

4. ATP のソース及び周辺細胞とのコミュニケーション

一次求心性神経の末梢端は表皮ケラチノサイトにまで達している。また上述したように、一次求心性神経はP2X受容体及びP2Y受容体を発現している。そこで、DRGとケラチノサイト (normal human epidermal keratinocytes, NHEKs) の共培養系を構築し、NHEKsとDRGのコミュニケーションの有無を検討した。Anti-peripherin及びanti-cytokeratin14抗体を用いた二重染色法により、小型のc繊維及びNHEKsが存在し、これらは互いに物理的に接触していることが明らかとなった (図4A)。このとき、共培養細胞にKC1で脱分極刺激を与えると、ほとんどのperipherin陽性DRG神経で $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が観察されたが、cytokeratin14陽性NHEKsでは応答が観察されなかった。P2Y₂作用薬UTPで刺激を加えると、DRG神経でも、NHEKsでも $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が観察され、これはP2Y受容体の拮抗薬で抑制された。つまり小型DRG神経細胞及びNHEKs両者共に機能的P2Y₂受容体を発現していることが明らかとなった。

ATP 及びそのアナログで NHEKs を刺激すると、ほとんどの細胞で $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が認められた。薬理的な解析により、P2Y₂ 受容体がこの応答の主たる責任受容体であることが明らかとなった。ATP 及び P2Y₂ 受容体作用薬 UTP による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は P2 受容体拮抗薬により抑制された。次に内在性の ATP により同様の応答が観察されるか否かを検討した。ある NHEK に機械刺激を加えると、その細胞で $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が観察され、これはタイムラグを経て周囲の NHEKs へ Ca^{2+} wave となって伝播した。この Ca^{2+} wave 伝播は P2 受容体拮抗薬及び ATP 分解酵素 apyrase 存在下で、ほぼ消失する。つまり、機械刺激による Ca^{2+} wave の伝播には ATP 及び P2Y₂ 受容体活性化が重要であること、つまり機械刺激に応答して ATP が放出され、拡散し、周囲の NHEKs の P2Y₂ 受容体が活性化されることにより、 Ca^{2+} wave が伝播されることが明らかとなった。また、ATP をルシフェリン・ルシフェラーゼ法とイメージング法の組み合わせにより画像化し¹⁶⁾、実際に NHEKs が機械刺激に応答して実際に ATP を放出していることも明らかとなった。

それでは機械刺激を受容したNHEKs細胞は、その刺激をATPの化学シグナルに変換してDRG神経細胞にその情報を伝えることが可能なのであろうか？共焦点レーザー顕微鏡によるfluo4- Ca^{2+} イメージング法を用いた検討により、単一NHEKの機械刺激により、 Ca^{2+} waveの伝播が近傍のDRG神経細胞に伝播すること、これがapyrase及びsuraminにより抑制されたことから、NHEKsとDRG間のコミュニケーションがATP/P2Y₂受容体依存的に起きていることが明らかとなった (図4C)。CookらはDRG神経細胞と皮膚の共培養系を用い、皮膚を傷害すると、小型DRG神経細胞で、P2X受容体を介した内向き電流が観察されることを報告した¹⁷⁾。これは、皮膚からのATPを介する情報が、P2X受容体を介して経路によってもDRG神経細胞に伝わることを示唆している。このように、皮膚は一次求心性神経の自由終末にATPを供給する非常に大切なソースであると考えられる。また、皮膚は最も外側に位置する器官であり、身体を外界からの有害な刺激から守る役割を有しているが、それ以外に、外界からの物理刺激等の情報をATPの化学シグナルに変換して、知覚神経系に伝える重要な

役割を有しているものと考えられる。また、DRG神経細胞の細胞体を取り巻くサテライトグリア細胞にもP2Y₁及びP2Y₂受容体が発現してATPを介してDRG神経細胞とコミュニケーションをとっている可能性があること¹⁸⁾、中枢神経系ではアストロサイトがATPを放出して周辺神経細胞及びグリア細胞の機能を調節していること¹⁶⁾、等の報告から、部位によっては、グリア細胞がATPのソースとして痛み伝達を制御する重要なソースであると考えられる。

5. おわりに

ATPによる痛み情報の伝達について、特にP2Y受容体に関する最近の知見と、ATP/P2Y₂受容体を介した一次求心性神経-皮膚連関の重要性について述べた。表皮ケラチノサイトが機械刺激に応答してATPを放出しP2Y₂受容体を刺激することにより細胞間で情報を交換していること、さらにこのシグナルが皮膚に入力する小型一次求心性神経のP2Y₂受容体を活性化すること、DRG神経細胞P2Y₂受容体刺激がメカニカルアロディニアを引き起こす可能性を示した。皮膚は、通常の機械刺激だけでなく、傷害、紫外線照射等により、容易にATPを放出する。ATPによるシグナルが、皮膚の機能だけでなく、皮膚-知覚神経細胞連関に強く影響すること、またこれまで痛覚伝達で注目されていたイオンチャンネル型P2X受容体に加え、P2Y受容体も痛み情報の伝達と密接にリンクしている可能性が示唆された。ATPはこれら異なるP2受容体群をどの様に使い分けて痛み情報を伝達しているのか、また、異種P2受容体の相互作用によってどの様に痛み情報が修飾されるのか等、今後明らかにすべき課題は多く残されている。

