

平成13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

創薬のための生体機能解析に関する研究

## 難治性疼痛に關与するATP受容体の機能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

- |                    |      |
|--------------------|------|
| (1)山之内製薬(株)筑波研究所   | 山口時男 |
| (2)NTT(株)物性科学基礎研究所 | 鳥光慶一 |
| (3)東京慈恵会医科大学       | 加藤総夫 |
| (4)三重大学医学部         | 富永真琴 |
| (5)広島大学医学部         | 仲田義啓 |
| (6)大阪市大医学部         | 木山博資 |

### 要 旨

本年度得られた新知見は以下のとおりである。1. ATP 誘発急性アロディニア発症に ATP 受容体 P2X2+3 受容体ヘテロマーが深く関与している、2. 各種慢性難治性疼痛の発症にも P2 受容体が関与している、3. ATP は後根神経節から substance P を放出する、4. ATP は代謝型 P2Y1 受容体刺激とプロテインキナーゼ C 活性化により、痛み受容器バニロイド受容体 VR1 を制御する、5. 脊髄損傷モデルで P2X3 受容体 mRNA が変化する、6. 脳幹での知覚神経情報伝達にも ATP が関与している、さらに 7. Neurometer による新規 in vivo 知覚/痛覚測定装置を開発し、ATP 放りアルタイム画像化の技術基盤を築いた。

### 1. 研究目的

痛みは危険を回避するための重要な情報であるが、強すぎる場合には対処を要する。特に神経因性疼痛はモルフィンが奏効しない難治性であり、临床上最も重要なペインコントロールの対象と考えられている。しかしながらその機転については未だ明らかにされていない。我々はごく最近、P2X2+3 ヘテロマー受容体刺激により神経因性疼痛の主症状アロディニア(異痛症)に類似した疼痛反応が動物で引き起こされるという事実を発表した。この論文は *Current Opinion in Neurobiology* の Paper alert (10:529-538, 2000) にて紹介され、アロディニアのメカニズム解明の糸口として期待された。加えて、2000年 *Nature* に発表された P2X3 欠損マウスによる 2 論文(Cockayne et al., 407: 1011-1015; Souslova et al., 407:1015-1017) でも我々の研究成果が引用、追認され、P2X3 が特に炎症性疼痛に深く関与していることがあらためて示された。また、バニロイド受容体(VR1)およびテトロドトキシン(TTX)非感受性 Na<sup>+</sup>チャンネルは難治性疼痛との関与が最近指摘され、ATP 受容体との相互作用についても研究報告がなされているが、その詳細は不明のままである。以上の背景を踏まえ、本研究の目的は、難治性疼痛発症における ATP 受容体の生理機能について詳細に研究し、VR1 受容体など他の因子との相互作用を含めた成果を元に、アロディニア発現および炎症性疼痛のメカニズム解明とそれらを防ぐための技術開発を目指すことである。

### 2. 研究方法

**アロディニアの測定法:** 測定対象となる部位(後肢足底部)へ von Frey フィラメント(VFF)を押し当て、ラットが後肢を VFF から退ける閾値を測定することでアロディニアを評価した。通常は疼痛反応を引き起こさない強度の VFF 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 VFF 強度に逆比例する。各種病態モデルでのアロディニア発現に關与する ATP 受容体の同定は、ATP 受容体拮抗薬 pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulphonic acid tetrasodium (PPADS)を用いた行動薬理学的手法、ならびに標的受容体(P2X2ならびに P2X3)アンチセンスオリゴ法によった。

**ATP 誘発急性アロディニア:** ATP 受容体アゴニスト  $\alpha, \beta$ -methylene ATP ( $\alpha\beta$ meATP) をラット後肢足底部に投与し、その投与部位へ VFF を押し当て、アロディニアを評価した。

**術後疼痛モデル作製 (Brennan らのモデル) :** Brennan らの報告に従い、後肢左足底部の皮膚を 1cm 切開し、さらに筋肉をピンセットを用いて浮かし、筋線維に添って縦に切開を入れた。その後、絹糸で 2 箇所縫合した。手術終了後、2, 24 および 48 時間に切開部より少し内側へ VFF を押し当て、アロディニアを評価した。P2 受容体拮抗薬 PPADS は尾静脈内および切開部位へ投与した。PPADS の効果は脊髄内の c-Fos 蛋白の発現により評価した。c-Fos 抗体の免疫染色実験には、足底部切開 2 時間後に灌流固定した脊髄 (第 5 腰髄) を用いた。脊髄スライスごとに c-Fos 陽性細胞の数をカウントし、平均化した。P2 受容体拮抗薬 PPADS は、尾静脈投与あるいは切開部皮下へ投与した。

**脊髄神経結紮モデル (Chung モデル) :** 実験には Wistar 系雄性ラットを使用した。脊髄神経結紮モデルの作製は Chung らの報告に従い、L5 脊髄神経を露出し、後根神経節細胞 (DRG) より末梢側を 5-0 絹糸で強く結紮して、その結紮部位より末梢側を切断した。神経損傷後、1, 3, 7 および 14 日後に足底部へ VFF を押し当て、アロディニアを評価した。P2 受容体拮抗薬 PPADS および TNP-ATP は、脊髄くも膜下腔内へ留置した PE-10 カテーテルを通して投与した。

**Substance P (SP) の定量 :** 5 日間培養したラット初代培養 DRG を Krebs-HEPES buffer で 1 回洗浄することにより DMEM を除き、peptidase inhibitor 含有 Krebs-HEPES buffer 中で刺激薬物と共に 37°C, 95% air/5% CO<sub>2</sub> の条件下で 10 分間インキュベーションし、上清を回収し SP 遊離サンプルとした。SP 量の定量は Powell らの方法に準拠した。すなわち、SP 遊離サンプルに 0.1% BSA 含有 0.15 M PBS (pH 7.5) で 5000 倍に希釈した抗 SP 抗体と <sup>125</sup>I-Tyr<sup>8</sup>-SP を混合し、4°C で 18 時間インキュベーションした。上清の結合型 <sup>125</sup>I-Tyr<sup>8</sup>-SP の放射能活性し、検量線から SP 様免疫活性物質量を求めた。

