

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

平成17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1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

目 次

第1分野

課題番号

KH11001	バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 ……	1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 ……	11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 ……	13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 ……	17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 ……	25

第2分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)受容体(S1P3)の拮抗薬の開発	望月直樹 ……	31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 ……	35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 ……	47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 ……	58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 ……	66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 ……	70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 ……	77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 ……	86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析;癌予防および治療への応用	矢野友啓 ……	96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 ……	102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 ……	108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 ……	113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 ……	117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 ……	120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 ……	124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 ……	129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 ……	134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 ……	142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 ……	148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 ……	152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 ……	156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 ……	160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 ……	167
 第3分野			
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 ……	175
KH31025	生薬及び漢方処方の科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 ……	185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤 由起子 ……	194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 ……	200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里 勝利 ……	210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 ……	218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 ……	226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 ……	235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 ……	243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭金 正博 ……	252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭金 正博 ……	257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ ……	261

KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 288
第4分野		
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱脇祥子 …… 307
KH41038	ポツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 …… 315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 319
第5分野		
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 …… 327
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 …… 336
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 …… 342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 …… 349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 …… 359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 …… 367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 …… 372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 …… 376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 …… 383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 …… 387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 …… 395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 …… 401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 …… 406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 ……	410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 ……	418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 ……	422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 ……	428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 ……	431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 ……	437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 ……	442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 ……	452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 ……	459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 ……	464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 ……	466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 ……	471
第6分野			
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 ……	479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 ……	500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 ……	511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 ……	516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 ……	524
第7分野			
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法法の確立に関する研究	乾 賢一 ……	531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 ……	540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 ……	548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究－ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作り－（平成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

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 P2X 受容体は脊髄後角のシナプス前後各細胞に発現し、末梢からの痛覚情報を多彩に修飾している。慢性炎症などの病態時において脊髄後角における P2X 受容体の活性化が痛覚過敏に深く關与している。神経損傷時に脊髄内で増大する細胞外マトリックスのフィブロネクチン及びそれを受容するミクログリアの B1 インテグリンが、P2X4 受容体発現亢進に重要な役割を果たしている。この神経因性慢性疼痛動物モデルでは、扁桃体中心核におけるシナプス伝達の増強とその固定化が生じ、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。

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)NTT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 譲二

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、多くの患者が痛みで苦しんでおり、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關与する」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とすることにより、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ある。その為、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解明に対して責任者（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、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。
ラット膝関節炎モデル：ラット膝関節内に、CFA (complete

Freund adjuvant suspended in an oil/saline (1:1) emulsion) 125 μ l を注射し、ラット膝関節炎モデルを作成した。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て、DRG の P2X 受容体発現ニューロンにおける ERK のリン酸化と、関節への侵害刺激との相関関係を調べた。

CFA を注射した3日後の腫脹したラット膝関節を1分間に30回伸展屈曲刺激を与えることで、関節への侵害刺激とした。関節運動の1分後にラットを灌流固定し、DRG を摘出し、免疫組織化学法を施行した。関節痛の行動評価として、膝関節の extension angle を測定した。ラット膝関節を他動的に伸展させ、ラットが疼痛行動を示す時点での角度を測定し、その低下を膝関節痛の尺度として使用した。さらに P2X 受容体のアンタゴニスト、TNP-ATP 1, 10, 100, 500 nmol を 10 μ l PBS に希釈して膝関節内に投与し、膝関節痛行動への影響を検討した。

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. 炎症部位でのプリン作動性情報伝達機構

血管内皮細胞の PG 合成系におよぼす ATP および IFN- γ の作用についてヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いて検討した。静止状態において HUVEC には構成型の COX1 とともに炎症性に誘導される COX2 の発現が認められた。HUVEC を ATP で刺激すると、COX1 の mRNA は変化しなかったが、一過性の COX2 mRNA の上昇が認められ、PGE2 および PGE2 の産生が増大していた。この反応は、ATP 添加 30 分以内に生じ、1 時間でピークに達した後、速やかに減衰した。ATP の作用は濃度依存性に増大し、EC50 は約

20 μ M であった。ATP による COX2 の発現上昇の程度は、ピーク時には IL-1 β の作用に匹敵していた。COX2 の発現上昇における P2 受容体アゴニストに対する選択性では、ATP > ADP > 2-メチルチオ ATP で、 α 、 β -メチレン ATP や AMP、アデノシンは作用しなかった。また、HUVEC において ATP と同程度の [Ca²⁺]_i 上昇を惹起する UTP は無効であった。ATP による COX2 の発現上昇は P2Y 受容体に連関するホスホリパーゼ C の阻害薬、U73122 (3 μ M) では影響されず、細胞外 Ca²⁺ を除去すると抑制された。また、P2X4 受容体機能を亢進するイバメクチン (10 μ M) により増大した。一方、IFN- γ は単独では COX2 発現に影響しなかったが、ATP による COX2 発現誘導を増大させた。IFN- γ を処理した細胞では P2X4 受容体発現が上昇することから、ATP は HUVEC の P2X4 受容体を介して、COX2 発現の調節に関与すると考えられた。ATP による COX2 発現誘導は蛋白質合成阻害薬のシクロヘキシミド (10 μ M)、PI3 キナーゼ阻害薬ワルトマニン (0.1 μ M)、PKC 阻害薬 GF109203X (10 μ M)、MEK 阻害薬 U0126 (10 μ M) では影響されず、p38MAP キナーゼ阻害薬 SB203580 (10 μ M) で抑制された。また、ATP で刺激した細胞では RNA 合成阻害薬 DRB (10 μ M) 存在下で認められる COX2 mRNA の減衰が阻止され、この作用は SB203580 (10 μ M) で消失した。さらに、ATP は HUVEC の p38MAP キナーゼおよび ERK のリン酸化を亢進した。一方、UTP の p38MAP キナーゼのリン酸化は弱く、ERK のリン酸化のみ認められた。以上の結果から、ATP は P2X4 受容体を介し p38MAP キナーゼを活性化して、COX2 mRNA の安定性を上昇させると考えられた。

