

平成15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

目 次

課題番号

20030895A KH21009	リン脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	西島正弘 …… 1
896A KH21010	低酸素センサーを介する虚血性および変性性神経疾患の機序解明と新規治療薬開発	芝崎 太 …… 6
897A KH21011	細胞内情報伝達分子を標的とした抗ウイルス剤および抗癌剤の開発	松田道行 …… 19
898A KH21012	抗動脈硬化性リポ蛋白質HDLの代謝制御機構	新井洋由 …… 25
899A KH21013	ゲノム修復と細胞分裂に関連する因子の構造機能解析と応用に関する研究	葛西正孝 …… 33
900A KH21014	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	井上和秀 …… 39
901A KH21015	動脈硬化症進展阻止のための血管内皮細胞特異的発現EDG受容体作働薬・拮抗薬の開発	望月直樹 …… 47
902A KH21016	天然物由来シグナル伝達制御物質の探索と創薬への応用に関する研究	上原至雅 …… 51
903A KH21017	肥満/糖尿病発症予防のためのターゲット遺伝子の同定と制御法の開発	江崎 治 …… 55
904A KH21018	ゲノム情報にもとづいた移植免疫抑制にかかわる遺伝子の検索と創薬への応用に関する研究	絵野沢 伸 …… 59
905A KH21019	神経・免疫・内分泌相関による生体防御機構の解明と創薬	田平 武 …… 62
906A KH21020	レクチン機能を利用した血管における生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 …… 67
907A KH21021	感染症に関連した免疫異常の解析と新規制御物質の開発	鈴木和男 …… 74
908A KH21022	自己免疫性膵炎発症に関連するIgG 4型抗体の認識する自己抗原の検索、ならびに特異的診断システムの開発	川 茂幸 …… 84
909A KH21024	動物細胞におけるラフト等の脂質膜ドメインを介した生体機能調節機構の解析と疾病関連因子探索への応用	北川隆之 …… 89
910A KH21025	新規サイトカインの炎症性疾患における役割の解析と創薬への応用	山越 智 …… 95
911A KH21026	マイクロアレイDNAチップを用いた各種病態関連発現遺伝子の解析	辻本豪三 …… 104
912A KH21027	細胞死をもたらすストレスシグナル伝達機構の解析および生体防御機構の解明	桃井 隆 …… 111
913A KH22071	ウイルスの侵入および発芽過程を標的とした次世代抗インフルエンザ薬の開発	鈴木康夫 …… 118
914A KH22072	サイトカインシグナル制御分子による慢性関節リウマチの治療薬の開発	吉村昭彦 …… 121
915A KH22073	T細胞の活性化およびヘルパーT細胞サブセットの分化を特異的に制御する手法の樹立	宮武昌一郎 …… 125
916A KH22082	変異型HB-EGFノックインマウスによる循環器疾患の解析	目加田英輔 …… 133

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 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 岡田正路
- (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)広島大学医学部 仲田義啓
- (5)福島医科大学 松岡 功

要 旨

神経因性疼痛の主症状アロディニア発症と維持に脊髄ミクログリア P2X4 受容体の活性化が必要であることを明らかにした (Nature 424, 778-783, 2003)。本論文は難治性疼痛の新しい作用メカニズムとして世界的な注目を浴び (Nature, News & Views 424: 729-730, 2003)、また、ATP 受容体が鎮痛薬の新しいターゲットとして紹介された (Nature Reviews /Drug Discovery 2, 772-773, 2003)。

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。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 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

Neurometer による in vivo 知覚/痛覚閾値測定 (末梢知覚神経選択的刺激): 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。

神経因性疼痛モデル: 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。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 (PPADS) および 2', 3'-O-(2, 4, 6-trinitrophenyl) adenosine 5-triphosphate (TNP-ATP)を用いた行動薬理学的手法、ならびに標的受容体 (P2X4) アンチセンスオリゴ法によった。

脳スライス標本等の作製と電気生理実験 (中枢神経系での侵害刺激等の処理に関する研究): 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 Ca²⁺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 μm) 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。