**VR1 の ATP による制御 :** ヒト由来培養細胞 HEK293 細胞にカプサイシン受容体 VR1 を強制発現させてパッチクランプ法を適用して電圧固定法による膜電流測定を行った。VR1 を発現した細胞はカプサイシン・プロトン・熱によって刺激して、細胞外 ATP の効果を検討した。熱刺激においては膜電流とともに細胞近傍の温度も同時に取り込んだ。また、ラット DRG でも同様にカプサイシン活性化電流に対する ATP の効果を調べた。さらに、ラット DRG、HEK293 細胞において代謝型 ATP 受容体 P2Y1 の遺伝子及び蛋白質の発現をそれぞれ RT-PCR 法、免疫組織化学法で検証した。

**VR1 リン酸化部位の同定 :** VR1 の PKC による直接のリン酸化を証明するために、VR1 を <sup>32</sup>P でロードして PMA 刺激によって <sup>32</sup>P が VR1 蛋白質に取り込まれることを観察した。さらにアミノ末端、細胞内ループ、カルボキシル末端の GST 融合蛋白質を作製し in vitro kinase assay を行った。PKCε によるリン酸化が示唆された細胞内ドメインのリン酸化候補アミノ酸を 1 つ 1 つ点変異させた変異体を作製して電気生理学的な機能解析を行うことによって、リン酸化されるアミノ酸残基の同定を行った。**三叉神経脊髄路核尾側亜核膠様質 (Sp5cSG) スライス標本の作製と電気生理実験 :** 幼若ラットならびに幼若マウスを深麻酔下に断頭し、下部脳幹を摘出した。振動刃スライサー上に脳幹 bloc を吻側を前方、尾側を後方、背側を上方に固定し、Sp5cSG と三叉神経脊髄路を含む脳幹水平断スライス (厚さ、400~500 μm) を作成した。近赤外微分干渉顕微鏡観察下、Sp5cSG を同定し、同神経核から小型ニューロンの膜電流をホール・セル・パッチ・クランプ法で記録した。三叉神経誘発シナプス後電流を解析するために、ステンレス製同心円双極刺激電極を三叉神経上に設置し、電気刺激装置によって刺激した (100 μs, 0.1 Hz; 0.025-1.1 mA)。また、記録ニューロンに投射する抑制性シナプス入力を同定するため、記録ニューロン近傍に刺激電極を置き、局所刺激を行なった。細胞膜電流はパッチクランプ専用アンプ (Axon 社 AxoPatch 200B) で記録し、AD 変換システム (AD Instruments, PowerLab) を用いてコンピュータのハードディスクに保存した。記録された Sp5cSG ニューロンが受け取るシナプス入力の種類および ATP に対する応答と、ニューロンの形態の関係を検討するため、電気生理学的記録時に近赤外微分干渉顕微鏡による細胞体像と Sp5cSG 内位置を撮像してハードディスクに記録した。また、パッチクランプ内液に neurobiotin トレーサーを含め、実験終了後、スライスを 4% PFA で固定し、ABC 法で peroxidase 化し、DAB 法によって染色した後、透過光顕微鏡によって観察した。また一部のニューロンではパッチクランプ内液に Lucifer Yellow を含め、実験終了後、スライスを 4% PFA で固定して蛍光顕微鏡で観察した。

**坐骨神経損傷モデル :** 麻酔下でラットの片側の坐骨神経に損傷を与え、一定期間生存させた後、深麻酔下で腰髄 DRG (L4-L5) を取り出し、一次感覚神経細胞における各種遺伝子発現 (ATP 受容体、DINE など) を組織学的に検討した。遺伝子発現の同定には、各種遺伝子の cDNA フラグメントを 35 S にて標識した RNA プローブを作成し、in situ ハイブリダイゼーション法を行った。可視可には写

真乳剤を標本に塗布する乳剤オートラジオグラフィーを用いた。また、DRG 内で細胞のタイプの同定のために、一部標本では NGF 受容体の TrkA や IB4 に対する抗体を用いて、in situ ハイブリダイゼーション法と免疫組織化学の二重標識を試みた。

**ラット骨盤神経節損傷モデル**：ラットを麻酔下で片側の cavernous nerve(骨盤神経節副交感節後細胞の軸索)を切断し、1週間から6ヶ月の生存期間の後、両側の骨盤神経節を取り出し、in situ ハイブリダイゼーション法を行った。GAP43 mRNA の同定には、cDNA を鋳型に 35 S 標識した RNA プロブを用いて行った。また、交感神経節後細胞の同定には tyrosine hydroxylase (TH)抗体を、副交感節後細胞で cavernous nerve の起始細胞の同定には neuronal NOS (nNOS)抗体を用い GAP43 mRNA との二重標識を行った。

**Neurometer による in vivo 知覚/痛覚閾値測定**：薬物投与カニューレ装着手術は Yaksh & Rudy の方法に準じて実施した。術後7-8日、刺激電極を右後肢足裏、体極板を左背部皮膚に装着したラットをボールマニケージ(夏目製作所)に保定し、Neurometer CPT/C (Neurotron, Incorporated)の測定モードを Animal response test (ART) mode とし、経皮的に足裏を電気刺激(サイン波形：2000, 250, 5 Hz)した。ラットが鳴き声を上げる、あるいは驚愕反応を示したところで直ちに刺激を止め、そのときの刺激強度(mA)を電流刺激閾値と定義した。この測定を10分間隔で実施した。基礎検討の結果から、10分間隔で繰り返し測定した場合、3回目測定以降の閾値は安定であることが分かっているため、3回目測定時の閾値を薬物投与前値(pre値)と定義した。Pre値測定後に薬物もしくは PBS 5  $\mu$ l を投与し、投与10分後から再び10分間隔で繰り返し測定を実施した。

**新規 ATP 測定法の開発**：Wistar ラットの大脳皮質あるいは、海馬神経細胞など、主として中枢神経細胞を初代培養して使用した。Preliminary な実験として、スライス組織(厚さ約 300  $\mu$ m)についても同様な実験を試みた。また、海馬神経細胞においては、血清を含まない無血清培養を行い、神経細胞育成のみに特化した細胞の育成を行った。ATP の測定は、主として通常のルシフェリン・ルシフェラーゼによる発光測定により測定を行った。グルタミン酸の測定およびシナプス活動計測とあわせて細胞近傍より溶液をサンプリングし、ルミノメータを用いて溶液中の ATP 含有量の測定を行った。また、レーザー光を光源とする ATP 計測の可能性についても検討し、エバネッセント場あるいは、表面プラズモン共鳴による ATP 放出量の計測について、画像化を念頭に検討を進めた。

