

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

若手研究者奨励研究報告書

# 目 次

## 課題番号

### 第1分野

|       |       |                                |       |    |    |
|-------|-------|--------------------------------|-------|----|----|
| 20000 | 13001 | アドレノメデュリン投与による重症心不全治療の臨床評価     | 永谷 憲歳 | …… | 1  |
| 1009A | 13002 | 子宮体癌に対するヒト型モノクローナル抗体の作製        | 福地 剛  | …… | 5  |
| 1008A | 13003 | 新しい変異導入法の開発による神経疾患モデルマウスの樹立    | 笹岡 俊邦 | …… | 10 |
| 1010A | 13004 | 病原細菌のコミュニケーションシステムを標的とした医薬品の開発 | 阿部 章夫 | …… | 15 |
| 1006A | 13005 | 糖部立体配座を固定した人工核酸によるアンチセンス医薬品の開発 | 小比賀 聡 | …… | 20 |
| 1007A |       |                                |       |    |    |

### 第2分野

|       |       |   |       |    |    |
|-------|-------|---|-------|----|----|
| 1011A | 23001 | 慢性C型肝炎に対するインターフェロン治療効果に関与する宿主因子の解析と医療への応用 | 土方美奈子 | …… | 29 |
| 1012A | 23002 | ゲノム情報に基づいた移植免疫機構の解明と免疫抑制療法                | 梨井 康  | …… | 35 |
| 1016A | 23003 | ヒトヘルペスウイルス8による悪性腫瘍発症機構の解明と医療への応用          | 片野 晴隆 | …… | 42 |
| 1013A | 23004 | 血管内造血機構の解明と臍腸間膜動脈より新規造血幹細胞因子の単離           | 高倉 伸幸 | …… | 47 |
| 1014A | 23005 | BRS-3安定発現細胞系を用いた新規摂食調節ペプチドの同定と病態生理学的意義の解明 | 宮里 幹也 | …… | 52 |
| 1015A | 23006 | ATP受容体を介した痛み情報伝達機序の解明と医療への応用              | 小泉 修一 | …… | 57 |
| 1018A | 23007 | トリプトファンによる細胞性免疫の制御                        | 五條 理志 | …… | 61 |
| 1019A | 23008 | 気管支喘息における気道リモデリングの制御についての検討               | 中尾 篤人 | …… | 66 |
| 1017A | 23009 | 顔面神経再生に際して発現制御を受ける遺伝子データベースの構築            | 赤澤 智宏 | …… | 69 |

### 第3分野

|       |       |                                       |       |    |    |
|-------|-------|---------------------------------------|-------|----|----|
| 1020A | 33001 | 循環器病治療薬開発に不可欠な小動物における循環動態テレメトリシステムの開発 | 佐藤 隆幸 | …… | 73 |
| 1022A | 33002 | 有機アニオントランスポーターを介した小腸および腎臓における排出・分泌機構  | 崔 吉道  | …… | 77 |
| 1021A | 33003 | 組換えヒトP450酵素の代謝反応を利用した医薬品等の評価方法の開発     | 山崎 浩史 | …… | 81 |

### 第4分野

|       |       |   |       |    |     |
|-------|-------|---|-------|----|-----|
| 1025A | 43001 | 腹膜透析の重篤な合併症である硬化性被嚢性腹膜炎 (Sclerosing Encapsulating Peritonitis) の診断と治療に関する研究 | 平原 一郎 | …… | 89  |
| 1023A | 43002 | 多発性硬化症における病原性T細胞特異的抑制方法の検討  | 三宅 幸子 | …… | 98  |
| 1024A | 43003 | 熱帯病に対する新たな治療薬の開発に関する研究  | 小出 達夫 | …… | 103 |