3. 研究成果

Neurometer による in vivo 知覚/痛覚閾値測定: 我々はすでに、ラットでは Neurometer の 2000 Hz 刺激は Aβ-fiber を、250 および 5 Hz 刺激はそれぞれ、Aδ-および C-fiber を選択的に刺激することを明らかとした。これは、この方法が、非侵襲的に侵害刺激や非侵害刺激を与えうることを意味している。本方法を用いて、これまでに正常ラット脊髄髄腔内に投与した各種 ATP 受容体作動薬および阻害薬の痛覚閾値に対する影響を検討し、正常動物では脊髄内 ATP 受容体の痛覚伝達における関与は小さいという結果を得ている。神経傷害モデルあるいは慢性炎症モデルでは、DRG に存在する P2X 受容体の感受性が増大しているという報告があることなどから、ATP 受容体は正常時よりむしろ病態時の疼痛伝達に深く関与していることが報告されている。そこで本研究では、complete Freund's adjuvant (CFA) 誘発関節炎モデルラット (以下 CFA ラットと記す) での痛覚伝達における ATP

受容体の関与を調べることを目的とし、CFA ラットに選択的 P2X₃/P2X_{2/3} 受容体阻害薬 (A-317491: 山之内製薬において合成) を静脈内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。

その結果、正常ラットでは、生理食塩水および A-317491 静脈内累積投与はすべての周波数刺激時の閾値に対して影響を与えなかった。一方、CFA ラットにおいては、A-317491 静脈内累積投与により 5 Hz 刺激時の閾値が 3 mg/kg から次第に上昇し、30 mg/kg で有意に上昇した。2000 および 250 Hz 刺激時の閾値に対しては 30 mg/kg の用量まで何ら影響を与えなかった。また、CFA ラットに生理食塩水を静脈内投与した場合は、痛覚閾値に変化は認められなかった。

脊髄神経損傷モデル: アロディニア (異痛症: 触刺激など非侵害刺激を痛みと誤認識する病態) を示す神経因性疼痛動物モデルとしてラットの第 5 腰髄 (L5) 脊髄神経を結紮した後、その末梢側を切断する神経因性疼痛動物モデルを用いた。まず、このメカニカル・アロディニアの発現に脊髄内 P2X 受容体が関与するか否かを行動薬理学的手法で調べた。モデル動物の脊髄腔内へ、P2X4 を阻害する TNP-ATP を投与した場合、メカニカル・アロディニアはほぼ完全に抑制された。一方、P2X4 を阻害しない PPADS では抑制は全く認められなかった。このように P2X4 の関与が示唆されたので、脊髄後角におけるその発現量を解析した。その結果、疼痛モデルでは P2X4 タンパク質の発現がアロディニア強度の経時変化によく相関して上昇した。しかも、P2X4 受容体陽性細胞を同定したところ、それは神経細胞やアストロサイトではなくて、ミクログリアであることが判明した。ミクログリア細胞一個あたりで調べた場合にも P2X4 タンパク質の発現量が劇的に増えていた。さらに、P2X4 受容体発現を遺伝子レベルで抑制するアンチセンスオリゴ (AS) を作製し、メカニカル・アロディニアに対する効果を検討した。P2X4AS 髄腔内投与ラットでは P2X4 受容体タンパクとメカニカル・アロディニアの発現を同程度有意に抑制できた (図 1)。

さらに ATP (50 μM) によりイン・ビトロにて P2X4 受容体を刺激したミクログリア細胞を正常ラットの脊髄髄腔内へ投与したところ、投与後 5 時間目にメカニカル・アロディニアが発症した (図 2 黒●)。そして P2X4 受容体を TNP-ATP で予め遮断しておくことで、ATP による刺激効果・痛み発現は完全に阻害された (図 2、