### 3. 研究成果

**ATP 誘発急性アロディニアモデル**：ラット後肢足底部へ P2X 受容体作動薬  $\alpha,\beta$ -methylene ATP ( $\alpha\beta$ meATP)を投与することにより、著明なアロディニア反応が発現した。アロディニア反応は、P2X 受容体拮抗薬 PPADS の前処置により抑制された。 $\alpha\beta$ meATP の投与によって浮腫形成は認められず、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。Capsaicin 感受性神経を破壊したラットにおいては、 $\alpha\beta$ meATP 誘発アロディニアは殆ど変化を示さなかった。一方、capsaicin 感受性神経を破壊したラットから取り出した DRG では、早い脱感作を伴った P2X<sub>3</sub> 受容体を介すると思われる内向き電流は消失したが、遅い脱感作を伴った P2X<sub>2/3</sub> ヘテロマー受容体を介すると思われる内向き電流は変化しなかった。以上の結果から、 $\alpha\beta$  神経の P2X<sub>2/3</sub> ヘテロマー受容体が関与していると考えられる。その責任受容体を明確にする目的から、P2X<sub>3</sub> および P2X<sub>2</sub> 受容体遺伝子に選択的なアンチセンスオリゴを作製し、P2X<sub>3</sub> および P2X<sub>2</sub> 受容体の特異的にノックダウンした動物を作製した。P2X<sub>3</sub> 受容体及び P2X<sub>2</sub> 受容体アンチセンスオリゴの処置は、ラット後肢足底部への  $\alpha\beta$ meATP 投与によるアロディニアをそれぞれ著明に抑制した。しかし、それぞれの受容体ミスマッチオリゴではアロディニアの発現に影響はなかった。

**術後疼痛モデル**：ラット足底部の皮膚切開により著明なアロディニアが出現した。このアロディニアは PPADS の術前静脈内および切開部位内処置により有意に抑制された。この抑制効果は、術後2時間から48時間後まで見られた。一方、PPADS の術後静脈内投与によってはアロディニアの発現に全く影響がなかった。足底部皮膚切開2時間後の脊髄後角において c-Fos 蛋白の発現が観察された。c-Fos 発現はアロディニアを抑制した PPADS の術前静脈内により有意に減少した。c-Fos 蛋白陽性細胞の減少は脊髄後角の表層部と深層部で著明であった。

**脊髄神経損傷モデル**：ラット L5 脊髄神経損傷により、損傷側後肢において著明なアロディニア反応が検出できた。しかし反対側(非損傷側)後肢ではそのような反応は認められなかった。この神経

損傷によるアロディニア反応は損傷後 2 週間でピークになり、損傷後 8 週間経過しても程度は弱くなるものの有意なアロディニア反応が発現した。神経損傷誘発アロディニア反応は、ATP 受容体拮抗薬 PPADS の投与によっては有意に変化が見られなかったが、別のタイプの ATP 受容体拮抗薬 TNP-ATP の投与により著明に抑制された。その TNP-ATP の抗アロディニア効果は用量依存的であった。

**坐骨神経損傷モデルと P2 受容体発現：**ラット坐骨神経損傷モデルでは、多くの遺伝子が発動した。Galatinin などの神経ペプチド群をはじめ、細胞内情報伝達因子、一部の転写因子、熱ショック蛋白の HSP ファミリーや神経栄養因子受容体等で、著しい遺伝子発現上昇が観察された。ATP 受容体 P2X3 mRNA は健常な DRG(小型)にかなりのレベルで発現していた。TrkA とレクチン IB4 を用いて細胞種の同定を行ったところ、ほとんどの P2X3 mRNA 発現細胞は IB4 陽性であった。このことから、ATP 受容体 P2X3 を発現する小型の細胞は IB4 で標識される脊髄後角 2 層の内層へ投射するタイプのニューロンであることが明らかになった。坐骨神経に損傷を与えると、P2X3 mRNA 発現の強度は減弱し、軸索損傷により P2X3 発現は減少した。Damage Induced Neuronal Endopeptidase (DINE)は坐骨神経傷害により著しい遺伝子発現が見られた。DINE mRNA 陽性細胞の多くは TrkA と共存し、IB4 とはほとんど共存しなかった。

**ATP による Substance P 放出：**ATP による疼痛発症機序における、他の発痛分子の関与を検討した。培養開始後 5 日のラット初代培養 DRG に ATP の濃度を変化させ 10 分間処置し Krebs-HEPES buffer 中の SP 遊離量を測定した。ATP は 1mM 以上の濃度で有意に SP 遊離を誘発し、これは P2X 阻害剤 PPADS (50, 100  $\mu$ M)より部分的に抑制され、細胞外  $Ca^{2+}$ を除去により消失した。アデノシン (0.01-1mM) は SP 遊離に影響しなかった。P2X 選択的アゴニスト  $\alpha$ meATP は SP 放出を誘発したが、各種 P2Y アゴニスト ADP, 2MeSATP, UTP は無効であった。この ATP (1 mM) による SP 遊離は 50  $\mu$ M AP5 により有意に抑制された。ラット DRG における ATP 誘発性 SP 遊離は ATP がグルタミン酸を遊離させ、それが間接的に SP 遊離を誘発している可能性が考えられた。IL1 $\beta$ も DRG から SP 放出を引き起こしたが、ATP によるそれとは全く異なる作用機序によるものであった。

