

難治性疼痛に関与する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 代謝生化学部
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 |

要 旨

1. ATP 誘発急性アロディニア発症に P2X2+3 受容体ヘテロマーが深く関与している. 2. 慢性神経因性疼痛モデルではアロディニア発症に ATP 受容体とミクログリア p38 活性化が関与している. 3. ATP は後根神経節から substance P を放出する. 4. ATP は代謝型 P2Y1 受容体刺激によりプロテインキナーゼ C を介し痛み受容器パニロイド受容体 VR1 を活性化する. 5. 脳幹での知覚神経情報伝達にも ATP が関与している. 5. ATP 放出リ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、臨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 において最近注目すべき論文として紹介され（10:529-538, 2000）、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、パニロイド受容体 (VR1) およびテトロドトキシン (TTX) 非感受性 Na チャ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を行い、それらを防ぐための予防・治療法開発に資することである。

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。各種病態モデルでのアロディニア発現に関与する 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る。

術後疼痛モデル作製：Brennan らの方法に従い、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、絹糸で 2 箇所縫合した。術後、一定時間後に切開部やや内側に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：Wistar 系雄性ラットを使用し Chung らの報告に従い脊髄神経結紮モデルを作製した。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。術後、1, 3, 7 および 14 日後にアロディニアを評価した。P2 受容体拮抗薬は、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。

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ンケージに保定し、Neurometer CPT/C の Animal response test (ART) mode で、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きの刺激強度 (mA) を電流刺激閾値と定義し、これを指標に薬物の効果を判定した。

三叉神経脊髄路核尾側亜核膠様質 (Sp5cSG) スライス標本等の作製と電気生理実験：幼若ラット (Wistar 系) ならびに幼若マウス (ddY 系もしくは ICR 系) を深麻酔下に断頭し、下部脳幹 (A, B) を摘出した。振動刃スライサーを用いて、(A) Sp5cSG と三叉神経脊髄路を含む脳幹水平断スライス、(B) 孤束核を含む延髄冠状断を作成した。近赤外微分干渉顕微鏡観察下、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。また、スライス中の細胞に Fluo-4AM を負荷し、共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus, Fluoview-300) を用いて、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を記録解析した。作動薬は人工脳脊髄液に溶解し、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。膜電流はパッチクランプ専用アンプで記録し、AD 変換システムを用いてハードディスクに保存した。電極内液に 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、Streptavidin-FITC もしくは Streptavidin-Texas Red で蛍光標識した後、共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。

新規 ATP 測定法の開発：Wistar ラットの脳皮質あるいは海馬神経細胞などを用いて、外液 ATP 濃度を、ルシフェリン・ルシフェラーゼによる発光測定、及びラベル化 ATP による細胞内分布測定・イメージングにより計測した。前者では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採取し、ルミノメータを用いて溶液中の ATP 濃度を測定した。また、後者では、レーザー光によるエバネッセント場や共焦点顕微鏡を用いた測定により ATP 放出量を計測した。

Substance P (SP) の定量：5 日間培養したラット初代培養 DRG を洗浄後 peptidase inhibitor 含有 Krebs-HEPES buffer 中で刺激薬物と共に 37°C, 95% air/5% CO₂ 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。

TTX 非感受性 NaV1.9 電流に対する細胞内外 ATP の影響：C57 / BL / 6 系、および同系マウスより作成した NaV1.8-null mutant の成熟マウス (体重 20 - 30 g) から DRG を無菌単離し、0.2 % collagenase solution、0.1 % trypsin solution の順に各 20 分間酵素処理を行った。その後、10 % heat-inactivated fetal bovine serum および penicillin (100 IU/ml) and streptomycin (100 μ g/ml) を添加した DMEM 中に細胞を分散させ、0.01 % poly-L-lysine コートしたディッシュ上で 37°C、95 % air / 5 % CO₂ の条件で培養した。全ての実験は培養 4 - 12 時間の直径 30 μ m 以下の小型 DRG 細胞を用い、conventional whole-cell patch-clamp 法により膜電流を記録した。

VR1 の ATP による制御と VR1 リン酸化部位の同定：ラット DRG ニューロン、および VR1 強制発現ヒト由来培養細胞 HEK293 にパッチクランプ法を適用して膜電流測定を行った。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。さらに、ラット DRG、HEK293 細胞において P2Y1 の mRNA 及び蛋白質の発現を RT-PCR 法、免疫組織化学法で検証した。VR1 の PKC によるリン酸化部位同定のために、PMA 刺激によって ³²P 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。PKC ϵ 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点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。