2. 膝関節炎モデルにおける P2X 受容体の機械的刺激に対する痛覚過敏反応における関与

ラット膝関節に CFA を注射して作成したモデルは、明らかな膝関節の腫脹と、他動的伸展運動に対する逃避反応による疼痛行動測定において明らかな疼痛過敏反応を示した。1 分間の屈曲伸展運動による疼痛刺激による誘導されるリン酸化 ERK の発現と P2X 受容体との関係を免疫組織化学法にて検討した。その結果、炎症のみで関節運動がないラットでは、P2X 受容体発現ニューロンと pERK の共存は少なかったが、関節運動を与えたモデルラットでは、多くのニューロンで共存が観察された。定量化すると共存ニューロン数は、pERK 発現ニューロン中では約 25 倍の増加、P2X 受容体発現ニューロン中では 5 倍以上の増加が検出された。この結果は、炎症膝関節に対する運動による疼痛刺激において、P2X 受容体を発現しているニューロンが大きな役割を果たしている可能性を示唆している。さらに、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。その結果、ラット膝関節炎症モデルにおいて、膝関節内に P2X 受容体拮抗剤の TNP-ATP 投与すると、明らかに用量依存性に他動的伸展運動に伴う疼痛行動が抑制された。その際に、DRG ニューロンにおける pERK の発現を観察すると明らかに P2X 受容体拮抗剤投与群でその発現の減少が観察された。この結果は、炎症関節において関節運動による ATP の遊離、そして一次知覚神経上の ATP 受容体への結合、さらに疼痛行動の惹起という一連の仮説に、一定の証明を与えることができたと判断出来る。

3. 脊髄での痛み情報伝達におけるプリン受容体の機能

脊髄後角深層のシナプス後細胞に発現する ATP 受容体の機能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検討した。脊髄第 V 層細胞からパッチクランプ記録を行い、膜電位を -70 mV で電位固定して電気応答を観察した。まず、代謝安定型の ATP 受容体作動薬である ATP γ S の作用を検討した。ATP γ S は P2X 受容体ならびに P2Y 受容体に作用する広作用域の ATP 受容体作動薬である。ATP γ S (100 μ M) を脊髄スライス標本に 1 分間灌流投与すると、殆ど全ての脊髄第 V 層細胞において自発性興奮性シナプス後電流の発生頻度の増強作用が観察された (n=52)。この自発性興奮性シナプス後電流の発生頻度の増強作用は、シナプス前の P2X 受容体の活性化に伴う神経終末内シナプス小胞からの興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の遊離増強作用に起因していた。また、記録した約 40% の脊髄第 V 層細胞において、ATP γ S (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発生頻度の増強作用に加えて、内向き電流が誘起された (n=19)。ATP γ S (100 μ M) の灌流投与によって生じた内向き電流の平均膜電流の変化量は 10 ± 3 pA (n=19) であった。一方、残りの約 60% の脊髄第 V 層細胞では ATP γ S (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発生頻度の増強作用は観察されたが、内向き電流は発生しなかった (n=33)。

ATP γ S の灌流投与によって生じる内向き電流は、ATP γ S の濃度の増加とともに大きくなった (n=8)。また、ATP γ S (100 μ M) の灌流投与によって内向き電流が観察される細胞において、ATP γ S 非存在下と ATP γ S (100 μ M) 存在下のそれぞれで電流—電圧関係を調べた。ATP γ S の作用によって膜コンダクタンスは電位依存性に増加した (n=4)。したがって、ATP γ S 投与によって生じる膜電流の変化には、シナプス後細胞に存在する非選択的陽イオンチャネルの関与が示唆された。ATP γ S の灌流投与によって生じる内向き電流に

P2Y 受容体が関与しているかどうかを検討した。ATP γ S (100 μ M) によって内向き電流を生じた脊髄第 V 層細胞において、P2Y 受容体作動薬である UTP (100 μ M) を灌流投与したが、内向き電流は全く観察されなかった (n=3)。また、異なる P2Y 受容体作動薬である UDP (100 μ M) や 2MeSATP (100 μ M) を灌流投与しても、内向き電流は全く観察されなかった (n=3)。さらに、ATP γ S の灌流投与によって生じる内向き電流に細胞内 G 蛋白質が関与しているかどうかを検討するために、記録電極内液に G 蛋白質の活性を阻害する GDP- β -S (2 mM) を加えて実験を行った。記録直後に ATP γ S (100 μ M) の灌流投与によって内向き電流を生じた脊髄後角深層細胞に対して、1 時間後に再度 ATP γ S (100 μ M) を灌流投与したが、内向き電流に変化は観察されなかった (n=4)。したがって、脊髄後角深層細胞において ATP γ S によって生じた内向き電流は、細胞内 G 蛋白質を介していなかった。以上の結果より、ATP γ S によって生じた内向き電流の発生には、P2Y 受容体ではなく、P2X 受容体が関与している可能性が推察された。

ATP γ S の灌流投与によって生じる内向き電流にどのサブタイプの P2X 受容体が関与しているかを調べるために、薬理的に検討を行った。代謝安定型の P2X 受容体作動薬である $\alpha\beta$ -methylene ATP (100 μ M) を灌流投与すると、殆どの全てにおいて自発性興奮性シナプス後電流の発生頻度の増強作用が観察されたが、内向き電流は全く観察されなかった (n=12)。さらに、P2X 阻害薬の存在下において、ATP γ S によって生じる内向き電流の変化を観察した。P2X 受容体拮抗薬である PPADS (10 μ M) によって、ATP γ S (100 μ M) 投与によって生じる内向き電流は完全に阻害された (n=5)。一方、異なる P2X 受容体拮抗薬である TNP-ATP (20 μ M) の存在下において、ATP γ S (100 μ M) 投与によって生じた内向き電流は全く阻害されなかった (n=5)。

4. 脊髄ミクログリアでの ATP 受容体過剰発現メカニズムの解明

我々は「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 (Nature 424, 778-783, 2003)、さらに「P2X₄ 刺激によりミクログリアから BDNF が放出され、抑制性介在ニューロンの働きを興奮性に変えてしまう」という驚くべき報告をした (Nature, 438, 1017-1021, 2005) が、どのようなメカニズムで P2X₄ 蛋白が過剰に発現するのかは不明であった。この問題に答えるために、神経因性疼痛モデル動物でやはり過剰に発現するフ