**パニロイド受容体 VR1 の ATP による制御：**痛み受容器 VR1 と ATP の関係を検討した。VR1 を発現した HEK293 細胞では、細胞外 ATP (100  $\mu$ M)は低刺激のカブサイシン活性化電流及びプロトン活性化電流を増大させた。ATP 存在下、非存在下でカブサイシン濃度依存曲線・プロトン濃度依存曲線を作製すると、ATP によって最大電流を変化させることなくいずれの曲線も低濃度（低刺激）側へシフトした。ATP のカブサイシン活性化電流増強作用は 1  $\mu$ M から観察された。また、ATP 存在下では VR1 の熱による活性化温度閾値は 42 度から 35 度に低下し、体温でも VR1 が活性化して痛みを惹起する可能性が示された。この責任受容体は Gq 蛋白質に共役する代謝型 P2Y<sub>1</sub> 受容体であることが示唆された。Gq の下流シグナルのうち、DAG 系が PKC を介して VR1 機能を制御していることが判明した。これは PMA によって直接 PKC を活性化したり PKC の阻害剤 calphostin C を用いることでも確認できた。この ATP の効果は DRG でも観察された。VR1 を発現した HEK293 細胞で PKC を直接活性化する PMA 存在下、非存在下での放射性 <sup>32</sup>P の VR1 蛋白質への取り込みをみると、PMA 存在下で大きな取り込みの増加がみられ、VR1 が PKC によってリン酸化することが示された。VR1 の第一細胞内ループとカルボキシル末端細胞内ドメインの 8 個のセリンもしくはスレオニンアラニンに置換した点変異体を用いた電気生理学的な解析から、第一細胞内ループの 502 番目のセリンとカルボキシル末端細胞内ドメインの 800 番目のセリンが VR1 の PKC $\epsilon$ によるリン酸化に強く関与することが判明した。

**自律神経系の関与：**骨盤神経節は交感神経系と副交感神経系が混在する特徴を有する神経節で、この神経節から出る副交感の節後神経である cavernous nerve の片側に傷害を与えた。軸索損傷後、骨盤神経節を取り出し軸索伸展や可塑性のマーカーである GAP43 mRNA の発現を検討した。損傷後 7 日目には損傷側の骨盤神経節に著しい GAP-43 の発現上昇が認められたが、その後 1 ヶ月になるとその発現は通常のレベルに低下した。一方、健常側の骨盤神経節では損傷後 7 日では GAP43 mRNA の発現には明らかな変化は認められなかったが、損傷後 1 ヶ月から 6 ヶ月に至るまで長期にわたる発現の上昇が観察された。この GAP43 mRNA 発現細胞の多くは、交感神経の節後細胞であった。これは、近傍の副交感節後細胞の傷害により、実際には傷害を受けていない交感神経の節後細胞で可塑的变化やスプラウティングが起こっていることを示唆している。また、損傷と反対側の骨盤神経節で、損傷後暫くしてから GAP43 を発現するようになる細胞は、対側の cavernous nerve を

構成する副交感の節後細胞であることが明らかになった。これは、損傷側の節後細胞が標的へ向けて再投射するのではなく、健常側の副交感節後細胞が機能を回復するためにスプラウティングを起こしていると考えられた。以上のことから、自律神経節は知覚神経節や運動神経に比べてきわめて高い可塑性を有すると考えられる。

**脳幹スライス標本における ATP の関与：**幼弱ラットおよびマウス脳幹を用いて、1.痛覚求心路、2.痛覚情報処理ネットワーク、および、3.上行性痛覚情報投射路のすべてを同一スライス内に含む Sp5cSG 水平断スライス標本を確立し、Sp5cSG ニューロンのシナプス後電流に及ぼす ATP の作用を検討した。興奮性シナプス後電流 (EPSC) および抑制性シナプス後電流 (IPSC) をそれぞれ内向きおよび外向き電流として弁別的に同時記録し、誘発シナプス後電流のパターンによって Sp5cSG ニューロンは以下の4種に分類された。Type 1 ニューロン：短潜時の興奮性シナプス後電流 (EPSC) のみを示すニューロン (約 43%)。Type 2 ニューロン：短潜時の内向き電流に続いて長潜時・長持続の抑制性シナプス後電流 (IPSC) を示すニューロン (約 13%)、Type 3 ニューロン：短潜時の EPSC に続いて長潜時の EPSC を示すニューロン (約 13%)、Type 4 ニューロン：長潜時・長持続の IPSC を示すニューロン (約 13%)。Type 1 ニューロンの誘発 EPSC の振幅は 100  $\mu$ M ATP によって約 47.0%、1 mM ATP によって約 63%まで減少した。アデノシン A<sub>1</sub> 受容体遮断薬 DPCPX (1  $\mu$ M) 存在下、1 mM ATP による誘発 EPSC 振幅の現象は、約 34%まで、とほぼ半減した。Type 1 ニューロンの 86%において、100  $\mu$ M ATP は自発 EPSC に著明な変化を引き起こさなかったが、1 mM ATP は自発 EPSC 頻度を約 550%まで増加した。この増加は DPCPX によって変化しなかった。ATP (100  $\mu$ M および 1 mM) は、Type 2 ニューロンの短潜時 EPSC 振幅を変化させなかったが、長潜時の IPSC 振幅のみを約 8%まで著明に減少した。Type 3 ニューロンの誘発 EPSC 振幅は ATP (100  $\mu$ M および 1 mM) によってほとんど影響を受けなかった。Type 4 ニューロンの長潜時 IPSC は ATP によって僅かに減少した。

**Neurometer による in vivo 知覚/痛覚閾値測定：**ヒトにおいて Neurometer の 2000 Hz 刺激は A $\beta$ -fiber を、250 および 5 Hz 刺激はそれぞれ、A $\delta$ -および C-fiber を選択的に刺激するとされている。我々は、ラットにおいて同様の結果を得たことから、実験動物においても Neurometer による神経径選択的な神経機能検査が可能であることが明らかとなった。脊髄内痛覚伝達における P2X の関与を調べる目的から、各種 P2X アゴニストおよびアンタゴニストを正常ラット脊髄髄腔内に投与したときの電流刺激閾値を Neurometer を用いて径の異なる神経毎に測定した。PPADS (6 及び 60  $\mu$ g) 脊髄髄腔内(i.t.)投与により、2000 および 250 Hz 刺激時の閾値が低下したが 5 Hz 刺激時の閾値にはほとんど変化が認められなかった。また、TNP-ATP 2  $\mu$ g i.t.投与では、PPADS 同様 2000 および 250 Hz 刺激時の閾値が低下し、5 Hz 刺激時の閾値にはほとんど変化が認められなかった。20  $\mu$ g 投与ではすべての周波数で閾値に変化は認められなかった。一方、ATP アナログの  $\alpha\beta$ meATP 10  $\mu$ g i.t.投与では、5 および 250 Hz 刺激時の閾値が低下した。2000 Hz 刺激時の閾値には変化が認められなかった。PBS 投与は全ての周波数刺激時の閾値に影響を与えなかった。