黒■)。これらの結果は、ミクログリア P2X4 受容体からのシグナルがメカニカル・アロディニア発症と維持に必須であることを示している。

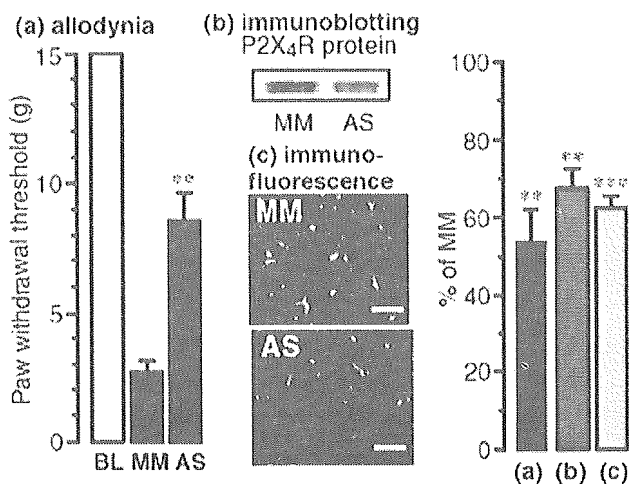


図1 アンチセンスオリゴ(AS)投与による P2X4 タンパク発現低下とアロディニアの抑制
AS 投与群の P2X4 発現低下の程度と、アロディニアの強度抑制の程度がほぼ一致した。

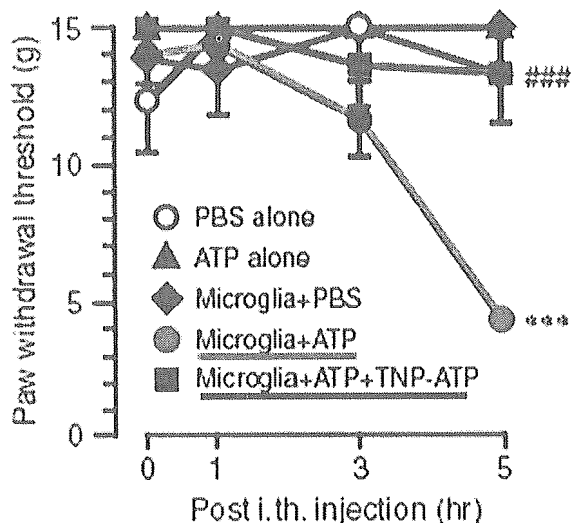


図2 正常ラット髄腔内に活性化ミクログリアを投与したことによるアロディニア発現

脳スライス標本における ATP の関与：

(1) 内臓知覚性、特に、腹腔部からの痛み情報を受容し統合する延髄孤束核のスライスを作成し、2次ニューロンにおいて細胞外 ATP 濃度の上昇によって生じるシナプス伝達の変調現象の分子・細胞機構をパッチクランプ法で解析した。ラットおよびマウスにおいて、孤束核 2次ニューロンを形態的および生理学的に同定し、興奮

性シナプス後電流 (EPSC) を記録した。孤束核興奮性シナプスにシナプス前 P2X が発現し、その活性化が P2X 受容体からの Ca^{2+} 流入を促し、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルに依存しないグルタミン酸の放出を誘発する事実を証明し、昨年度の本報告書で報告した。本年度は、孤束核におけるグルタミン酸放出機構およびその生理的意義の解明を試みた。

活動電位に依存しない神経伝達物質放出は、一般に、単シナプス小胞性放出からなり、シナプス後側受容体の活性が変化しない限り、惹起される EPSC 振幅は変化しない。ところが ATP および $\alpha\beta$ meATP による EPSC 頻度増大時、80.1% のニューロンでは、微小 EPSC 振幅の増大が生じた。この高振幅 EPSC は、P2X 受容体以外の他のシナプス前受容体活性化によっては観察されず、また、神経伝達物質放出が P2X 受容体活性化によって生ずる他の神経核では認められないため、孤束核シナプスの P2X 受容体に特徴的な性質である。事実、麻酔下動物中枢神経系への P2 受容体作動薬局所投与によって著明な生体反応が生じるとする報告は、脊髄後角の疼痛反応を除き、孤束核以外にはされていない。