フィブロネクチンとの関係を明らかにしようとした。まず、病態モデルを作成し、末梢神経損傷側と非損傷側の脊髄のフィブロネクチン量を比較解析した。損傷後3日後から7日目まで、損傷側脊髄のフィブロネクチン量は統計学的に有意に増大した。これは、痛み行動及びP2X4受容体亢進と強く相関していた。つぎにフィブロネクチンによるP2X4mRNA発現に対する影響を*in vitro*で検討した。その結果、フィブロネクチンは、濃度及び時間依存的にミクログリアのP2X4受容体の発現を亢進させた。フィブロネクチン処理培養皿で培養した場合、ミクログリアP2X4受容体mRNAは6時間後から、またP2X4受容体蛋白質は24時間後に約2倍増加した。さらにカルシウムイメージング法による解析により、P2X4受容体の機能が亢進していることも確認した。フィブロネクチンによるP2X4受容体亢進は、 $\beta 1$ インテグリン阻害により消失した。したがって、ミクログリアのインテグリンが、フィブロネクチンを受容することによりP2X4受容体発現を制御していることが明らかとなった。

ATP処置したミクログリアをnaïveな動物の脊髄内に投与すると神経因性疼痛アロディニアが観察されることが知られている (Tsuda et al, Nature 2003)。通常、 $50\mu\text{M}$ 以上の濃度のATPで刺激をしたミクログリアを髄腔内に投与した場合のみアロディニアが誘発されるが、フィブロネクチン処置を行った培養皿で培養したミクログリアを用いた場合、低濃度のATP ($5\mu\text{M}$)で刺激を行っただけでも、その髄腔内投与により強いアロディニアが誘発された。これは、P2X4受容体発現亢進に依存的であった。

5. 情動の中樞神経核・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

痛み情報は大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種の求心性入力が入力される。(1) 外側橋傍核 (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。(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。昨年度の本研究課題報告書に記したように、神経因性慢性疼痛モデル作成後に計測した下肢挙上反射閾値低下 (アロディニア発症を意味する) は、結紮側のみに、有意に、手術後の日数依存的に低下した。

5-1) PB 由来入力線維刺激による興奮性シナプス後電流 (PB-EPSC)

術後6~7日、最後の異痛症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 $600\text{--}1000\mu\text{A}$ と低値であったが、結紮同側、および、非結紮群では $2000\mu\text{A}$ を超えてもスパイクは生じなかった。この結果は、結紮対側においては、結紮同側および非結紮群と比較して、より弱いPB刺激によってより大きなEPSCが発生するという新知見を示すものである。両側のEPSC振幅の比は、結紮群において非結紮群よりも有意に高値を示した。以上より、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を、昨年度に続き、より高い再現性ととも証明した。

5-2) 慢性神経因性疼痛モデルにおける扁桃体シナプス伝達増大におけるNMDA受容体成分の関与

現在までに関節炎誘発痛および大腸炎誘発内臓痛モデルなどの亜急性疼痛モデルにおいて、疼痛発生数時間後の扁桃体シナプス伝達増大が、NMDA受容体成分の増大によって生じる可能性が示されている (Bird GC et al, J Physiol 564: 907-921, 2005)。本研究で観察された慢性疼痛 (発症後約7日) におけるシナプス伝達増強が同じ機構を介しているか否かを検討した。Non-NMDA受容体遮断薬6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX, $10\mu\text{M}$) は、PB刺激誘発EPSC成分をほぼ完全に消失させた。一方、NMDA受容体遮断薬D(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (APV, $50\mu\text{M}$) は、EPSC振幅・波形に影響を及ぼさなかった。これらの効果

は結紮群および非結紮群、ならびに、結紮同側および対側 CeA のいずれにおいても同様に観察された。以上より、慢性化した神経因性疼痛における扁桃体シナプス伝達増強は、亜急性疼痛とは異なる分子機構を介して生じている事実が明らかになった。本事実、痛み誘発の情動変化に関連したシナプス伝達変化に、海馬などのシナプス伝達可塑性と同様に、増強の時間経過に伴って異なる分子群が関与することを示すものであり、固定化・慢性化した疼痛関連情動応答に関与する標的分子を特化した治療薬の開発の意義と可能性を示す重要な所見である。

EPSC 振幅の変化はしばしばシナプス前終末からの神経伝達物質放出確率の変化を伴うことが知られている。このような機構が本研究で観察されたシナプス伝達増強に関与しているか否かを検討するため、放出確率にその値が大きく影響を受ける paired-pulse ratio を、50 ms 秒隔てられた二つの刺激パルスに対する応答の振幅比から求めた。その結果、結紮群と非結紮群、ならびに、結紮同側と対側の CeA におけるシナプスの paired-pulse ratio には有意な変化は認められず、上述のシナプス伝達増強には主にシナプス後性的変化が関与する可能性が示された。

5-3) 異痛症の程度と扁桃体シナプス伝達増強の関係

神経因性慢性疼痛モデル作成後に計測した下肢上反射閾値の低下の程度には固体差が見られた。また、神経結紮動物における PB-EPSC の増大率にも個体差が見られた。下肢上反射閾値の左右比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、CeA ニューロン誘発 EPSC 振幅の左右比を「興奮性シナプス伝達の結紮側依存的な増強の程度」の指標として両者の関係を解析した。その結果、異痛症応答の亢進の程度と PB-EPSC 増強の程度は 0.75 の高い相関を示した。これは、慢性疼痛発現の程度と扁桃体シナプス伝達効率の増強との間に明白な相関がある事実を世界で初めて証明したものである。

5-4) PB 由来入力線維刺激による興奮性シナプス後電流 (PB-EPSC) におよぼすプリン受容体活性化の影響

アデノシンや ATP などの細胞外プリン体が、中枢神経系の興奮性シナプスをさまざまな受容体機構を介して制御する事実がよく知られている。このシナプス伝達が、ATP (から細胞外産生されるアデノシン) およびアデノシンによるシナプス前アデノシン A1 受容体の活性化によってシナプス前抑制を示す事実を報昨年度、報告した。本年度は、異痛症応答の亢進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。PB-EPSC を結紮対側および結紮同側の CeA から記録し、adenosine 100 μ M および ATP 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 ATP は PB-EPSC 振幅を明瞭に減少させた。アデノシンによるシナプス伝達抑制効果は非結紮群、および、結紮同側 CeA ニューロンにおいて有意に弱かった。異痛症の程度が高い個体ほど、その対側 CeA においてより強いアデノシンのシナプス伝達抑制効果を示した。一方、ATP は、結紮の有無、CeA の左右に依存せず、ほぼアデノシンに近い強いシナプス伝達抑制を示した。興味深いことに、個々のニューロンにおいて ATP とアデノシンそれぞれによって生じた EPSC の抑制率は、非結紮群、および、結紮同側 CeA においては、大部分の例において ATP の方が大きかったが、結紮群対側 CeA においては全例において、アデノシンの方が強い抑制を起こした。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。

