

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

目 次

文献No	課題番号			
20000937A	21008	血管壁細胞の抗血栓性機能の制御機構の解明と新規抗血栓薬の開発	加藤 久雄	1
938A	21019	組織内脂肪蓄積の予防及びGLUT4の発現増加を目指したインスリン抵抗性治療法の研究	江崎 治	14
939A	21045	慢性呼吸器疾患の発症機構の解明と医療への応用	斎藤 博久	18
940A	21052	閉経後骨粗鬆症の発症機構の解明とその予防と治療薬に関する研究	宮浦 千里	25
942A	21067	細菌感染に関与する病原遺伝子の発現機構の解明とその制御法の開発	渡辺 治雄	33
943A	21073	脳循環障害による神経細胞死の発症機序の解析と治療法の開発	内村 英幸	38
944A	21079	疾患モデルマウスを用いたβ-ガラクトシドシスの病態解析と治療への応用	松田潤一郎	46
945A	21081	精神疾患の分子メカニズムの解明と新しい診断・治療法の開発への応用	西川 徹	53
946A	21086	新しい生体防御調節物質の機能と作用の解析	鈴木 和男	60
948A	21089	感染症が誘発する自己免疫疾患病態の解明とその医療への応用に関する研究	大川原明子	68
949A	21092	生体膜脂質を介する細胞機能調節機構の解明とその医療への応用	西島 正弘	80
950A	21096	免疫・内分泌系による神経系の障害機構の解明とその制御	田平 武	88
951A	21102	移植免疫寛容とマイクロキメリズムに関する基礎的研究	木村 廣光	92
952A	21104	G蛋白質共役型受容体の個体レベルでのゲノム機能評価	辻本 豪三	98
953A	21107	難治性腎疾患の病態解明と医療への応用に関する研究	藤本純一郎	111
954A	21110	食細胞による感染防御機構の解明と医療への応用	綱脇 祥子	118
955A	21121	抗酸化機能調節に及ぼす運動と栄養の影響に関する研究	樋口 満	126
956A	21130	神経変性疾患における神経細胞死の分子機構の解析	桃井 隆	134
957A	21142	C型肝炎ウイルスに対するインターフェロン(IFN)の治療効果を増強する新薬の開発研究	小長谷昌功	144
958A	21150	グリア細胞の機能調節による神経疾患治療法の開発	高坂 新一	149
959A	21166	新規破骨細胞形成抑制因子(OCIF)とそのリガンドである破骨細胞分化因子(ODF)の生理的役割の解明と医療への応用	高橋 直之	160
960A	21177	コレステロール代謝・動脈硬化関連遺伝子の発現調節因子の検索	松本 明世	167
961A	21179	血圧調節物質・動脈硬化起因物質などに関する分子生物学的、生化学的研究	南野 直人	178
964A	21215	アトピー性皮膚炎自然発症(NC)マウスを用いた皮膚掻痒症の発症機序の解明と新規治療薬の創製	廣田 直美	183
965A	21224	ヒト血液細胞情報伝達の解明とオリゴヌクレオチドを用いた治療法の開発	湯尾 明	193
966A	21225	癌化とウイルス感染を制御する細胞内情報伝達分子を標的とする薬剤の探索	松田 道行	200

20000969A	21228	細胞内シグナル伝達の解明による創薬シーズの探索	上原 至雅	……	204
968A	21234	スフィンゴ脂質の情報伝達の研究と抗血栓症薬開発	望月 直樹	……	208
969A	21279	中枢神経系におけるATP受容体の機能の解析と医療への応用	井上 和秀	……	213
941A	22055	宿主の防御機能動態と感染機構の解明と医療への応用	高津 聖志	……	221
949A	22088	ビタミンE欠乏性脊髄小脳失調症の病態解明と治療法の確立に関する研究	水澤 英洋	……	228
962A	22183	炎症・アレルギー性疾患の発症機構の解明と医療への応用	清水 孝雄	……	233
963A	22194	コレステロール代謝を標的とした抗動脈硬化薬開発のための基盤研究	新井 洋由	……	237

中枢神経系におけるATP受容体の機能の解析と医療への応用

所属 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部
研究者 井上 和秀

分担研究者

山口 時男 山之内製薬(株)・第一創薬研究所
劉 世玉 日本グラクソ(株) 筑波研究所
宮地 宏昌 協和発酵工業(株) 医薬総合研究所
岩永 敏彦 北海道大学獣医学部解剖学教室
木村 純子 福島県立医科大学薬理学講座
黒田洋一郎 東京都神経科学総合研究所
川村 将弘 東京慈恵会医科大学薬理学教室
荒木 博陽 岡山大学・医学部・薬剤部
赤池 紀扶 九州大学医学部第2生理学教室

要 旨

脊髄後根神経節における痛覚受容・伝達機構にATP受容体P2X3が関与していること、また、アロディニアの発症原因の一つにヘテロマーP2X2/3受容体の被刺激増大が考えられることが明らかとなった。孤束核において、細胞外ATPはシナプス前構造の興奮を介さずに、受容体チャネルからの直接的カルシウム流入によって興奮性シナプス伝達を引き起こすことによって、孤束核ネットワークを興奮させることを世界に先駆けて証明した。一方、その可塑性機構のために低酸素や虚血に対して極めて脆弱な神経構造である海馬では、細胞外ATPが、多シナプス性興奮の抑制と、抑制性神経伝達の高進を引き起こした。これは、側頭性てんかんなどの病態時における海馬の多シナプス性異常興奮を抑えることによって、グルタミン酸細胞毒性を抑える保護的機構と考えられる。

