

病態時の侵害情報伝達に關与するプリン受容体の機能 解明

所 属 九州大学大学院薬学研究院

研究者 井上 和秀

研究要旨 細胞外 ATP は主にイオンチャネル内蔵型プリン受容体 P2X に作用し、種々の痛覚伝達で重要な役割を果たす。本研究は、G 蛋白共役型 P2Y2 受容体が一次求心性神経 c 繊維に存在し、皮膚から放出される ATP を受容し、アロディニアを引き起こすことを明らかとしたものである。

分担研究者

- (1) 国立医薬品食品衛生研究所・薬理部 小泉修一
- (2) N T T 物性科学基礎研究所・分子生体機能研究グループ・神経化学 鳥光 慶一
- (3) 福島県立医科大学 薬理学講座 松岡 功
- (4) 兵庫医科大学解剖学第二講座 野口 光一
- (5) 佐賀大学医学部生体構造機能学講座 中塚 映政
- (6) 東京慈恵会医科大学・総合医科学研究センター神経科学研究部・神経生理学研究室 加藤 総夫
- (7) 東京大学大学院医学系研究科・生体医工学 安藤 謙二

A 研究目的

難治性疼痛（神経因性および慢性炎症疼痛など）は発症機序が不明の部分が多く、有効な治療薬や治療法が確立されていないために、多くの患者が痛みを苦しんでおり、現在臨床上最も重要な課題の一つとされている。我々は本事業（平成 13-15 年度）の成果として「末梢神経損傷モデルでは脊髄内ミクログリアが著明に活性化し、ATP 受容体サブタイプ P2X4 が非常に高率に発現すること、そして P2X4 刺激が神経因性疼痛の発症と維持に深く関与する」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, 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）。しかしながら、より本質的な多くの疑問点が残されている。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。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。本研究の目的は、このような不明の部分をはっきりさせることにより、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ある。その為に、侵害情報の発生から認知までのプロセスを、(1) 末梢組織、(2) 後根神経節ニューロン、(3) 後根神経節ニューロン-脊髄後角ニューロン間のシナプス情報伝達、(4) 脊髄後角ニューロンと上位中枢とのシナプス伝達、の4つに区分し、各区分におけるプリン受容体の機能発現に対して責任者（分担研究者）を決め、研究推進を担保した。

B 研究方法

研究方法としては、脊髄損傷モデルあるいは慢性炎症モデルによる行動薬理学的手法をメインに据え、それを遺伝子分子生物学的手法（ノックアウト動物、アンチセンス DNA、siRNA、DNA チップ）、組織解剖学的手法（免疫染色、in situ hybridization）、電気生理学的手法（in vivo、培養細胞系あるいは脳スライス標本）および in vitro 画像解析法（電位依存性色素イメージング、カルシウムイメージング、フォトンカウンティングイメージング）で立体的に補完する。脊髄神経結紮モデル作成：実験には Wistar 系雄ラットを使用した。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、DRG より末梢側を 50 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。薬物は、脊髄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。

末梢炎症モデル：ラット足底に、CFA (complete Freund adjuvant) を注射し、末梢炎症モデルを作成した。ERK リン酸化抗体を用いた免疫組織化学法および ATP 受容体との二重染色法を用い、DRG ニューロンにおける各 ATP 受容体サブタイプと、末梢組織への侵害刺激との相関関係を調べた。

行動薬理学的手法：測定対象となる部位（後肢足底部）へフォンレイフィラメントを押し当て、ラットが後肢をフ

フィラメントから退ける閾値 (グラム) 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。細胞培養: 既報に従い、後根神経節細胞 (DRG) 及び皮膚表皮ケラチノサイト (NHEK)、ヒト血管内皮細胞、さらに DRG と NHEK の共培養を行った。

電気生理学的手法: 既報に従い、各種細胞あるいはスライス標本に対してホールセルパッチクランプを行った。

細胞内カルシウム測定: 既報通り、fura2 法及び fluo4 を用いたレーザー共焦点法を用いた。

免疫組織学的検討: 既報に従い行った。C 繊維は anti-ペリフェリン抗体を、NHEK は anti-cytokeratin 抗体を用いて染色した。

C 研究結果

1. 皮膚への機械刺激にตอบสนองした ATP 放出、ならびにその ATP の生理作用

皮膚ケラチノサイト (NHEKs) を機械刺激すると、細胞内 Ca 上昇が生じ、それは近傍の NHEKs へと伝播していった。ATP 分解するアピラーゼを加えておくとその伝ばんが抑制されたことから、ATP が細胞間情報伝達物質である可能性が高い。実際にルシフェリン-ルシフェラーゼ反応により ATP を定量化した結果、機械刺激に応じて NHEKs から ATP が放出されていることが明確になった。