6. P2X4 ノックアウトマウスでの解析：副作用に関する情報

P2X4 阻害剤が有用な鎮痛薬となる可能性が出てきたが、一方で P2X4 は血管内皮にも発現している、血管系の制御に関与していることが知られている。これは P2X4 阻害剤が循環系で副作用を引き起こす可能性を示唆している。そこで、今回 P2X4 ノックアウト (-/-) マウスでの血管内皮での情報を解析し、副作用情報となるかどうかを検討した。+/+ マウスでは培養した肺微小循環内皮細胞において P2X4 の発現が蛋白および遺伝子レベルで消失していた。しかし、P2X4 以外の他のサブタイプの代償的な発現増加は見られなかった。+/+ マウスの肺微小循環内皮細胞に剪断応力を作用させても、正常 (+/+) マウスで見られた細胞外 Ca²⁺ の細胞内流入反応が起こらなかった。Ca²⁺ の流入反応は血管拡張物質である一酸化窒素 (NO) の放出に直接つながるので、剪断応力を作用させたときの NO 産生を蛍光色素 DAF-2 により計測した。その結果、+/+ の内皮細胞では剪断応力依存性に起こる NO 産生が起こらないことが示された。+/+ マウスと ++ マウスでは外見的に全く違いがなく、3 ヶ月の飼育期間中の体重の増加、食餌の量、飲水量、尿量にも差は認められなかった。しかし、血圧には差が現れた。マウスの尻尾でオシロメトリック法による非観血的血圧測定を行ったところ、+/+ マウスは ++ マウスと比較して有意に血圧が上昇していた。一方、心拍数には両者間に差は認められなかった。尿中への NO 産物排泄量を測定したところ、+/+ マウスでは ++ マウスと比較して有意に NO 産物排泄量が低下していることが示された。in vivo で血管は ATP や

血流の増加に対して拡張反応を示す。この反応は内皮細胞を剥離した血管では起こらないことから、内皮依存性と考えられている。そこで、P2X₄の欠損が内皮依存性の血管の拡張反応に及ぼす影響について *in vivo* 及び *ex vivo* で検討した。マウスの挙動筋の微小血管を生体顕微鏡で観察しながら、ATPを投与したときの細動脈の径の変化を解析した。予め、phenylephrine で細動脈を収縮させた後、頸静脈からAcetylcholine(Ach)とATP投与したところ、+/+マウスでは用量依存性の血管径の増大、すなわち拡張反応が現れた。一方、-/-マウスではAchによる拡張反応は+/+マウスと変わらなかったが、ATPによる拡張反応が明らかに抑制されていた。また、+/+マウスにおいて、細動脈の分岐の片方を圧迫することで、もう片方の分岐の血流を増加させると拡張反応が現れたが、-/-マウスではこの反応が著明に減弱していた。さらに、摘出したマウスの腸間膜動脈で流量増加に対する反応を観察した。+/+マウスでは明らかな拡張反応が現れたが -/-マウスでは、拡張反応が明らかに抑制を受けていた。これらの所見は、-/-マウスではATP刺激あるいは血流増加による内皮依存性の血管拡張反応が障害されていることを示している。

血管は慢性的な血流変化に対して構築の変化、リモデリングを起こす。血流の増加に対しては血管径の増大と血管壁厚の減少、血流の減少に対しては血管径の縮小と血管壁厚の増加を示す。そこで P2X₄の欠損が血流依存性の血管のリモデリングに及ぼす影響を検討した。マウスの左外頸動脈を結紮して左総頸動脈の血流を減少させたときの左総頸動脈の径の変化を病理標本上で評価した。その結果、+/+マウスでは血流減少2週間で有意な左総頸動脈の径の減少を示したが、-/-マウスでは血管径は変化しなかった。また、血流変化の有無に関わらず、-/-マウスは+/+マウスと比較して血管壁が厚い傾向が見られた。

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)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) 炎症部位でのプリン作動性情報伝達機構

今回の実験結果から、プリン作動性情報伝達機構は炎症のメディエーターであるPGsと、相互に連携して炎症応答に重要な役割を果たす可能性が示唆された。この連携は血管内皮細胞

でもATPによるCOX2の発現上昇として認められた。血管内皮細胞をATPで刺激すると、迅速かつ著明にCOX2発現が上昇した。血管内皮細胞にはイオンチャネル型のP2X₁およびP2X₇、G蛋白共役型のP2Y₁、P2Y₂およびP2Y₁₁など多様なP2受容体が発現している。また、ATP分解酵素の作用で産生されるアデバニンに対する受容体(A_{2b}、A_{2y})も存在する。このような受容体のうち、ATPによるCOX2発現上昇に関与するのは、以下のような実験結果からP2X₁受容体であると考えられた。まず、P2受容体アゴニストに対する選択性では、ATP>ADP>2-メチルチオ ATPで、UTPやAMP、アデバニンが無効であったことから、P2Y₂やアデバニン受容体の関与は否定された。次に、ATPの作用はホスホリパーゼC阻害薬U73122で抑制されず、細胞外Ca²⁺の除去により減弱したことから、G蛋白共役型受容体は関与せず、イオンチャネル型受容体に媒介されると考えられた。また、ATPの有効濃度はEC₅₀が約20μMであることからP2X₁受容体が関与する可能性は低いと考えられた。我々は、以前に血管内皮細胞をIFN-γで処理すると、P2X₁受容体を介する応答が亢進することを示したが、ATPによるCOX2発現の上昇は、IFN-γ処理により増大した。さらに、P2X₁受容体機能を促進するイバメクチンは、ATPによるCOX2誘導を増強した。P2X₁受容体には有効なアンタゴニストが見出されておらず、スラミンやPPADSが無効であることが知られているが、ATPによるCOX2発現誘導も、スラミンやPPADSで阻害されなかった。以上の結果は、間接的であるが、P2X₁受容体の関与を示唆するものである。

