検討した結果、増強作用はP2X5および6の可能性が考えられ、抑制作用はP2Y1の可能性が高まった。これまで、様々な動物実験を用いた成績が報告されているが、ある論文ではインシュリン分泌を抑制したとされ、別の論文では逆に増強したとされ、互いに矛盾していたが、今回の報告でその矛盾は見事に解決された。

本研究の最終目的は電位依存性Ca²⁺チャンネルに依存しないインシュリン分泌経路を発見することであった。しかし、ATP単独ではインシュリン分泌を引き起こさない。生理的条件ではグルコースが存在しない状況は考えられないことから、このような条件設定はあまり意味がない。そこで、我々は、グルコース存在下のインシュリン分泌に対するATPの影響を調べ、その結果、P2Xを介してインシュリン分泌を増強することを見いだしたのであるが、予想に反してこの増強のかなりの部分は電位依存性Ca²⁺チャンネル依存性であった。しかし、nifedipineでは抑制しきれないインシュリン分泌部分も残るため、電位依存性Ca²⁺チャンネル以外の経路も関与すると考えられる。一方、P2Y1受容体を介するグルコース誘発

インシュリン分泌の抑制は非常に著明であり、過剰なインシュリン分泌を制御するという重要な役割をATPが担っている可能性が考えられる。すなわち、ATP受容体は様々な形で膵 β 細胞の機能維持において重要な役割を果たしていると考えられる。

E. 結論

臨床的に用いられているカルシウム拮抗薬は、ある条件下においては、膵 β 細胞機能を抑制し、糖尿病治療薬であるスルホニルウレア剤の効果を阻害する。従って今までとは全く違った分子を標的とした新規糖尿病治療薬の開発が必須であり、ATP受容体の活性化がその一つの方向性を示すものと思われる。その様な意味からは、インスリン放出を、分子レベルから解析することが必要であり、私達が確立した β 細胞におけるTIRFMシステムは、本研究を推進する上で強力にtoolとなった。

グルコース誘発インシュリン分泌に対するATP受容体の作用は2相性であり、低濃度（1 μ M）では増強し、高濃度（100 μ M）では逆に抑制した。受容体サブタイプの間をアゴニストやアンタゴニストを用いて検討した結果、増強作用はP2X5およびP2X6の可能性が考えられ、抑制作用はP2Y1の可能性が高まった。これまで、様々な動物実験を用いた成績が報告されているが、ある論文ではインシュリン分泌を抑制したとされ、別の論文では逆に増強したとされ、互いに矛盾していたが、今回の報告でその矛盾は見事に解決された。この増強のかなりの部分は電位依存性Ca²⁺チャンネル依存性であったが、電位依存性Ca²⁺チャンネル以外の経路も関与すると考えられる。一方、P2Y1受容体を介するグルコース誘発インシュリン分泌の抑制は非常に著明であり、過剰なインシュリン分泌を制御するという重要な役割をATPが担っている可能性が考えられる。このように、ATP受容体は様々な形で膵 β 細胞の機能維持において重要な役割を果たしていると考えられる。

F. 健康危機情報

本研究結果からは現段階において特段の健康危機情報は得られていない。

G. 研究発表

1. Y. Shinozaki, S. Koizumi, S. Ishida, J. Sawada, Y. Ohno and K. Inoue: Cytoprotection against oxidative-stress-induced damage of astrocytes by extracellular ATP via P2Y1 receptors. *Glia* 49, 288 - 300, 2004
2. S. Ishida, Y. Shigemoto-Mogami, Y. Shinozaki, H. Kagechika, K. Shudo, S. Ozawa, J. Sawada, Y. Ohno, K. Inoue. Differential modulation of PI3-kinase/Akt pathway during all-trans retinoic acid- and

Am80-induced HL-60 cell differentiation revealed by DNA microarray analysis.

Biochem.Pharmacol., 68, 2177-2186, 2004

3. S.Koizumi, K.Fujishita, K. Inoue, Y. Shigemoto-Mogami, M.Tsuda and K. Inoue. Ca²⁺ waves in keratinocytes are transmitted to sensory neurons: the involvement of extracellular ATP and P2Y2 receptor activation. *Biochem. J.* 380, 329-338, 2004
4. T.Suzuki, I.Hide, K.Ido, A.Inoue, S.Kohsaka, K.Inoue and Y.Nakata. Production and release of neuroprotective TNF by P2X7 receptor-activated microglia. *J. Neurosci.*, 24, 1-7, 2004
5. M. Ohara-Imaizumi, A.K. Cardozo, T. Kikuta, D.L. Eizirik & S. Nagamatsu. The cytokine IL-1 β reduces the docking and fusion of insulin granules in pancreatic β -cells, preferentially decreasing the first phase of exocytosis. *J.Biol.Chem.* 279: 41271- 41274, 2004
6. M. Ohara-Imaizumi, C. Nishiwaki, T. Kikuta, S. Nagai, Y. Nakamichi & S. Nagamatsu TIRF imaging of docking and fusion of single insulin granule motion in primary rat pancreatic β -cells: different behaviour of granule motion between normal and Goto-Kakizaki diabetic rat β -cells. *Biochem. J.* 381, 13-18,2004
7. S. Torii, T. Takeuchi, S. Nagamatsu & T. Izumi. Rab27 Effector Granophilin Promotes the Plasma Membrane Targeting of Insulin Granules via Interaction with Syntaxin 1a. *J.Biol.Chem.* vol.279 p22532-22538 , 2004
8. M. Ohara-Imaizumi, C. Nishiwaki, T. Kikuta, K. Kumakura, Y. Nakamichi & S. Nagamatsu Site of Docking and Fusion of Insulin Secretory Granules in Live MIN6 Cells Analyzed by TAT-conjugated Anti-syntaxin 1 Antibody and Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy . *J.Biol.Chem.* 279 :8403-8408 ,2004
9. Nasu-tada, K., Koizumi, S. and Inoue, K. Involvement of beta1 integrin in microglial chemotaxis and proliferation on fibronectin: Different regulations by ADP through PKA. *Glia.* 52, 98-107, 2005.
10. K. Fujishita, S. Koizumi and K. Inoue. Upregulation of P2Y2 receptors by retinoids in normal human epidermal keratinocytes. *Purinergic Signallings in press*
11. M. Narita, M. Miyatake, M. Shibasaki, M. Tsuda, S. Koizumi, M. Narita, Y. Yajima, K. Inoue and T. Suzuki. Long-lasting change in brain dynamics induced by methamphetamine: enhancement of protein kinase C-dependent astrocytic response and behavioral sensitization. *J.Neurochem.*, 93, 1383-1392, 2005
12. K.Inoue, M.Denda, H.Tozaki, K.Fujishita,