つぎに NHEKs での生理反応の責任受容体を明確にしようとした。定量的 RT-PCR 測定から得られた Ct 値 (threshold cycle value) を指標として NHEKs での ATP 受容体サブタイプの mRNA 発現量を測定した結果、NHEKs には P2Y2 受容体 mRNA が最も多く発現していることが示された。NHEKs では ATP と UIP 刺激で同様に細胞内 Ca 上昇が生じること、ならびに P2Y2 受容体のアンタゴニストであるスラミン、P2Y2 に対するオリゴアンチセンス (AS) DNA 処置により ATP による Ca 波が抑制されることから、本反応の責任受容体は P2Y2 であると考えられた。

さらに、NHEKs から後根神経節 (DRG) 神経細胞への情報伝達機構とその生理的意義の解明のために NHEKs とラット DRG の初代共培養系を作成した。これを用いて、NHEKs から DRG 神経細胞への情報伝達が ATP 分子によってなされていることを薬理的に明らかにした。そして DRG 神経には P2Y2 が発現しており、機械刺激等により皮膚から放出された ATP を受容することが示唆された。

2. 末梢組織の P2Y2 刺激によるアロディニア発現

上記のように皮膚から放出された ATP が DRG 神経に存在する P2Y2 を刺激することが示唆されたので、その P2Y2 受容体と痛覚の関係を明らかにしようとした。そこでまず P2Y2 受容体のアゴニスト UIP を足底部に投与した。その結果、濃度依存的 (0.1-100 $\mu\text{mol/paw}$) にフォンフレイフィラメントに対する閾値の低下、つまり触刺激を痛みとして感じてしまう“メカニカルアロディニア”が誘発された。このメカニカルアロディニアは、以前我々が報告した P2X 受容体を介するものより低濃度から誘発され、また持続時間が長かった (4 時間) (Tsuda et al, J. Neurosci, 2000)。P2 受容体拮抗薬及び P2Y2 受容体アンチセンスオリゴヌクレオチドは、このメカニカルアロディニアを消失させた。また、UIP は細胞外に存在するエクトヌクレオチダーゼにより、UDP 及び UMP に代謝されるが、これら代謝産物はメカニカルアロディニアを誘発しなかった。生後すぐにカプサイシン (capsaicin) を投与して、カプサイシン感受性神経を破壊し、その後成熟させたラット (カプサイシンラット) では、UIP を足底部に投与してもメカニカルアロディニアは誘発されなかった。従って、UIP はカプサイシン感受性神経、おそらく小型の C 繊維に作用して、メカニカルアロディニアを引き起こすことが推測された。

DRG 神経を培養して、UIP に対するカルシウム応答を観察し、カプサイシンによるそれと比較した。P2Y2 受容体は Gq/11 と共役しており、その刺激により phospholipase C (PLC) が活性化され、inositol 1,4,5-triphosphate (InsP3) 依存的に Ca^{2+} が細胞内ストアから放出される。UIP は 60% 以上の DRG 神経でカルシウム応答を引き起こし、これは P2 受容体拮抗薬により抑制された。これらは小型 (<30 μm) かつカプサイシンにも応答する DRG 神経で強く認められた。従って、カプサイシン受容体 (TRPV1) と P2Y2 受容体が、小型 C 繊維に共存していることが明らかとなり、UIP によるメカニカルアロディニアの作用機序に TRPV1 が関与している可能性が示唆された。しかし、UIP は TRPV1 が関与すると考えられる熱刺激に対する過敏応答 (thermal hyperalgesia) を誘発せず、また TRPV1 拮抗薬は UIP により惹起されるメカニカルアロディニアには影響しなかった。

3. 炎症病態モデルでの痛みに関する ATP 受容体の機能

末梢炎症状態で各侵害刺激に対する疼痛過敏に直接関与する ATP 受容体のサブタイプをそれぞれ解明し、各種 ATP 受容体を介した細胞内シグナル伝達系の炎症疼痛過敏における役割を突き止めることを目的とした。

侵害性疼痛刺激に対する DRG における活性化型リン酸化

ERK (pERK) の反応は、CFAによる炎症側で明らかに増加した。そして P2X3 免疫反応との共存を有意に増加することが明らかとなった。炎症側では pERK を発現する DRG 細胞の 60% の細胞で p2X3 を含有するのに対して、正常側では 10 数% で共存が示された。さらに末梢炎症組織に対する侵害刺激によって活性化するニューロンが有髄神経を持つニューロンか無髄神経を持つニューロンかという課題に対して、有髄神経のマーカーである NF-200 との二重免疫組織化学法を施行した。その結果、正常側では二重染色ニューロンはごく少数であるのに対して、炎症側では大きく増加することが明らかとなった。この有髄ニューロンにおける pERK 陽性ニューロンの増加は、末梢組織への P2X 受容体阻害剤の投与 (PPADS 及び TNP-ATP) で有意に抑制されることが明らかとなった。この結果は、末梢組織における P2X 受容体の興奮性の増強が、侵害受容体に関わるニューロンの変化と密接な関係を持っていることを示している。