3. 研究成果

ATP 誘発急性アロディニア：ラット後肢足底部への P2X 受容体作動薬 α, β -methylene ATP ($\alpha\beta$ meATP) 投与により、著明なアロディニアが発現した。アロディニアは、P2X 受容体拮抗薬 PPADS の前処置により抑制された。VR1 アゴニスト capsaicin を生後まもなく投与して C-繊維を破壊したラット

では P2X₃ 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_{2/3} ヘテロマー受容体を介すると思われる内向き電流は正常群と同様に認められ $\alpha\beta$ meATP はアロディニアを同様に誘発した。またアンチセンスオリゴ法により P2X₃ および P2X₂ 受容体の特異的にノックダウンした動物では、ラット後肢足底部への $\alpha\beta$ meATP 投与によるアロディニアが著明に抑制された。以上の結果から本アロディニアには A δ 神経の P2X_{2/3} ヘテロマー受容体が関与していると考えられる。

術後疼痛モデル: ラット足底部の皮膚切開により著明な急性アロディニアが出現する。ATP 誘発急性アロディニアの生理的意義を明らかにするために、本アロディニアに対する PPADS の効果を検討した。その結果、アロディニアは PPADS 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、損傷側後肢にのみ著明なアロディニア反応が認められ、損傷後 2 週間目をピークとした。本反応は PPADS ではなく、別の ATP 拮抗薬 TNP-ATP の投与により用量依存的に著明に抑制された。さらに、損傷側の脊髄内ではミクログリアやアストロサイトなどグリア細胞が非常に活性化され、特に C-繊維や A δ 繊維、ならびに運動神経が入力されている部位でその活性化が著明であった。その活性化の程度は、術後発症するアロディニアの重症度の経時変化と一致し、術後 2 週間目をピークとした。また、数種類の mitogen activated protein kinases (MAPKs) のうち、p38 のリン酸化 (活性化) がアロディニアの重症度の経時変化と一致して増強され、しかも p38 活性化が認められたのは、唯一ミクログリアであった。加えて、p38 活性化の阻害剤の髄腔内投与により、p38 活性化は阻害され、かつアロディニアが抑制された。

Neurometer による in vivo 知覚/痛覚閾値測定: ラットでは Neurometer の 2000 Hz 刺激は A β -fiber を、250 および 5 Hz 刺激はそれぞれ、A δ -および C-fiber を選択的に刺激することが明らかとなった。PPADS (6 及び 60 μ 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 μ g i. t. 投与では、PPADS と同様に 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。一方、ATP アナログの $\alpha\beta$ meATP 10 μ 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。UTP 投与はすべての用量、周波数において閾値に変化は認められなかった。

脳幹スライス標本における ATP の関与: (A) マウス三叉神経脊髄路核スライスの Sp5cSG ニューロンに及ぼす ATP の作用: ATP (100-300 mM) の投与によって全 18 例中 2 例で一過性外向き電流、7 例で一過性内向き電流が観察された。三叉神経求心性線維を電気刺激して得られる Sp5cSG ニューロンでの誘発シナプス後電流は 4 種のパターンを示した。Type 1 (約 43%): 短潜時の興奮性シナプス後電流 (EPSC)、Type 2 (約 13%): 短潜時の内向き電流に続く長潜時・長持続の抑制性シナプス後電流 (IPSC)、Type 3 (約 13%): 短潜時の EPSC に続く長潜時の EPSC、Type 4 (約 13%): 長潜時・長持続の IPSC。ATP (100 mM および 1 mM) は Type 1 誘発 EPSC を約 47% および約 63% まで減少し、この効果はアデノシン A1 受容体遮断薬 DPCPX (1 mM) により半減した。Type 1 の自発 EPSC 頻度を 1 mM ATP は約 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 は、Type 2 の長潜時の IPSC 振幅のみを約 8% まで著明に減少した。Type 3 および Type 4 は ATP によってほとんど影響を受けなかった。同標本での $[Ca^{2+}]_i$ では、高濃度 K⁺溶液 (20 mM) の投与によって $[Ca^{2+}]_i$ が上昇した全 35 細胞のうち、18 細胞で ATP (100 mM) によって同程度の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が生じた。また、高濃度 K⁺溶液によって $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が観察されず ATP によって $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が観察された細胞が 11 例認められた。