1. 研究目的

本研究は、受容体の遺伝子解析に基づく多様なATP受容体機能解析ツールを開発し、それを遺伝子強制発現系、細胞レベル、組織切片、全身動物病態モデルに応用し、ATPによる脳保護作用と痛み伝達について明らかにするものである。その成果により、全く作用機序を新たにする脳保護薬と鎮痛薬の開発に寄与しうる。

痛みについては、昨年度までに、痛みを伝える後根神経節(DRG)ニューロンには形態的に大、中、小の神経細胞があり、小型細胞ではP2X3モノマーが、中型細胞ではP2X2とP2X3のヘテロマーが発現して機能していること、そして丸ごとの動物を用いた行動薬理学的手法により、P2X3受容体の活性化が末梢では痛みを誘発(自発痛)し、脊髄シナプスではglutamate遊離を誘発させ、遊離されたglutamateによるNMDA受容体の活性化がATPによる痛覚過敏反応を引き起こすことが示された。この2つの疼痛反応に加え、本年度は、ATP受容体刺激により誘発されるもう一つの疼痛反応、メカニカル・アロディニアについてそのメカニズムを検討した。さらに、炎症モデル動物(ラット)を作成し、炎症発現状態におけるDRGでのP2X3mRNAおよびP2Y2mRNAの発現を検討した。また、モルフィンが奏効しにくい、神経因性疼痛モデルラットをつくり、そのDRG内のP2Xn mRNA量を経日的に測定することで本病態形成におけるP2Xnの関与を調べようとした。

脳保護作用に関する研究では、脳内ATP受容体が脳室系に隣接した脳内構造に多く発現している事実に着目し、これらが、虚血や低酸素、あるいは同期性アポトーシスなどの病態時、あるいは、てんかんなどの神経細胞の異常興奮時に上昇した細胞外ATPを検出して、それぞれの構造の機能に応じた最適の反

応を引き起こす「緊急事態デテクター」としての役割を持っているのではないかと考え、本年度は、自律機能制御に関与する求心性情報の中継・統合神経核である延髄孤束核および海馬に注目し、それぞれの神経ネットワークにおいてATP受容体がシナプス伝達をどのように修飾して、それぞれの機能を変化させるのか、脳スライスにおけるシナプス伝達をパッチクランプ法を用いてリアルタイム計測することによって明らかにすることを試みた。

2. 研究方法

メカニカル・アロディニア：メカニカル・アロディニアはATP受容体アゴニスト α,β -methyleneATP ($\alpha\beta$ meATP)をラット足掌(末梢)に投与した一定時間後に、その投与部位をVon Freyフィラメントで刺激し、どの強度のフィラメントで反応が引き起こされるかを観察することにより評価した(Von Frey Hair (VFH) test)。通常は疼痛反応を引き起こさない強度のフィラメントに反応した場合をアロディニア陽性と判断し、その強さはフィラメント強度に逆比例すると仮定した。アンタゴニストPPADSは、 $\alpha\beta$ meATP足掌投与の10分前に足掌投与した。また、痛み刺激伝達経路を明らかにするために生後2日目のラットにカプサイシンを負荷してDRGのなかでC-繊維脱落動物を作成した。更に8週令のウイスターラットを麻酔下致死させL4-6から摘出し酵素処理後機械刺激により単離したDRGを電気生理学的研究に使用した。

炎症モデル動物での *in situ* hybridization および免疫組織学的検討：complete Freund's adjuvant を足底部に注射をして、炎症モデル動物(ラット)を作製し(1週間後)、コントロールとともに後根神経節を採取した。これらの新鮮組織から凍結切片を作製し、P2X3およびP2Y2受容体mRNAに対するアンチセンスプローブ(35S標識)を用いた *in situ* hybridization 法を行った。また、P2X3に対する抗体による免疫染色も行った。*in situ* hybridization はP2Y2およびP2X3のcDNAのそれぞれに対するオリゴヌクレオチドを合成し³⁵Sラベル化しプローブとして使い、常法により行った。新鮮あるいは固定凍結切片を³⁵Sで標識したプローブで処理し、洗浄後、X線フィルムに露光した。また、乳剤をかけてオートラジオグラフを行った。