(2) 顔面神経軸索切断によって、ATP 受容体を発現するミクログリア細胞が活性化され、顔面運動神経核に凝集することが知られているが、その凝集活性化機構を同定するために、顔面神経軸索損傷モデルを用いて軸索損傷に伴うシナプス入力の変化を解析した。その結果、切断後わずか1日目において、軸索切断ニューロンは、非切断側の約3倍の頻度の有意に多くのシナプス入力を受けることが明らかになった (図3)。切断側と非切断側間のこの有意な差は、tetrodotoxin 存在下でも認められたため、前運動ニューロンの興奮性の変化のみならず、興奮性シナプスの伝達効率の可塑的な変化が切断後わずか1日の間に生じたことを意味している。このシナプス入力の増大は、すでに報告されている運動ニューロンの電気的膜特性の変化よりも3~4日早く認められた。また、切断から3日目以降にはこのシナプス入力の有意な増加はもはや観察されず、おそらくは細胞の小型化およびシナプス減少にともない、シナプス入力頻度は、切断側よりも有意に低値を示した(図3)。この、運動ニューロン軸索切断のわずか1日目における有意なシナプス入力の増加は、かつて報告されていない所見であり、これに伴う運動ニューロン近傍での細胞外 ATP 濃度上昇によるミクログリアの活性化、および、グル

タミン酸による細胞毒性によって、運動神経のアポトーシスとマイクログリアによる保護、あるいは、貪食過程が誘発される可能性が示された。

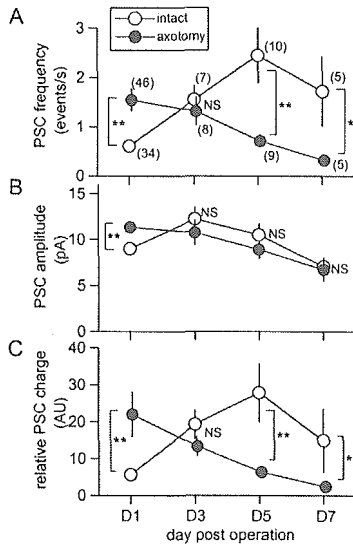


図3 顔面神経軸索切断後のシナプス入力の変化
○は無償側、●は切断側でのシナプス後電流値。
**, P < 0.01; *, P < 0.05; NS, not significantly different between sides (Mann-Whitney U-test).

4. 考察・まとめ

ヒトにおいて Neurometer の 2000 Hz 刺激は大径神経線維 (A β -fiber) を、250 および 5 Hz 刺激はそれぞれ、小径神経線維である A δ -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 C-fiber もしくは C-および A δ -fiber に選択的に作用するとされる capsaicin が 250 および 5 Hz 刺激時の閾値を上昇させること、および C-fiber を介した反応のみを抑制するとされる morphine 20 μ g i.t.投与が 5 Hz 刺激時の閾値のみを選択的に上昇させることを示し、実験動物においても Neurometer による神経経選択的な神経機能検査が可能であることを報告している。今回は、病態時における ATP 受容体の痛覚伝達に対する役割を調べる目的で、慢性炎症性疼痛モデルの一つである CFA ラットを用い、選択的 P2X₃/P2X_{2/3} 受容体阻害薬 (A-317491) 静脈内累積投与による痛覚閾値の変化を Neurometer により測定した。正常動物に対する A-317491 の作用を検討したところ、2000、250 および 5 Hz のすべての周波数刺激時の閾値に変化は認められなかった。これは、正常ラットに脊髄内投与した各種 ATP 受容体阻害薬は痛覚閾値に変化を与えなかったというこれまでの我々の結果と一致する。次に、慢性炎症性疼痛モデルである CFA ラットを用

いて同様の検討を行った。A-317491 は、2000 および 250 Hz 刺激に対しては、30 mg/kg まで何ら閾値に影響を及ぼさなかった。一方、5 Hz 刺激に対しては、痛覚閾値が 3 mg/kg から上昇傾向を示し、30 mg/kg で有意に上昇した。CFA モデルでは CFA 足底投与 1 日後から熱痛覚過敏が生じているという我々の報告および CFA ラットの DRG では P2X₃/P2X_{2/3} 受容体発現が亢進し ATP に対する反応性が増大しているという Xu らの報告から、A-317491 は、CFA ラットの熱痛覚過敏発現時に活性化された P2X 受容体に作用して C-fiber を介した痛覚伝達の閾値を選択的に上昇させると考えられた。これらの結果は、Jarvis らの報告と一致している。その報告では各種急性痛および慢性痛モデルに対する A-317491 の作用を検討し、A-317491 は急性痛モデルにはほとんど無作用であるが、CFA モデルの熱刺激に対する反応潜時を 10 mmol/kg, s.c.(約 5.7 mg/kg)から有意に延長している。我々の結果およびこれら文献報告を総合すると、ATP 受容体は正常時よりむしろ病態時、少なくとも慢性炎症時の疼痛伝達に重要な役割を果たしていると考えられた。以上より、ATP 受容体、特に C-fiber 上の P2X₃/P2X_{2/3} 受容体は、正常時ではなく病態時の痛覚伝達において重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