最後に P2X 受容体と疼痛行動との関連について行動試験を用いて検討した。CFA による炎症によって、機械的刺激による逃避行動の閾値が大きく減少し、その減少が P2X 受容体阻害剤により回復傾向を示すことが明らかとなった。P2X1 受容体の阻害剤ではこの効果は見られなかった。

4. 脊髄での痛み情報伝達におけるプリン受容体の機能

脊髄における AIP が如何に P2X 受容体ならびにアデノシン受容体に作用して、痛覚情報伝達を総合的に修飾するかを明らかにするために、脊髄スライス標本を用いて脊髄後角細胞からパッチクランプ記録を行い、脊髄後角における AIP およびアデノシンの相互作用を検討した。アデノシンはエクトヌクレオチダーゼによる AIP の分解によって産生され、アデノシン受容体は脊髄を含む中枢神経系で広く発現している。脊髄後角細胞ではグルタミン酸を介する自発性の興奮性シナプス後電流が観察される。今回はこの興奮性情報伝達が、AIP/P2X 受容体およびアデノシン受容体によって、どのような影響を受けるのかを検討した。

代謝安定型の P2X 受容体作動薬である $\alpha\beta$ -methylene AIP (100 μ M) を脊髄スライス標本に灌流投与すると、殆どの全ての脊髄後角細胞において自発性興奮性シナプス後電流の振幅ならびに発生頻度の増強効果が観察された。自発性興奮性シナプス後電流の振幅における平均増加率は $136 \pm 11\%$ 、発生頻度における平均増加率は $355 \pm 58\%$ であった ($n=23, P<0.05$)。また、Na チャネルの阻害薬であるテトロドトキシン (1 μ M) の存在下において、微小興奮性シナプ

ス後電流を記録した。 $\alpha\beta$ -methylene AIP (100 μ M) の灌流投与によって、微小興奮性シナプス後電流の振幅には有意な増強は観察されなかったが、発生頻度の著明な増加が観察された。微小興奮性シナプス後電流の発生頻度における平均増加率は $382 \pm 49\%$ であった ($n=23, P<0.05$)。この作用は、PPADS (10 μ M) によって、完全に阻害された ($n=5$)。アデノシン (100 μ M) を脊髄スライス標本に灌流投与すると、全ての脊髄後角細胞において自発性興奮性シナプス後電流の発生頻度は可逆的に減少した。自発性興奮性シナプス後電流の発生頻度における平均減少率は $40 \pm 3\%$ であった ($n=25, P<0.05$)。一方、アデノシン (100 μ M) の灌流投与によって、自発性興奮性シナプス後電流の振幅には有意な変化は観察されなかった。また、アデノシン A1 受容体作動薬である CPA (1 μ M) を脊髄スライス標本に灌流投与すると、アデノシンと同様に自発性興奮性シナプス後電流の発生頻度は減少した。自発性興奮性シナプス後電流の発生頻度における平均減少率は $54 \pm 9\%$ であった ($n=4, P<0.05$)。更に、アデノシン A1 受容体拮抗薬である DPCPX (1 μ M) の存在下では、アデノシン (100 μ M) による自発性興奮性シナプス後電流の抑制作用は観察されなかった ($n=4$)。AIP (100 μ M) を脊髄スライス標本に灌流投与すると、興奮性シナプス後電流の発生頻度は 10~20 秒間の短時間に増強し、以後 5 分程度の比較的長時間に渡って減少するという 2 相性の変化が観察された。同一細胞において、 $\alpha\beta$ -methylene AIP (100 μ M) を灌流投与すると、後続の抑制効果は観察されず、最初の増強作用時間は延長していた ($n=6$)。更に、AIP (100 μ M) の灌流投与による興奮性シナプス後電流発生頻度の減少作用は AIP 代謝阻害薬の ARL67156 (50 μ M) とアデノシン受容体阻害薬であるカフェイン (3 mM) 存在下において、明らかに抑制された ($n=4$)。

5. 情動の中脳神経核・扁桃体での疼痛情報処理とプリン受容体の生理的意義の解明

痛み情報は脳皮質に到達する一方で、情動関連神経核へも伝達される。難治性慢性疼痛の多くは、原発性の外傷や炎症が治癒した後にも残存し、特異的な不快感や苦痛を伴う。ここでは、恐怖や不快感の情動記憶の成立に中心的役割を演ずる扁桃体に注目し、そこでの疼痛情報シナプス伝達の制御におけるプリン受容体の意義の解明を試みた。扁桃体中心核 (CeA) へは主に以下の 2 種の求心性入力投射することが知られている。(1) 外側橋脚核 (PB) 由来投射: 主として脊髄から上行性に橋に入力する痛覚情報に関連した入力であり、脊髄橋外側脚核扁桃体路の最終投射路である。脊髄で交叉するため、両側の扁桃体には

末梢神経から対側性に連絡がある。(2) 扁桃体基底外側核 (BSL) 由来投射: 連合皮質や視床からの投射は両側性に扁桃体基底外側核に入力し、その後、扁桃体中心核に投射する。これらの2種の投射路は、脳スライス上、それぞれ異なる背外側・腹内側の経路を通るため、刺激部位を選ぶことによって選択的に刺激した。