神経因性疼痛モデル作製とDRGからのtotal RNA抽出およびcDNA合成：神経因性疼痛モデル(Chung model)はSD系雄性ラット(5週齢、体重180~200g)をペントバルビタール麻酔下に、左側L5、L6の神経を固く結紮することにより作製した。DRGからのtotal RNA抽出およびcDNA合成はつぎのように行った。結紮後0、1、3、7日で左右後肢に対しVFH testを行い、機械刺激に対する閾値を測定した(各群4~5例)。閾値低下を確認した後ラットを脱血により致死せしめた後、素早く左L5、L6DRGを採取し、ドライアイス上で凍結した。total RNAの抽出には、ISOGEN(ニッポンジーン)を用いた。mRNAの定量は、ABI PRISM 7700を用いて半定量的に行った。SYBR Greenは二重鎖DNAに特異的に結合して蛍光を発する色素である。したがって、SYBR Green存在下でPCR反応を行うことでPCR産物をリアルタイムで検出することが可能である。さらに、ある一定の蛍光強度を閾値と設定し、その閾値に達するサイクル数をサンプル間で比較することでサンプル中のmRNAを半定量することが可能となる。理論上このサイクル数が1小さいとき、サンプル中に含まれるmRNAのコピー数は2倍多いことを意味する。この方法は一度に多検体のサンプルを効率的に定量することができるため、本研究のようなすべてのP2X受容体mRNAの経日的変動の網羅的な検討に適していると考えた。得られたcDNAを鋳型としてSYBR Greenを含む反応液(SYBR Green PCR core Reagents, Perkin-Elmer)中でP2X1-7、SNSおよびG3PDHに対する特異的プライマーを用いてABI Prism 7700上でPCR反応を行った。増幅されたDNA断片量は、SYBR Greenの蛍光強度を指標としてリアルタイムで検出した。PCR条件は95°C, 10 min, (94°C 30 sec, 60°C 30 sec, 72°C 30 sec) 40 cyclesで行った。閾値設定は、すべてのサンプルが指数関数的に増加している範囲で設定した。また、内部標準としてハウスキーピングジーンG3PDHを用いた。すなわち、P2Xの閾値に達するサイクル数を同じサンプルのG3PDHの閾値に達するサイクル数で除することによりサンプル間の補正を行った。したがって、この比が正常動物より大きいときはmRNAが減少し、小さいときは増加したことを意味する。

細胞内Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)測定：Grynkiewiczら(1985)のfura-2法を基本にした同時多点解析法によった。細胞を実験用緩衝液(BSS)で洗浄し、fura-2 acetoxymethylester (10 mM)を、37°C、30分間インキュ

バージョンすることにより細胞内にロードし、BSSで洗浄した。これを顕微鏡のステージ上に静置し、340 nm 及び 360 nm の励起光を交互に照射し、生じた蛍光 (F340 及び F360) を高感度ビデオカメラで測定し、蛍光画像としてフレームメモリに取り込み、パーソナルコンピュータで演算処理し $[Ca^{2+}]_i$ を算出した。

スライスパッチ電気生理学的手法法：シナプス伝達に及ぼす ATP 受容体刺激の効果を検討するために、孤束核もしくは海馬の急性脳スライスを作成し、同定された神経細胞の膜電流をホール・セル・パッチ・クランプ法で記録した。麻酔下に幼若ラットを断頭して脳を摘出し、孤束核 (NTS)、もしくは海馬を含む冠状断スライス (厚み 400 μ m) を作成した。記録チェンバー内にスライスを固定し、人工脳脊髄液で連続的灌流維持した。赤外線微分干渉コントラスト増強ビデオ顕微鏡で視察下にニューロンを同定し、神経細胞の膜電流をパッチクランプ・ホール・セル・モードで記録した。記録は、小径 2 次求心性ニューロン (孤束核) もしくは CA1、CA2 および CA3 錐体ニューロン (海馬) から行なった。また、孤束、あるいは、海馬分子網状線維層に同心円ステンレス双極電極を置き、投射線維を電気刺激した (100 μ s, 0.2-0.5 Hz)。拮抗薬は人工脳脊髄液に溶解し持続的に灌流した。作動薬は、人工脳脊髄液に溶解し、記録細胞の灌流上流でスライスの近傍 (数 100 μ m) に設置した投与用ガラスピペット (内径 0.6 mm) から直接スライスに適用した。細胞膜電流はパッチクランプ専用アンプ (日本光電 CEZ-2400 および Axon AxoPatch 200B) で記録し、AD 変換システム (ADInstruments, PowerLab) を用いてコンピュータのハードディスクに保存した。実験終了後、lucifer yellow を注入した例では、スライスを 4%PFA で固定し、共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss, LSM-410) で細胞形態の 3 次元再構築を行った。