- S.Koizumi and K.Inoue. Characterization of multiple P2X receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. *J.Invest.Dermatol.*, 124, 756-763, 2005
13. Y. Sato, R. Nakamura, M. Satoh, K. Fujishita, S. Mori, S.Ishida, T. Yamaguchi, K. Inoue, T.Nagao and Y. Ohno. Thyroid hormone targets matrix gla protein gene associated with vascular smooth muscle calcification. *Circulation Research*, 97:550-557, 2005.
14. Norimasa Tamehiro, Yoji Sato, Takuo Suzuki, Toshihiro Hashimoto, Yoshinori Asakawa, Shinji Yokoyama, Tohru Kawanishi, Yasuo Ohno, Kazuhide Inoue, Taku Nagao, Tomoko Nishimaki-Mogami. Riccardin C: a natural product that functions as a liver X receptor (LXR) agonist and an LXR antagonist *FEBS Letters*, 579, 5299-5304, 2005
15. J.A.M. Coull, S. Beggs, D. Boudreau, D. Boivin, M. Tsuda, K. Inoue, C.Gravel, M.W. Salter and Y. De Koninck. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*, 438, 1017-1021, 2005.
16. K. Inoue. The function of microglia through purinergic receptors: Neuropathic pain and cytokine release. *Pharmacol Ther.* 109, 210-226, 2005
17. K. Suzuki, T. Kurose, M. Takizawa, M. Maruyama, K. Ushikawa, M. Kikuyama, C. Sugimoto, Y. Seino, S. Nagamatsu, H. Ishida. Osteoclastic function is accelerated in male patients with type 2 diabetes mellitus: the preventive role of osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin (OCIF/OPG) on the decrease of bone mineral density. *Diabetes Res Clin Practice* 68:117-125, 2005
18. S. Yamaguchi, H. Katahira, S. Ozawa, Y. Nakamichi, T.Tanaka, T. Shimoyama, K. Takahashi, K. Yoshimoto, M. Ohara-Imaizumi, S. Nagamatsu, and H. Ishida. Activators of AMP-activated protein kinase enhance GLUT4 translocation and its glucose transport activity in 3T3L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*289:E643-649, 2005
19. M. Ohara-Imaizumi, T. Ohtsuka, S. Matsushima, Y. Akimoto, C. Nishiwaki, Y. Nakamichi, T. Kikuta, S. Nagai S, H. Kawakami, T. Watanabe, and S. Nagamatsu. ELKS, a protein structurally related to the active zone-associated protein CAST, is expressed in pancreatic b cells and functions in insulin exocytosis: Interaction of ELKS with exocytotic machinery analyzed by total internal reflection fluorescence microscopy. *Mol.Biol.Cell* 16:3289-3300, 2005
20. M. Akishita, K. Nagai, Xi H, Yu W, N. Sudoh, T. Watanabe, M. Ohara-Imaizumi, S. Nagamatsu, K. Kozaki, M. Horiuchi, K. Toba. Renin-angiotensin system modulates oxidative stress-induced endothelial

cell apoptosis in rats. *Hypertension* 45:1188-1193, 2005

21. Nishimaki-Mogami T, Kawahara Y, Tamehiro N, Yoshida T, Inoue K, Ohno Y, Nagao T, Une M. Alpha-bile alcohols function as farnesoid X receptor antagonists. *Biochem Biophys Res Commun.* 339:386-91, 2006

22. Nasu-Tada K., Koizumi S., Tsuda M., Kunifusa E., Inoue K. Possible involvement of increase in spinal fibronectin following peripheral nerve injury in upregulation of microglial P2X4, a key molecule for mechanical allodynia. *Glia* 53, 769-775, 2006

23. Shiokawa H, Nakatsuka T, Furue H, Tsuda M, Katafuchi T, Inoue K, Yoshimura M. Direct excitation of deep dorsal horn neurones in the rat spinal cord by the activation of postsynaptic P2X receptors. *J Physiology* 573:753-763, 2006

24. Tozaki-Saitoh H, Koizumi S, Sato Y, Tsuda M, Nagao T, Inoue K. Retinoic acids increase P2X2 receptor expression through the 5'-flanking region of P2rx2 gene in rat phaeochromocytoma PC-12 cells. *Mol Pharmacol.* 70:319-28, 2006

25. Y. Shinozaki, S. Koizumi, Y. Ohno, T. Nagao and K. Inoue. Extracellular ATP counteracts the ERK1/2-mediated death-promoting signaling cascades in astrocytes. *Glia*, 54: 606-618, 2006

26. Suzuki T, Hide I, Matsubara A, Hama C, Harada K, Miyano K, Andra M, Matsubayashi H, Sakai N, Kohsaka S, Inoue K, Nakata Y. Microglial $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors drive a phospholipase C/IP3 pathway and modulate the cell activation toward a neuroprotective role. *J Neurosci Res* 83: 1461-1470, 2006

27. Suzuki T, Nishimaki-Mogami T, Kawai H, Kobayashi T, Shinozaki Y, Sato Y, Hashimoto T, Asakawa Y, Inoue K, Ohno Y, Hayakawa T, Kawanishi T. Screening of novel nuclear receptor agonists by a convenient reporter gene assay system using green fluorescent protein derivatives. *Phytomedicine* 13:401-11, 2006

28. Ikeda R, Takahashi Y, Inoue K, Kato F. NMDA receptor-independent synaptic plasticity in the central amygdala in the rat model of neuropathic pain. *Pain* 127:161-172, 2007

29. Ohsawa K, Irino Y, Nakamura Y, Akazawa C, Inoue K, Kohsaka S. Involvement of P2X(4) and P2Y(12) receptors in ATP-induced microglial chemotaxis. *Glia.* 55:604-616, 2007

現段階ではなし。
2. 実用新案登録
現段階ではなし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
（分担研究報告書）

副作用の発現メカニズムを考慮した対応方策に関する研究
（分担研究者 永松 信哉 杏林大学・生化学教室・教授）

研究要旨

临床上使用されているカルシウムチャネル拮抗薬が明らかにβ細胞からのインスリン分泌を抑制することを示し、更にATP受容体を介したインスリン分泌を促進する経路が存在する可能性を提示した。本年度はATPのラ氏島培養液中への添加、更にはATPγSやATP受容体アゴニストを用いた種々の実験を詳細に行い、その結果、ATPを介したインスリン分泌促進経路があることは明らかとなったが、ATPの効果は限局的であるという結論に達した。一方、前年度に開発した新しいインスリン分泌測定装置であるTIRFシステムを用いてATP受容体を介する以外の種々のインスリン分泌経路についても検討した。その結果、新規糖尿病治療薬であるグリニド製剤は、少なくともSU受容体を介さない別ルートでインスリン分泌を促進するため、Caチャネル拮抗薬と併用しても有用な血糖降下剤として作用することが明らかとなった