神経因性疼痛モデル作成後6~7日、最後のアロディニア応答の計測を行った直後に作成した脳スライスの扁桃体中心核からPB-EPSCを記録した。刺激強度を増強していくと、漸増的にPB-EPSC振幅が増大した。そのとき、最も低電流の刺激で、明瞭なPB-EPSCが観察されたのは、結紮対側CeAから記録されたニューロン群であった。さらに、結紮対側のCeAニューロンが示すPB-EPSCは、同じ刺激強度で刺激を行った結紮同側のCeAニューロン、あるいは、非結紮群のCeAニューロンと比べて高振幅のPB-EPSCを示した。また、刺激強度を増大させたとき、CeAニューロンの中には活動電位性の速い高振幅内向き電流(これをスパイクと呼ぶ)を示すものがあったが、そのスパイクを発生させる刺激電流閾値は、結紮対側CeAのニューロンにおいては600-1000 μ Aと低値であったが、結紮同側、および、非結紮群では2000 μ Aを超えてもスパイクは生じなかった。つまり、結紮対側CeAニューロンは、PBの刺激によって、結紮同側および非結紮群よりも、有意に弱い刺激で興奮し活動電位を発生するという事実が明らかになった。

次に、BSL由来入力線維刺激後をCeAニューロンから記録を行った。PB刺激同様、刺激強度を増加していくと、漸増的にBSL-EPSC振幅が増大した。結紮同側・対側共に、非結紮群と比べて弱い刺激で大きな振幅のBSL-EPSCが発生した。結紮群において、数100~1000 μ A刺激による高振幅BSL-EPSCは、電位固定下に活動電位性の内向き電流スパイクを発生させたが、非結紮群においてはより強い刺激電流を与えなければスパイクは発生しなかった。刺激強度—BSL-EPSC振幅関係系を求めた結果、結紮対側CeAニューロンにおいて、「低い刺激強度で高振幅EPSCが誘発される」ことを示す刺激強度—EPSC振幅関係系が得られた。PB由来線維刺激の結果とは異なり、BSL由来入力線維の刺激に対しては、結紮対側・同側いずれのCeAニューロンも、非結紮群よりも有意に弱い刺激で興奮して活動電位を発生するという事実が明らかになった。したがって、一側性の結紮の影響が、PB-CeA経路の興奮性シナプス伝達に対しては片側性の促通効果であったのに対し、BSL-CeA経路の興奮性シナプス伝達に対しては、対側CeAにおける増強の方が強いものの、両側性に促通が生じることが示された。

アロディニア発症程度と神経結紮動物におけるPB-EPSC

の増大率、およびBSL-EPSCの増大率には固体差が見られた。そこで、結紮側の下肢上反射閾値を非結紮側のそれで標準化した値を、その個体における「異痛症応答の亢進の程度」を表す指標とし、また、左右両側のCeAニューロンにおいて、活動電位スパイクを発生しない最大の刺激強度で得られた誘発EPSC振幅を求め、結紮対側CeAで記録されたEPSC振幅を同じ個体の同じスライスから記録された結紮同側CeAのEPSC振幅で標準化して「興奮性シナプス伝達の結紮側依存的な増強の程度」の指標とした。解析の結果、異痛症応答の亢進の程度とPB-EPSC増強の程度は0.74の高い相関を示し、両者の間には強い相関があった。また、BSL由来入力とのシナプス伝達においても、異痛症応答の亢進の程度とBSL-EPSC増強の程度の間には0.75という高い相関が認められた。

アロディニアの発症程度に伴って亢進する扁桃体興奮性シナプス伝達に及ぼすプリン受容体活性化の影響を検討した。神経因性疼痛モデルのPB-EPSCを結紮対側および結紮同側のCeAからシナプス電流を記録し、adenosine 100 μ MおよびAIP 100 μ Mを1分間投与した。同側・対側にかかわらず、また結紮・非結紮にかかわらず、80%以上のニューロンにおいて、adenosine およびAIPはPB-EPSC振幅を明瞭に減少させた。これらの効果は、すべてアデノシンA1受容体遮断薬8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine(DPCPX; 1 μ M)によってほぼ完全に消失した。したがって、PB-CeAシナプスにおいては、adenosine および細胞外で加水分解を受けたAIPが、いずれもA1受容体を介して抑制的影響を及ぼすと考えられる。一方adenosineによるPB-EPSC振幅の抑制率は、結紮対側CeAと同側CeAで大きく異なっていた。結紮対側のCeAから記録されたニューロンでは、もともとのEPSC振幅が結紮側のCeAよりも高値であったが、adenosineの投与によって、結紮同側よりも顕著な振幅の減少が起きた。結紮対側のCeAニューロンは、結紮同側、非結紮群、および非手術群に比し、有意に高いadenosineによるPB-EPSC振幅の抑制率を示した。一方、神経因性疼痛モデルでのBSL-CeAシナプスは、PB-CeAシナプスと異なるアデノシン感受性を示した。Adenosine (100 μ M)は、結紮対側CeAにおいて約30%程度、結紮同側CeAに対して約15%程度BSL-EPSC振幅を減少した。また、結紮対側CeAでは約75%の、結紮同側CeAでは約60%のニューロンがadenosineによるBSL-EPSC振幅の変化を示した。このようなことが正常動物でも起きるのか?驚くべきことに、大部分のBSL-CeAシナプスのEPSCは、非結紮群、および、非手術群において、ほとんどadenosineの影響を受けないことが判明した。