3. 研究成果

ラット後肢足底部に ATP あるいは $\alpha\beta$ meATP を投与することで誘発される疼痛関連行動は、現在まで三種類が報告されている。一つは、自発痛と思われる投与側後肢の lifting および licking 行動 (nocifensive behavior)、二つめは熱刺激に対する痛覚過敏反応 (thermal hyperalgesia) である。これらはいずれも短時間に回復し、拮抗薬 PPADS により抑制され、幼仔期に capsaicin を処置して capsaicin 感受性神経を破壊したラットで消失する。本年度は、三つめの疼痛関連行動として機械刺激に対する異痛反応 (mechanical allodynia) が誘発されることを見出した。この allodynia 反応は PPADS により抑制されるが、前者二つの疼痛関連行動と大きく異なる点は、発現持続時間が比較的長く、capsaicin 感受性神経破壊ラットにおいても対照ラットと同程度に出現することである。この allodynia 反応の強度を既知の疼痛誘発物質である BK, 5-HT および PGE2 と比較したところ、BK および 5-HT よりはるかに強く、PGE2 に匹敵するものであった。しかし、PGE2 誘発 allodynia 反応は capsaicin 感受性神経破壊ラットにおいて消失することから、 $\alpha\beta$ meATP の allodynia とは作用機序が異なるものと考えられる。さらに、これらの疼痛関連行動を誘発する $\alpha\beta$ meATP の用量においては浮腫形成が認められなかった。 $\alpha\beta$ meATP 誘発疼痛行動は、交感神経節後神経破壊薬 6-OHDA や肥満細胞脱顆粒薬 compound48/80 の処置によっていずれも影響を受けなかった。したがって、 $\alpha\beta$ meATP 誘発疼痛関連行動は投与部位に入力している一次求心性線維上の P2X 受容体の活性化が起因していると思われる。また、capsaicin 感受性神経破壊ラットの L4-L6 DRG 神経細胞では、P2X3 受容体を介する急速な不活性化を伴った ATP 電流は消失するが、P2X2/3 受容体を介すると思われる緩徐な不活性化を伴った電流は変化していなかった。以上のことから、 $\alpha\beta$ meATP 誘発 nocifensive behavior および thermal hyperalgesia 発現には P2X3 受容体が、mechanical allodynia には P2X2/3 受容体が関与していると考えられる。

このアロディニア反応は神経因性疼痛の代表的な症状であるため、神経因性疼痛モデルラットを作成し、その動物の DRG での P2X3 の発現パターンを他の P2X 類と比較した。その結果、設定した閾値に達するサイクル数 () 内数値) の比較から、正常ラット DRG 内 mRNA 発現量は G3PDH (26.1) > SNS (27.3) \geq P2X3 (27.5) >> P2X5 (33.1), P2X4 (33.4), P2X6 (33.7), P2X7 (33.9) \geq P2X2 (34.2) > P2X1 (37.6) の順が多かった。Chung model においてその mRNA 量が減少することが知られている Sensory Neuron Selective (SNS) Na⁺ channel は、本研究においても減少していることが確認された。一方、P2X については、P2X4 には変動が認められなかった。しかしながら、P2X1 は、1 から 7 日目まで増加傾向が、P2X2、P2X5 および P2X6 は 1 から 7 日目まで減少傾向が認められた。また、P2X3 は 1 日目で減少傾向、P2X7 では 7 日目で

増加していた。

昨年度の報告に、ホルマリン試験での第2相は炎症性疼痛と関係があるとされており、この炎症性疼痛はP2X3受容体刺激により増強される事を示した。そこで、本年度は炎症モデル動物のDRGでのP2X3受容体の発現パターンを検討した。その結果、コントロールラットの後根神経節では、既報の通り、小型のニューロン群のみがP2X3mRNAの強いシグナルを発現していた。一方、炎症モデルラットの後根神経節では、小型ニューロンに加えて、コントロールでは見られない大型のニューロンの一部がP2X3mRNAを発現していた。炎症モデルの後根神経節におけるP2Y2mRNAの発現は、コントロールに比べると、全体的にやや増加していた。ところが、発現細胞は神経節細胞ではなく、それらを取り囲むグリア細胞(外套細胞)および神経線維中のシュワン細胞であることが判明した。

次に、脳保護作用に関する研究結果を述べる。ラット孤束核P2X受容体活性化による孤束核興奮性ネットワークシナプス伝達の促進を検討するために、孤束核の小径(細胞体長径15 μ m以下)ニューロンを同定し、膜電流をホール・セル・パッチ・クランプ法で記録した。孤束の電気刺激によって単シナプス性に誘発興奮性シナプス後電流を示す2次求心性ニューロンを対象とした。これらのニューロンの多くは、共焦点顕微鏡による実験後の形態解析の結果、数本の短い樹状突起を有し軸索が孤束核内で終わる介在ニューロンであった。ATP(10⁻⁶-10⁻⁴M)が、孤束刺激誘発の興奮性シナプス後電流の振幅を有意に抑制すると同時に、自発性の興奮性シナプス後電流頻度を有意に増加する事実を昨年度報告した。本年度はこの自発性興奮性シナプス後電流頻度の増加機構を解明した。この増加は、テトロドトキシンによって影響されず、細胞外液中のカルシウムイオン濃度に依存していた。したがって活動電位発生に依存しない細胞外からのカルシウム流入によって生じていることが分かった。そのカルシウムの流入起源を同定するため、電位依存性カルシウムチャネルの関与を検討した。孤束刺激誘発電流を完全に消失させる濃度のカドミウムイオン存在下にATPの影響を調べたところ、カドミウム非存在下と同程度のこの頻度増加が観察された。この事実は、孤束核2次求心性ニューロンに収斂する興奮性シナプスの終末にカルシウム透過性のP2X受容体が発現しており、そこからのカルシウム流入が、電位依存性カルシウムチャネルの活性化を介さずにグルタミン酸の放出を引き起こしていることを明示している。この事実をさらに確認するために、電子顕微鏡を用いて、post-embeddingの免疫組織化学を行なったところ、孤束核における興奮性シナプス前の細胞膜にP2Xサブユニットが発現していることが示された。このシナプス後電流頻度増加はATP(ED₅₀=3.3 \times 10⁻⁴M)でも、 α,β -methylene ATP(ED₅₀=8.0 \times 10⁻⁵M)でも生じ、その効力は α,β -methylene ATP>ATPであった。いずれの作用もPPADS(20-40 μ M)でほぼ完全に消失した。ATPによって発生した興奮性シナプス後電流は、振幅が大きく(平均20pA)、時定数も小さく、膜電流固定記録下シナプス後細胞に活動電位を発生させるに十分であった。以上の成果は、孤束核2次ニューロンに投射する興奮性ニューロンのインパルス発生を伴わずに、細胞外ATP濃度の上昇のみによって、グルタミン酸作動性興奮性シナプス伝達が起こることを明示している。