参考文献

- 1) Chen CC, Akopian AN, Sivilotti L, et al.: A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* 377: 428-431, 1995
- 2) Lewis C, Neidhart S, Holy C, et al.: Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* 377: 432-435, 1995
- 3) Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Ueno S, et al.: Downregulation of P2X3 receptor-dependent sensory functions in A/J inbred mouse strain. *Eur J Neurosci* 15: 1444-1450, 2002
- 4) Tsuda M, Koizumi S, Kita A, et al.: Mechanical allodynia caused by intraplantar injection of P2X receptor agonist in rats: involvement of heteromeric P2X2/3 receptor signaling in capsaicin-insensitive primary

- afferent neurons. *J Neurosci* 20: RC90,2000
- 5) Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, et al.: P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 424: 778-783,2003
 - 6) Coull JA, Beggs S, Boudreau D, et al.: BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438: 1017-1021,2005
 - 7) Nakamura F, Strittmatter SM: P2Y1 purinergic receptors in sensory neurons: contribution to touch-induced impulse generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 10465-10470,1996
 - 8) Sanada M, Yasuda H, Omatsu-Kanbe M, et al.: Increase in intracellular Ca(2+) and calcitonin gene-related peptide release through metabotropic P2Y receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 111: 413-422,2002
 - 9) Nakayama S, Yamashita T, Konishi M, et al.: P2Y-mediated Ca²⁺ response is spatiotemporally graded and synchronized in sensory neurons: a two-photon photolysis study. *Faseb J* 18: 1562-1564,2004
 - 10) Gerevich Z, Borvendeg SJ, Schroder W, et al.: Inhibition of N-type voltage-activated calcium channels in rat dorsal root ganglion neurons by P2Y receptors is a possible mechanism of ADP-induced analgesia. *J Neurosci* 24: 797-807,2004
 - 11) Gerevich Z, Muller C, Illes P: Metabotropic P2Y1 receptors inhibit P2X3 receptor-channels in rat dorsal root ganglion neurons. *Eur J Pharmacol* 521: 34-38,2005
 - 12) Tominaga M, Wada M, 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
 - 13) Moriyama T, Iida T, Kobayashi K, et al.: Possible involvement of P2Y2 metabotropic receptors in ATP-induced transient receptor potential vanilloid receptor 1-mediated thermal hypersensitivity. *J Neurosci* 23: 6058-6062,2003
 - 14) Molliver DC, Cook SP, Carlsten JA, et al.: ATP and UTP excite sensory neurons and induce CREB phosphorylation through the metabotropic receptor, P2Y2. *Eur J Neurosci* 16: 1850-1860,2002
 - 15) Okada M, Nakagawa T, Minami M, et al.: Analgesic effects of intrathecal administration of P2Y nucleotide receptor agonists UTP and UDP in normal and neuropathic pain model rats. *J Pharmacol Exp Ther* 303: 66-73,2002
 - 16) Koizumi S, Fujishita K, Tsuda M, et al.: Dynamic inhibition of excitatory synaptic transmission by astrocyte-derived ATP in hippocampal cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 11023-11028,2003

- 17) Cook SP, McCleskey EW: Cell damage excites nociceptors through release of cytosolic ATP. *Pain* 95: 41-47,2002
- 18) Weick M, Cherkas PS, Hartig W, et al.: P2 receptors in satellite glial cells in trigeminal ganglia of mice. *Neuroscience* 120: 969-977,2003

図の説明

図1 ATP受容体の模式図

イオンチャネル型 P2X 受容体は P2X_{1,7} の 7 種類、G 蛋白共役型 P2Y 受容体は P2Y_{1,2,4,6,11-14} の 8 種類が知られている。

図2 ATP 及び UTP により惹起される小型 DRG 神経細胞の [Ca²⁺]_i 上昇

A. Fura2 法により測定した小型 DRG 神経細胞 [Ca²⁺]_i 変動の代表例。ATP (100 μM) により惹起される [Ca²⁺]_i 上昇は、細胞外 Ca²⁺ 除去 (0 Ca²⁺) により影響を受けず、同様の応答は UTP 刺激を行った場合にも観察される。B. この [Ca²⁺]_i 上昇に関する責任受容体 P2Y₂ 受容体の模式図。P2Y₂ 受容体は、Gq/11-phospholipase C (PLC) とリンクしており、その刺激により inositol 1m4m5-trisphosphate (InsP₃) が産生され、小胞体 (ER) InsP₃ 受容体から Ca²⁺ が放出される。ATP 及び UTP は同程度の強さでこの受容体を活性化する。

図3 UTP により惹起される痛み行動

A. 実験の模式図。ラット後肢足底部に、各種濃度の UTP (1-100 ng/paw) を注入した後、一定時間ごとに太さの異なる von Frey filaments による触刺激を行い、それに対する足上げ行動を異痛症 (allodynia, アロディニア) として観察した。B. UTP 投与後 30、60、120 及び 240 分後のアロディニア。値は 50% 閾値 (g) を示す。

図4 ATP による DRG 神経—表皮ケラチノサイト (NHEK) 間コミュニケーション

A. DRG 神経細胞及び NHEK の共培養系の免疫組織学像。小型 DRG 神経細胞は anti-peripherin 抗体 (緑)、NHEK は anti-cytokeratin14 抗体 (赤) を用いて標識した。B. NHEK の機械刺激 (K1) により、その情報は離れた NHEKs (K2 及び K3) へ、さらには近傍の DRG 神経細胞 (N4) にも Ca²⁺ wave として伝播した。この Ca²⁺ 伝播は、ATP 分解酵素 apyrase によりほぼ消失した (C)。[Ca²⁺]_i 変動は共焦点レーザー顕微鏡による fluo4 法により測定し、値は ΔF/F0 で表した。