節ニューロンを刺激することが明らかとなった。

D 考察

本研究では、難治性疼痛の発症・維持メカニズムを解明する為に、侵害情報の発生から認知までのプロセスを、(1)皮膚末梢組織、(2)後根神経節ニューロン、(3)後根神経節ニューロン-脊髄後角ニューロン間のシナプス情報伝達、(4)上位中枢でのシナプス伝達、の4つに区分し、各区分におけるプリン受容体の機能的解明に対して研究を進めた。その結果、大変重要な知見が多く得られた。

(1) 皮膚末梢組織

まず、皮膚では代謝型 P2Y2 受容体が非常に高濃度に発現しており、機械刺激により AIP 放出を引き起こすこと、P2Y2 受容体を介して c 線維に伝わる事が明らかとなった。知覚神経の自由終末は表皮ケラチノサイトの基底層に達しているため、例えば皮膚が侵害刺激となる機械刺激を受けた場合には AIP が放出され知覚神経を刺激することを示唆する。その生理的意義を明らかにするために、末梢組織を P2Y2 受容体アゴニストで刺激したところ、強いメカニカルアロディニアが誘発されることが明らかとなった。このアロディニアの強さは以前報告した、A δ 線維の P2X2 β ヘテロマー受容体刺激によるメカニカルアロディニアとは、以下の点に於いて異なっていた。メカニカルアロディニアは誘発されるが、熱感受性の亢進は起きないこと、小型のカプサイシン依存的であること(c線維依存的)、メカニカルアロディニアの持続時間が長いこと。この様に、一次知覚神経のタイプにより発現するP2受容体は異なり、AIP はこれらの違いにより異なる疼痛を引き起こすようである。P2Y2 受容体刺激により、どのような細胞内分子機序で疼痛の伝達が引き起こされるのかに関してはまだ不明であるが、TRPV1 の活性化自体は関与せず、P2Y2 受容体とリンクした Gq/11 活性化、PLC/InsP₃/Ca²⁺以降のシグナルカスケードが、疼痛発生に関与しているようである。

ケラチノサイトから後根神経節ニューロンへの情報伝達が何によってなされているかは世界的に見ても明確にはされていない。我々は本研究によりその一つの候補として AIP 分子を想定することが出来た。これまでに、痛覚を伝える後根神経節ニューロン末梢端に発現する AIP 受容体が痛み刺激を受けインパルス発生に関与する可能性が我々を含めた多くの研究グループから報告されてきたが、ではその AIP 受容体を刺激する AIP はいったいどこから放出されるのかという根元的な問いかけには十分に答えがなかった。しかしながら、本研究により、機械刺激により AIP が皮膚から放出されること、その AIP が後根神経

(2) 後根神経節ニューロン

難治性慢性疼痛の一つに炎症性疼痛がある。炎症性疼痛に AIP 受容体が関与することは動物実験よりも先にヒトで 1977 年に明らかにされた。さらに 2000 年には、紫外線照射による炎症状態において AIP 誘発疼痛が増強されたとする報告がなされた。動物実験では、我々によるホルマリン投与による疼痛、あるいはカラゲニン誘発疼痛反応を AIP 受容体ブロッカーの PPADS や TNP-AIP が抑制したとする報告がある。そこで、今回は侵害性疼痛との関係で注目されている MAPK グループの ERK 活性化と AIP 受容体の関係を炎症モデルラットの DRG 神経で検討した。侵害性疼痛刺激に対する DRG における活性化型リン酸化 ERK (pERK) の反応は、CFA による炎症側 DRG で明らかに増加した。そしてそれら DRG 神経細胞では P2X3 免疫反応との共存を正常側に比して有意に増加することが明らかとなった。この結果は明らかに炎症組織において P2X3 受容体を持つニューロンの反応性が上昇し、機械的疼痛刺激に対して細胞内情報伝達系が活性化するニューロンが増加することを示している。ERK がどのように興奮性の上昇に関与しているかは今後の課題であるが、少なくとも pERK の検出は活動している一次知覚ニューロンを可視化する有力な方法であることを示している。さらに末梢炎症組織に対する侵害刺激によって活性化するニューロンが有髄神経を持つニューロンか無髄神経を持つニューロンかという課題に対して、有髄神経のマーカーである NF-200 との二重免疫組織化学法を施行した。その結果、正常側では二重染色ニューロンはごく少数であるのに対して、炎症側では大きく増加することが明らかとなった。この有髄ニューロンにおける pERK 陽性ニューロンの増加は、末梢組織への P2X 受容体阻害剤の投与 (PPADS 及び TNP-AIP) で有意に抑制されることが明らかとなった。この結果は、末梢組織における P2X 受容体の興奮性の増強が、侵害受容に関わるニューロンの変化と密接な関係を持っていることを示している。これらのことは行動実験でも明らかになった。CFA による炎症によって、機械的刺激による逃避行動の閾値が大きく減少し、その減少が P2X 受容体阻害剤により回復傾向を示すことが明らかとなった。このように、CFA による炎症組織において、P2X3 受容体を中心とする P2X 受容体の感受性の亢進が見られ、その結果疼痛刺激による疼痛行動の過敏化、細胞内情報伝達系の一つである ERK のリン酸化の亢進、さらに有髄ニューロンの動員などの所見が明らかとなった。こうした結果は炎症性疼痛メカニズム