(B) 孤束核 2 次ニューロンへのシナプス入力に及ぼす ATP の作用: 我々がすでに証明した孤束核におけるグルタミン酸放出について機序解明を試みた。自発 EPSC は電位依存性 Ca²⁺ チャネルあるいはテトロドトキシンに抵抗性を示すが、ATP もしくは $\alpha\beta$ meATP (100 mM) により著明な頻度増加が生じ、そのうち 79.5% の細胞においては、自発 EPSC 振幅も有意に増加した。ATP はシナプス前細胞の興奮なしに、グルタミン酸の同期的放出を引き起こし、このグルタミン酸の放出は、その頻度の高さや振幅の大きさのため、シナプス後細胞に活動電位を生じさせ得たと考えられた。孤束核の IPSC 頻度は、EPSC 頻度とは異なり、 $\alpha\beta$ meATP によってまったく影響を受けなかったことから、シナプス前 P2X 受容体の活性化による伝達物質放出確率の増大は、孤束核においては興奮性シナプスに特異的であることが証明された。次に、GAD67-GFP トランスジェニックマウス (国立生理学研究部神経化学部門・柳川右千夫博士からの供与) を用い、記録前に細胞が GABA 作動性か否かを同定した上で、 $\alpha\beta$ meATP の作用を

観察した。GAD67-GFP 陰性ニューロンの 100%が自発 EPSC 頻度の増加を示したのに対し、GAD67-GFP 陽性ニューロンの約半数近くにおいては明瞭な自発 EPSC 頻度の増加が認められなかった。つまりシナプス前 P2X 受容体の活性化によるグルタミン酸放出促進作用はシナプス後細胞が興奮性である場合が多かった。グルタミン酸放出に対する TNP-ATP の IC50 は 1.0 mM と推定され、関与する受容体は P2X1, P2X3, P2X2/3 ではないと示唆された。αβmeATP によって ATP よりも強い作用が観察されたことから P2X2 ホモ体サブタイプの関与の可能性も低い。P2X4/6 あるいは、P2X1/5 のサブタイプ、もしくは、まだ報告されていないヘテロ体受容体である可能性が高い。なお、免疫電子顕微鏡法を用い、興奮性と考えられるゴルジ I 型シナプスの前膜上に P2X4 サブユニットが発現していることは確認した。

新規 ATP 測定系の開発：大脳皮質細胞及び海馬神経細胞において、初代培養開始後 2-3 日でシナプス活動に伴う発火現象が観測可能となり、2-3 週程度で、頻繁に自発活動を繰り返すようになる。ATP はこれを一過性に増強したのち、可逆的に抑制した。グルタミン酸酸化酵素を用いた酵素電気化学計測により、神経活動とグルタミン酸との関連、さらには ATP との関連について検討を行った。その結果、刺激に伴って大脳皮質分散培養細胞より一過性のグルタミン酸放出が観測された。また、刺激に伴って放出されるグルタミン酸は海馬各部位、例えば CA1, CA3 により異なり、応答解析において本センサー測定のような多点同時計測、空間的解析の必要性が非常に有効であることが示された。さらに、電気活動との同時計測より、このグルタミン酸放出がスパイク数の増減と密接に関連しており、グルタミン酸受容体のアンタゴニストによって影響を受けることが明らかになった。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結果、ATP 濃度は KCl 刺激後比較的ゆっくりではあるが一過性に増加した。これは NMDA 受容体のアンタゴニスト MK801 により一部抑制され、NMDA 受容体の関与が示唆された。ATP 細胞内分布および、ATP の直接観察を目的に、ATP を TEXAS-RED でラベル化し神経細胞に取り込ませた後、共焦点レーザー顕微鏡、もしくはエバネッセント場計測法により ATP 変化の画像化を行った。また、ATP 放出とシナプス活動との関連性を調べるため、FM1-43 とのダブルラベルを行い Kr-Ar レーザ励起による ATP 濃度変化を測定した。その結果 ATP の細胞外への放出に伴い、細胞内 ATP 濃度は、一過性に減少し、FM1-43 も同様に減少した。また、MK801 によりその減少は軽度抑えられた。全般的に ATP と FM1-43 は共存する傾向にあるが、場所によっては片方のみ存在する。また、ATP は細胞内で vesicle 状に存在しており、局所的に濃度が高い場所があることが明らかになった。ここでは、FM1-43 の蛍光も高いことから、ATP がシナプス活動と密接な関係にあることが示唆された。