A. 研究目的

潜在患者数を含めると既に1620万人を超すと言われている糖尿病は、動脈硬化症の基礎疾患であり、更に、高血圧症が多くの人に併発していることから、心脳血管障害を引き起こす最大の危険因子である。血糖のコントロールが、そのリスクを引き下げる最大の治療であるが、現時点では糖尿病治療薬の種類は限られている。新規糖尿病薬の開発のためにも新しいインスリン分泌経路の発見は必須の課題であり、ATP受容体活性薬の糖尿病治療薬としての可能性、ならびに、新しい画像解析法であるTIRFシステムを用いて新しいインスリン分泌経路の解明を行う。

B. 研究方法

1. 膵β細胞の調整・培養；麻酔下にWistar ratを開腹し、総胆管よりコラジネース液を注入し、膵摘出後、ラ氏島を回収し、Ca²⁺free溶液にて単一β細胞を採取、glass bottom dishにまき、RPMI1640溶液中にて培養した、TIRF、分泌実験に用いた。
2. 新たなインスリン分泌測定法であるTIRF法によるインスリン分泌経路の解明；従来のRIA法を用いたインスリン分泌の測定解析では限られた情報が得られるのみなので、単一インスリン顆粒の放出をナノスケールから解析するために、TIRFM(total internal reflection fluorescence microscopy)法を膵β細胞に導入し、インスリン顆粒の動態をTIRFMシステムを用いてCCDカメラにて0.1秒毎に取得し、メタモルフソフトウェアにて時間的・空間的解析を行っ

た。

3. TATシステムによる形質膜分子とインスリン顆粒の分子間相互作用解析；TAT融合抗体を作製し、これをCy3標識し、インスリン顆粒との相互作用をTIRF解析した。
4. 膵β細胞のperifusionと分泌インスリン量の定量(RIA)；膵β細胞をペリスタポンプにより灌流し、1分毎の流出液を回収、回収液を¹²⁵I-インスリン、及び抗インスリン抗体を用いてRadio immuno assay(RIA)を行った。

C. 研究結果

(1) ATP受容体を介したインスリン分泌：100μM ATPを用いた膵β細胞perifusionシステムによる実験を繰り返したが、その方法ではATPのインスリン分泌能に与える影響についてははっきりしなかったため、種々の濃度のブドウ糖にATPを加えたラ氏島batch実験を行った。その結果、低濃度グルコース存在下にてはATPのインスリン分泌促進反応は見られなかったが、200mg/dlグルコース存在下においてのみATPはインスリン分泌をATP非存在下り約30%増強した。次に、ヒト2型糖尿病のモデル実験動物であるGKラット膵β細胞を用いてATPの効果を検討した。GKラット膵ラ氏島においては200mg/dlグルコース存在下でのATPの効果はみられなかった。更に、定量的PCR法を用いてATP受容体の遺伝子発現をGKラット膵ラ氏島を用いて検討したところ生後5週齢、6週齢どちらに於いても、P2X1、P2Y1のmRNAの発現はcontrolウイスターラットラ氏島での約半分以下にまで

低下していた。

臨床的に高血圧治療薬として使用されているL型-電位依存性Caチャンネルブロッカーは、グルコース刺激インスリン分泌を著明に抑制する。一方、ATP受容体を介したインスリン分泌経路は、L型Ca₂₊チャンネルを介さない可能性があり、この解決策になると考えられたが、GK糖尿病ラットを用いたRT-PCRの結果から、糖尿病においてATP受容体も減少しているのならば、必ずしもこの経路が有力な解決策とも言い難い。そこで昨年度に開発した新たなインスリン分泌測定法であるTIRFシステムを用いて、SNARE蛋白質を介したインスリン放出経路についての詳細な解析を行うことにより、L型Caチャンネルを介さない可能性のあるインスリン分泌経路の模索を行った。

(2) TIRFシステムを用いたインスリン分泌機構の研究：単一インスリン顆粒の時間的空間的動態を解析するために、前年度までに開発したinsulin-GFP発現アデノウィルスベクターを用いて、初代培養膵β細胞のインスリン顆粒を標識し、TIRFシステムによりインスリン顆粒の蛍光変化をmsオーダーにて追跡した。一方、SNARE蛋白質の代表格であるsyntaxin 1Aは、開口放出分子として細胞膜に局在する必須エレメントとして知られている。そこでsyntaxin 1Aとインスリン顆粒との分子間相互作用を検討するために、生きたβ細胞に於いて、syntaxin 1Aを標識し、同時にインスリン-GFPにてインスリン顆粒を標識することにより、これらの空間的動的動態並びに相互作用を観察した。すなわち、抗syntaxin 1A抗体をCy3で標識した後にTATペプチドを融合したCy3-TAT融合抗体を作製し、これを用いて生細胞におけるsyntaxin 1を標識した。その結果、インスリン顆粒はsyntaxin 1クラスター上に局在しており、ブドウ糖刺激では、syntaxin 1クラスターは変化せず、インスリン顆粒のみがfusion、そして消失する像がみられた。一方、GKラット糖尿病β細胞ではsyntaxin 1クラスターが激減するため、膜に結合しているインスリン顆粒数が減少し、その結果としてインスリンのfusionが減少していた。ところがアデノウィルスを用いてsyntaxin 1クラスターを正常状態に回復させると、膜に結合しているインスリン顆粒数が増加、その結果としてインスリンのfusionも増えることから、SNARE蛋白質を標的とした新しい糖尿病治療薬の開発が、新規糖尿病治療としての候補と考えられる。

K_{ATP}チャンネルにcouplingしているSUR1受容体を標的とするスルホニルウレア剤は、最終時にL型Caチャンネルを活性化させることによりインスリン分泌を促進する作用機構を有しているため、高血圧治療薬として臨床的に用いられているCa拮抗剤であるニフェジピンが存在していると、細胞内Ca₂₊上昇を引き