血管内皮細胞ではUTPはATPと同様な[Ca²⁺]上昇を引き起こすが、COX2発現作用を示さなかった。この背景には、ATPの作用を媒介するイオンチャネル型受容体とUTPの作用を媒介するP2Y₂受容体の情報伝達機構の間に違いがあると考えられた。ATP刺激はp38MAPキナーゼを活性化したが、UTPはp38MAPキナーゼには影響しなかった。さらに、ATPによるCOX2の発現誘導はp38MAPキナーゼ阻害薬SB203580により抑制された。以上の結果から、ATPとUTPの作用の違いは、P2X₁受容体の活性化が特異的にp38MAPキナーゼを活性化することに起因するものと考えられた。

COX2の発現誘導には転写の亢進とともにmRNAの安定性を制御するメカニズムが知られている。RNA合成阻害薬を用いた実験結果から、ATP刺激作用はCOX2 mRNAを安定化することが明らかになった。また、この安定化作用にはp38MAPキナーゼが重要な役割を果たすと考えられた。

ATPは血管内皮細胞のホスホリパーゼA₂を活性化し、PGs合成を促進することが知られているが、本研究から、COX2の発現を介して、さらにPGsの合成を促進することが明らかになった。このことは、炎症反応におけるプリン作動性機構とPGsの密接な関係を示唆するものである。血管内皮細胞は、腎臓とともに生

理的状態で COX2 を発現している例外的な組織(細胞)として知られている。最近、COX2 の選択低阻害薬ロフェコキシブが、心血管障害のリスクを上昇させるといふエビデンスのため市場から回収されたように、血管内皮細胞の COX2 は生理的な抗凝固、血管緊張の調節に関与することが明らかになってきた。血管内皮細胞はシェアーストレスにより ATP を放出し、P2X₁ 受容体を介して[Ca²⁺] 上昇を起こすことから、このような反応が血管内皮細胞の恒常的な COX2 発現に関与している可能性が考えられる。

(2) 膝関節炎モデルにおける P2X 受容体の機械的刺激に対する痛覚過敏反応における関与

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 ATP 受容体に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 ATP 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 ATP 受容体ブロッカーの PPADS や TNP-ATP が抑制したとする報告がある。近年、股関節の炎症等による疼痛が問題となってきたので、本年度はラット膝関節に CFA を注射して作成したモデルを研究対象とした。モデル動物は、明らかな膝関節の腫脹と、他動的伸展運動に対する逃避反応による疼痛行動測定において明らかな疼痛過敏反応を示した。1 分間の屈曲伸展運動による疼痛刺激による誘導されるリン酸化 ERK の発現と P2X 受容体との関係を免疫組織化学法にて検討した結果、炎症のみで関節運動がないラットでは、P2X 受容体発現ニューロンと pERK の共存は少なかったが、関節運動を与えたモデルラットでは、多くのニューロンで共存が観察された (pERK 発現ニューロン中では約 25 倍の増加、P2X 受容体発現ニューロン中では 5 倍以上の増加)。この結果は、炎症膝関節に対する運動による疼痛刺激において、P2X 受容体が大きな役割を果たしている可能性を示唆している。さらに、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結果、膝関節内に P2X 受容体拮抗剤の TNP-ATP 投与すると、明らかに用量依存性に他動的伸展運動に伴う疼痛行動が抑制された。また、P2X 受容体拮抗剤投与群で pERK の発現の減少も観察された。この結果は、炎症関節において関節運動による ATP の遊離、そして一次知覚神経上の ATP 受容体への結合、さらに疼痛行動の惹起という一連の仮説を支持するものと考えられる。

(3) 脊髄での痛み情報伝達におけるプリン受容体の機能

P2X 受容体は単一のサブユニットからなる P2X₁~5、P2X₇ 受容体と複数のサブユニットからなる P2X_{1/5,2/3,2/6,4/6} 受容

体が機能的に認知されている。今回の実験結果において、記録した約 4 割の脊髄第 V 層細胞において、代謝安定型で P2X ならびに P2Y 受容体に広く作用する ATP_S の灌流投与によって、内向き電流が観察された。さらに、この内向き電流は P2Y 受容体ではなく、P2X 受容体を介していた。代謝安定型の P2X 受容体作動薬である $\alpha\beta$ -methylene ATP を投与すると、我々が過去に報告した結果と同様に、ほとんどすべての脊髄第 V 層細胞において自発性興奮性シナプス後電流の発生頻度の増強効果が観察された。すなわち、脊髄第 V 層細胞のシナプス前には $\alpha\beta$ -methylene ATP に感受性のあるサブタイプの P2X 受容体が発現しており、その活性化に伴って興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の遊離増強がおこったことが示唆された。しかしながら、 $\alpha\beta$ -methylene ATP を灌流投与しても脊髄第 V 層細胞において内向き電流は観察されなかった。したがって、脊髄第 V 層のシナプス後細胞に発現し、内向き電流の発生に関与する P2X 受容体は、 $\alpha\beta$ -methylene ATP に感受性がなく、シナプス前に発現する P2X 受容体と異なるサブタイプであると考えられた。更に、ATP_S 投与によって生じた内向き電流は、P2X 受容体拮抗薬の PPADS (10 μ M) によって完全に阻害されたが、TNP-ATP (20 μ M) には影響を受けなかった。これまでに様々な ATP 受容体作動薬や阻害薬の開発が行われてきたが、いまだ各々のサブタイプに選択性の高い薬剤がない。従来の ATP 研究の結果から薬理的に考慮すると、脊髄第 V 層細胞のシナプス後細胞に発現している ATP 受容体のサブタイプは P2X₅ もしくは P2X_{2/6} 受容体であると推察された。介在細胞を密に分布する脊髄膠様質において、約半数のシナプス後細胞に何らかの ATP 受容体が発現し、その活性化によって内向き電流を生じることが報告されている。また、この脊髄膠様質において、GABA やグリシンを含有する抑制性介在細胞に P2X 受容体が発現しており、その活性化に伴って GABA や Glycine などの抑制性神経伝達物質の放出を促進することが知られている。今回の結果から、脊髄第 V 層細胞のシナプス前には $\alpha\beta$ -methylene ATP に感受性を有するサブタイプの P2X 受容体が発現し、その活性化によりグルタミン酸の遊離増強を惹起する。更に、シナプス後細胞には P2X₅、あるいは P2X_{2/6} 受容体が発現しており、その活性化に伴って、直接的に脊髄第 V 層細胞が脱分極することが明らかとなった。このように様々なサブタイプの P2X 受容体が広く脊髄後角に分布しており、P2X 受容体は末梢からの感覚情報を多彩に修飾していることが示唆された。