このことは、神経因性疼痛病態モデルを用いた研究でも明らかとなり、脊髄神経損傷後、アロディニア発症の程度に比例して、脊髄内のミ

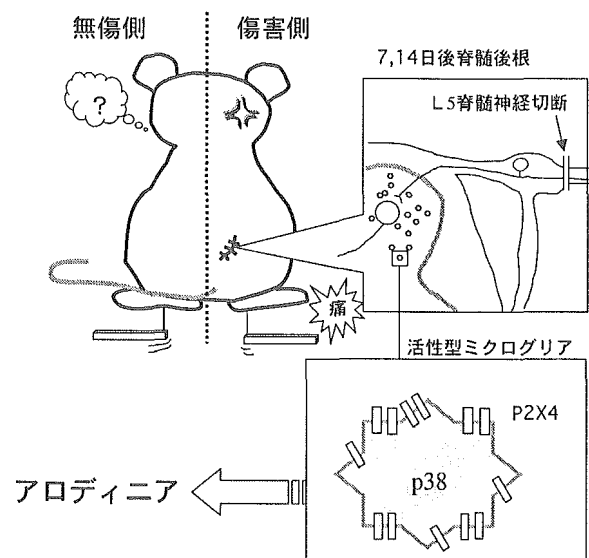


図4 仮説：脊髄神経損傷によるアロディニアとマイクログリア P2X₄ の関係
脊髄神経損傷により、脊髄後角のマイクログリアが活性化され、P2X₄ が高濃度に発現し、それが刺激を受けてアロディニアが発症維持される。

クログリアが高度に活性化し、そのミクログリア一個一個で P2X4 受容体が高濃度に発現した。しかも、その P2X4 活性化がアロディニア発症と維持にきわめて重要な役割を担っていたのである（図4の仮説）。

痛覚情報の統合ならびに伝達に關与する中枢ネットワークにおける ATP 受容体の機能については次のことが考えられる。

孤束核においては、極めて高い効率でシナプス前 P2X 受容体活性化によるグルタミン酸放出が促進されることが本研究によって証明された。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るとともに、興奮性→興奮性シナプスでは、100%のシナプスで起こることが明らかになった。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。視床下部の電気刺激によって孤束核内で ATP が放出される事実が示されている。この細胞外 ATP による興奮性シナプス伝達の促進機構は、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。

顔面神経軸索損傷モデルにおいて、軸索切断側において特異的なシナプス入力の増加が起きている事実は驚きであった。切断側ではシナプス後電流の振幅も有意に増大しており、これらは全体として、シナプス前から放出される神経伝達物質・生理活性物質の総量の増大、ならびに、それによるチャネル開口に伴うシナプス後細胞へのイオン流入の増大を引き起こす。これらの帰結として、ATP を含む生理活性物質の細胞外濃度上昇、および、運動ニューロンへの受容体チャネルと電位依存性チャネルを介した Ca^{2+} 流入の増大が起こりうる。我々の現時点の仮説は、これらの変化が、その後に細胞外で起こるミクログリアの凝集と活性化、および、運動ニューロンで起こるアポトーシス過程を誘発、もしくは、促進している可能性があるというものである。

以上のように、ATP 受容体は正常の痛みにおいてよりも、むしろ特徴的な痛みを引き起こす病態において様々なサブタイプがそれぞれ異なる働きをしている可能性が示された。しか