**新規 ATP 測定系の開発：**海馬初代培養神経細胞を用いた実験では、ATP により神経活動、特に電気活動が盛んになった。また、神経活動の増加に伴ってグルタミン酸の放出が増加した。神経活動の増加と ATP がどのような関連性にあるのか調べるために、KCl 刺激に伴う ATP 放出量の変化について計測した。実験では、細胞近傍の溶液をサンプリングし、ルミノメータで測定した。ATP の放出量は、時間的には、比較的ゆっくりではあるがグルタミン酸と同様に、KCl 添加後一過性に増加した。このような一過性の放出は、海馬無血清培養細胞でも観測され、神経活動との関連性が示唆される。また、スライス海馬のスライスでグルタミン酸放出の分布について調べてみると、CA 1 や CA 3 で放出量の異なる結果が得られた。ATP 放出量について、同様な実験を海馬スライス標本について行い、フォトンカウントによる ATP 放出の画像化を試みた。標本の中で発光量の異なる場所があることが示唆される結果が得られ、グルタミン酸放出量分布と同様、画像化の可能性が確認できた。

#### 4. 考察

**各種疼痛病態モデルにおける P2 受容体の関与：**ラット後肢足底部への ATP あるいは  $\alpha\beta$ meATP の投与で誘発される疼痛関連行動を測定することにより、現在まで報告されている二種類の疼痛行動 (自

発痛および熱刺激痛覚過敏反応)の他に、新たに第三の疼痛行動として、軽度な機械刺激に対する異痛反応(アロディニア)を見出した。このアロディニアはモルヒネが効きにくい難治性疼痛である神経因性疼痛の特徴的な症状であり、この症状が P2X 作動薬で再現できたことは、P2X 受容体がアロディニア発現に対して何らかの関与を有していると考えられる。さらに、 $\alpha\beta\text{meATP}$  によるアロディニアが他の疼痛行動と大きく異なる点は、発現持続時間が比較的長いことと 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。また、capsaicin 感受性神経破壊ラットの L4-L6 DRG 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。すなわち、 $\alpha\beta\text{meATP}$  誘発アロディニア発現には P2X2/3 受容体が関与していると考えられる。さらに我々は、P2X3 および P2X2 受容体サブタイプに特異的なアンチセンスオリゴを見出し、 $\alpha\beta\text{meATP}$  誘発アロディニア反応に P2X2/3 ヘテロ受容体が関与していることを明らかにした。以上、一次求心性知覚神経末梢端の P2X2/3 ヘテロ受容体活性化が、神経因性疼痛の特徴的なアロディニアを誘発することを新規に明らかとし、これが既報の疼痛行動とは明らかに異なった機序で発現していることを示した。

上記の ATP 受容体依存性アロディニア発現経路が実際に病態モデルにおけるアロディニアの発症に関与しているのか否かを検討した。ラット足底部切開で誘発されるアロディニア反応が P2 受容体拮抗薬 PPADS の術前処置により抑制されたという結果は、組織損傷により漏出した ATP が PPADS 感受性 ATP 受容体を介して術後疼痛性アロディニアを発生していることを示唆している。この結果は、PPADS を切開部位へ直接投与した場合においても静脈内投与の結果とほぼ類似した抑制効果をしめしたことから、c-Fos 抗体の免疫染色実験で得られた PPADS の c-Fos 蛋白陽性細胞の減少効果によって強力に裏付けられた。一方、PPADS はアロディニア形成後に処置しても抑制効果を示さなかった。このことは、PPADS 感受性 ATP 受容体がアロディニアの維持過程ではなく、むしろその誘導過程に重要な役割を果たしていることがわかる。後肢足底部の P2X2/3 受容体を活性化することでアロディニアが発現し、その発現には capsaicin 非感受性一次求心性神経が関与した。切開誘発のアロディニアも capsaicin 非感受性一次求心性神経が関与していることから、今回の術後モデルにおけるアロディニアの発現は、P2X 受容体活性化によるアロディニア発現と一部同じ経路を介していることが示唆された。

慢性的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。正常ラット DRG 内 mRNA 発現量は P2X3 (27.5) >> P2X5 (33.1), P2X4 (33.4), P2X6 (33.7), P2X7 (33.9)  $\geq$  P2X2 (34.2) > P2X1 (37.6) ( ) 数値は real-time PCR 法で設定した閾値に達するサイクル数の順で多かった。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)  $\text{Na}^+$  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。慢性的神経因性疼痛ラットのアロディニア反応は、PPADS の脊髄内投与によっては有意に変化が見られなかったが、TNP-ATP の投与により用量依存的に著明な抑制効果が観察された。両阻害剤は P2X サブタイプによりその効果が異なることが知られている。従って、慢性的神経因性疼痛ラットのアロディニアに関与する責任受容体は、急性のアロディニアとは異なることが予想される。その同定は、次年度の大きな課題であるが、ATP 受容体拮抗薬が難治性疼痛のモデルラットにおいて治療効果を示した点は非常に興味深いと思われる。今後は、アンチセンス法や免疫染色法により責任受容体を同定し、その役割を明確にしていきたい。

坐骨神経損傷モデルでは P2X3 発現の低下が見られた。これは、P2X3 発現細胞において ATP を介する情報伝達が軸索損傷により抑制されていることを示唆している。Tsuzuki ら (Pain, 91, 351-, 2001) は、P2X3 は軸索損傷を受けた DRG では発現が抑制されるが、近傍の軸索損傷を受けていない神経節細胞では逆に発現が促進していると報告した。これは、軸索損傷により ATP が正常とは異なる細胞で作動するようになる可能性を示しており興味深い。また、P2X3 が小型の IB4 陽生細胞に発現するが、DINE は TrkA 発現細胞に多く発現していたことから、侵害情報を伝える細胞の中で P2X3 と DINE は異なる細胞種に存在することになる。従って、神経傷害後に DINE と P2X3 が共存するようになる可能性が高く、これが慢性神経因性疼痛と ATP をリンクさせ得る重要な知見であり、次年度以降、明確にする予定である。