ATP による Substance P 放出：ラット初代培養 DRG では ATP は 1mM 以上の濃度で SP を有意に遊離し、これは PPADS (50, 100 μM) により部分的に抑制され、細胞外 Ca²⁺ を除去により消失した。αβmeATP 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 μM 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。

TTX 非感受性 NaV1.9 電流に対する細胞外 ATP の影響：ニスタチン法により NaV1.9 電流量に対する ATP 500 μM の影響を検討した。その結果、ATP の還流直後から NaV1.9 電流が減少する傾向が見られた。さらに、ATP の還流を止めても電流量は減少したままであり、ATP の作用は不可逆的あるいは持続的であることが示唆された。

パニロイド受容体 VR1 の ATP による制御：VR1 を発現した HEK293 細胞では、細胞外 ATP (1 ~ 100 μM) はカプサイシン濃度依存曲線・プロトン濃度依存曲線を、最大電流を変化させることなくいずれも低濃度側へシフトした。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 P2Y₁ 受容体であり、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。PMA 存在下、放射性 ³²P の VR1 蛋白質への取り込みの増加がみられ、VR1 が PKC によってリン酸化されることが示された。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 PKCε によるリン酸化に強く関与することが判明した。この ATP と TRPV1 の機能連関を個体レベルで確かめるために、TRPV1 欠損マウスで ATP 投与による疼痛関連行動を観察した。ATP の足底皮内注射後に放射性熱刺激による痛覚過敏反応を検討した。野生型マウスでは、投与 5-30 分の間、逃避行動潜時の短縮（熱性痛覚過敏）が観察された。TRPV1 欠損マウスでは、そのような熱性痛覚過敏は全く観察されず、個体レベルにおいて ATP と TRPV1 の機能連関が明らかとなった。P2Y₁ 欠損マウスを用いて同様の行動解析を行ったが P2Y₁ 欠損マウス

でも、野生型マウスと同じような熱性痛覚過敏が観察された。マウス DRG 細胞におけるカプサイシン活性化電流の増強効果について再検討した結果、P2Y2 受容体の関与が明らかとなった。

4. 考察・まとめ

ATP は二種類の疼痛行動（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）を引き起こす。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り臨床上最も問題となる痛みであるが、その発生機序については未だ明確にされておらず、有効な治療薬も少ない。今回の研究により、世界で初めて急性アロディニア反応に A δ 繊維の P2X2/3 ヘテロ受容体が関与していることを明らかにできた。一方、慢性的神経因性疼痛モデルラット DRG 内の ATP 受容体 mRNA 発現量は正常値 (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) に比して様々に変化したことから、慢性疼痛発現に何らかの役割を担っていると推測される。これは行動薬理的にも示され、アロディニア反応はアンタゴニスト TNP-ATP により著明に抑制された。PPADS が無効なことから、責任受容体は急性アロディニアとは異なる。さらに、損傷側の脊髄内のミクログリアやアストロサイトなどグリア細胞が非常に活性化され、その活性化の程度は、術後発症するアロディニアの重症度の経時変化と一致し、術後 2 週間目をピークとした。また、MAPKs のうち、p38 のリン酸化（活性化）がアロディニアの重症度の経時変化と一致して増強され、しかも p38 活性化が認められたのは、唯一ミクログリアであり、かつ、p38 活性化の阻害剤の髄腔内投与により、p38 活性化は阻害されるとともにアロディニアが抑制されたことにより、ミクログリアの増殖、肥大、p38 活性化が神経因性疼痛発症に何らかの重要な役割を担っていると考えられる。この事実は非常に重要であり、ここを新しい切り口として慢性疼痛発症のメカニズム解析が進むであろう。