|       |       |   |              |
|-------|-------|---|--------------|
| 20000 | 第5分野  |   |              |
| 1026A | 53001 | カルボシラン dendリマーを基本骨格としたペロ毒素中和剤の開発  | 西川喜代孝 …… 109 |
| 1027A | 53002 | 新規抗酸化酵素ペルオキシレドキシンを標的とする抗マラリア薬の開発に関する研究                                  | 河津信一郎 …… 113 |
| 1028A | 53003 | Non-typable Haemophilus influenzae 由来リポオリゴ糖抗原に対するペプチドミミックのワクチン応用についての研究 | 橋本 雅仁 …… 119 |
| 1029A | 53004 | RNAヘリカーゼを標的とする抗ウイルス剤の開発   | 清水 博之 …… 124 |
| 1030A | 53005 | 薬用植物の分子エンジニアリングによる抗酸化物質生産の改良  | 山崎 真巳 …… 132 |
|       | 第6分野  |   |              |
| 1031A | 63001 | 分子間相互作用制御による高度安定型タンパク質製剤の設計   | 伊豆津健一 …… 137 |
| 1032A | 63002 | 生分解性を有する新規な化学合成ハイドロゲルの開発と組織再建スキャホールドへの応用                                | 山岡 哲二 …… 140 |
| 1033A | 第7分野  |   |              |
|       | 73001 | ヒト破骨細胞と骨芽細胞培養系を用いた薬物の有効性と安全性に関する検討                                      | 和田 誠基 …… 151 |

## ATP受容体を介した痛み情報伝達機序の解明と医療への応用

所属 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部  
研究者 小泉 修一

### 要 旨

ATP が一次知覚神経の情報伝達に果たす役割を明らかにする目的から、ラット後根神経節 (DRG) 細胞の P2Y 受容体に注目して検討を行った。P2Y2 受容体が capsaicin 感受性小型 DRG 神経に存在し、疼痛伝達と関連している可能性が明らかになった。

### 1 研究目的

細胞内の高エネルギー物質 “ATP” の受容体蛋白質がクローニングされたこと (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 10449-53, 1993), 及びそれが種々の組織に存在していることが明らかにされたことにより, “神経伝達物質 ATP” の役割が注目されるようになってきている。なかでも 1995 年に新たにクローニングされたイオン透過型 ATP 受容体 P2X3 が、一次求心性神経の中継点である後根神経節 (DRG) 及び三叉神経節にのみ限局していることが明らかとなり (Nature 377, 432-435, 1995)、“知覚と ATP” の関係は急速に注目されるようになってきている。P2X3 受容体は DRG のなかでも、侵害刺激を伝える中型細胞 A $\delta$  繊維及び小型細胞 C 繊維に限局されていることから, “P2X3 受容体と痛み” は近年特に注目されている。これに対し、触覚などの非侵害性の知覚情報を伝えている DRG 大型細胞 A $\beta$  繊維には P2X3 受容体は存在せず、G 蛋白共役型 P2Y1 受容体が発現している。さらに他の P2Y 受容体が存在していることを示唆する報告もある。従って、ATP がこれら受容体サブクラスに固有の、異なる知覚情報伝達に寄与している可能性が考えられるが、その機能については全く不明である。従って本研究は、ATP 受容体、特に “P2Y 受容体” に注目し、P2Y 受容体を介する DRG 細胞内シグナル伝達様式を明らかとし、P2Y 受容体と痛覚情報伝達系の関連性を明らかとし、将来的に疼痛治療・予防に直接つながる結果を得ることを目的とするものである。

### 2 研究方法

#### (1) 細胞レベルでの検討

(a) 神経細胞急性単離及び培養：6 週齢の Wistar 系ラットを麻酔下で致死させ、L4-6 から後根神経節細胞を取り出しパパイン/コラゲナーゼ混合酵素溶液で処理した後、機械的に単離して実験に使用した。DRG 培養は、上述した神経細胞を、GDNF/NGF を含む培養液にて 2 日間培養した後、実験に使用した。

(b) In situ hybridization 及び免疫組織学的検討：In situ hybridization は、各種 P2Y 受容体 cDNA に対するオリゴヌクレオチドを合成し、<sup>35</sup>S ラベル化しプローブとして用い、常法により行った。凍結 DRG 切片を <sup>35</sup>S 標識プローブで処理、洗浄後、X 線フィルムに露光し、乳剤をかけてオートラジオグラフィーを行い画像化した。C 繊維及び A $\delta$  繊維のマーカーである anti-peripherin 抗体及び anti-neurofilament 200kD 抗体をそれぞれ用い、常法に従い培養 DRG 神経細胞を染色した。

(c) RT-PCR: 培養 DRG 細胞より RNA を抽出し、oligo(dT)-Latex により poly(A)+RNA を回収した。Reverse transcriptase により cDNA を合成後、各種 P2Y 受容体プライマーを用いて PCR を行った。