さらにラット海馬多シナプス性シナプス伝達に及ぼすATPの影響を検討した。まず海馬CA1およびCA2領域の錐体細胞から全細胞膜電流を記録し、それぞれに投射する分子網状層の電気刺激によって生ずるシナプス後電流に及ぼすATPおよびアデノシンの作用を検討した。電気刺激は単シナプス性の興奮性内向き電流を誘発したが、picrotoxinの灌流によってさらに、多シナプス性バースト状内向き電流、および、遅延外向き電流が顕現した。いずれもCNQXで消失した。遅延外向き電流は、約-100mVの反転電位を示し、phaclofenによって有意に減弱し、さらに、細胞内セシウムおよびQX-314灌流によって消失したことから、多シナプス性に放出されたGABAがシナプス後膜のGABAB受容体を活性化させて生じたK⁺電流と同定された。単シナプス性内向き電流は、ATPとアデノシンのいずれによってもほぼ同程度まで抑制され、いずれの効果も8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine(DPCPX)によって有意に減弱した。多シナプス性内向き電流もATPとアデノシン両方によって有意に抑制されたが、アデノシンによる抑制作用がDPCPXによって有意に減弱したのに対し、ATPによる抑制はDPCPXでは減弱しなかった。ATPによる抑制は、PPADSでも減弱しなかった。ついで、ラット海馬自発性シナプス伝達に及ぼすATPの影響を検討するために、海馬CA3から自発性の抑制性および興奮性シナプス後電流を同時記録し、ATP(100 μ M)およびアデノシン(100 μ M)は抑制性および興奮性シナプス後電流の頻度を減少させた。ところが、ATP(1mM)は、抑制性シナプス後電流頻度を増加し、興奮性シナプス後電流頻度を減少させるという

相反的な作用を同時に示した。このうち、興奮性シナプス後電流頻度の減少は、DPCPXによって消失した。また、 α, β -methylene ATP は、抑制性シナプス後電流頻度を増加したが、興奮性シナプス後電流頻度の減少は起こさなかった。これらの効果は tetrodotoxin 存在下では観察されなかった。

4. 考察

痛みの発生や疼痛反応閾値に及ぼす ATP 受容体の役割を行動薬理学的手法により疼痛モデルを作成して検討した。痛みは末梢で発生し、DRG ニューロンにより脊髄にまで伝えられ、そこでシナプス伝達を介して脊髄後角ニューロンに伝えられ、さらに上位の中樞へと伝達される。これまでの研究により、末梢で ATP 受容体を刺激することにより痛みが誘発されることが明らかとなった。末梢での痛み誘発の強さはブラジキニンにほぼ匹敵し、プロスタグランジン E2 やセロトニンよりも強いと考えられた。次に、DRG ニューロンから後角ニューロンへのシナプス伝達における ATP 受容体の役割をホルマリンテストおよびカプサイシンテストで検討した。その結果、両テストにおいて ATP 受容体ブロッカー PPADS 髄空内投与は強力に用量依存的に疼痛作用を抑制した。このことから、ATP 受容体はこのシナプス伝達において痛み情報を伝えるための重要な働きをしていることがわかった。さらなる研究により、脊髄後角に終末する一次知覚神経 (C-繊維) 末端部に存在する P2X3 受容体の活性化が glutamate 遊離を誘発させ、遊離された glutamate による NMDA 受容体の活性化が痛覚過敏反応を引き起こしている可能性も明らかとなった。本年度は、ATP 受容体を介して発現する異痛症 (メカニカルアロディニア) について検討した。このアロディニアは既存の鎮痛薬がなかなか奏効しない神経因性疼痛の代表的な症状であり、そのメカニズム解明は新規の鎮痛薬開発に貢献することが出来ると期待されている。今回の研究成果から、アロディニアの発症原因の一つに P2X2/3 受容体の被刺激増大の可能性がでてきた。この受容体ブロッカーが一部のアロディニアを抑制するかどうかについては今後のさらなる研究を待たなければならないが、ニューロパチックペインコントロールになかなか有効な策を講じることが出来ない現状を鑑みれば、ここに一つの可能性を求めることは妥当であろう。そこで、神経因性疼痛モデルでの P2X 類の発現パターンを対照群と比較したところ、今回の結果では、P2X3 mRNA は結紮後 1 日目で減少傾向が認められた。最近 Chung model において DRG 内の小型神経細胞において P2X3 immunoreactivity が減少していることが報告されており、今回の結果は矛盾しないものであった。しかし、P2X3 発現はモデルの作製法 (緩結紮あるいは完全結紮) により異なり、病態形成への P2X3 の役割もモデルにより異なっていることが示唆された。また、P2X1 mRNA は増加傾向が観察されたが、すべてのサブタイプのうちで最も発現量が低く、実際の病態形成における影響は小さい可能性が考えられた。一方、P2X2、P2X5 および P2X6 の mRNA 量の減少が確認されたが、P2X1 と同様にもともとの発現量は非常に低く病態形成における役割は小さいものと思われた。しかしながら、P2X3 以外にもほとんどのサブタイプで mRNA 発現変動が起こっていることから、傷害を受けた感覚神経の ATP 感受性は、全体としては変化しており、本モデルの病態形成に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられた。