骨盤神経節損傷モデルでは、自律神経節後細胞は軸索損傷により細胞死には至らないことが明らかになった。また、可塑性の指標として GAP43 を用いた実験では交感神経節の節後細胞は極めて可塑性のポテンシャルの高い細胞であると考えられた。本実験系では、交感神経節の節後細胞は直接傷害を受けておらず、近傍に存在する副交感の節後細胞の軸索損傷に反応して GAP43 を発現している。このような損傷細胞と非損傷細胞との間で何らかのやり取り(クロストーク)があり、結果的に非損傷細胞の可塑性が亢進する現象は興味深い。今回は同一の神経節内でのクロストークであるが、自律神経節と知覚神経節のように神経節を越えたクロストークが存在する可能性が高い。今後、この交感神経の可塑性と ATP、さらに難治性疼痛との関連性について、さらなる研究を展開する必要がある。

**ATP による他の疼痛関連物質制御-SP 放出と VR1 受容体活性化：**ATP はラット初代培養 DRG で P2X 型 ATP 受容体に作用して、細胞外  $Ca^{2+}$  依存性に SP を放出させた。この SP 放出は、ATP がグルタミン酸を遊離し、NMDA 受容体活性化すること起因している可能性が示唆された。IL-1 $\beta$  も IL-1 $\beta$  受容体を介して遅発的に SP 遊離を誘発したが、この作用には typeIIA 分泌性 phospholipase A2、typeIV 細胞質性 PLA2 及び cyclooxygenase-2 という 3 種類のアラキドン酸代謝酵素の機能発現を介して産生されるプロスタグランジン類が関与しており、ATP による作用と全く異なっていた。ATP 及びブラジキニンがカプサイシン受容体 VR1 の機能を増強し、活性化温度閾値を体温以下とした。いずれも Gq に couple する代謝型受容体であり、これら代謝型受容体と VR1 は細胞膜近傍に共発現している機能的連関による疼痛発生システムを形成していることが示唆された。さらにこの VR1 機能増強作用は PKC $\epsilon$  の活性化を介しており、VR1 が PKC $\epsilon$  によって直接リン酸化されることが証明された。PKC $\epsilon$  によってリン酸化される 2 つのセリン残基が明になり、これらのセリンに作用する物質は鎮痛薬として機能する可能性が示唆される。このように、ATP は直接的な作用だけでなく、他の疼痛物質放出や、痛み受容体 VR1 の制御により、痛覚伝達を多角的に制御していることが示唆された。

**三叉神経脊髄路核尾側亜核膠様質 (Sp5cSG) の痛覚情報伝達における ATP の関与：**幼若マウス Sp5cSG ニューロンは三叉神経刺激に対する応答によって 4 種に分類され得た。これら 4 種のニューロンは温痛覚求心路から視床投射へ至る Sp5cSG 内の機能階層の異なる段階に属するニューロンであると考えられる。シナプス後電流の頻度および振幅に及ぼす ATP の作用はそれぞれのタイプのニューロンにおいて異なっていた。しかもその一部は我々が今までに報告してきたようにアデノシン受容体の活性化をともなっていた。ATP シグナルは、P2X 受容体と P2Y 受容体を介した系とアデノシン受容体を介した系の二つを同時かつ部位選択的に活性化することによって複雑な細胞機能制御を担っている可能性があり、両者をターゲットとした創薬・治療法の開発・評価にも本実験系は有用である。来年度以降、電気生理学的計測に加えて、本スライス標本でのカルシウム濃度イメージングや細胞外グルタミン酸濃度のリアルタイム計測によって、ATP がネットワークを構成するどのニューロンに発現しているどの受容体を活性化させて、どのような痛み情報処理の変化を引き起こすのか、さらに、慢性疼痛側において、それがどのように変化しているのかを解析していく。

**新規 in vivo 知覚/痛覚測定系及び ATP 測定系の開発：**In vivo でラットの知覚/痛覚を測定するシステムを開発し、正常ラットにおいて P2X 受容体の痛覚伝達における脊髄レベルでの役割を検討した。正常状態では、脊髄内 P2X 受容体は「痛みの伝達」ではなく「痛みの抑制」に働いている可能性を明らかとした。一方、P2X<sub>1</sub>、P2X<sub>3</sub>、P2X<sub>2/3</sub> 選択的アゴニストである  $\alpha,\beta$ -meATP は、A $\delta$ -fiber および C-fiber を介した疼痛伝達を抑制的に調節している可能性が示された。本装置により、正常ラットにおいては痛覚伝達における脊髄内 ATP 受容体、特に P2X 受容体の役割は小さいと考えられ、むしろ临床上重要視されているいわゆる難治性疼痛との関連性で重要である可能性が示唆された。来年度以降、病態モデルを使い、ATP 受容体関与の検討を行う予定である。

一方 ATP 測定系の開発では、神経活動の活性化が、ATP 放出量の一過性増加と結びつく可能性を示す結果が得られた。この結果は、シナプス活動とグルタミン酸を介しての ATP 放出との密接な関連性を示唆するものであり、次年度以降、この結果に関する詳細な検討に加え、その関連性を画像化するための技術確立に重点を置き研究を推進する予定である。技術的には、光を中心にした既存技術に加え、分子レベルでの光解析技術を応用した新しい計測法の確立が最も可能性が高いと考える。これら新規測定系の開発は、アロディニア発現および炎症性疼痛のメカニズムと ATP の関連性を明らかにする上で、非常に有用なツールになると考えられる。



## 5. まとめ

難治性疼痛に關与する ATP 受容体の役割を明らかにする目的から各種検討を行った。一次求心性知覚神経末梢端の P2X<sub>2/3</sub> ヘテロ受容体を刺激することにより神経因性疼痛の特徴的な疼痛反応であるアロディニア反応が出現することを明らかにした。また、この疼痛反応がすでに報告されていた他の疼痛行動とは明らかに異なった機序で発現していることも見出した。このアロディニア発生経路は、組織損傷により誘発する術後疼痛性アロディニア反応にも関与していることを明らかにした。加えて、慢性神経因性疼痛においても ATP 受容体が関与している可能性が示唆された。また、ATP は SP 放出や VR1 受容体機能亢進など、他の痛覚系をも制御して、疼痛発生システムを形成していることが示唆された。また交感神経節後細胞は極めて可塑性に富む神経細胞であり、知覚神経の損傷時においても何らかの可塑性を作動させている可能性が考えられ、この可塑的变化に ATP が関与している可能性が示唆された。さらに三叉神経脊髄路核のシナプス伝達においても細胞外 ATP が多様な制御を行なっている可能性が示された。最後に、Neurometer により ATP を介した知覚情報伝達が *in vivo* で測定可能となり、また ATP 放出画像化技術の基礎的基盤を築いた。