しながら、例えば神経因性疼痛モデルでのミクログリア P2X4 のアロディニア発症維持についても、多くの不明な問題が残されている。つまり、病態という特有の環境下、何がどこから来て、どのようにしてその受容体を活性化し、その結果なぜ神経因性疼痛を発症するのかなど、全くわかっていない。正常脊髄および脳内のミクログリアは、静止型ミクログリアと呼ばれ、小さい細胞体と細かく分岐した細長い突起を持ち、一定間隔をもって点在している。中枢神経系の物理的損傷あるいはウイルス等による感染後に、ミクログリアは劇的な変化を起こす。小さかった細胞体は肥大化し、短く太い突起を持つ活性化型ミクログリアになり、激しく分裂増殖する。このような活性化型ミクログリアは ATP に対して走化性を示し、ATP 刺激により、mitogen-activated protein kinase (MAPK) に属する p38 および extracellular signal-regulated protein kinases (ERK)1/2 のリン酸化を通じて、サイトカイン等の強力な生理活性物質を産生・放出することを我々は既に報告している。また、昨年度はミクログリアの p38 活性化がアロディニアを誘発することを明らかにした。そして、損傷神経からインパルスが異常に発射されることから、ATP の高濃度放出の可能性が出てきた。従って、ATP によるミクログリアからのサイトカイン放出作用に痛み伝達変調を解く鍵が隠されているかもしれない。いずれにしても、これらの疑問点それぞれに優れた鎮痛薬を開発するシーズやペインコントロール技術のヒントが隠されている可能性が高いことから、このような不明の部分明らかにすることにより、難治性疼痛の発症・維持メカニズムを解明し、もって世界的に通用する難治性疼痛に有効な鎮痛薬創製のシーズを得ることに努力しなければならない。

5. 研究発表

[原著]

1. T.Fujino, M.Une, T.Imanaka, K.Inoue and T.Nishimaki-Mogami. Structure-activity relationship of bile acids and bile acid analogs in regard to FXR activation. *J.Lipid Res* in press
2. T.Fujino, Y.Sato, M.Une, T.Kanayasu-Toyoda, T. Yamaguchi, K.Shudo, K.Inoue and T. Nishimaki-Mogami. In vitro farnesoid X receptor ligand sensor assay using surface plasmon resonance and based on ligand-induced coactivator association.

J. Steroid Biochem. Mol. Biol. in press

3. K.Toda, S.Ishida, K.Nakata, R.Matsuda, S.Ozawa, J.Sawada, Y.Ohno, K.Inoue, K.Shudo and Y.Hayashi. Improvement in Reliability of Probabilistic Test of Significant Differences in GeneChip Experiments.

Analytical Sciences in press

4. K.Toda, S.Ishida, K.Nakata, R.Matsuda, Y.Shigemoto-Mogami, K.Fujishita, S.Ozawa, J. Sawada, K.Inoue, K.Shudo and Y.Hayashi.

Test of significant differences with a priori probability in microarray experiments.

Analytical Sciences in press

5. 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

6. M.Tsuda, A.Mizokoshi, Y.Shigemoto-Mogami, S.Koizumi and K.Inoue. Activation of p38MAPK in spinal hyperactive microglia contributes to neuropathic pain hypersensitivity following peripheral nerve injury. *Glia* 89, 89-95, 2004

7. M.Tsuda, Y.Shigemoto-Mogami, S.Koizumi, A.Mizokoshi, S.Kohsaka, M.W. Salter and K.Inoue. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 424, 778-783, 2003

8. S.Koizumi, K.Fujishita, M.Tsuda, Y.Shigemoto-Mogami, A.Kita and K.Inoue. A dynamic regulation by astrocytic ATP of excitatory synaptic transmission in cultured rat hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 11023-11028, 2003

9. K.Inoue, M.Tsuda and S.Koizumi. ATP induced three types of pain behaviors including allodynia. *Drug Develop. Res.* 59, 56-63, 2003

10. K.Inoue, S.Koizumi, M.Tsuda and Y.Shigemoto-Mogami. Signaling of ATP receptors in glia-neuron interaction and pain. *Life Sci.* 74, 189-197, 2003

11. S.Moriguchi, Y.Mizoguchi, Y.Tomimatsu, Y.Hayashi, T.Kadowaki, Y.Kagamiishi, N.Katsube, K.Yamamoto, K.Inoue, S.Watanabe, J.Nabekura, H.Nakanishi. Potentiation of NMDA receptor-mediated synaptic responses by microglia. *Brain Res.*

Mol. Brain. Res. 119, 160-169, 2003

12. T.Moriyama, T.Iida, K.Kobayashi, T.Higashi, T.Fukuoka, H.Tsumura, C.Leon, N.Suzuki, K.Inoue, C.Gachet, K.Noguchi and M.Tominaga. Possible involvement of P2Y2 metabotropic receptors in ATP-induced transient receptor potential vanilloid receptor 1-mediated thermal hypersensitivity. *J. Neurosci.* 23, 6058-6062, 2003.