痛覚情報の統合ならびに伝達に関与する中枢ネットワークにおける ATP 受容体の役割について検討した結果、最も著明な反応が認められたのは孤束核においてであった。この部位には内臓痛等の入力があるが、シナプス前 P2X 受容体活性化によるグルタミン酸放出が極めて高い効率で促進されることが証明された。（同様な知見が大脳皮質細胞及び海馬神経細胞において、グルタミン酸酸化酵素を用いた酵素電気化学計測によっても明らかにされた。）しかもこの放出促進は、興奮性シナプスにのみ限定していた。驚くべき発見は、シナプス前 P2X 受容体の活性化が、シナプス前細胞の興奮がまったくない状態においても、興奮性シナプス伝達を起こし、シナプス後細胞に活動電位を生じさせた事実である。すなわち、ニューロンからニューロンへの情報伝達が、従来の教科書的な過程を経ることなく、細胞外 ATP 濃度の上昇のみによって生じ得る事実が脳内のシナプスで初めて証明されたのである。孤束核においては興奮性ニューロンが自己興奮的局所ネットワークを構成して、一定の興奮レベルを維持していることが明らかにされているので、この結果は、細胞外 ATP 濃度の上昇が、興奮性求心性入力なしに、内因性自発的持続的興奮状態をもたらすことを意味している。これは、孤束核の興奮が視床下部、疑核、迷走神経背側核、延髄吻腹外側核などの生命維持に関与した諸神経核の活動を強く制御している事実から考えて、痛み信号と同様に生体内外の異常を警告し、内環境を最適化する重要なシステムであると推察される。

以上、難治性疼痛に関与する 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 P2X2/3 ヘテロ受容体刺激によりアロディニア反応が出現する。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 受容体がグリア細胞の活性化を巻き込んで重要な役割を担っ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。さらに孤束核や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くこともできた。

5. 研究発表

[原著]

1. S. Koizumi and K. Inoue. Astrocytic ATP-mediated communication between astrocytes and neurons in the primary culture of hippocampus. Drug Develop Res, in press.
2. Iida T, Moriyama T, Kobata K, Morita A, Urano H, Murayama N, Hashizume S, Fushiki T, Yazawa S, Watanabe T and