起こすことが出来ずに、インスリン分泌を促進させることが出来ない。最近、スルホニルウレア剤とは構造が違う新しいタイプのインスリン分泌促進剤(グリニド剤)が临床上においても使用され始めた。この薬剤の作用機構の一部はL型Ca₂₊チャンネルを介しているが、一方、Caチャンネルを介さない、インスリン分泌促進経路が存在すると考えられる。そこでTIRFシステムを用いてグリニド剤のβ細胞内での作用機構について検討した。グリニド剤は、ダイアゾキサイド前処理して、L型Caチャンネルの活性を完全にブロックした状態にても、細胞内由来のインスリン顆粒(newcomer)からのインスリン放出を引き起こした。すなわち、グリニド剤によるインスリン分泌促進は、高血圧治療に用いられるニフェジピンが存在している場合でも、非常に有効にインスリン分泌を引き起こすことができる新しいタイプの糖尿病治療薬であることが、TIRFを用いた薬剤の分子作用機構解明の研究結果から明らかにすることが出来た。

D. 考察

一般的糖尿病治療薬であるスルホニルウレア剤にとって代わることが出来る新しい血糖降下剤の可能性としてATP受容体の活性薬を考えたが、ATP受容体を介したインスリン分泌促進作用は限局的であったため必ずしも有効な薬剤とはなり得ない様である。一方、新しいインスリン分泌経路を見出すために必要とされた新しいインスリン分泌測定法であるTIRFイメージング法を確立し、これを用いたインスリン分泌機構の研究からは、新知見を得ることが出来た。すなわち、2型糖尿病モデルラットであるGKラットβ細胞におけるインスリン分泌第一相が低下する主因に、SNARE蛋白質が大きく関与していること、又、新規糖尿病治療薬であるグリニド剤は、SUレセプターを介さず、newcomerインスリン顆粒からのインスリン放出を引き起こすことが明らかとなった。

E. 結論

新しいインスリン分泌経路としてATP受容体を介する経路につき詳細な検討を行ったところATPはインスリン分泌を促進するものの、効果は限定的であるため、現時点においては、ATP受容体活性薬は、糖尿病治療薬の候補としては最適ではない。一方、新しい画像解析システムによるインスリン分泌測定法であるTIRF解析法を確立し、この方法を用いることにより、新規糖尿病治療薬の開発に必須であるインスリン分泌及び糖尿病におけるインスリン分泌及び糖尿病におけるインスリン分泌障害機構の解明を行うことが可能となった。

F. 健康危機情報

本研究成果からは現段階において特段の健康危機情報は得られていない。

G. 研究発表

1. M. Ohara-Imaizumi, C. Nishiwaki, Y. Nakamichi, T. Kikuta, S. Nagai & S. Nagamatsu
Corelation of syntaxin1 and SNAP-25 clusters with docking and fusion of insulin granules analyzed by total internal reflection microscopy. *Diabetologia* (in press)
2. M. Ohara-Imaizumi, A.K. Cardozo, T. Kikuta, D.L. Eizirik & S. Nagamatsu.
The cytokine IL-1 β reduces the docking and fusion of insulin granules in pancreatic β -cells, preferentially decreasing the first phase of exocytosis. *J.Biol.Chem.* 279: 41271-41274, 2004
3. M. Ohara-Imaizumi, C. Nishiwaki, T. Kikuta, S. Nagai, Y. Nakamichi & S. Nagamatsu
TIRF imaging of docking and fusion of single insulin granule motion in primary rat pancreatic β -cells: different behaviour of granule motion between normal and Goto-Kakizaki diabetic rat β -cells. *Biochem. J.* 381, 13-18, 2004
4. S. Torii, T. Takeuchi, S. Nagamatsu & T. Izumi. Rab27 Effector Granophilin Promotes the Plasma Membrane Targeting of Insulin Granules via Interaction with Syntaxin 1a. *J.Biol.Chem.* vol.279 p22532-22538, 2004
5. M. Ohara-Imaizumi, C. Nishiwaki, T. Kikuta, K. Kumakura, Y. Nakamichi & S. Nagamatsu
Site of Docking and Fusion of Insulin Secretory Granules in Live MIN6 Cells Analyzed by TAT-conjugated Anti-syntaxin 1 Antibody and Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy. *J.Biol.Chem.* 279 :8403-8408, 2004
6. K. Suzuki, T. Kurose, M. Takizawa, M. Maruyama, K. Ushikawa, M. Kikuyama, C. Sugimoto, Y. Seino, S. Nagamatsu, H. Ishida.
Osteoclastic function is accelerated in male patients with type 2 diabetes mellitus: the preventive role of osteoclastogenesis inhibitory

- factor/osteoprotegerin (OCIF/OPG) on the decrease of bone mineral density. *Diabetes Res Clin Practice* 68:117-125, 2005
7. 永松信哉 2相性インスリン分泌機構と糖尿病におけるインスリン分泌不全
Nephrology Frontier 4:63-67, 2005
 8. S. Yamaguchi, H. Katahira, S. Ozawa, Y. Nakamichi, T. Tanaka, T. Shimoyama, K. Takahashi, K. Yoshimoto, M. Ohara-Imaizumi, S. Nagamatsu, and H. Ishida.
Activators of AMP-activated protein kinase enhance GLUT4 translocation and its glucose transport activity in 3T3L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 289:E643-649, 2005
 9. M. Ohara-Imaizumi, T. Ohtsuka, S. Matsushima, Y. Akimoto, C. Nishiwaki, Y. Nakamichi, T. Kikuta, S. Nagai S, H. Kawakami, T. Watanabe, and S. Nagamatsu.
ELKS, a protein structurally related to the active zone-associated protein CAST, is expressed in pancreatic β cells and functions in insulin exocytosis: Interaction of ELKS with exocytotic machinery analyzed by total internal reflection fluorescence microscopy. *Mol. Biol. Cell* 16:3289-3300, 2005
 10. M. Akishita, K. Nagai, Xi H, Yu W, N. Sudoh, T. Watanabe, M. Ohara-Imaizumi, S. Nagamatsu, K. Kozaki, M. Horiuchi, K. Toba.
Renin-angiotensin system modulates oxidative stress-induced endothelial cell apoptosis in rats. *Hypertension* 45:1188-1193, 2005
 11. 今泉美佳、永松信哉：インスリン開口放出のリアルタイム可視化技術。
日本薬理学雑誌 126:399-455, 2005
 12. 今泉美佳、永松信哉 インスリン顆粒開口分泌とその異常 分子糖尿病学の進歩2006 (監修 矢崎義雄) 金原出版 pp8-17, 2006

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
現段階ではなし。
2. 実用新案登録
現段階ではなし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