13. Y.Sasaki, M.Hoshi, C.Akazawa, Y.Nakamura, H.Tsuzuki, K.Inoue and S.Kohsaka. Selective expression of Gi/o-coupled ATP receptor P2Y12 in microglia in rat brain. *Glia* 44, 242-250, 2003

14. S.Ishida, Y.Shigemoto-Mogami, H.Kagechika, K.Shudo, S.Ozawa, J.Sawada, Y.Ohno and K.Inoue. Clinically Potential Subclasses of Retinoid Synergists Revealed by Gene Expression Profiling. *Mol. Cancer Therap.* 2, 49-58, 2003

15. S.Koizumi and K.Inoue. Neurone-to-astrocyte communication by endogenous ATP in mixed culture of rat hippocampal neurones and astrocytes. *Drug Develop. Res.*, 59, 88-94, 2003

16. K.Torimitsu. Nano-Bio Science-Unification of neural functions with nanotechnology, *Electrochemistry*, 71, 809-813, 2003

17. Y.Kashimura, H.Nakashima, K.Furukawa and K. Torimitsu. Fabrication of Nano-Gap Electrodes using Electroplating Technique, *Thin Solid Films*, 438-439, 317-321, 2003

18. K. Torimitsu, Y. Furukawa, N. Kasai. Real-time detection of neurotransmitter release and its spatial distribution *日本薬理学雑誌*, 121, 349-356, 2003

19. K.Torimitsu, Y.Furukawa, H.Tabei. Nanostructure effect on neural activities and growth, *Proceedings of ICCE-10*, 891-894, 2003

20. Y.Jimbo, N.Kasai, K.Torimitsu, T.Tateno, H. P. C. Robinson, A System for MEA-Based Multi-site Stimulation, *IEEE Transactions on biomedical engineering*, 50, 241-248 2003

21. C. Han, N. Kasai, K. Torimitsu. Neuronal cell death and defasciculation of mossy fibers were induced by bicuculline in rat

organotypic hippocampal slice cultures, *Jpn. J. physiol.*, 53, 605, 2003

22. C. Han, K. Torimitsu. Effects of neuronal cell toxicity induced by bicuculline methiodide in slices cultures of rat hippocampus, *JSN*, 42(2) 236, 2003

23. K. Ajito, C. Han, K. Torimitsu. Nanometer-scale raman spectroscopy of neurons, *Proceeding of microscopy and microanalysis 2003* (Cambridge University Press), 1062-1063, 2003

24. R. Kurita, K. Hayashi, K. Torimitsu, O. Niwa. Continuous Measurement of Glutamate and Hydrogen Peroxide Using a Microfabricated Biosensor for Studying the Neurotoxicity of Tributyltin, *Anal. Sci*, 19, 1581-1585, 2004

25. W. Hu, H. Nakashima, K. Furukawa, Y. Kashimura, K. Ajito, C. Han, K. Torimitsu Carrier injection from gold electrodes into thioacetyl-end-functionalized poly(paraphenyleneethynylene)s, *Phys. Rev. B*, in press, 2004

26. K. Ajito, C. Han, K. Torimitsu. Detection of glutamate in optically trapped single nerve terminals by raman spectroscopy, *Anal. Chem.*, in press, 2004

27. Shigetomi E, Kato F, Action potential-independent release of glutamate by Ca²⁺ entry through presynaptic P2X receptors elicits postsynaptic firing in the brainstem autonomic network, *J Neurosci* 24(12) (2004) in press.

28. Fukuda S, Kato F, Tozuka Y, Yamaguchi M, Miyamoto Y, Hisatsune T. Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus, *J Neurosci* 23: 9357-9366 (2003).

29. Atkinson L, Shigetomi E, Kato F, Deuchars J. Differential increases in P2X receptor levels in rat vagal efferent neurons following a vagal nerve section. *Brain Res* 977: 112-118 (2003).