(4) 脊髄ミクログリアでの ATP 受容体過剰発現メカニズムの解明

神経因性疼痛の発症は脊髄ミクログリアの P2X4 受容体の発現が亢進することに起因している。しかし、①末梢神経損傷によりなぜ脊髄ミクログリアの P2X4 受容体が増えるのか、また、②P2X4 受容体が増えるとなぜ神経因性疼痛が惹起されるのか、という非常に重要な疑問点が未解決のままであった。本研究では、①の P2X4 受容体発現亢進のメカニズムを追及し、細胞外の因子、フィブロネクチンが重要な役割を果たしていることを明らかにした。フィブロネクチンは細胞外マトリックスで、細胞の増殖、突起伸展等の際、細胞の足場となる重要な蛋白である。中枢神経系では発生の初期以外では通常あまり発現していないが、外傷、炎症等の傷害時に、その発現が増大することが知られている。本研究では、末梢神経を傷害することにより、損傷側の脊髄で強いフィブロネクチンの増大が観察された。このフィブロネクチン増大の経時変化は、アロディニア発症及び P2X4 受容体発現亢進のそれとよく一致していた。従って、フィブロネクチンの発現亢進は、脊髄ミクログリアの P2X4 受容体発現亢進及びアロディニア発現に強く関与しているものと考えられる。実際にフィブロネクチン処理した培養皿で培養したミクログリアでは、フィブロネクチン濃度及び培養時間依存的に P2X4 受容体の mRNA、蛋白増大が観察され、これは $\beta 1$ インテグリン依存的であった。さらに、フィブロネクチン処理を行ったミクログリアは、極低濃度の ATP で刺激を行うだけで、髄腔内に投与すると痛みを惹起した。

以上、末梢神経損傷は、脊髄内でフィブロネクチンを増大させ、ミクログリアがこの情報をインテグリンを介して受容し、P2X4 受容体の転写亢進・機能亢進を引き起こし、神経因性疼痛アロディニアを誘発することが強く示唆された。

(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

本年度の研究によって、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体の影響に関する新知見が得られた。最も重要な事実は、(1) 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、(2) 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、(3) 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 A_1 受容体活性化によって、特異的に、強い異痛症を示す動物ほど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、痛覚性の上行性投射によって情動関連の 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、各個体ごとの異痛症獲得の程度と高い正の相関を示した。PB を介した CeA への入力は交差性であるのに対し、CeA から中脳水道周辺灰白質ニューロンを介した下降性疼痛制御は同側性なので、この相関は、シナプス伝達の増強が、異痛症の成立の結果として二次性に生じた変化である可能性を明示している。

ところが、興味深いことに、このシナプス増強は NMDA 受容体のリン酸化に起因すると考えられる同受容体チャネル電流の増加によるものではなかった。これは、数時間の経過で生じる亜急性疼痛モデルと全く異なる結果であり、神経因性疼痛の慢性化に伴い、形態的・分子発現的な変化を伴うシナプス伝達増強の「長期的固定化」が生じた可能性を示唆する。事実、我々は今年度、慢性化した神経因性疼痛モデルにおける神経因性疼痛の外科的改善法を開発したが、その新規慢性疼痛モデルにおいて、PB-CeA のシナプス伝達増強は疼痛が改善された動物においても緩和されなかった。この事実は、慢性神経因性疼痛の情動変化の重要な背景機構として、持続的に入力される疼痛情報によって扁桃体中心核のシナプス伝達長期増強がさらに固定化した可能性を示している。一般に、慢性疼痛の極めて初期の段階で受診する患者は稀であり、ほとんど全ての患者は、すでに長期化・固定した慢性疼痛を主訴とするため、情動障害を併う慢性疼痛患者の有力な治療戦略はこのような「固定化」されたシナプス伝達増強を減弱させる、という戦略であると期待される。

本研究で明らかにされた CeA 興奮シナプス伝達の増強は、異痛症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、幻肢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。

このような見地から、本研究で見出されたアデノシンと ATP による CeA シナプス伝達抑制効果の特異性は、極めて重要な意義を持つ。ATP 受容体、アデノシン受容体、細胞外 ATP をアデノシンまで代謝する細胞外 ATP 代謝系、ならびに、アデノシンを細胞内に取り込むヌクレオシドトランスポーターは、中枢神経系の大部分のシナプスにおいて、ごく近傍に局在し、細胞外 ATP をめぐる一つの大きな機能的コンプレックスを形成している (図 9)。慢性疼痛を生じていない CeA シナプスでは、アデノシン A₁ 受容体活性化によるシナプス前抑制作用が ATP>アデノシンであった。この結果は、シナプス・サイト近傍における強力な細胞外 ATP 代謝系の存在と、シナプス・サイトでのアデノシン濃度の過度の上昇を妨げる強力なヌクレオシド・トランスポーター活性を示唆する。一方、慢性疼痛を示す動物では、全例においてアデノシン>ATP という作用強度関係が認められた。この事実は、CeA シナプスで長期増強が「固定化」されるのに伴い、アデノシン受容体の発現変化のみならず、細胞外の代謝・取り込みを含む「プリン・シグナリング・コンプレックス」の変化が起きている可能性を強く支持する。モルヒネ抵抗性の高い難治性慢性疼痛症例における深刻な情動的な応答を緩和しようとする薬物治療において、このプリン・シグナリング・コンプレックスが有効な治療標的となりうる可能性を本研究は示した。