図5 まとめの模式図

皮膚は機械刺激等の物理刺激及び損傷等により ATP を放出する。一次求心性神経

の末梢端は NHEK まで達していることから、知覚神経はしばしば ATP に曝露される。一次求心性神経末梢端には、P2X 受容体以外に P2Y 受容体も存在し、特に無髄 c 繊維には P2Y₂ 受容体が強く発現している。小型一次求心性神経 P2Y₂ 受容体活性化によりメカニカルアロディニアが惹起される。この詳細な機序は不明であるが、PLC 及び細胞内 Ca²⁺ がその発現に重要な役割を果たす。

イオンチャネル型・P2X受容体

P2X1-7

G蛋白質共役型・P2Y受容体

P2X1, 2, 4, 6, 11-14

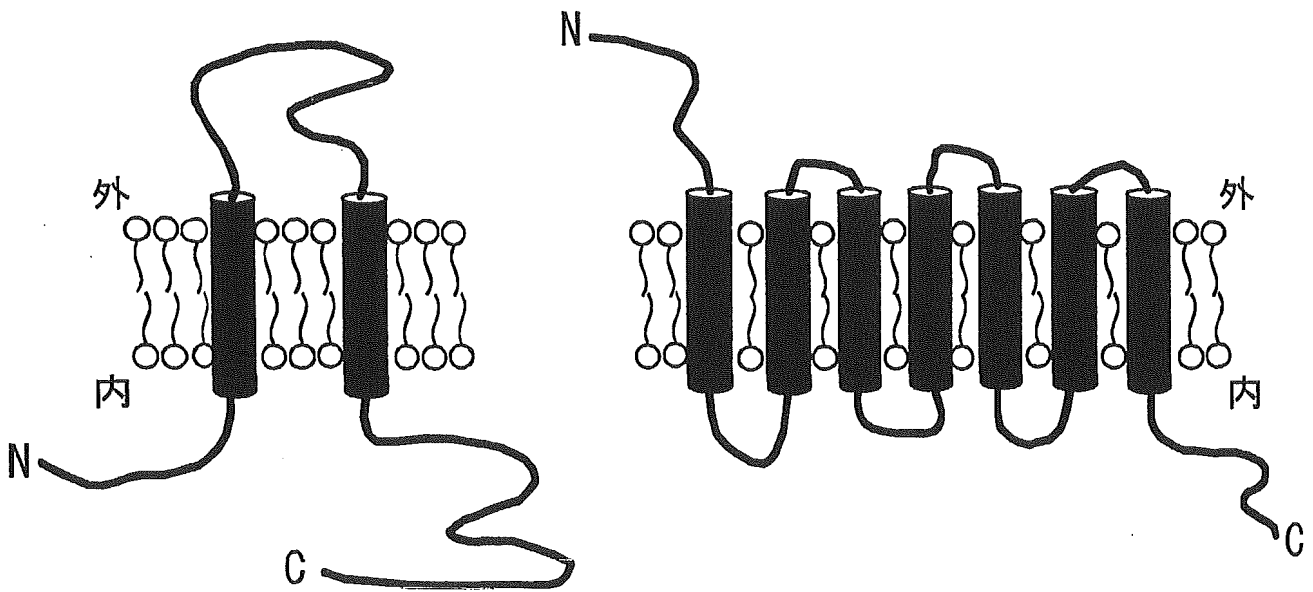
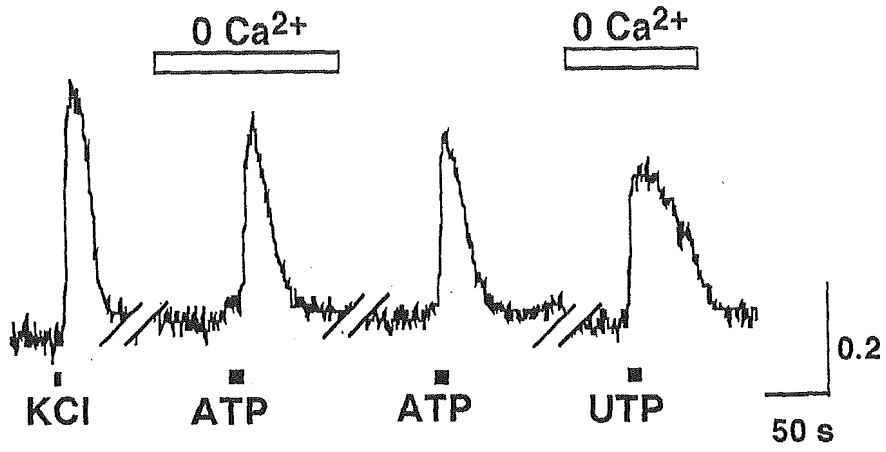


Fig. 1 Koizumi et al.

A



B

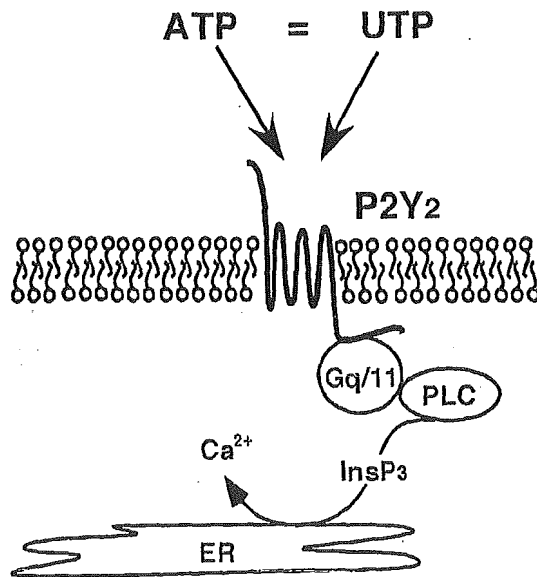


Fig.2 Koizumi et al.