### (b) Ca<sup>2+</sup>イメージング

急性単離及び培養 DRG を用い、fura-2 法により、単一細胞の同時多点解析法を行った。細胞に fura-2AM を取り込ませ、洗浄した後、顕微鏡ステージ上に静置し、各種 ATP アナログ、high K<sup>+</sup> 及び capsaicin を灌流装置より細胞に添加した。340 及び 360 nm の励起光を照射し、生じた蛍光(520 nm)を高感度 SIT カメラで捉え、蛍光画像としてパーソナルコンピューターに取り込み、解析を行った。これら汎用型 Ca<sup>2+</sup>イメージングに加え、共焦点レーザー顕微鏡による、時間及び空間分解能の高い詳細な検討も行った。

### (c) 電気生理学的検討

急性単離及び培養 DRG を用い、ATP により惹起される内向き電流の測定は既報 (Hamill et al., Pflugers Arch., 391, 85-100, 1981) に従って行った。

#### (2) 丸ごとの動物を用いた検討

ATP 及びそのアナログ刺激を後肢に投与した後、各種疼痛関連行動(熱刺激に対する痛覚過敏反応、機械刺激による異痛反応)を観察した。

## 3 研究成果

### (1) 機能的 P2Y 受容体の発現

細胞外 Ca<sup>2+</sup>を除去した場合、ATP による細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) 上昇は、①消失、②一部消失及び③不変の3つのパターンを呈した (Figure 1 A)。①は P2X 受容体のみが、②は P2X 及び P2Y 受容体の両者が、③は P2Y 受容体が主に発現している DRG 神経であると考えられる。②及び③に属する DRG 神経細胞が多くを占めた。RT-PCR により各種 P2Y 受容体 mRNA の発現を調べると、P2Y1, P2Y2 及び P2Y4 受容体 mRNA が確認された (Figure 1B)。RT-PCR により DRG に P2Y を発現している DRG 神経細胞のうち、60 %以上の細胞が、UTP に応答し、P2Y<sub>i</sub> 受容体拮抗薬 A3P5PS に非感受性であった (Figure 1C, #2)。よって以下は、P2Y 受容体 agonist として、UTP を用いて実験を進めた。

### (2) UTP により惹起される[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇応答の特徴

UTP は濃度依存的に DRG 神経細胞の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇応答を引き起こした。このとき、最小有効濃度は 3 μM、ED50 値は 20 μM、用量依存曲線の Hill 系数は 1.1 であった (Figure 2A)。UTP によるこれら Ca<sup>2+</sup> 応答は、P2 受容体非選択的拮抗薬 suramin により消失し (Figure 2Ba)、細胞外 Ca<sup>2+</sup>除去の影響を受けず (Figure 2Bb)、phospholipase C (PLC)阻害剤 U73122 及び小胞体 Ca<sup>2+</sup>ATPase 阻害剤 cyclopiazonic acid (CPA)によって消失した (Figure 2Bc, d)。従って、UTP はおそらく G<sub>q/11</sub> と共役した P2Y 受容体を刺激することにより、PLC の活性化とそれに引き続き inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP<sub>3</sub>)を産生し、小胞体上の InsP<sub>3</sub> 受容体から Ca<sup>2+</sup>放出を引き起こしているものと考えられる。

### (3) UTP 応答 DRG 神経細胞の性質

Capsaicin は侵害受容器 VR1 受容体を刺激することが知られている。そこで、次に UTP 応答細胞の capsaicin 感受性について検討した。UTP 添加後、capsaicin 刺激を行い、両者の応答性を調べた (Figure 3A)。UTP 及び capsaicin の両者に応答する細胞 (Aa)、capsaicin (Ab) もしくは UTP (Ac) の一方のみに応答する細胞、さらに両者に応答しない細胞 (Ad) に分類され、観察した 1,000 以上の DRG 神経細胞のうち、(Aa) の性質を示すものが一番多かった (458/1,061)。UTP に応答した細胞の約 75 %は capsaicin にも応答し、capsaicin に応答した細胞の約 70 %は UTP にも応答した (Figure 3B)。従って、P2Y2 受容体と VR1 受容体の多くは、同じ DRG 神経細胞に共存していることが明らかとなった。さらに、C 繊維のマーカーである anti-peripherin 抗体及び Aδ繊維のマーカーである anti-neurofilament 200kd 抗体を用いて DRG 細胞を染色すると、ほとんどが anti-peripherin 抗体陽性細胞であり、C 繊維が多い培養系であることがわかった。最後に、DRG 神経細胞の大きさと、UTP 応答との関連性を検討した。VR1 受容体は小型の DRG 神経細胞 C 繊維に発現している。Capsaicin 感受性神経細胞の直