氏名	タイトル	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Y. Shinozaki et al.	Cytoprotection against oxidative-stress-induced damage of astrocytes by extracellular ATP via P2Y1 receptors.	Glia	49	288 - 300	2004
S. Ishida et al.	Differential modulation of PI3-kinase/Akt pathway during all-trans retinoic acid- and Am80-induced HL-60 cell differentiation revealed by DNA microarray analysis.	Biochem. Pharmacol.	68	2177-2186	2004
S. Koizumi et al.	Ca ²⁺ waves in keratinocytes are transmitted to sensory neurons: the involvement of extracellular ATP and P2Y2 receptor activation.	Biochem. J.	380	329-338	2004
T. Suzuki et al.	Production and release of neuroprotective TNF by P2X7 receptor-activated microglia.	J. Neurosci.	24	1-7	2004
Mica Ohara-Imaizumi et al.	TIRF imaging of docking and fusion of single insulin granule motion in primary rat pancreatic β -cells: different behaviour of granule motion between normal and Goto-Kakizaki diabetic rat β -cells	Biochem. J	381	13-18	2004
S. Torii et al.	Rab27 Effector Granophilin Promotes the Plasma Membrane Targeting of Insulin Granules via Interaction with Syntaxin 1a.	J. Biol. Chem	279	22532-22538	2004
Yoko. Nakamichi et al.	Functions of pancreatic beta cells and adipocytes in bombesin receptor subtype-3-deficient mice.	Biochem, Biophys. Res. Commun	318	698-703	2004

Mica Ohara- Imaizumi et al.	The cytokine IL-1 β reduces the docking and fusion of insulin granules in pancreatic β -cells, preferentially decreasing the first phase of exocytosis	J. Biol. Chem	279	41271-4 1274	2004
Mica Ohara- Imaizumi et al.	Corelation of syntaxin1 and SNAP-25 clusters with docking and fusion of insulin granules analyzed by total internal reflection microscopy	Diabetologia	47	2200-22 07	2004
K. Kasai, et al.	Rab27a mediates the tight docking of insulin granules onto the plasma membrane during glucose stimulation.	J. Clin. Invest	115	388-396	2005

氏名	タイトル	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Nasu-tada, K., et al.	Involvement of beta1 integrin in microglial chemotaxis and proliferation on fibronectin: Different regulations by ADP through PKA.	Glia	52	98-107	2005
M. Narita et al.	Long-lasting change in brain dynamics induced by methamphetamine: enhancement of protein kinase C-dependent astrocytic response and behavioral sensitization.	J. Neurochem.	93	1383- 1 392	2005
K. Inoue et al.	Characterization of multiple P2X receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes.	J. Invest. Dermatol.	124	756-763	2005
Y. Sato et al.	Thyroid hormone targets matrix gla protein gene associated with vascular smooth muscle calcification.	Circulation Research	97	550-557	2005
N. Tamehiro et al.	Riccardin C: a natural product that functions as a liver X receptor (LXR) agonist and an LXR antagonist.	FEBS Letters	579	5299-53 04	2005
J. A. M. Coul et al.	BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain.	Nature	438	1017-10 21	2005

K. Inoue	The function of microglia through purinergic receptors: Neuropathic pain and cytokine release.	Pharmacol Ther.	109	210-226	2005
K. Suzuki et al	Osteoclastic function is accelerated in male patients with type 2 diabetes mellitus: the preventive role of osteoclastogenesis is inhibitory factor/osteoprotegerin (OCIF/OPG) on the decrease of bone mineral density.	Diabetes Res Clin Practice	68	117-125	2005
S. Yamaguchi et al	Activators of AMP-activated protein kinase enhance GLUT4 translocation and its glucose transport activity in 3T3L1 adipocytes.	Am J Physiol Endocrinol Metab	289	E643-649	2005
M. Ohara-Imaizumi et al.	ELKS, a protein structurally related to the active zone-associated protein CAST, is expressed in pancreatic beta cells and functions in insulin exocytosis: Interaction of ELKS with exocytotic machinery analyzed by total internal reflection fluorescence microscopy.	Mol. Biol. Cell	16	3289-3300	2005
M. Akishita et al	Renin-angiotensin system modulates oxidative stress-induced endothelial cell apoptosis in rats.	Hypertension	45	1188-1193	2005

氏名	タイトル	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Nishimaki-Mogami T, Kawahara Y, Tamehiro N, Yoshida T, Inoue K, Ohno Y, Nagao T, Une M.	Alpha-bile alcohols function as farnesoid X receptor antagonists.	Biochem Biophys Res Commun.	339	386-391	2006
Nasu-Tada K., Koizumi S., Tsuda M., Kunifusa E., Inoue K.	Possible involvement of increase in spinal fibronectin following peripheral nerve injury in upregulation of microglial P2X4, a key molecule for mechanical allodynia.	Glia	53	769-775	2006

Shiokawa H, Nakatsuka T, Furue H, Tsuda M, Katafuchi T, Inoue K, Yoshimura M.	Direct excitation of deep dorsal horn neurones in the rat spinal cord by the activation of postsynaptic P2X receptors.	J Physiology	573	753-763	2006
Tozaki-Saitoh H, Koizumi S, Sato Y, Tsuda M, Nagao T, Inoue K.	Retinoic acids increase P2X ₂ receptor expression through the 5'-flanking region of P2rx2 gene in rat pheochromocytoma PC-12 cells.	Mol Pharmacol	70	319-328	2006
Y. Shinozaki, S. Koizumi, Y. Ohno, T. Nagao and K. Inoue.	Extracellular ATP counteracts the ERK1/2-mediated death-promoting signaling cascades in astrocytes.	Glia	54	606-618	2006
Suzuki T, Hide I, Matsubara A, Hama C, Harada K, Miyano K, Andra M, Matsubayashi H, Sakai N, Kohsaka S, Inoue K, Nakata Y.	Microglial $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors drive a phospholipase C/IP3 pathway and modulate the cell activation toward a neuroprotective role.	J Neurosci Res	83	1461-1470	2006
Ikeda R, Takahashi Y, Inoue K, Kato F.	NMDA receptor-independent synaptic plasticity in the central amygdala in the rat model of neuropathic pain.	Pain	127	161-172	2007
Ohsawa K, Irino Y, Nakamura Y, Akazawa C, Inoue K, Kohsaka S.	Involvement of P2X ₄ and P2Y ₁₂ receptors in ATP-induced microglial chemotaxis.	Glia	55	604-616	2007

Cytoprotection Against Oxidative Stress-Induced Damage of Astrocytes by Extracellular ATP Via P2Y₁ Receptors

YOUICHI SHINOZAKI,^{1,4} SCHUICHI KOIZUMI,² SEIICHI ISHIDA,²
JUN-ICHI SAWADA,³ YASUO OHNO,² AND KAZUHIDE INOUE^{1,4*}

¹Division of Biosignaling, National Institute of Health Sciences, Setagaya, Tokyo, Japan