炎症や火傷に伴う強い痛みは、臨床医学的にも重要な問題となっている。痛みの軽減あるいは除去法を開発・導入するには、痛覚発生や伝達機構の解明が必要である。これまでに、後根神経節の主に小型ニューロンに P2X3 受容体が選択的に発現し、ATP が痛みの伝達的一端を担っていることが示されている。本研究ではさらに一歩進め、病的な状態での P2X3 受容体および、痛みとの関連性が示唆されている P2Y2 受容体 mRNA の発現を炎症モデル動物で検討した。顕著な差異はコントロールとの間で認められなかったが、正常状態では発現しない大型ニューロンの一部が P2X3 mRNA を発現していた。本研究プロジェクトの予備実験により、P2Y2 が痛みの伝達に関与することが示唆されているが、後根神経節での P2Y2 の発現様式は正常状態においても知られていない。今回の検索では、P2Y2 の強いシグナルは観察されなかったが、中程度の強さのシグナルが外套細胞とシュワン細胞を含むグリア系細胞に発現しており、その発現の強さは炎症モデルでやや強くなっていた。ただし、痛覚伝達に関わる後根神経節神経細胞にはシグナルが発現していなかったことから、P2Y2 の直接的な関与はないと思われる。

脳保護作用についてであるが、孤束核 (nTS) は、化学受容器および圧受容器をはじめとする諸種内臓性受容器からの一次求心性線維終末が脳内で最初のシナプスをつくる神経核である。孤束核に入力された内臓性情報はその後、孤束核内のネットワークで統合的処理を受けた後、循環、呼吸、消化など様々な自

律機能に関与する諸核へ投射される。また孤束核は、第4脳室から脊髓中心管へ向けて脳脊髄液が圧縮されて流れ込む領域に位置し、最後野とともに、脳脊髄液中の組成変化を検出し得る神経構造であることが示されている。本年度の研究成果は、孤束核のシナプス前構造に P2X 受容体が発現しており、それが単に細胞外の ATP を感知して細胞を興奮させるのみならず、シナプス前 P2X 受容体から流入したカルシウムが、電位依存性カルシウムチャネルからのカルシウム流入がない状態においてもシナプス伝達を起こすのに十分な伝達物質の放出を引き起こすことを明示している。これは中枢神経系の native なシナプスでは初めて示された事実であり、脳内の P2X 受容体が、伝達物質放出を引き起こすカルシウムチャネルとしての機能を持ちうることを実証したものである。この事実の意義は大きい。グルタミン酸による興奮性シナプス伝達は、脳内の最も主要な興奮伝達機構であり、その放出と受容はシナプス前後のさまざまな分子機構によってダイナミックに制御されている。孤束核においては、グルタミン酸が NO 産生を刺激する事実、代謝型グルタミン酸受容体を介してシナプス伝達を制御する事実、さらに、過剰なグルタミン酸作動性入力 AMPA 受容体のカイネティクスを変化させて long-term depression (LTD) を起こす事実などが報告されている。ATP が、孤束核 2 次求心性細胞を直接的に興奮させるのではなく、むしろ、グルタミン酸放出の活性化を介して孤束核ネットワーク全体を興奮させた事実は、ATP がこれらの制御系を活用できるような「生理的」興奮状態を孤束核ネットワークで引き起こしうることを意味している。さらに、培養星状膠細胞がさまざまな刺激に応じて ATP を放出する事実が近年明らかにされており、孤束核シナプスを取り囲む星状膠細胞の突起から放出された ATP がシナプス前細胞の興奮なしにグルタミン酸作動性シナプス伝達を引き起こすという新しい様式のグリアニューロン連関が孤束核で起きている可能性が考えられる。細胞外 ATP による中枢機能の制御機構に関する重要な知見であり、さらに研究を続けることによって、将来、脳機能障害、脳細胞死の予防など、プリン作動性薬物の重要な応用が見い出される可能性がある。また、Native な海馬ネットワークにおいて、ATP が P2 受容体系を介して、GABAA 受容体遮断下に観察される多シナプス性の興奮性入力を抑制する事実が示された。海馬 GABAA 信号系の低下は側頭葉性てんかんを誘発することが知られているので、この観察事実は、てんかんなどの神経活動異常高進時に、ATP が、グルタミン酸放出を押さえることにより、グルタミン酸負荷に対して脆弱な海馬神経細胞に対し、保護的に働く可能性を示唆する。また、ATP が、CA3 錐体細胞に収斂する抑制性シナプス入力を選択的に増強すると同時に、おそらくはシナプス前アデノシン A1 受容体を介して興奮性入力を選択的に抑制するという相反性制御が認められた。この結果は、昨年度報告した孤束核における ATP とアデノシンによる「チームプレイ」と同じように、ATP とそれから代謝されて産生されるアデノシンが、CA3 錐体細胞の興奮性を低下させるために協働的に機能することを示している。