の重要な一つであると考えることが出来る。

炎症時の疼痛増悪のメカニズムは諸説あるが、今回の重要な発見と、次のいくつかの既知情報を考察すると、AIP受容体の関与は大であると考えざるを得ない。慢性炎症状態ではAIP受容体蛋白の発現が著明にup-regulationされること、および炎症組織からはAIP分子が正常時に比較して大量に放出され、そのために細胞外AIP濃度が上昇することなどの報告がある。さらに、P2XサブタイプはpHの低下により活性化が促進されることは既に知られているが、炎症組織ではpHが5.5以下へ低下するためにAIPによるP2X活性化が増強されるために痛みが増強するのではないかと考えられる。AIP受容体はサブスタンスPやブラジキニンと相互作用することが知られている。炎症組織からはこれらペプチドが大量に放出されるので、当然ながらAIP受容体はサブスタンスPやブラジキニンなどと相互作用して、これらペプチドによる痛みを増強することができる。このように、AIP受容体を介在する様々な要因が複雑に影響しあい絡み合い、炎症組織での疼痛を増強しているのではないかと推測される。

③ 後根神経節ニューロン-脊髄後角ニューロン間のシナプス情報伝達

脊髄後角細胞におけるグルタミン酸を介する興奮性シナプス後電流は、AIP灌流投与によって二相性の変化を示した。最初に出現する短期間の増強作用はAIP/P2X受容体を介する応答であり、後続する比較的長期間の減弱作用はアデノシン受容体を介する作用であった。すなわち、脊髄後角において、細胞外AIPは直接的にシナプス前終末のP2X受容体に作用するだけでなく、速やかにアデノシンに代謝されてシナプス前終末のアデノシン受容体に作用し、P2X受容体と逆の効果をもたらした。本結果は生理的狀態下で、脊髄後角におけるAIPの遊離は必ずしも痛覚過敏を惹起するとは限らないことを示唆した。おそらく、生理的狀態下では、P2X受容体を介する痛覚情報伝達増強作用はアデノシン受容体の活性化によって速やかに抑制されることにより、AIPによる痛覚過敏の発生を制御している。一方、病態時においてP2X受容体発現量が増強すると、脊髄後角におけるアデノシン受容体との均衡が崩れ、最初に出現するP2X受容体を介する反応が相対的に強くなる。その結果として行動学的に痛覚過敏が惹起する可能性が推察された。このようなことが病態モデルで確認出来るかは次年度の課題である。