径分布を解析すると、それらは 20~30  $\mu\text{m}$  に集中していた (D: Cap(+))。UTP 応答細胞のうち capsaicin に感受性のある細胞の直径分布は、ほぼ capsaicin 感受性細胞のそれと等しく、20~30  $\mu\text{m}$  に集中した分布を呈した (UTP(+)&Cap (+))。ところが、UTP 応答細胞でも、capsaicin 非感受性神経細胞の直径分布は、どの直径群にも比較的一様に観察された (UTP(+)&Cap(-))。UTP 応答細胞は、小型~大型の細胞まで存在するが、capsaicin にも応答細胞する細胞は 20~30 $\mu\text{m}$  程度の小型細胞であり、これは DRG 神経 C 繊維であると考えられる。

#### (4) 痛み行動

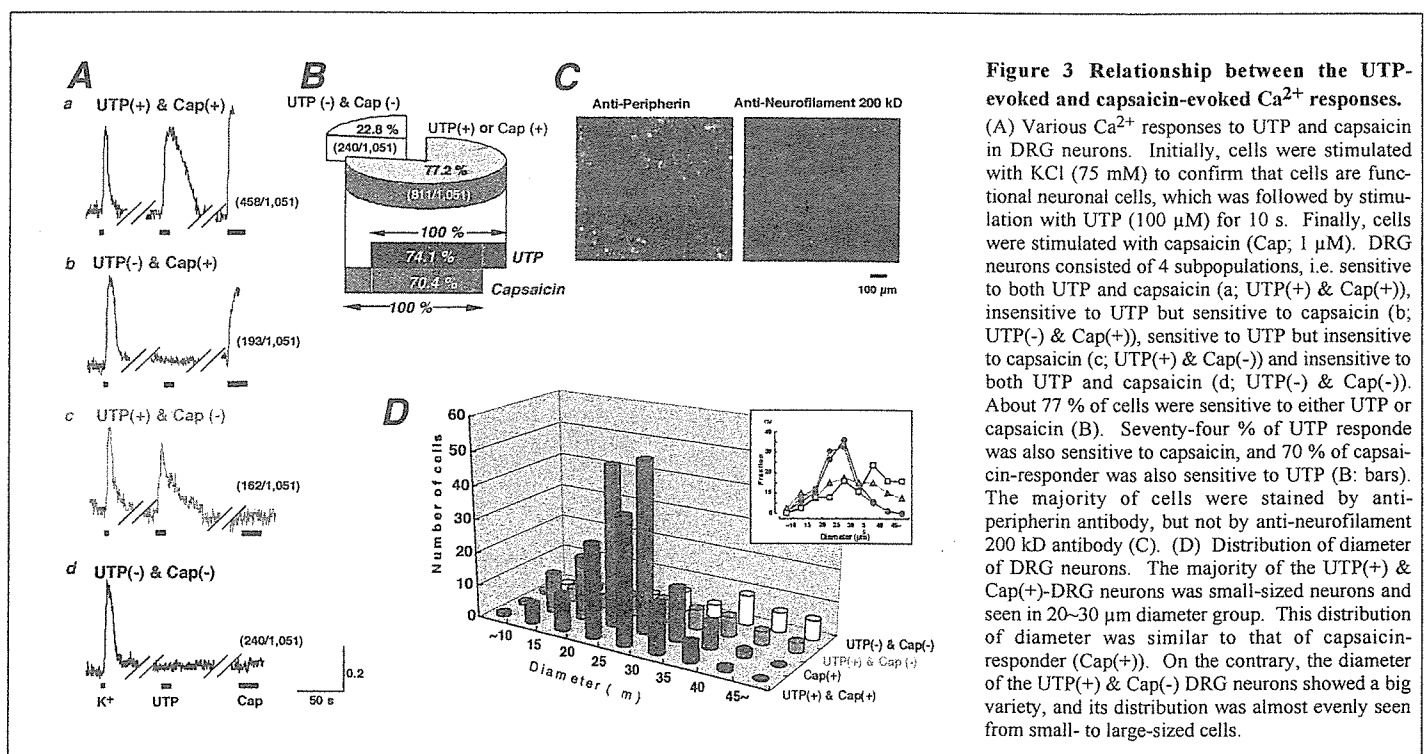
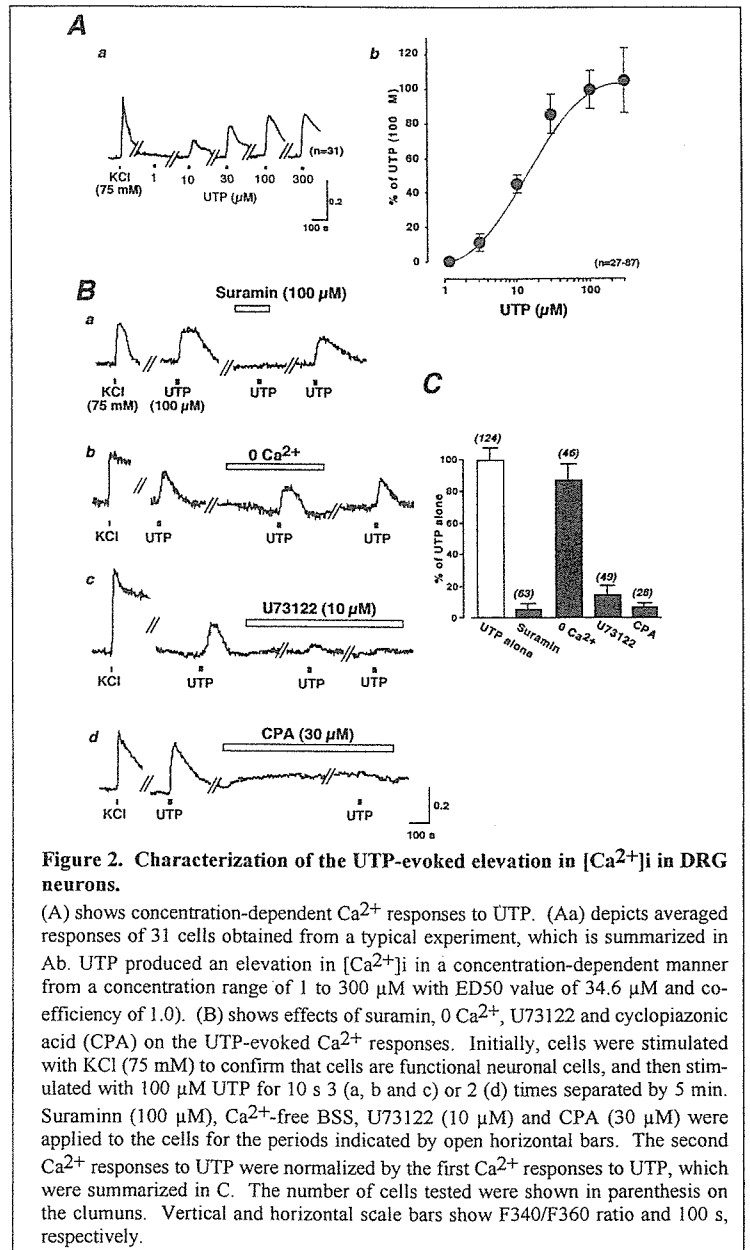
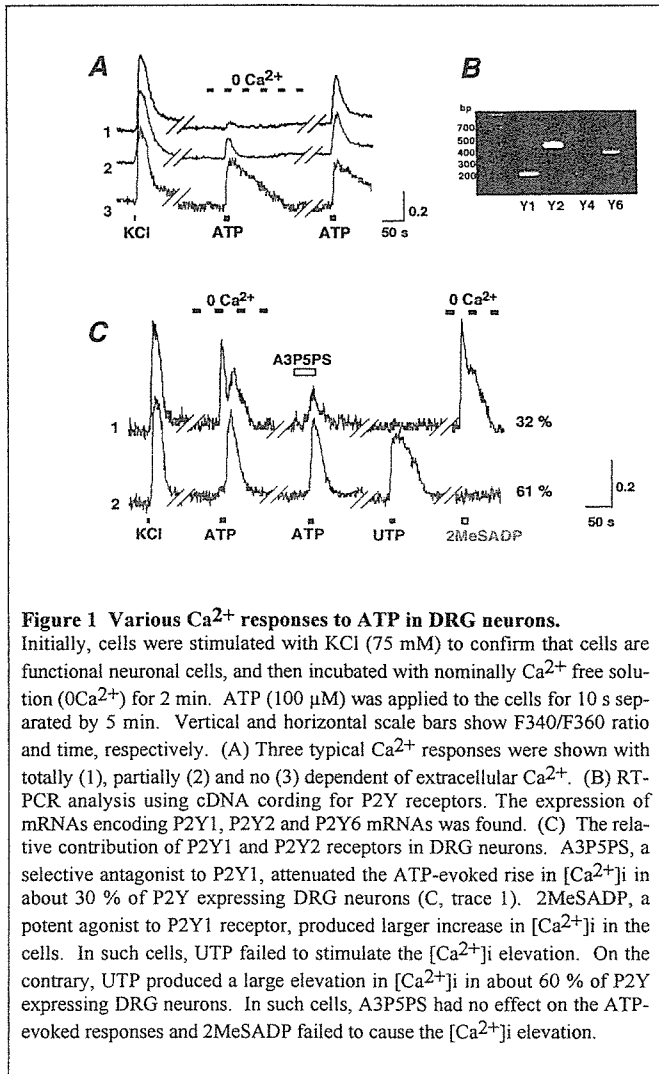
UTP を後肢に投与することにより、熱刺激に対する痛覚過敏反応、機械刺激による異痛反応が観察された。