## 6. 研究発表

1. S.Honda, Y.Imai, K.Ohsawa, Y.Nakamura, K.Inoue and S.Kohsaka. Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. *J.Neurosci.* 21, 1975-1982, 2001
2. M. Tsuda, S. Koizumi and K. Inoue. Role of endogenous ATP at the incision area in a rat model of postoperative pain. *NeuroReport* 12, 1701-1704, 2001
3. K.Inoue and S. Koizumi. Mechanism of the inhibitory action of ATP in rat hippocampus. *Drug Develp Res.* 52, 95-103, 2001
4. Y. Shigemoto-Mogami, S. Koizumi, M. Tsuda, K. Ohsawa, S. Kohsaka and K. Inoue. Mechanisms underlying extracellular ATP-evoked IL-6 release in mouse microglial cell line, MG-5. *J.Neurochem.* 78, 1339-1349, 2001
5. M. Tsuda, Y. Shigemoto-Mogami, S. Ueno, S. Koizumi, H. Ueda, T. Iwanaga and K. Inoue. Down-regulation of P2X<sub>3</sub> receptor-dependent sensory functions in A/J inbred mouse strain. *Eur.J.Neurosci.* in press
6. K.Inoue. Independent signaling pathways in ATP-evoked secretion of plasminogen and cytokines from microglia. *Drug Develp Res.*53, 166-171, 2001
7. 井上和秀. 特集に寄せて. 生体の科学 52, 92-94, 2001
8. 小泉修一、井上和秀. 中枢神経系ネットワークと ATP. 生体の科学 52, 101-107, 2001
9. 津田誠、小泉修一、井上和秀. 痛みと ATP. 生体の科学 52, 131-137, 2001
10. 井上和秀. ATP と痛覚. *Clinical Neuroscience* 19, 1212-1213, 2001
11. 井上和秀. ATP 受容体. 医学のあゆみ「7 回膜貫通型受容体研究の新展開」佐藤公道、赤池昭紀編 p38-42、医歯薬出版、2001
12. 井上和秀、竹島多賀夫. セロトニンレセプター. 薬物動態・作用と遺伝子多型. 澤田康文、片岡泰文、樋口駿編. p392-399, 医薬ジャーナル社、2001
13. K. Ajito and K. Torimitsu Near-infrared Raman Spectroscopy of Single Particles, *Trends in Anal. Chem.*, 20, 255-262, 2001
14. 荒木信之、神保泰彦、市川一寿、川名明夫、鳥光慶一 二点からの刺激による培養神経細胞群の変化, 電気学会論文誌, **120-C**, 2071-2075, 2001
15. 鳥光慶一 多光子レーザー顕微鏡による細胞活動観察, *Appl. NoteJ1*, 2001
16. Y. Ueno, K. Ajito, Y. Yamada-Maruo, O. Niwa, K. Torimitsu and T. Ichino. Near-infrared raman spectra of azo dye produced by a nitrogen-dioxide-gas-selective coloration reaction in a porous glass chip, *Appl. Spectrosc.*, in press, 2001
17. N. Kasai, Y. Jimbo and K. Torimitsu. Real-time electrochemical observation of glutamate release at multiple positions in a rat hippocampal slice, *Proc. JSBB*, in press
18. R. Kurita, H. Tabei, K. Hayashi, T. Horiuchi, K. Torimitsu and O. Niwa. Improvement in signal reliability