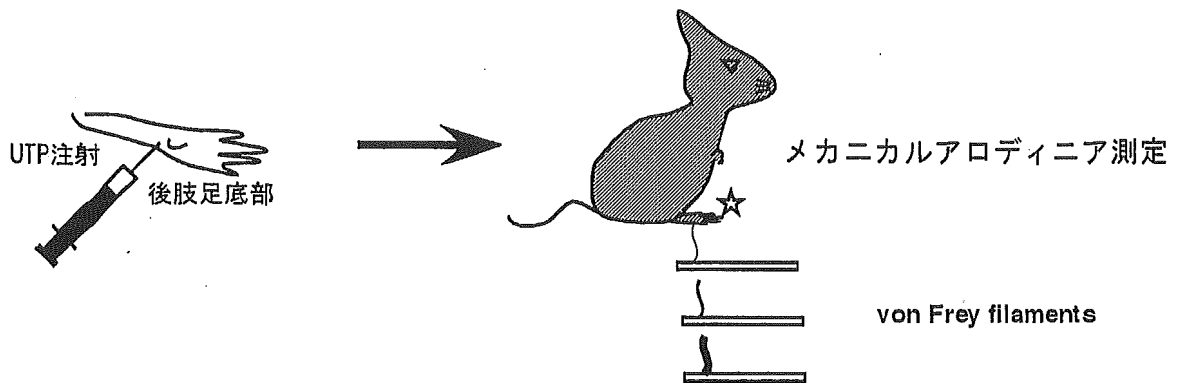
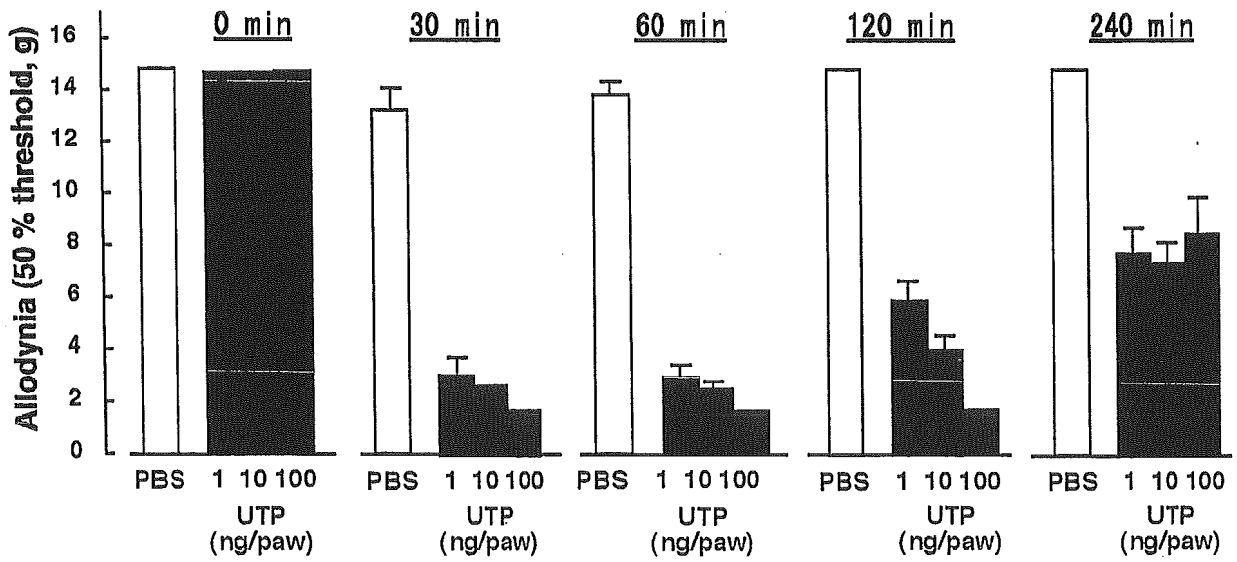
A**B**

Fig. 3 Koizumi et al.