5. まとめ

脊髄後根神経節における痛覚受容・伝達機構に ATP 受容体 P2X3 が関与していることは、本研究による結果から支持される。また、アロディニアの発症原因の一つに P2X2/3 受容体の被刺激増大の可能性がでてきた。しかし、ATP が関与する痛覚の種類、痛みの強さと P2X3 発現の関係についてはさらなる精査が必要である。

ATP 受容体の中枢性自律機能制御における役割をネットワーク・レベルで同定するために、脳スライス標本で孤束核および海馬ニューロンのシナプス後電流を計測した。孤束核において、細胞外 ATP はシナプス前構造の興奮を介さずに、受容体チャネルからの直接的カルシウム流入によって興奮性シナプス伝達を引き起こすことによって、孤束核ネットワークを興奮させることを証明した。これは、脳内の native なシナプスにおける世界初の証明であるとともに、孤束核 P2X 受容体の直接的活性化が、自律神経系を介した生体の「防御反応」を引き出す可能性を示す重要な実験事実である。また、その可塑性機構のために低酸素や虚血に対して極めて脆弱な神経構造である海馬では、孤束核と反対に、細胞外 ATP が、多シナプス性興奮の抑制と、抑制性神経伝達の高進を引き起こした。これは、側頭性てんかんなどの病態時における海馬の多シナプス性異常興奮を抑えることによって、グルタミン酸細胞毒性を抑える保護的機構と考えられる。これらはいずれも、近年証明されたマイクログリアの例と同じように、細胞外の ATP を危険信号として受け取り、それに対処するために各組織ごとに最適の反応を引き出す、という中枢神経系における P2 受容体の重要な機能的役割を示す例であるといえるだろう。

以上のように、本研究により ATP 受容体の中枢神経系における役割に関して非常に重要な新知見が次々と明らかとなり、研究は素晴らしい進展を見せた。

6. 研究発表

原著

- (1) J. S. Rhee, Z. M. Wang, J. Nabekura, K. Inoue and N. Akaike. ATP facilitates spontaneous glycinergic IPSC frequency at dissociated dorsal horn interneurone synapses, *J.Physiol.(Lond.)*, 524, 471-483, 2000
- (2) A.Tomioka, S.Ueno, K.Kohama, F.Goto, K.Inoue. Propofol potentiates ATP-activated currents on recombinant P2X4 receptor channels expressed in human embryonic kidney 293 cells. *Neurosci Lett.* 284,167-170, 2000
- (3) I.Hide, M.Tanaka, A.Inoue, K.Inoue, K.Nakajima, S.Kohsaka and Y.Nakata. Extracellular ATP triggers TNF- α release from rat microglia. *J.Neurochem.* 75, 965-972, 2000
- (4) M. Tsuda, S. Koizumi, A. Kita, Y. Shigemoto, S. Ueno and K. Inoue. Mechanical allodynia caused by intraplantar injection of P2X receptor agonist in rats: Involvement of the heteromeric P2X2/3 receptor signalling in capsaicin-insensitive primary afferent neurons. *J.Neurosci.* 20, RC90(1-5), 2000
- (5) S.Honda, Y.Imai, K.ohsawa, Y.Nakamura, K.Inoue and S.Kohsaka. Extracellular ATP induces membrane ruffling and random migration in rat primary cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptor(s). *J.Neurosci.*, in press.
- (6) Kato F, Shigetomi E. Distinct modulation of evoked and spontaneous EPSCs by purinoceptors in the nucleus tractus solitarii of the rat. *J Physiol (Lond)* 2001; 530: 469-86.
- (7) Kato F, Kawamura M Jr, Masaki E. Distinct responses to ATP of identified neurons in mesencephalic trigeminal nucleus and locus coeruleus in the rat pontine slice. In: Suketa Y, Carafoli E, Lazdunski M, Mikoshiba K, Okada Y, Wright EM, ed. *Control and Diseases of Sodium Dependent Transport Proteins and Ion Channels*. Amsterdam: Elsevier, 2000: 411-2.
- (8) Masaki, E. Yamazaki, K., Ohno, Y., Nishi, H., Matsumoto, Y., Kawamura, M., The anesthetic interaction between adenosine triphosphate and N-methyl-D-Aspartate receptor antagonists in the rat. *Anesth. Analg.* 2001; 92: 134-9.
- (9) Hiroaki Araki, Machiko Kawasaki, Naoyuki Matsuka, Akira Nakatsuma, Kazuhide Watanabe, Koujiro Futagami and Yutaka Gomita : The effect of exposure to cigarette smoke on pharmacokinetics and pharmacodynamics on zonisamide in rats. *Acta Medica Okayama* 53, 185-188,1999
- (10) Akira Nakatsuma, Hiromu Kawasaki, Yuji Kurosaki, Koujiro Futagami, Hiroaki Araki, Yutaka Gomita : Effects of long-term treatment with calcium antagonists on periaarterial nerve function in the mesenteric artery of spontaneously hypertensive rat. *Japanese Journal of Pharmacology* 84, 156-162,2000
- (11) Katsuya Suemaru, Hiroaki Araki, Yutaka Gomita : Involvement of 5-hydroxy- tryptamine1A receptors in nicotine-induced tail tremor in rats. *European journal of Pharmacology* 408,19-23, 2000
- (12) Yasuhiko Hashimoto, Katsuya Suemaru, Takahiko Yamamoto, Tenny Kawakami, Hiroaki Araki, Yutaka Gomita : Effect of immobilization stress on anticonvulsant actions and pharmacokinetics of zonisamide in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* (in press)
- (13) Mowa CN & Iwanaga T. Differential distribution of estrogen receptor- α and - β mRNAs in the female reproductive organ of rats as revealed by in situ hybridization. *J. Endocrinol.* 165, 59-66 (2000).
- (14) Mowa CN & Iwanaga T. Developmental changes of the estrogen- α and - β mRNAs in the female reproductive organ of the rat. An analysis by in situ hybridization. *J. Endocrinol.* 167, 363-369 (2000).
- (15) Seino S, Iwanaga T, Nagashima K & Seino S. Diverse roles of KATP channels learned from Kir6.2 genetically engineered mice. *Diabetes* 49, 311-318 (2000).
- (16) Hosoda Y, Winarto A, Iwanaga T & Kuwahara A. Mode of action of ANG II on ion transport in guinea pig colon. *Am. J. Physiol.* 278, G625-G634 (2000).
- (17) Ozaki N, Shibasaki T, Kashima Y, Miki T, Takahashi K, Ueno H, Sunaga Y, Yano H, Matsuura Y, Iwanaga T, Takai Y & Seino S. cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. *Nature Cell Biology* 2, 805-811 (2000).