④ 上位中枢でのシナプス伝達

難治性慢性疼痛の多くは、原発性の外傷や炎症が治癒した後も残存し、特異的な不快感や苦痛を伴う。国際疼痛研究学会の定義によれば、痛みとは、「実際に存在する、または、潜在的、あるいはそれらに関連して表現される組織損傷に関連した、不快な感覚的、および、情動的な経験」であるとされている。不快な情動がどこで形成されているのかは明確ではないが、痛み情報は脳皮質に到達する一方で、扁桃体など情動関連神経核へも伝達される。従って、恐怖や不快感の情動記憶の成立に中心的役割を演ずる扁桃体にまず注目し、そこでのシナプス伝達の制御における疼痛情報とプリン受容体の意義を検討すべきと考えた。扁桃体中心核(CeA)へは主に以下の2種の求心性入力に投射することが知られている。外側橋傍核(PB)由来投射：主として脊髄から上行性に橋に inputs する痛覚情報に関連した入力であり、脊髄橋外側橋傍核扁桃体路の最終投射路である。脊髄で交叉するため、両側の扁桃体には末梢神経から対側性に連絡がある。扁桃体基底外側核(BSL)由来投射：連合皮質や視床からの投射は両側性に扁桃体基底外側核に入力し、その後、扁桃体中心核に投射する。これらの2種の投射路は、脳スライス上、それぞれ異なる背外側・腹内側の経路を通るため、刺激部位を選ぶことによって選択的に刺激した。本研究により、慢性疼痛の情動的側面を成立させている上位中枢の神経機構と、それにおよぼすプリン受容体の影響に関する驚くべき新発見が得られた。最も重要かつ初めて見出された事実は、一側性に異痛症が成立している動物において、扁桃体中心核シナプス伝達が、経路、対側・同側依存的に増強している、その増強の程度が、各個体ごとの異痛症獲得の程度と高い正の相関を示す、そして、異痛症成立動物において増強している扁桃体中心核シナプス伝達は、adenosine A1受容体活性化によって、特異的に、より強く抑制される、の三点である。本研究は、神経因性慢性疼痛が、情動の記憶、特に、不快感を伴う記憶の成立において主要な役割を演ずる扁桃体のシナプスの機能的な変化を伴うことを証明した世界で初めての研究である。特に、扁桃体からの出力核であるCeAニューロンが、慢性疼痛側と対側のPBからの入力に対する興奮性の増大と閾値の低下を示した事実は、痛覚性の上行性入力によってCeAからの興奮性出力が発生しやすくなっていることを意味している。その増強の程度は、各個体ごとのアロディニアの程度と高い正の相関を示した。ただし、相関は必ずしも因果関係を明示しないため、このシナプス伝達の増強が、異痛症の成立の結果として起きた変化なのか、それとも、CeAにおけるこの変化が異痛症応答の成立の上流となっているのかは不明である。その確定は

今後の重要な課題であるが、扁桃体中心核ニューロンの選択的破壊によって疼痛刺激による場所嫌悪反応が消失するとの報告 (Tanimoto et al, Eur J Neurosci 18:2343-2350, 2003) から、本研究で明らかにされた CeA 興奮シナプス伝達の増強は、アロディニア成立時に脊髄レベルで生じている疼痛情報の増大の結果として二次的に生じ、扁桃体における疼痛と不快情動を結びつける結合が強化され、さらにその結果として、疼痛以下の触覚などの入力によっても、不快な情動応答がより鋭敏に生じやすくなる、という機構を想定することが可能である。事実、臨床においては、原発性の炎症や外傷が消失した後や、乳房痛のように原発臓器が存在しない状態においても、強い不快感を伴う慢性疼痛が長期にわたり残存する例があり、本研究の発見はこのような臨床像の生理学的理解に手がかりをもたらす可能性のある重要な意義を持つものである。

本研究ではさらに、この増強した扁桃体中心核のシナプス伝達が、adenosine A1 受容体の活性化によって特異的に抑制されることを明らかにした。この事実は、従来までの脊髄レベルを標的とした疼痛治療とは異なり、慢性疼痛に伴う不快な情動を抑えることによって痛みに伴う患者の苦痛を軽減させるという、それによる負の情動を選択的に抑えるという、上位中枢を標的とした新たな薬物療法の可能性を示すものである。

E 結論

代謝型 A1P 受容体である P2Y2 受容体が一次求心性神経 C 線維に存在し、痛覚、特にメカニカルアロディニア誘発に重要であることが明らかとなった。炎症性疼痛における DRG 神経での P2X3 受容体の関与について検討し、炎症により DRG 神経における P2X 受容体の興奮性が増強され、侵害受容を亢進させていることが明らかとなった。脊髄後角細胞におけるグルタミン酸を介する興奮性シナプス後電流は、A1P 灌流投与によって、初期増強、後抑制という二相性の変化を示した。神経因性疼痛モデルの上位中枢では、アロディニアの成立に扁桃体中心核におけるシナプス伝達の増強が関与していること、および、adenosine A1 受容体活性化によってその増強が特異的に抑制されることが明らかとなった。

F 研究発表

1. 論文発表

1. M.Tsuda, A.Mizokoshi, YShigemoto-Mogami, S.Koizumi, S.Kohsaka, and K.Inoue, Activation of p38MAPK in spinal hyperactive microglia contributes to neuropathic pain hypersensitivity following peripheral nerve

injury. *Glia*, 45, 89-95, 2004.

2. K.Inoue, M.Tsuda, and S.Koizumi. A1P- and Adenosine-Mediated Signaling in the Central Nervous System: Chronic Pain and Microglia: Involvement of the A1P Receptor P2X(4). *J. Pharmacol. Sci.*, 94, 112-114, 2004

3. 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.*, 42, 132-138, 2004

4. TSuzuki, IHide, K.Ido, A.Inoue, SKohsaka, K.Inoue and Y.Nakata. Production and release of neuroprotective TNF by P2X7 receptor-activated microglia. *J. Neurosci.*, 24, 1-7, 2004

5. TNishimaki-Mogami, MUne, TFujino, YSato, NTamehiro, YKawahara, KShudo and K.Inoue. Identification of intermediates in the bile acid synthetic pathway as ligands for the farnesoid X receptor. *J. Lipid Res.*, 45, 1538-1545, 2004