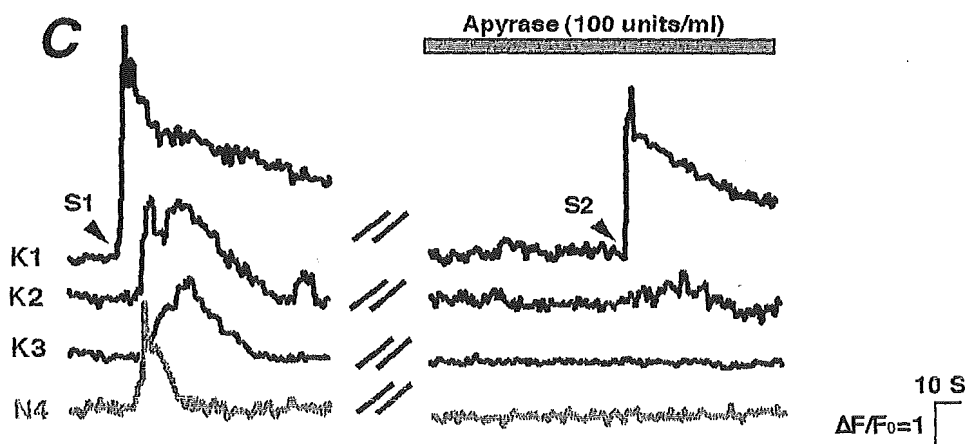
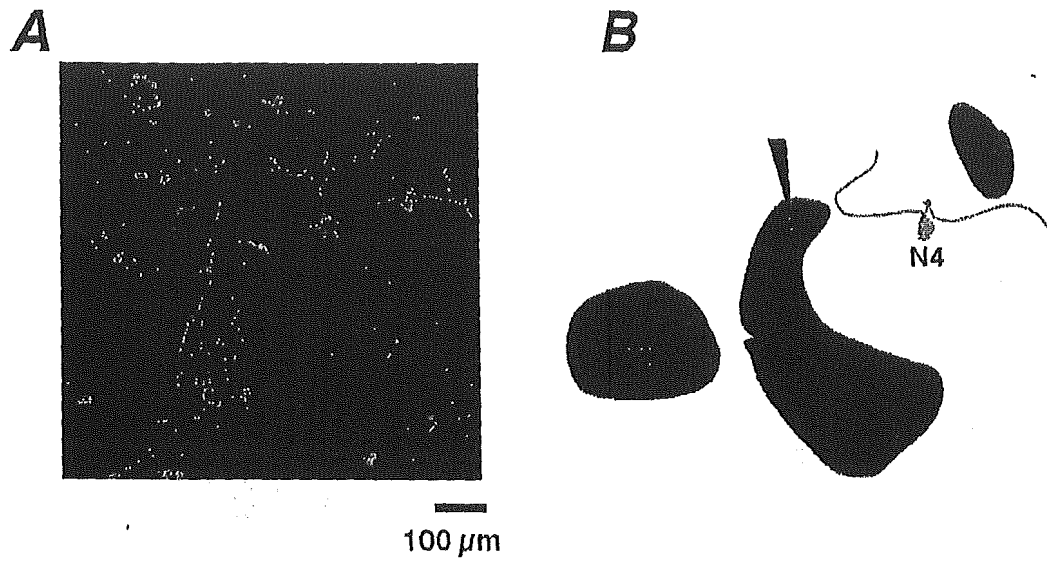


Fig. 4 Koizumi et al.

メカニカルアロディニア

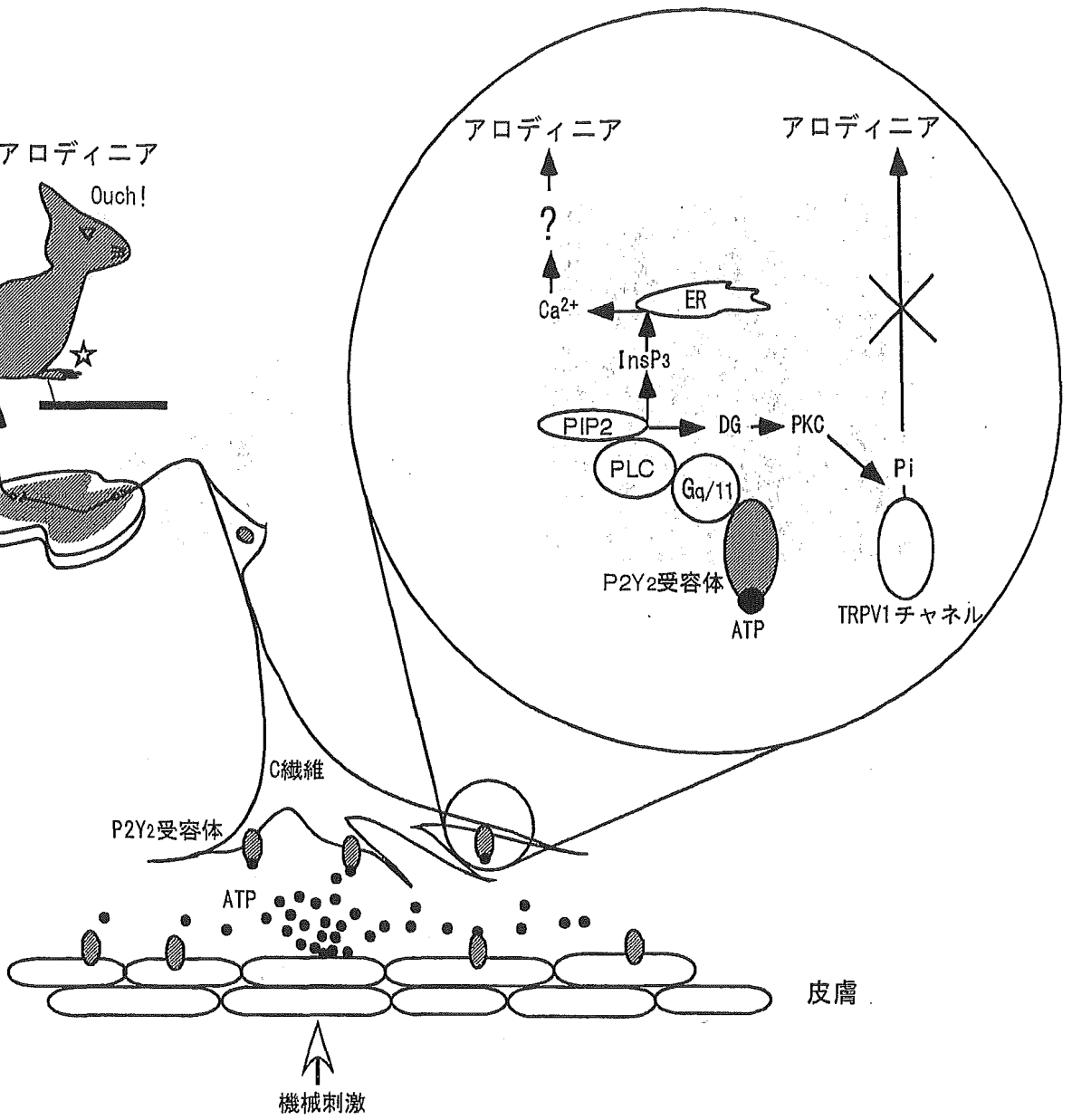
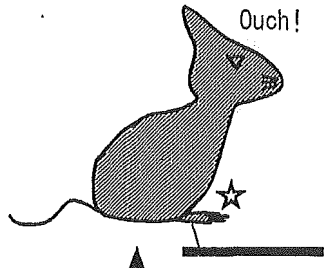