²Division of Pharmacology, National Institute of Health Sciences, Setagaya, Tokyo, Japan

³Division of Biochemistry and Immunochemistry, National Institute of Health Sciences, Setagaya, Tokyo, Japan

⁴Department of Molecular and System Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

KEY WORDS ATP; P2Y₁ receptors; astrocytes; oxidative stress

ABSTRACT Oxidative stress is the main cause of neuronal damage in traumatic brain injury, hypoxia/reperfusion injury, and neurodegenerative disorders. Although extracellular nucleosides, especially adenosine, are well known to protect against neuronal damage in such pathological conditions, the effects of these nucleosides or nucleotides on glial cell damage remain largely unknown. We report that ATP but not adenosine protects against the cell death of cultured astrocytes induced by hydrogen peroxide (H₂O₂). ATP ameliorated the H₂O₂-induced decrease in cell viability of astrocytes in an incubation time- and concentration-dependent fashion. Protection by ATP was inhibited by P2 receptor antagonists and was mimicked by P2Y₁ receptor agonists but not by adenosine. The expressions of P2Y₁ mRNAs and functional P2Y₁ receptors in astrocytes were confirmed. Thus, ATP, acting on P2Y₁ receptors in astrocytes, showed a protective action against H₂O₂. The astrocytic protection by the P2Y₁ receptor agonist 2-methylthio-ADP was inhibited by an intracellular Ca²⁺ chelator and a blocker of phospholipase C, indicating the involvement of intracellular signals mediated by Gq/11-coupled P2Y₁ receptors. The ATP-induced protection was inhibited by cycloheximide, a protein synthesis inhibitor, and it took more than 12 h for the onset of the protective action. In the DNA microarray analysis, ATP induced a dramatic upregulation of various oxidoreductase genes. Taken together, ATP acts on P2Y₁ receptors coupled to Gq/11, resulting in the upregulation of oxidoreductase genes, leading to the protection of astrocytes against H₂O₂. © 2004 Wiley-Liss, Inc.

INTRODUCTION

Astrocytes are much more than merely support cells for neurons in the central nervous system (CNS). They can receive inputs, assimilate information, and send instructive chemical signals to neighboring glial cells as well as neurons (Araque et al., 1999a, b, 2001; Haydon, 2001). Thus, communication among astrocytes would play an important role in brain function. Initially, so-called gliotransmission, a glia-to-glia communication or even neuron-to-glia communication, was reported to be mediated by glutamate (Cornell-Bell et al., 1990; Charles et al., 1991; Parpura et al., 1994;

Innocenti et al., 2000) because astrocytes express glutamate receptors and release glutamate. However, re-

Grant sponsor: Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences of the Organization for Pharmaceutical Safety and Research (OPSR); Grant number: MF-16; Grant number: MPJ-6; Grant sponsor: Grant-in-Aid for Scientific Research; Grant sponsor: Brain Science Foundation.

*Correspondence to: Kazuhide Inoue, Division of Biosignaling, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan. E-mail: inoue@nihs.go.jp

Received 29 March 2004; Accepted 30 July 2004

DOI 10.1002/glia.20118

Published online 19 October 2004 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

cent accumulating evidence has shown that extracellular ATP released from astrocytes has a central role in astrocyte-to-astrocyte (Guthrie et al., 1999), astrocyte-to-microglia (Verderio and Matteoli, 2001; Schipke et al., 2002), and even astrocyte-to-neuron communication (Koizumi et al., 2003; Newman, 2003; Zhang et al., 2003).

ATP is an endogenous ligand for P2 receptors that are classified into ligand-gated P2X and G-protein-coupled metabotropic P2Y receptors (Abbracchio and Burnstock, 1994). Astrocytes express both types of P2 receptors (James and Butt, 2002; Fumagalli et al., 2003) and can release ATP in response to various stimuli (Guthrie et al., 1999; Queiroz et al., 1999; Koizumi et al., 2003). Astrocytic ATP acting on these P2 receptors forms intercellular Ca^{2+} waves that mediate long-range communications in astrocytes (Fam et al., 2000; Gallagher and Salter, 2003). However, the physiological or pathological significance of such an ATP/P2 receptor-mediated response in astrocytes remains largely unknown.

It has been reported that ATP inhibits excess neuronal excitations by inhibiting the release of glutamate (Koizumi and Inoue, 1997; Zhang et al., 2003) or by facilitating inhibitory γ -aminobutyric acid (GABA) release in the hippocampus (Aihara et al., 2002) and is therefore presumably involved in protecting neurons against excitotoxicity. With regard to neuroprotective actions, however, adenosine, a metabolite of ATP, has received much attention as an important inhibitory molecule because it is formed by the immediate degradation of ATP by ectonucleotidases, potentially inhibiting the excitability of neurons and protecting them against various neurodegenerative disorders including excitatory neuronal death (Jones et al., 1998; Behan and Stone, 2002; Hentschel et al., 2003; Schwarzschild et al., 2003). This might be why the functional role of ATP in relation to neuroprotection has received only limited attention. Interestingly, however, adenosine does not show any protective action in astrocytes, rather it induces the cell death of astrocytes (Abbracchio et al., 1995; Appel et al., 2001; Di Iorio et al., 2002). It has been reported that ATP protects astrocytes against glucose deprivation-induced cell death, although this protection appears to be independent of P2 receptors (Shin et al., 2002). ATP is released from both neurons (Wieraszko et al., 1989; Inoue et al., 1995) and astrocytes (Guthrie et al., 1999; Ahmed et al., 2000) in physiological and pathological conditions, and astrocytes could receive the ATP signal via various P2 receptors, including a high-affinity P2Y₁ receptor (Koizumi et al., 2002). These findings raise the possibility that, unlike neurons, astrocytes mainly use ATP/P2 receptor-mediated pathway(s) for their own survival.