30. Kato F, Kawamura M, Shigetomi E, Tanaka J, Inoue K, Synaptic purinoceptors - The stage for ATP to play its "dual-role", *J Pharmacol Sci* 94, 107-111 (2004).

31. Kato F, ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: Preface, *J Pharmacol Sci* 94, 87 (2004).

32. Takano K and Kato F. Inspiration-promoting vagal reflex in anaesthetized rabbits after rostral dorsolateral pons lesions. *J Physiol (Lond)*, 550, 973-983 (2003).

33. Masaki E, Kawamura M, Kato F, Attenuation of gap-junction-mediated signaling facilitated anesthetic effect of sevoflurane in the central nervous system of the rats, *Anesth Analg* 98, 647-652 (2004).

34. Kato F, Shigetomi E, Yamazaki K, Tsuji N, Takano K, A dual-role played by extracellular ATP in frequency-filtering of the nucleus tractus solitarius network, *Adv Exp Med Biol* (in press; 2004).

35. MATUOKA Isao, OHKUBO Satoko. ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: Adenosine receptor activation by ATP through rapid and localized generation of adenosine by ectonucleotidases. *J Pharmacol Sci*, 94, 95-99, 2004

36. TAKANO Shizuko, HOSHINO Yuji, LI Libing, MATSUOKA Isao, ONO Tomoyuki, KIMURA Junko: Dual Roles of 5-hydroxytryptamine in ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts
J Cardiovasc Pharmacol Therapeut, (Accepted)

[総説および単行本]

1. 井上和秀. 活性化ミクログリアの ATP 受容体と神経因性疼痛.
Clinical Neuroscience 印刷中
2. 井上和秀、小泉修一、津田誠. 脳と ATP. *脳* 21 7, 69-74, 2004
3. 井上和秀. 活性化ミクログリアと神経因性疼痛—ATP 受容体の役割. *医学の歩み* 207, 509, 2003
4. 津田誠、井上和秀. 活性化ミクログリアの ATP 受容体と神経因性疼痛.
Bio Medical Quick Review Net (ネット上レビュー誌)、2003
5. 井上和秀. 神経因性疼痛とミクログリア: ATP 受容体の関与. *細胞工学* 22, 1208-1209, 2003
6. 井上和秀. ATP 受容体の脳・神経系での役割. *遺伝子医学* 7, 209-213, 2003
7. 井上和秀, 小泉修一. 細胞外 ATP を介

- したグリアーニューロン相互調節機構. 細胞工学 22, 397-401, 2003
8. 井上和秀. ATP と痛み : 危機管理分子 ATP. 脳 21 6, 16-21, 2003
 9. 井上和秀. 慢性疼痛とミクログリア : ATP 受容体の関与. 痛みの基礎と臨床. 緒方宣邦、柿木隆介編、p. 93-101, 真興交易 (株) 医書出版部 2003
 10. 井上和秀. アデノシン受容体. 麻酔管理. 大下修造編. p. 158-162. 真興交易 (株) 医書出版部 2003
 11. 井上和秀. ATP 受容体. 麻酔管理. 大下修造編. p. 163-167. 真興交易 (株) 医書出版部 2003
 12. K. Torimitsu. Nano-Bio Science, NTT Technical Review, 2, 12-20, 2004
 13. K. Torimitsu, C. Han. 神経機能と分子デバイス, 化学工業, in press, 2004
 14. 加藤総夫, 細胞外 ATP と自律神経機能, クリニカル・ニューロサイエンス, 21, 1419-1421 (2003).
 15. 加藤総夫, 細胞外 ATP と中枢性呼吸調節, 自律神経 41(1) (2004) in press.
 16. 松岡 功: ATP 受容体を介する細胞応答と細胞外 ATP 代謝酵素の役割. 福島医誌, 53: 125-142, 2003.
 17. 松岡 功: 神経系におけるエクトヌクレオチダーゼ 臨床化学 33 : 127-134, 2004

7. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許出願 : 1
 1. 外国特許出願「神経因性疼痛治療用薬物のスクリーニング法」米国特許庁受理番号 10/676,289 受理日 10/01/2003
- 2) 実用新案登録 : なし

平成15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16年9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