Fig. 5 Koizumi et al.

ATPを介した皮膚ケラチノサイト間情報連絡と痛み

小泉 修一¹、藤下 加代子¹、津田 誠²、井上 和秀²¹国立医薬品食品衛生研究所・薬理、²九州大学大学院薬学研究院・薬効解析学

背景

エネルギーの通貨であるATPは細胞外に放出されて、情報伝達物質としても機能する。ATPを受容する特異的受容体P2受容体は、イオン型P2X受容体とG蛋白共役型P2Y受容体に大別され、それぞれが7及び8種類のサブタイプに分類されている。ATPは各種P2受容体に作用して、様々な応答を呈するが、その生理的意義に関する研究は緒についたばかりである。最近ATPが種々の知覚情報シグナルと強くリンクしているとの報告が相次ぎ、特に痛み情報の伝達との関連性で注目を集めている。ATP受容体のなかでも特に、P2X受容体は、痛覚情報の伝達と強く関連していることが指摘されており、実際、一次求心性神経P2X₃受容体^{1,11)}及びP2X_{2/3}受容体¹³⁾さらに脊髄ミクログリアのP2X₄受容体¹⁴⁾の活性化は、痛覚を伝達する。ところが、一次求心性神経に各種P2Y受容体が存在し⁸⁾、機能していること^{6,10)}またこれらが痛みとリンクしている可能性が報告されている等、P2Y受容体も痛み情報の制御と関連していること^{7,12)}が示唆されてきた。一方、知覚神経の末梢端は表皮ケラチノサイトにその終末を伸ばし、皮膚から種々のシグナルを受容していると考えられている。最近表皮ケラチノサイトにP2受容体が存在していること^{2,4)}、皮膚にのみ存在する感覚受容器がその情報を伝える際にATPを使う可能性が示唆される等⁹⁾、皮膚と感覚神経間のコミュニケーションとATPの関連性に注目が集まっている。

本報告では、表皮ケラチノサイトがATPを用いて細胞間情報連絡を担っていること、またこのケラチノサイト由来ATPは、知覚神経自由終末に作用し、痛覚伝達に関与していることを示す。

実験方法

(1) 細胞培養法：ヒト表皮ケラチノサイト (normal human epidermal keratinocytes; NHEKs) は、クラブウ (大阪) から入手し情報に従って培養した。マウス後根神経節細胞 (DRG) とNHEKsの共培養は既報に従った⁵⁾。つまり、3T3-J2細胞をfeeder層としてNHEKsを播種し、2日後にNHEKsが完全に接着した後にDRGを播種した。共培養2-3日後に、細胞を実験に供した。(2)細胞内カルシウム濃度([Ca²⁺]_i)測定：[Ca²⁺]_iは既報に従い、fura-2法及びfluo-4を用いた共焦点レーザー法により行った。(3)免疫組織学的検討：NHEKs及びDRGsはanti-cytokeratin14 (Cymbus Biotechnology) 及びanti-peripherin抗体(Chemicon)を用いて二重染色を行った。(4)ATP放出量の測定：既報⁵⁾に従い、ルシフェリン-ルシフェラーゼ存在下で、機械刺激により惹起される発光をVIMカメラに蓄積し、画像化した。(5)行動薬理的検討：痛み行動は

既報¹³⁾に従い、von Frey filamentを用いてメカニカルアロディニアを判定した。P2Y₂受容体作用薬であるUTPをラット左足底部に投与し(100 μl)、15、30、60、120、180及び240分後の痛み行動変化を観察した。