- Tominaga M: TRPV1 Activation and Induction of Nociceptive Response by a Non-pungent Capsaicin-like Compound, Capsiate. *Neuropharmacology*, in press
3. S. Ishida, Y. Shigemoto-Mogami, H. Kagechika, K. Shudo, S. Ozawa, J. Sawada, Y. Ohno, K. Inoue. Clinically Potential Subclasses of Retinoid Synergists Revealed by Gene Expression Profiling. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2, 49-58, 2003
 4. K. Furukawa, K. Ebata, H. Nakashima, Y. Kashimura, and K. Torimitsu. Polysilane Bearing "Sulfide Tripod" Terminus: Preparation and Selective Chemisorption to Gold Surface, *Macromolecules*, 36, 9-11, 2003
 5. S. Koizumi, Y. Saito, K. Nakazawa, K. Nakajima, J. Sawada, S. Kohsaka, P. Illes, Inoue K. Spatial and temporal aspects of Ca signaling mediated by P2Y receptors in cultured rat hippocampal astrocytes. *Life Sci.* 72,431-42, 2002.
 6. H.Aihara, S.Fujiwara, I.mizuta, H.Tada, T.Kanno, H.Tozaki, K.Nagai, Y.Yajima, K.Inoue, T.Kondoh, Y.Motooka and T.Nishizaki. Adenosine triphosphate accelerates recovery from hypoxic/hypoglycemic perturbation of guinea pig hippocampal neurotransmission vvia a P2 receptor. *Brain Research*, 952, 31-37, 2002
 7. S.Koizumi, P.Rosa , G. B. Willars, R.A. J. Challiss , E. Taverna , M. Francolini 2 , M. D. Bootman, P. Lipp, K. Inoue, J. Roder and A. Jeromin. Mechanisms underlying the neuronal calcium sensor-1-evoked enhancement of exocytosis in PC12 cells. *J.Biol.Chem.* 277, 30315-30324, 2002
 8. M. Tsuda, Y. Shigemoto-Mogami, S. Ueno, S. Koizumi, H. Ueda, T. Iwanaga and K. Inoue. Down-regulation of P2X3 receptor-dependent sensory functions in A/J inbred mouse strain. *Eur.J.Neurosci.* 15, 1444-1450, 2002
 9. K.Inoue, S.Koizumi, S.Fuziwara, S.Denda, K.Inoue and M.Denda. Functional vanilloid receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. *BBRC*, 291, 124-129, 2002
 10. T. Nakanishi, H. Okamoto, Y. Nagai, K. Takeda, I. Obataya, H. Mihara, H. Azehara, Y. Suzuki, W. Mizutani, K. Furukawa and K. Torimitsu. Synthesis and atomic force microscopy observations of the single-peptide nanotubes and their micro-order assemblies, *Physical Review B*, 66, 165417-1-8, 2002
 11. Y. Jimbo, N. Kasai, K. Torimitsu, T. Tateno and H.P.C. Robinson. MEA-based multi-site stimulation system, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, in press, 2002
 12. Z.-B. Zhan, M. Fujiki, M. Motonaga, H. Nakashima, K. Torimitsu , and H. Tang. Chiroptical properties of poly{3,4-bis[(S)-2-methyloctyl]thiophene}, *Macromolecules*, 35, 941-944, 2002
 13. M. Fujiki, H. Tang, M. Motonaga, K. Torimitsu, J. R. Koe, J. Watanabe, T. Sato and A. Teramoto. Thermo-driven chiroptical switching polysilylene featuring 2-cyclopentylethyl side group, *Silicon Chemistry*, in press, 2002
 14. Nishi, H. Kato, F. Masaki, E. Kawamura, M.: ADP-sensitive purinoceptors induce steroidogenesis via adenylyl cyclase activation in bovine adrenocortical fasciculata cells. *Brit. J. Pharmacol.* 2002, 137: 177-184.
 15. K. Ajito and K. Torimitsu. Single Nanoparticle Trapping Using a Raman Tweezers Microscope, *Appl. Spectrosc.*, 56, 541-544, 2002
 16. K. Ajito and K. Torimitsu. Laser Trapping and Raman Spectroscopy of Single Cellular Organelles, *Lab on a chip*, 2, 11-14, 2002
 17. Z.-B. Zhan, M. Fujiki, H. Tang, M. Motonaga and K. Torimitsu The First High Molecular Weight Poly(N-alkyl-3,6-carbazole)s, *Macromolecules*, 35, 1988-1990, 2002
 18. N. Kasai, Y. Jimbo and K. Torimitsu, Electrochemical monitoring of glutamate release at multiple positions in a rat hippocampal slice, *Analytical Science*, in press, 2002
 19. Morioka, N., Takeda, K., Kumagai, K., Hanada, T., Ikoma, K., Hide, I., Inoue, A. & Nakata, Y. Intereukin-1 β 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)
 20. N. Morioka, A. Inoue, K. T. Harada, K. Kumagai, K.Takeda, K.Ikoma, I. Hide, Y. Tamura, H. Shiomi, T. Dohi, and Y. Nakata: Nitric oxide synergistically potentiates interleukin-1 β induced increase of cyclooxygenase-2 mRNA levels, resulting in the facilitation of substance P release from primary afferent neurons :involvement of cGMP-independent mechanisms. *Neuropharmacology* 43, 868-876 (2002)
 21. 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.
 22. Numazaki M, Tominaga T, Toyooka H, Tominaga M: Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by PKC ϵ and identification of two target serine residues. *J. Biol. Chem.* 277: 13375-13378, 2002.