(6) P2X₄ ノックアウトマウスでの解析：副作用に関する情報

今回の検討で P2X₄ の遺伝子を欠損させたマウスでは血管のフェノタイプ、とくに血流に対する反応性の面で異常が現れた。P2X₄ 欠損マウスの血管内皮細胞は、正常マウスの内皮細胞で見られる流れによる細胞外カルシウム流入反応が消失していた。また、流れに反応して起こる NO 産生反応も著明に減弱していた。P2X₄ 欠損マウスでは骨格筋の細動脈における血流増加に対する血管拡張反応も明らかに減弱していて、全身の血圧の上昇と、尿中への NO product の排出量の減少も見られた。さらに、P2X₄ 欠損マウスでは、正常なマウスで見られる慢性の血流変化に適応して起こる血管のリモデリングが観察されなかった。このことは、P2X₄ が血流に依存した血管機能の調節機構に重要な役割を果たしていることを示している。P2X₄ 阻害剤を鎮痛薬として用いる場合にはこの調節機構への影響を考慮する必要がある。

E 結論

様々な型の P2X 受容体は脊髄後角の痛覚伝達系において、

シナプス前およびシナプス後細胞に発現し、末梢からの痛覚情報を多彩に修飾していることが明らかとなった。慢性炎症などの病態時において後根神経節細胞や脊髄後角の P2X 受容体の発現量は可塑的に変化することが報告されており、脊髄後角における P2X 受容体の活性化は病態時における痛覚過敏に深く関与していることが示唆された。さらに、神経損傷時に脊髄内で増大する細胞外マトリックスのフィブロネクチン及びそれを受容するミクログリアの β 1 インテグリンが、P2X₄ 受容体発現亢進に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。この神経因性慢性疼痛動物モデルでは、扁桃体中心核におけるシナプス伝達の増強とその固定化が生じる事実、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事実が明らかとなった。P2X₄ 受容体は血管内皮細胞において COX2 mRNA を安定化させ、PGs 産生に関与することが明らかになった。すなわち PGs と連携し、炎症応答を調節する可能性が示唆された。また P2X₄ は血管内皮細胞にかかる血流の変化の情報をキャッチして個体レベルでの循環系の生理機能の維持に関わっていることも明らかになった。P2X₄ 阻害剤を鎮痛薬として使用する場合にはこれらへの影響を考慮しなければならない。

F 研究発表 (原著論文)

1. Nasu-tada, K., Koizumi, S. and Inoue, K. Involvement of beta1 integrin in microglial chemotaxis and proliferation on fibronectin: Different regulations by ADP through PKA/Gi α . *52*, 98-107, 2005.
2. K. Fujishita, S. Koizumi and K. Inoue. Upregulation of P2Y₂ receptors by retinoids in normal human epidermal keratinocytes. *Purinergic Signallings* in press
3. M. Narita, M. Miyatake, M. Shibasaki, M. Tsuda, S. Koizumi, M. Narita, Y. Yajima, K. Inoue and T. Suzuki. Long-lasting change in brain dynamics induced by methamphetamine: enhancement of protein kinase C-dependent astrocytic response and behavioral sensitization. *J.Neurochem.*, *93*, 1383-1392, 2005
4. K.Inoue, M.Denda, H.Tozaki, K.Fujishita, S.Koizumi and K.Inoue. Characterization of multiple P2X receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. *J.Invest.Dermatol.*, *124*, 756-763, 2005
5. Y. Sato, R. Nakamura, M. Satoh, K. Fujishita, S. Mori, S.Ishida, T. Yamaguchi, K. Inoue, T.Nagao and Y. Ohno. Thyroid hormone targets matrix gla protein gene associated with vascular smooth muscle calcification. *Circulation Research*, *97*:550-557, 2005.
6. Norimasa Tamehiro, Yoji Sato, Takuo Suzuki, Toshihiro Hashimoto, Yoshinori Asakawa, Shinji Yokoyama, Tohru Kawanishi, Yasuo Ohno,