- when measuring L-glutamate released from cultured cells using multi-channel microfabricated sensors, *Anal. Chimica Acta*, 441, 165-174, 2001
19. K. Torimitsu, Y. Furukawa, N. Kasai and Y. Jimbo. Neural modulation induced by neurotrophic factors in cultured rat cortex and hippocampal neurons, *EuroMedLab*, PO-T076, 2001
  20. K. Torimitsu, Y. Furukawa and H. Tabei. Nanostructure controlled substrates: nanostructure modification of bio-active substrates for nerve cell growth, *Proc. ICCE/8*, 2001
  21. Y. Furukawa and K. Torimitsu. Nanostructure controlled substrates: effect of nanostructure conditions on neural growth in surface modified substrates, *Proc. ICCE/8*, 2001
  22. N. Kasai, Y. Jimbo, Y. Furukawa, and K. Torimitsu. Glutamate transients at multiple positions in a rat hippocampal slice induced by low magnesium, *The 34<sup>th</sup> Int. conf. of Physiol. Sci.*, 2061, 2001
  23. N. Kasai, Y. Jimbo, O. Niwa, T. Matsue, K. Torimitsu. Real-time multisite observation of glutamate release in rat hippocampal slices, *Neurosci. Lett.*, 304, 112-116, 2001
  24. K. Ajito and K. Torimitsu. Laser trapping and Raman spectroscopy of single cellular organelles in the nanometer range, *Lab on a chip*, 2, 11-14, 2002
  25. 鳥光慶一 情報通信と分子生体機能研究、マイクロメカトロニクス、in press
  26. K. Torimitsu, N. Kasai, Y. Jimbo and Y. Furukawa. Glutamate transients and neuronal bursts at multiple positions in a rat cortex and hippocampus induced by low magnesium, *Gordon Res. Conf.*, Magnesium in biochemical processes and medicine, 2002
  27. Y. Jimbo, N. kasai, K. Torimitsu, T. Tateno and H.P.C. Robinson. MEA-based multi-site stimulation system, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, submitted
  28. K. Ajito and K. Torimitsu. Single Nanoparticle Trapping Using a Raman Tweezers Microscope, *Appl. Spectrosc.*, 56, 2002
  29. Masaki E, Kawamura M, Kato F, Reduction by sevoflurane of adenosine 5'-triphosphate-activated inward current of locus coeruleus neurons in pontine slices of rats. *Brain Research* 921, 226-232, 2001
  30. Kato F, Shigetomi E, Kawai Y, Senba E, Modulation of intrinsic network activity by purinergic receptor channels in the nucleus of the solitary tract. *Jpn J Physiol* 51, S8, 2001
  31. Shigetomi E, Kato F, Excitatory synaptic transmission by activation of presynaptic P2X receptors in the nucleus tractus solitarii of the rat. *Jpn J Physiol* 51, S186, 2001
  32. Shigetomi E, Kato F, Distinct pre- and postsynaptic responses to P2X receptor activation in the nucleus tractus solitarii. *Soc Neurosci Abstr*, 27, 602.4, 2001
  33. Shigetomi E Kato F, Pharmacological properties of presynaptic P2X receptors in the nucleus tractus solitarii of the rat. *Jpn J Pharmacol* 88, 193P, 2002
  34. Takano K, Kato F, Suppression of vagal inspiration-promoting reflex by blockade of P2X receptors in the nucleus of the solitary tract in rabbits, *Jpn J Pharmacol* 88, 193P, 2002
  35. Kawamura M, Masaki E, Kato F, Differential enhancement by distinct cholinergic receptors of GABA- and glycine-mediated inhibitory transmissions in the brainstem nociceptive network, *Jpn J Pharmacol* 88, 240P, 2002
  36. Yamazaki K, Masaki E, Kato F, Effects of sevoflurane on heterologously expressed central-type P2X receptors, *Jpn J Pharmacol* 88, 212P, 2002
  37. 繁富英治, 加藤総夫, 孤束自発シナプス後電流に及ぼす細胞内カルシウム放出チャンネル遮断の影響, *神経化学* 40・2&3, 437, 2001
  38. 川村将仁, 田中淳一, 井上和秀, 加藤総夫, ラット海馬 CA3 錐体細胞への興奮性および抑制性シナプス入力に及ぼす細胞外 ATP の相反的作用. *神経化学* 40・2&3, 437
  39. 福田諭, 加藤総夫, 山口正洋, 宮本有正, 久恒辰博, 成体海馬歯状回における神経幹細胞の電気生理学的特性. *神経化学*, 40・2&3, 456
  40. 加藤総夫, 孤束核 ATP 受容体と呼吸制御. *呼吸と循環* 50, 43-51, 2002
  41. Tominaga M, Wada M and Masu M: Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 6951-6956, 2001

42. Itoh M, Takasaki I, Andoh T, Nojima H, Tominaga M, Kuraishi Y: Induction by carrageenan inflammation of prepronociceptin mRNA in VR1-immunoreactive neurons in rat dorsal root ganglia. *Neuroscience Research* 40: 227-33, 2001
43. Isoda H, Han J, Tominaga M, Maekawa T: Effects of capsaicin on human intestinal cell line Caco-2. *Cytotechnology* 36: 155-161, 2001
44. Yamanaka A, Tsujino N, Funahashi H, Honda K, Guan J-L, Wang Q-P, Tominaga M, Goto K, Shioda S, Sakurai T: Orexin Activate Histaminergic neurons via the Orexin 2 Receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290: 1237-1245, 2002
45. Numazaki M, Tominaga T, Toyooka H, Tominaga M: Direct Phosphorylation of Capsaicin Receptor VR1 by PKC $\epsilon$  and Identification of Two Target Serine Residues. *J. Biol. Chem.* in press
46. Sugiyama T, Tominaga M, Katsuya H and Mizumura K: Bradykinin lowered the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1. *J Neurophysiol.* in press
47. 富永真琴：辛味成分カプサイシンと痛み 食の科学（光琳）279: 34-38, 200
48. 富永真琴：痛み受容体研究の進歩 脳の科学（星和書店）23: 829-835, 2001
49. 富永真琴：痛覚 アエラムック「人間科学がわかる」73: 26-29, 2001
50. 富永真琴：カプサイシン受容体およびそのホモログの構造・機能と制御機構
51. 神経ペプチド 最新の話（第5回 神経伝達物質研究会記録集）Excepta Media p. 10-17, 2001
52. Morioka, N., Takeda, K., Kumagai, K., Hanada, T., Ikoma, K., Hide, I., Inoue, A. & Nakata, Y. Interleukin-1 $\beta$  induced substance P release from rat cultured primary afferent neurons driven by two phospholipase A2 enzyme: secretory type IIA and cytosolic typeIV. *J. Neurochem.* 80, 989-997, 2002
53. Takeda M, Takamiya A, Yoshida A, & Kiyama H. Extracellular signal-regulated kinase activation predominantly in Muller cells of retina with endotoxin-induced uveitis *Invest Opth Vis Sci.*, in press
54. Abe K, Namikawa K, Honma M, Iwata T, Matsuoka I, Watabe K, & Kiyama H. Inhibition of Ras-Extracellular signal-regulated Kinase (ERK) mediated signaling promotes ciliary neurotrophic factor (CNTF) expression in schwann cells. *J. Neurochem* 77(2), 700-703, 2001
55. Sasaki M, Seo-Kiryu S, Kato R, Kita S & Kiyama H. A Disintegrin and Metalloprotease with Thrombospondin type1 motifs (ADAMTS-1) and IL-1 Receptor Type 1 mRNAs are simultaneously induced in nerve injured motor neurons. *Mol Brain Res.* 82, 158-163, 2001
56. Takahashi H, Honnma M, Ishida-Yamamoto A, Namikawa K, Kiyama H, & Iizuka H. Expression of human cystatin A by keratinocytes is positively regulated via the Ras/MEKK1/MKK7/JNK signal transduction pathway but negatively regulated via the Ras/Raf-1/MEK1/ERK pathway. *J Biol Chem.* 276(39), 36632-36638, 2001
57. Takamiya A, Takeda M, Yoshida A, & Kiyama H. Expression of serine protease inhibitor 3 in ocular tissues in endotoxin induced uveitis in rat. *Invest Opth Vis Sci* 42(11), 2427-2433, 2001

## 7. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得：なし
- 2) 実用新案登録：なし
- 3) その他：なし

---

平成13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  
創薬のための生体機能解析に関する研究

平成14年9月10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