結果及び考察

(1) NHEKsのP2受容体

ATP及びそのアナログでNHEKsを刺激すると、ほとんどの細胞で[Ca²⁺]_i上昇が認められた。図1Aに示すように、ATP及びUTPは最も強く[Ca²⁺]_iを上昇させ、その強さはほぼ同程度であった。ATP_γSは次に強く、2MeSATP及びUDPは非常に弱い作用有していた。P2受容体の薬理学的な性質を考えると、この応答の主たる責任受容体はP2Y₂受容体であると考えられる。P2Y₂受容体刺激により惹起される[Ca²⁺]_iの上昇はP2受容体拮抗薬suramin及びPPADS (pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonate)により抑制された(データは示さず)。次に内在性のATPにより同様の応答が観察されるか否かを検討した。共焦点レーザー顕微鏡によるfluo4-Ca²⁺イメージング法を用いた検討により、あるNHEKに機械刺激を加えると、その細胞で[Ca²⁺]_i上昇が観察され、これはタイムラグを経て周囲のNHEKsへCa²⁺waveとなって伝播した(図1B)。このCa²⁺wave伝播はP2受容体拮抗薬suramin及びPPADS、またATP分解酵素apyraseによりほぼ消失した(図1C)。またP2Y₁受容体を選択的に抑制するA3P5PS及びギャップ結合を阻害する1-octanolはこのCa²⁺wave伝播に影響しなかった。従って、機械刺激によるCa²⁺waveはATP及びP2受容体(P2Y₂受容体)の活性化が重要であること、つまり機械刺激に应答してATPが放出され、拡散し、周囲のNHEKsのP2Y₂受容体が活性化されることにより、Ca²⁺waveが伝播されることが示唆された。そこで次に実際、機械刺激に応じてNHEKsから放出されるATP量を測定し、可視化した。図2で示すように、ルシフェリン-ルシフェラーゼ存在下でNHEKをガラスピペットで刺激して、30秒間ATPに起因する光子を蓄積して画像化すると、刺激部位に光子が密集した画像が得られた。光子の密度と既知のATP量の間には高い相関関係が認められることを考慮すると(図2B)、機械刺激によりNHEKはATPを放出し、これが周辺に拡散していくものと考えられる。

一次求心性神経はP2受容体を発現しており、またその末梢端は表皮ケラチノサイトにまで達していることが知られている。そこで、DRGとNHEKsの共培養系を構築し、NHEKsとDRGのコミュニケーションの有無を検討した。Anti-peripherin及びanti-cytokeratin14抗体を用いた二重染色法により、小型のc繊維及びNHEKsが存在し、これらは互いに物理的に接触していることが明らかとなった(図3A)。このとき、共培養細胞にKClで脱分極刺激を与えると、ほとんどのperipherin陽性DRG神経で[Ca²⁺]_i上昇が観察されたが、cytokeratin14陽性NHEKsでは応答が観察されなかった(図3B)。P2Y₂作用薬UTPで刺激を加えると、DRG神経でも、NHEKsでも[Ca²⁺]_i上昇が観察され、これはP2Y受容体の拮抗薬suraminで抑制された。つまり小型DRG神経及びNHEKs両者共に機能的P2Y₂受容体を発現していることが明らかとなった。

機械刺激を受容したNHEKsはATPを放出し、細胞間にCa²⁺ waveを伝播させる。従って、共培養系を用いた系において、NHEKsの機械受容が、ATPを介してDRG神経に情報を伝えるか否かの検討を行った。共焦点レーザー顕微鏡によるCa²⁺イメージング法により、単一NHEKの機械刺激により（図3C及びD, K1）、Ca²⁺ waveの伝播が近傍のNHEKs (K2及びK3) 及びDRG神経 (N4) に伝播すること、これがapyrase及びsuraminにより抑制されたことから、NHEKsとDRG間のコミュニケーションがATP/P2Y₂受容体依存的に起きていることが明らかとなった（図3）。

(2) P2Y受容体と痛覚

皮膚から放出されたATPは、一次求心性神経に到達し、P2Y₂受容体を活性化し得る。それでは、一次求心性神経におけるP2Y₂受容体活性化はどのような生理機能とリンクしているのだろうか？前述したように、一次求心性神経に発現しているP2X₃及びP2X_{2/3}受容体が、痛覚伝達と密接にリンクしていることは良く知られている^{1,11,13,14}。一方、初代培養DRG神経細胞にはP2Y₂受容体も存在していた。つまり、P2Y₂受容体作用薬UTPの刺激により初代培養神経細胞で[Ca²⁺]_i上昇が惹起され、これはP2受容体拮抗薬suramin, phospholipase C (PLC) 阻害薬U73122及び小胞体Ca²⁺ ATPase阻害剤cyclopiasonic acidにより抑制された。興味深いことに、UTPによるCa²⁺応答は、一次感覚神経の中でも小型のカプサイシン感受性神経にほぼ限局していた。これらはUTPが小型のDRG神経細胞で [Ca²⁺]_iを上昇させ¹⁰、cyclic AMP response element binding proteinを活性化する⁶との先行実験データとよく一致している。

次にP2Y₂受容体活性化と痛覚伝達の関連性について検討した。ラットの後肢足底部にUTPを投与すると、濃度依存的にメカニカルアロディニアが観察された（図4）。このUTPによるアロディニアは、P2X_{2/3}受容体を介するアロディニアと同程度に強く、しかもより持続的であった¹⁹。P2受容体拮抗薬PPADSの前処置はこのアロディニアを抑制した（データは示さず）。またカプサイシン感受性神経破壊ラットでは、UTPによるアロディニアが抑制されたことから（データ未掲載）、小型のカプサイシン感受性一次求心性神経（C繊維）がUTPにより興奮し、アロディニアを誘発していると考えられる。責任受容体としては、P2Y₂, P2Y₄及びP2Y₆受容体が考えられるが、P2Y₂アンチセンスオリゴはUTPによるアロディニアをほぼ完全に抑制するが、P2Y₄アンチセンスオリゴは影響しないこと、P2Y₆作用薬UDPはアロディニアを誘発しないこと（データ未掲載）から、P2Y₂受容体がアロディニア形成の責任受容体と考えられる。