6. T. Nakatsuka, HShiokawa, TFujita, K.Inoue, MYoshimura and EKumamoto. The interaction of A1P and adenosine in spinal nociceptive transmission. *Pain Res.* 19, 133-139, 2004

7. M. Kawamura, C. Gachet, K. Inoue, and F. Kato. Direct excitation of inhibitory interneurons by extracellular A1P mediated by P2Y1 receptors in the hippocampal slice. *J. Neurosci.* 24, 10835-10845, 2004

8. S. Ishida, YShigemoto-Mogami, Y.Shinozaki, H.Kagechika, K. Shudo, S. Ozawa, J. Sawada, Y. Ohno, K. Inoue. Differential modulation of PI3-kinase/Akt pathway during all-trans retinoic acid- and Am80-induced HL-60 cell differentiation revealed by DNA microarray analysis. *Biochemical Pharmacology*, 68, 2177-2186, 2004

9. S. Suzuki, T.Nishimaki-Mogami, N. Tamehiro, K. Inoue, R. Arakawa, S. Abe-Dohmae, R.T. Tanaka, K. Ueda, S. Yokoyama, Verapamil increases the apolipoprotein-mediated release of cellular cholesterol by induction of ABCA1 expression via an LXR-independent mechanism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 24, 519-525, 2004

10. S.Koizumi, K.Fujishita, K.Inoue, YShigemoto-Mogami, M.Tsuda, and K.Inoue. Ca²⁺ waves in keratinocytes are transmitted to sensory neurons, involvement of extracellular A1P and activation of P2Y2 receptors. *Biochem. J.*, 380, 329-338, 2004.

11. YShinozaki, S.Koizumi, S.Ishida, J.Sawada, Y.Ohno and K.Inoue. Cytoprotection against oxidative-stress-induced damage of astrocytes by extracellular A1P via P2Y1 receptors. *Glia*, 49, 288-300, 2004

12. K.Nasu-tada, S.Koizumi and K.Inoue. The involvement of $\alpha 1$ integrin in P2Y12/13 receptor-mediated chemotaxis of microglia and its regulation of microglial proliferation that is inhibited by ADP. *Glia*, 2005 in press

13. Yi Dai, Tetsuo Fukuoka, Hu Wang, Hiroki Yamanaoka, Koichi Obata, Atsushi Tokumaga and Koichi Noguchi. Contribution of sensitized P2X receptors in inflamed tissue to the mechanical hypersensitivity revealed by

phosphorylated ERK in DRG neurons, *Pain*, 108, 258-266, 2004

14. Kimiko Kobayashi, Tetsuo Fukuoka, Hiroki Yamanaka, Yi Dai, Koichi Obata, Atsushi Tokumaga, and Koichi Noguchi, Differential expression patterns of mRNAs for P2X receptor subunits in neurochemically characterized DRG neurons in the rat, *J. Comp. Neurol.* 481, 377-90, 2005

15. Nakatsuka T, Shiokawa H, Fujita T, Inoue K, Yoshimura M, Kumamoto E: The interaction of ATP and adenosine in spinal nociceptive transmission. *Pain Research* 19, 133-139, 2004.

16. Yoshimura M, Furue H, Nakatsuka T, Katafuchi T: Analysis of receptive fields revealed by in vivo patch-clamp recordings from dorsal horn neurons and in situ intracellular recordings from dorsal root ganglion neurons. *Life Science* 74, 2611-2618, 2004.

17. Sonobe H, Nakatsuka T, Takeda D, Taniguchi Y, Tamaki T, Yoshida M: Substance P induced enhancement of inhibitory synaptic transmission in deep dorsal horn. *Pain Research* 19, 9-16, 2004.

18. K.Torimitsu, N.Kasai, Y.Furukawa, Magnesium effect on neural activities in vitro, *Clinical Calcium*, 14(8), 26(1204)-33(1211), 2004

19. K.Ajito, C.Han, K.Torimitsu, Detection of glutamate in optically trapped single nerve terminals by Raman spectroscopy, *Analytical Chemistry*, 76(9), 2506-2510, 2004

20. N.Kasai, C.Han, K.Torimitsu, Multichannel detection of hydrogen peroxide released from a rat hippocampal slice, *10-IMCS Technical Digest*, 20, 764-765, 2004

21. C.Han, N.Kasai, K.Torimitsu, CA2 : the most vulnerable sector to bicuculline exposure in rat hippocampal slice cultures, *NeuroReport*, 16(4), 333-336, 2005

22. C.Han, N.Kasai, K.Torimitsu, An apoptosis induced by bicuculline is involved P/Q type voltage dependent calcium channel in the rat hippocampal slice cultures, *Epilepsia*, in press, 2005

23. N.Kasai, C.Han, K.Torimitsu, Hydrogen peroxide distribution and neuronal cell death in a rat hippocampal slice, *Sensors and Actuators, B*, in press, 2005

G 知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

無し

3.その他

無し