We report that ATP acting on P2Y₁ receptors protects astrocytes from cell death induced by hydrogen peroxide (H_2O_2), one of the main reactive oxygen species (ROS) generated by traumatic brain injury, hypoxia/reperfusion, and various neurodegenerative disorders (Agarwal et al., 1991; Lei et al., 1997; Cuajungco et

al., 2000; Huang et al., 2000; Tabner et al., 2001; Tagliamonte et al., 2003). We further demonstrate by using differential gene expression analysis that ATP induces the upregulation of oxidoreductase genes, suggesting the involvement of these genes in the protective action.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Adenosine 5'-triphosphate (ATP), adenosine 5'-diphosphate (ADP), uridine 5'-triphosphate (UTP), adenosine, 2-methylthio-adenosine diphosphate (2Me-SADP), adenosine 5-o-(2-thiodiphosphate) (ADP β S), α,β -methylene-adenosine triphosphate (α,β meATP), suramin, reactive blue 2 (RB2), pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid (PPADS), MRS2179, U73122, U73343, glutamate, 1-octanol, DL-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP-V), 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) and (RS)- α -methyl-4-carboxyphenylglycine (MCPG) were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO). The sources of other chemicals are shown in parentheses as follows; trypsin-EDTA, M-MLV reverse transcriptase, 100 mM dNTP set, recombinant ribonuclease (RNase) inhibitor and deoxyribonuclease (DNase) I (GIBCO/Invitrogen, Tokyo, Japan), RNA STAT 60 (Tel-Test, Friendswood, TX), hydrogen peroxide (H_2O_2) (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay kit (Chemicon International, Temecula, CA), GeneAmp PCR Reagent Kit and AmpliTaq DNA polymerase (Perkin-Elmer, Foster City, CA) Roche Molecular Systems, (Pleasanton, CA), O,O'-Bis (2-aminophenyl) ethyleneglycol-N,N,N',N'-tetraacetic acid, tetraacetoxymethyl ester (BAPTA-AM) (Calbiochem Biosciences, San Diego, CA).

Cells and Cell Culture

Astrocytes were prepared from neonatal rat forebrain. The cells were cultured in Dulbecco's modified essential medium (DMEM, GIBCO/Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; GIBCO/Invitrogen). After 3 weeks with changing of the medium every 3 days, the medium was changed to DMEM with 5% horse serum (HS; GIBCO/Invitrogen) and 5% FBS; the cells were shaken for 15 h at 100 rpm. Then, the cells were washed 3 times with phosphate-buffered saline (PBS) (10 ml each) and supplemented with 0.025% trypsin-EDTA (diluted with PBS), and incubated for 2 min under 10% CO_2 /90% air at 37°C. After the cells were harvested, 2×10^5 cells were seeded on 60×15 -mm dishes (Falcon/Becton Dickinson, San Jose, CA) and cultured in DMEM with 5% HS and 5% FBS. Total RNA was collected from five dishes. For the cell viability assay, cells were seeded on 96-well plates (NUNC, Roskilde, Denmark) at a density of 1.25×10^4 cells/well. At 24 h after the seeding, the medium was

changed. The cells were used for experiments 72 h after the medium exchange.

Experimental Design of Hydrogen Peroxide (H_2O_2)-Evoked Cell Death

Astrocytes were exposed to various concentrations of H_2O_2 (75–300 μM) for 1–24 h, and then the cell viability was investigated. In the present study, we chose a H_2O_2 concentration of 250 μM and an incubation period of 2 h to assess the effect of ATP.

Cell Viability Assay

For the cell viability assay, we used an MTT assay. MTT is a yellow tetrazolium salt that is reduced to purple formazan (Altman, 1976). The MTT assay assesses cell viability by measuring the mitochondrial function (Twentyman and Luscombe, 1987). After incubation with H_2O_2 for 2 h, a 1/10 volume of MTT solution (5 mg/ml in PBS) was added and incubated for 4 h under 10% CO_2 /90% air at 37°C. Then an equal volume of isopropanol (with 0.04 N HCl) was added to the cells, and the MTT formazan was dissolved by pipetting. The absorbance was measured on an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) plate reader (ASYS Hitech, Eugendorf, Austria) with a test and reference wavelength of 570 and 630 nm, respectively.

Expression of P2Y₁ Receptors in Astrocytes

The expression of P2Y₁ receptor mRNA was analyzed by single reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). For RT-PCR analysis, astrocytes were directly lysed with 0.5 ml of RNA STAT-60 (Tel-Test B) and total RNA was isolated; 1 μg of RNA was reverse-transcribed with M-MLV transcriptase. Aliquots (1 μl) of the RT product were added to the reaction mixture containing 1 \times PCR buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl), 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs, 2.5 U of *Taq* polymerase and P2Y₁ receptors specific primers according to the nucleotide sequences as follows; forward, 5'-ctgatcttgggctgttatgg-3' and reverse, 5'-gctgttgagacttgctagac-3'. Amplification was performed in a Gene Amp PCR System 2400-R (Perkin-Elmer/Roche Molecular Systems) thermal cycler for 30–40 cycles, after an initial denaturation at 94°C for 2 min by utilizing sense and antisense primers specifically designed for P2Y₁ receptors. The PCR product was resolved on agarose gel stained by 2% ethidium bromide and visualized under ultraviolet (UV) light.

Measurement of Intracellular Ca^{2+} Concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in Single Cells

The increase in $[Ca^{2+}]_i$ in single cells was measured by the fura-2 method as described by Grynkiewicz et al.

(1985) with minor modifications (Koizumi et al., 2002). In brief, the cells were washed with a balanced salt solution (BSS) of the following composition (in mM): NaCl 150, KCl 5.0, $CaCl_2$ 1.8, $MgCl_2$ 1.2, N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) 25, and D-glucose 10 (pH = 7.4). Cells were then loaded with 5 μM fura-2 acetoxymethylester (fura-2 AM) at room temperature in BSS for 45 min, followed by a BSS wash and a further 30-min incubation to allow de-esterification of the loaded dye. For the Ca^{2+} -free experiment, Ca^{2+} was removed from the BSS (Ca^{2+} -free BSS). The coverslips were mounted on an inverted epifluorescence microscope (TE-2000-U, Nikon, Tokyo, Japan). Fluorescent images were obtained by alternate excitation at 340 nm (F340) and 380 nm (F380). The emission signal at 510 nm was collected by a charge-coupled device camera (C-6790, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) coupled with an image intensifier (GaAsP, C8600-03, Hamamatsu Photonics); digitized signals were stored and processed using an image processing system (Aquacosmos, Hamamatsu Photonics). Drugs were dissolved in BSS and applied by superfusion.

Measurement of Extracellular ATP Concentration

The extracellular ATP concentration in astrocytes was detected with a luciferin-luciferase bioluminescence assay. After glutamate stimulation or exogenous ATP application, supernatants were collected at different time points and were mixed with luciferase reagents (ATP bioluminescence assay kit CLS II; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). ATP bioluminescence was detected by a luminometer (Lumiphotometer TD-4000, Labo Science, Tokyo, Japan). The absolute ATP concentration was estimated using a standard ATP solution (0.001–1 μM).