- Kazuhide Inoue, Taku Nagao, Tomoko Nishimaki-Mogami, Riccardin C: a natural product that functions as a liver X receptor (LXR) agonist and an LXR antagonist *FEBS Letters*, 579, 5299-5304, 2005
7. J.A.M. Coull, S. Beggs, D. Boudreau, D. Boivin, M. Tsuda, K. Inoue, C.Gravel, M.W. Salter and Y. De Koninck. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*, 438, 1017-1021, 2005.
8. K. Inoue. The function of microglia through purinergic receptors: Neuropathic pain and cytokine release. *Pharmacol Ther.* 109, 210-226, 2005
9. Koichi Obata, Hirokazu Katsura, Toshiyuki Mizushima, Hiroki Yamanaka, Kimiko Kobayashi, Yi Dai, Tetsuo Fukuoka, Atsushi Tokunaga, Makoto Tominaga, Koichi Noguchi. The role of ERK signaling and the P2X receptor on mechanical pain evoked by movement of inflamed knee joint. *Pain*, in Press
10. Wan-Jun Zhu, Hiroki Yamanaka, Koichi Obata, Yi Dai, Kimiko Kobayashi, Toyoko Kozai, Atsushi Tokunaga and Koichi Noguchi. Antisense knock down of TRPA1, but not TRPM8, alleviates cold hyperalgesia after spinal nerve ligation in rats. *Exp. Neurol.* In Press
11. Hiroki Yamanaka, Koichi Obata, Tetsuo Fukuoka, Yi Dai, Kimiko Kobayashi, Atsushi Tokunaga and Koichi Noguchi. BDNF in sensory neurons and chronic pain. *Neurosci. Res.* In Press
12. Akiko Ogawa , Yi Dai, Hiroki Yamanaka, Koichi Iwata, Hitoshi Niwa, Koichi Noguchi. The effect of site and type of nerve injury on the expression of brain-derived neurotrophic factor in the dorsal root ganglion and on neuropathic pain behavior. *Neuroscience*, 137, 961-70
13. Kimiko Kobayashi, Tetsuo Fukuoka, Hiroki Yamanaka, Yi Dai, Koichi Obata, Atsushi Tokunaga, and Koichi Noguchi. Distinct expression of TRPM8, TRPA1 and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with A/C- fibers and colocalization with Trk receptors. *J. Comp. Neurol.* 493, 596-606
14. Toshiyuki Mizushima, Koichi Obata, Hiroki Yamanaka, Yi Dai, Tetsuo Fukuoka, Atsushi Tokunaga, Takashi Mashimo, Koichi Noguchi. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in the spinal cord contributes to neuropathic pain in a rat model of mononeuropathy. *Eur. J. Neurosci.* 21, 2467-2474
15. Koichi Obata, Hirokazu Katsura, Toshiyuki Mizushima, Hiroki Yamanaka, Kimiko Kobayashi, Yi Dai, Tetsuo Fukuoka, Atsushi Tokunaga, Makoto Tominaga, Koichi Noguchi. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J. Clin. Invest.* 115, 2393-2401, 2005
16. Wan-Jun Zhu, Hiroki Yamanaka, Koichi Obata, Yi Dai, Kimiko Kobayashi, Toyoko Kozai, Atsushi Tokunaga and Koichi Noguchi. Expression of mRNA for four subtypes of the proteinase-activated receptor in rat dorsal root ganglia. *Brain Res.* 1041, 205-11
17. Hiroki Yamanaka, Koichi Obata, Tetsuo Fukuoka, Yi Dai, Kimiko Kobayashi, Atsushi Tokunaga and Koichi Noguchi. Induction of plasminogen activator inhibitor-1 and -2 in dorsal root ganglion neurons after peripheral nerve injury. *Neuroscience*, 132, 183-191, 2005
18. Akiko Ogawa , Yi Dai, Hiroki Yamanaka, Koichi Iwata, Hitoshi Niwa, Koichi Noguchi. Ca²⁺/calmodulin-protein kinase II a in the trigeminal subnucleus caudalis contributes to neuropathic pain following inferior alveolar nerve transection. *Exp. Neurol.* 192, 310-19, 2005
19. Kimiko Kobayashi, Tetsuo Fukuoka, Hiroki Yamanaka, Yi Dai, Koichi Obata, Atsushi Tokunaga, 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
20. Toshiyuki Mizushima, Koichi Obata, Hiroki Yamanaka, Yi Dai, Tetsuo Fukuoka, Atsushi Tokunaga, Takashi Mashimo, Koichi Noguchi. Activation of p38 MAPK in primary afferent neurons by noxious stimulation and its involvement in the development of thermal hyperalgesia. *Pain*, 113, 51-60, 2005
21. N. Kasai, C. Han, K. Torimitsu, Hydrogen peroxide distribution and neuronal cell death in a rat hippocampal slice, *Sensors and Actuators B*, 108, 746-750, 2005
22. W. Sahara, M. Kobayashi, H. Sagara, K. Hamada, T. Goto, I. Fujimoto, K. Torimitsu, K. Mikoshiba, Visualization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by atomic force microscopy, *Neuroscience Letters*, 391, 102-107, 2006
23. 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*, 46, 11, 2005
24. 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
25. Shiokawa H, Nakatsuka T, Furue H, Tsuda M, Katafuchi T, Inoue K, Yoshimura M: Direct excitation of deep dorsal horn neurones in the rat spinal cord by the activation of postsynaptic P2X receptors. *Journal of Physiology* (in press)
26. Nakatsuka T, Gu JG: P2X purinoceptors and sensory transmission. *European Journal of Physiology*, (published online on March 18)
27. Nakatsuka T†, Chen M†, Takeda D†, King C, Ling J, Xing H, Ataka T, Vierck C, Yeziarski R, Gu JG (†: equal contribution): Substance P-driven feed-forward inhibitory activity in the mammalian spinal cord. *Mol. Pain* 1(20): 1-9, 2005.
28. Nakatsuka T†, Tamae A†, Koga K, Kato G, Furue H, Katafuchi T, Yoshimura M (†: equal contribution): Direct inhibition of substantia

gelatinosa neurones in the spinal cord by activation of dopamine D2-like receptors. *J. Physiol.* 568(1): 243-253, 2005.

29. Nakatsuka T, Tamae A, Koga K, Kato G, Fujita T, Furue H, Kumamoto E, Yoshimura M: Functional role of postsynaptic dopamine receptors in substantia gelatinosa neuron of the spinal cord. *Pain Res.* 20(3): 105-110, 2005.

30. Matayoshi S, Jiang N, Katafuchi T, Koga K, Furue H, Yasaka T, Nakatsuka T, Zhou X-F, Kawasaki Y, Tanaka N, Yoshimura M: Actions of brain-derived neurotrophic factor on the spinal nociceptive transmission during inflammation. *J. Physiol.* 569(2): 685-695, 2005.

31. Shiokawa H, Nakatsuka T, Furue H, Inoue K, Yoshimura M: Functional roles of post-synaptic ATP P2X receptors in spinal deep dorsal horn neurons. *Pain Res.* 20(1): 1-7, 2005.

32. Ikeda R, Kato F: Early and transient increase in spontaneous synaptic inputs to the rat facial motoneurons after axotomy in isolated brainstem slices of rats. *Neuroscience* 134:889-899 (2005).

33. Yamamoto K, Sokabe T, Matsumoto T, Yoshimura K, Shibata M, Ohura N, Fukuda T, Sato T, Sekine K, Kato S, Isshiki M, Fujita T, Kobayashi M, Kawamura K, Masuda H, Kamiya A, Ando J. Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice. *Nature Medicine.* 12:133-137, 2005

34. Yamamoto K, Sokabe T, Watabe T, Miyazono K, Yamashita JK, Obi S, Ohura N, Matsushita A, Kamiya A, Ando J. Fluid shear stress induces differentiation of Flk-1-positive embryonic stem cells into vascular endothelial cells in vitro. *American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology.* 288:H1915-H1924, 2005

35. Huang H, Nakayama Y, Qin K, Yamamoto K, Ando J, Yamashita JK, Itoh H, Kanda K, Yaku H, Okamoto Y, Nemoto Y. Differentiation from embryonic stem cells to vascular wall cells under in vitro pulsatile flow loading. *Journal of Artificial Organs.* 8:110-118, 2005.

36. Chen YM, Shiraishi N, Satokawa H, Kakugo A, Naita T, Gong JP, Osada Y, Yamamoto K, Ando J. Cultivation of endothelial cells on adhesive protein-free synthetic polymer gels. *Biomaterials.* 26:4588-4596, 2005

37. Shibata M, Ichioka S, Ando J, Togawa T, Kamiya A. Non-linear regulation of capillary perfusion in relation to ambient pO₂ changes in skeletal muscle. *European Journal of Applied Physiology.* 94:352-355, 2005

38. Asano Y, Ichioka S, Shibata M, Ando J, Nakatsuka T. Sprouting from arteriovenous shunt vessels with increased flow. *Medical and Biological Engineering and Computing.* 43:126-130, 2005

無し

3. その他

無し

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

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

平成18年7月31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