23. Sugiura T, Tominaga M, Katsuya H and Mizumura K: Bradykinin lowered the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1. *J Neurophysiol.* 88: 544-548, 2002.
24. Güler A, Lee H, Iida T, Shimizu I, Tominaga M and Caterina M: Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *J. Neurosci.* 22: 6408-6414, 2002.
25. Tominaga T, Meng W, Togashi K, Urano H and Tominaga M: mDia inhibits the DNA-binding ability of Pax6 and changes the pattern of neurite extension in cerebellar granule cells through its binding to Pax6. *J. Biol. Chem.* 277: 47686-47699, 2002.
26. 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
27. 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
28. K. Inoue and S. Koizumi. Mechanism of the inhibitory action of ATP in rat hippocampus. *Drug Develop Res.* 52, 95-103, 2001
29. K. Inoue. Independent signaling pathways in ATP-evoked secretion of plasminogen and cytokines from microglia. *Drug Develop Res.* 53, 166-171, 2001
30. 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
31. 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
32. K. Ajito and K. Torimitsu. Near-infrared Raman Spectroscopy of Single Particles, *Trends in Anal. Chem.*, 20, 255-262, 2001
33. 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
34. 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
35. 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.
36. 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.
37. Isoda H, Han J, Tominaga M, Maekawa T: Effects of capsaicin on human intestinal cell line Caco-2. *Cytotechnology* 36: 155-161, 2001.
38. 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
39. 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ネル遮断の影響、*神経化学* 40・2&3, 437, 2001
40. 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 の相対的作用。 *神経化学* 40・2&3, 437, 2001
41. 福田論、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, 2001
- [総説および単行本]
42. 井上和秀. ATP 受容体. 麻酔管理. 真興交易 (株) 医書出版部 印刷中
43. 井上和秀. アデノシン受容体. 麻酔管理. 真興交易 (株) 医書出版部 印刷中
44. 井上和秀. ATP と痛み: 危機管理分子 ATP. *脳* 21 6, 16-21, 2003
45. 富永真琴: TRP チャネルと痛み *脳* 21 6: 11-15, 2003.
46. 井上和秀. ミクログリアにおける ATP 受容体の発現と脳内生理機能. *神経研究の進歩* 46, 533-542, 2002
47. 井上和秀. ATP 受容体と慢性疼痛. *Clinical Neuroscience* 20, 1119-1121, 2002
48. K. Inoue. Microglial activation by purines and pyrimidines. *Glia* 40, 156-163, 2002
49. 小泉修一、井上和秀. 海馬 astrocyte によるダイナミックなシナプス伝達制御. 脳機能の解明-生命科学の

- 主潮流-赤池紀扶、東英穂、阿部康二、久保千春編 p.91-98、ガイア学出版会、2002
50. 井上和秀. 疼痛制御における ATP 受容体の役割. 痛みとその制御機構- 分子メカニズムと治療の最前線. 土肥修司編, 医歯薬出版, 2002
 51. 神保泰彦, 河西奈保子, 鳥光慶一. 電極アレイによる神経活動計測, マイクロマシン, 632-637, 2002
 52. 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
 53. 富永真琴: Regulation Mechanism of Capsaicin Receptor VR1 脳機能の解明「生命科学の主潮流」 赤池紀扶、東英穂、阿部康二、久保千春(編)ガイア出版会 p. 533-539, 2002.
 54. 富永真琴: 痛覚(カプサイシン受容体)脳神経科学入門講座下巻 渡辺雅彦(編)羊土社 p. 104-116, 2002.
 55. 富永真琴: Vanilloid 受容体 医学のあゆみ 200: 1068, 2002.
 56. 沼崎満子, 富永真琴: カプサイシン受容体 医学のあゆみ 201: 1071-1075, 2002.
 57. 富永真琴: ホットなトウガラシとクールなミント 現代化学 No. 376: 42-46, 2002.
 58. 飯田陶子, 富永真琴: カプサイシン受容体 CLINICAL NEUROSCIENCE 20: 1111-1114, 2002.
 59. 飯田陶子, 富永真琴: 痛み・温度を感じる 細胞工学 21: 1420-1424, 2002.
 60. 井上和秀. 特集に寄せて. 生体の科学 52, 92-94, 2001
 61. 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
 62. 津田誠, 小泉修一, 井上和秀. 痛みと ATP. 生体の科学 52, 131-137, 2001
 63. 井上和秀. ATP と痛覚. Clinical Neuroscience 19, 1212-1213, 2001
 64. 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
 65. 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
 66. 井上和秀, 津田 誠, 小泉修一. ATP および非受容体イオンチャネル. オピオイド治療: 課題と新潮流, 鎮痛薬・オピオイドペプチド研究会編. 240-245, エルゼビア・サイエンスミクス社, 2001
 67. 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、45、1-6, 2001
 68. 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, 2001.
 69. 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.
 70. 富永真琴: 痛覚 アエラムック「人間科学がわかる」73: 26-29, 2001.
 71. 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 神経ペプチド 最新の話題(第5回 神経伝達物質研究会記録集) Excepta Media p. 10-17, 2001.
 72. 富永真琴: 痛み刺激受容の分子機構 カプサイシン vanilloid receptor と疼痛制御 日本ペインクリニック学会誌 9: 57-61, 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