Total RNA Preparation

After washing the cells twice with PBS, total RNA was prepared with RNeasy Mini total RNA Preparation Kit (Qiagen GmbH, Tokyo, Japan) according to the manufacturer's instructions.

DNA Microarray Analysis

Converting total RNA to the targets for Affymetrix GeneChip DNA microarray hybridization was done according to the manufacturer's instructions. The targets were hybridized to rat genome U34A Gene Chip microarray (Affymetrix) for 16–24 h at 45°C. After the hybridization, the DNA microarrays were washed and stained on Fluidics Station (Affymetrix) according to the protocol provided by Affymetrix. Then, the DNA microarrays were scanned, and the images obtained

were analyzed by Microarray Suite Expression Analysis Software (version 5.0; Affymetrix). To analyze the gene expressions in astrocytes, differences in the mean level of the gene expression index between the control group and drug-treated group were assessed using the Student's *t*-test for each probeset.

Astrocytes were incubated for 2 h with ATP at a final concentration of 100 μ M. Total RNA was prepared at the end of incubation and converted to the target for GeneChip hybridization. The gene expression was analyzed in duplicate by Rat Genome U34A GeneChip using these targets. The addition of ATP and the preparation of total RNA was done four times independently.

Selection of Differentially Expressed Genes

The first step was selecting genes whose expression levels were increased 2-fold by treatment with ATP. The second step was selecting genes whose *P*-values were *P* < 0.05 using Student's *t*-test. The last step was selecting genes whose expression levels of the drug treated group were 1,000.

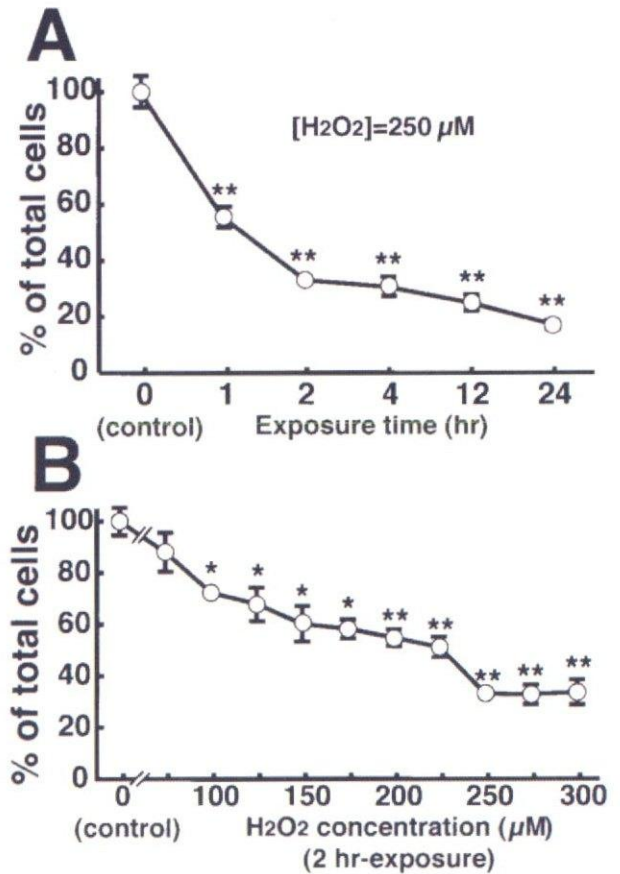
Quantitative RT-PCR of Oxidoreductase Genes

RT-PCR amplifications were performed using Taqman One-step RT-PCR Master Mix Reagents and, 200 nM oxidoreductase-specific primers. Using the computer software Primer Express (Applied Biosystems), clone-specific primers were designed to recognize rat oxidoreductase genes, i.e., rat carbonyl reductase (CBR, Taqman Probe, 5'-cctcctgaatgcctgcctg-3'; forward, 5'-tgaggagaggagaggacaaga-3'; reverse, 5'-cctgccatgtcggttctga-3'), schlafen-4 (SHL4, Taqman probe, 5'-aggcctatcgaggccagatggttg-3'; forward, 5'-tctgttttctagaactgttg-3'; reverse, 5'-ggtgaggtagcctggctatagc-3'), and thioredoxin reductase (TrxR, Taqman probe, 5'-attgaagcaggacaccaggccg-3'; forward, 5'-gtgcccagaaaattgaaca-3'; reverse, 5'-gtggatttagcggtcacctga-3'). RT-PCR was performed by 30 min reverse transcription at 48°C, 10 min Amplitaq Gold activation at 95°C, then 15-s denaturation at 95°C, 1 min annealing and elongation at 60°C for 40 cycles in a PRISM7700 (Applied Biosystems). To exclude contamination by nonspecific PCR products such as primer dimers, melting curve analysis was applied to all final PCR protocols after the cycling protocol. Each experiment was performed in triplicate.

RESULTS

Protection by ATP Against Oxidative Stress-Induced Cell Death in Astrocytes

Using an MTT assay, we tested the effect of hydrogen peroxide (H_2O_2) on cell viability in astrocytes. We found that H_2O_2 caused a time- (Fig. 1A) and concen-



P* < 0.05, *P* < 0.01 vs. control

Fig. 1. Changes in cell viability of astrocytes by H_2O_2 . **A:** Cells were incubated with 250 μ M H_2O_2 for various periods before the cell viability test. The cell viability was evaluated by the MTT assay as described in Materials and Methods. H_2O_2 induced a decrease in cell viability in an exposure time-dependent fashion. **B:** Cells were stimulated with various concentrations of H_2O_2 for 2 h; cell viability was then examined. H_2O_2 evoked cell death in a concentration-dependent fashion. Sequential plots show mean \pm SEM of triplicate measurements, depicting a representative experiment (*n* = 3). Values were normalized to total cell number (control) and the cell viability was expressed as percentage of total cell. Asterisks show significant differences from the control response (**P* < 0.05, ***P* < 0.01, Student's *t*-test).

tration-dependent (Fig. 1B) decrease in the cell viability of the astrocytes, i.e., cell death of the astrocytes. When incubated for 1 h at 250 μ M, the cell viability was almost halved and then was gradually decreased to ~20% of the non-treated control level by a further incubation (2–24 h, Fig. 1A). When the H_2O_2 concentrations were varied, the cell viability was decreased in a concentration-dependent fashion and reached the minimum at 250 μ M. We therefore chose an H_2O_2 concentration of 250 μ M and an incubation period of 2 h for the following experiments.

We tested the effect of exogenously applied ATP on the H_2O_2 -induced astrocytic cell death. ATP was applied to the cells 24 h before and during H_2O_2 applica-