- (18) Iwanaga T, Shikichi M, Kitamura H, Yanase H & Nozawa-Inoue K. Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Arch. Histol. Cytol.* 63, 17-31 (2000).
- (19) Mitsuhashi N, Miki T, Senbongi H, Yokoi N, Yano H, Miyazaki M, Nakajima N, Iwanaga T, Yokoyama Y, Shibata T & Seino S. MTABC3, a novel mitochondrial ATP-binding cassette protein involved in iron homeostasis. *J. Biol. Chem.* 275, 17536-17540 (2000).
- (20) Winarto A, Miki T, Seino S & Iwanaga T. Morphological changes in pancreatic islets of KATP channels in the survival of insulin cells and the maintenance of islet architecture. *Arch. Histol. Cytol.* 64, 59-67 (2001).
- (21) Miki T, Iwanaga T, Nagashima K, Ihara Y & Seino S. Role of ATP-sensitive K⁺ channels in cell survival and differentiation in the endocrine pancreas. *Diabetes* 50, Suppl. 1, S48-51 (2001).
- (22) Fujii, S., Kurroda Y. & Kato H. Long-term potentiation induction - a synaptic catch mechanism released by extracellular phosphorylation. *Neuroscience* 96, 2, 259-266 (2000)
- (23) Fujii, S., Kato, H., Ito, K., Itoh, S., Yamazaki, Y., Sasaki, H. & Kuroda, Y. Effects of A1 and A2 adenosine receptor antagonists on the induction and reversal of long-term potentiation in guinea pig hippocampal slices of CA1 neurons. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 20, 3, 331-350 (2000)
- (24) Ohkubo, S. Kimura, J., Nakanishi, H. and Matsuoka, I. Effect of P1 and P2 receptor antagonists on β,γ -methylene ATP- and CGS21680-induced cyclic AMP formation in NG108-15 cells. *Br. J. Pharmacol.* 129, 291-298 (2000)
- (25) Ohkubo S., Nakanishi H., Kimura J., and Matsuoka I. (2000c) Effects of AMP derivatives on cyclic AMP levels in NG108-15 cells. *Br.J. Pharmacol.* 129, 1244-1250.
- (26) Ohkubo S., Kimura J., and Matsuoka I. (2000). Correlation between adenine nucleotide-induced cyclic AMP elevation and extracellular adenosine formation in NG108-15 cells. *Jpn. J. Pharmacol.* 84, 325-333
- (27) Ohkubo S., Kimura J., and Matsuoka I. (2000) Ecto-alkaline phosphatase in NG108-15 cells : a key enzyme mediating P1 antagonist-sensitive ATP response. *Br. J. Pharmacol.* 131, 1667-1672.
- (28) Ohkubo S., Kumazawa K., Sagawa K., Kimura J., and Matsuoka I. (2001) b,g-Methylene ATP-induced cAMP formation in C6Bu-1 cells: involvement of local metabolism and subsequent stimulation of adenosine A2B receptor. *J. Neurochem.* 76, 872-880.

総説

- (29) 井上和秀. ATPによる神経伝達物質放出の抑制. *自律神経*, 37, 329-331, 2000
- (30) 津田誠、小泉修一、井上和秀. ATPと痛み. *日本薬理学雑誌*, 116, 343-350, 2000
- (31) 井上和秀. 疼痛制御におけるATP受容体の役割. *医学の歩み* 195, 613-616, 2000
- (32) 井上和秀. ATP受容体. *緩和医療学* 3, 94-95, 2001

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社