## 4 考察及びまとめ

DRG 神経細胞には、機能的 P2Y 型受容体が存在していることが明らかとなった。最も多く発現している P2Y 受容体サブクラスは P2Y2 受容体であった。P2Y2 受容体 agonist の UTP による応答の多くは、anti-peripherin 陽性で小型 (20~30  $\mu\text{m}$ )、さらに capsaicin 感受性の DRG 神経細胞で認められたことから、これら UTP 応答細胞の多くはおそらく C 繊維であり、疼痛伝達と密接な関係にあることが強く示唆された。実際 UTP による疼痛行動も認められた。これまでの報告では、DRG 神経細胞 P2Y 受容体の主たるサブクラスは  $\text{A}\beta$  細胞に存在している P2Y1 受容体で、触覚などの知覚情報の伝達にのみ関与し、痛み伝達への関与は全く考えられていなかった (Nakamura and Strittmatter, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93, 10465-10470, 1996)。従って、本実験結果は、同じ P2Y 受容体群でも、その受容体サブクラスにより分布する DRG 神経細胞の種類が異なること、また P2Y2 受容体は痛み伝達を直接的に制御し得ることを示唆する結果であり非常に興味深い。最近、capsaicin による侵害受容器 VR1 受容体の応答が、protein kinase C (PKC)により強く増強されることが報告された (Premkumar and Ahern, Nature, 408, 985-990, 2000)。DRG 神経細胞の P2Y2 受容体は  $\text{G}_{q/11}/\text{PLC}$  と共役していることから、UTP 刺激により、 $\text{InsP}_3$  と共に diacylglycerol が産生され、PKC が活性化される。したがって、P2Y2 受容体と VR1 受容体の DRG 神経細胞での共存を示した本実験結果は、侵害受容体の制御、つまり痛み伝達に P2Y2 型受容体を介した ATP 果たす役割の重要性を強く示唆するものである。これに対し、P2X 受容体、特に P2X2/3 受容体は、capsaicin 非感受性の  $\text{A}\delta$  繊維を介し、機械刺激に対する異痛症発症に重要な役割を果たしている。したがって、ATP は P2X 型及び P2Y 型受容体のサブクラスに固有の、異なる知覚情報伝達に寄与している可能性が示唆された。一次求心性神経の知覚伝達に ATP が深く関与していることを示すこれらの知見は、“痛み”の発生機序解明に新しい方向性を提示すると共に、神経因性疼痛など難治性疼痛治療のための新規薬物開発のブレークスルーとなり得るものである。

## 5. 研究発表

- (1) Tsuda M, Koizumi S, Kita A, Shigemoto Y, Ueno & S, Inoue K. Mechanical allodynia caused by intraplantar injection of P2X receptor agonist in rats: Involvement of heteromeric P2X<sub>2/3</sub> receptor signaling in capsaicin-insensitive primary afferent neurons. J. Neurosci. 20, RC90 (2000).
- (2) 津田誠、小泉修一、井上和秀. 痛みと ATP. 日薬理誌 116, 343-350 (2000).



---

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
若手研究者奨励研究報告書

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