P2Y₂活性化が如何にして痛みを伝えるかに関するメカニズムは不明である。最近、P2Y受容体（P2Y₁あるいはP2Y₂）活性化がPKCを介してカプサイシン受容体TRPV1の反応を増強し、熱刺激に対する痛覚過敏を引き起こすことが報告された^{7,12}。しかしUTPによるアロディニアはPKC阻害薬で全く影響されず、またTRPV1拮抗薬による影響を受けない（データ未掲載）。従って、メカニカルアロディニア発現には必ずしもTRPV1の感受性亢進が関与していない可能性が考えられる。また

大型DRG神経細胞にはP2Y₁受容体が発現しており、このP2Y₁受容体が触刺激の応答亢進とリンクしている可能性がアフリカツメガエル卵母細胞や、カエル下肢皮膚-感覚神経系で明らかにされている⁸⁾。従って、同様のメカニズムが小型DRG神経細胞のP2Y₂受容体を介するシグナル経路に存在している可能性も考えられる。

また、実際の報告はないものの、P2Y受容体と痛覚伝達系を考えたときに、アストロサイトが標的となり得る。ATPは脊髄神経細胞の約3分の1で反応性を示すのに対して、脊髄後角アストロサイトでは殆ど全細胞でATPでCa²⁺応答が認められる。アストロサイトでのATP反応には、P2Y₁及びP2Y₂受容体が介在し、G蛋白質/PLC/InsP₃系の活性化が関与している⁵⁾。さらにアストロサイトはATPを放出し、P2Y₁及びP2Y₂受容体を介して隣接するアストロサイト及び神経細胞にCa²⁺waveを伝播させる。アストロサイトは、神経因性疼痛モデルや最近報告された癌性疼痛モデル動物の脊髄内で著明な活性化が認められること、P2Y₁受容体が神経因性疼痛モデルの脊髄後角で発現増加分子の一つとしてcDNAマイクロアレイで検出されたこと等を考慮すると、アストロサイトのATP/P2Y受容体シグナル系も痛覚伝達と強くリンクしている可能性が考えられる。

以上、表皮ケラチノサイトが機械刺激に反応してATPを放出しP2Y₂受容体を刺激することにより細胞間で情報を交換していること、さらにこのシグナルが皮膚に入力する小型一次求心性神経のP2Y₂受容体を活性化し、メカニカルアロディニアを引き起こす可能性を示した。皮膚は、通常の機械刺激だけでなく、傷害、紫外線照射等により、容易にATPを放出する。ATPによるシグナルが、皮膚の機能だけでなく、皮膚-知覚神経細胞連関に強く影響すること、またこれまで痛みとの関連性ではイオンチャンネル型P2X受容体が注目されていたが、P2Y受容体も痛覚伝達と密接にリンクしている可能性が示唆された。

Legends for figures

Figure 1 Pharmacological characterization of increases in $[Ca^{2+}]_i$ in NHEKs.

(A) Changes in $[Ca^{2+}]_i$ in NHEKs were assessed by a conventional fura-2 fluorescence method. The value show ratiometric fura-2 fluorescence ($\Delta F_{340}/F_{360}$) in responses to various ATP analogues. ATP and UTP were almost equipotent to produce $[Ca^{2+}]_i$ in NHEKs. (B) Phase-contrast (left) and pseudo-colored $[Ca^{2+}]_i$ images of a field of cultured NHEKs in the absence (upper panels) and presence (lower panels) of apyrase (80 units/ml). Increase in $[Ca^{2+}]_i$ was estimated by self-ratio of fluo-4 fluorescence ($\Delta F/F_0$), which was obtained by a laser confocal microscopy. A single NHEK was mechanically stimulated. (C) The diameter of the spreading distance of Ca^{2+} wave was calculated in the absence and presence of various chemicals. The average diameter of the Ca^{2+} wave in the control condition was $93.4 \pm 9.7 \mu m$ (n=12). Suramin (300 μM), PPADS (100 μM) and U73122 (5 μM) also abolished the Ca^{2+} wave propagation, but A3P5PS (100 μM), 1-octanol (500 μM) or removal of extracellular Ca^{2+} (0 Ca^{2+}) failed to inhibit the mechanical stimulation-evoked Ca^{2+} wave in NHEKs (n=8-12).

Figure 2 Visualization of release of ATP from NHEKs

The images show photon counts (yellow dots) in a field of NHEKs bathed in luciferin-luciferase reagent before (C) and 30 s after (D) mechanical stimulation. Position of pipette is shown in a phase-contrast image of NHEKs (A). (B) A typical bioluminescence intensity-ATP concentration relationship in this condition. Various concentrations of ATP standard solution were injected in the presence of the luciferin-luciferase reagent, and then photons were accumulated for 30 s.

Figure 3 ATP-mediated communication between DRG neurons and NHEKs

(A) After some Ca^{2+} imaging experiments, cells were fixed and stained with anti-cytokeratin14 (red) and anti-peripherin (green) antibodies for confirming NHEKs and small-sized DRG neurons, respectively. (B) Summary of Ca^{2+} responses obtained from self ratios of fluo-4 fluorescence in anti-peripherin positive DRG neuron (green) and anti-cytokeratin14 positive NHEK (red). Firstly, cells were stimulated with 80 mM KCl for 3 s. Then, they were stimulated with 100 μM ATP and UTP for 10 s separated by 5 min. Finally, UTP (100 μM) was applied to the cells in the presence of 100 μM suramin. Both ATP and UTP produced elevations in $[Ca^{2+}]_i$ in about 71 % of the DRG neurons (37 out of 52 cells tested) and 73 % of the NHEKs (58 out of 79 cells tested) in the co-cultured cells. (C) Schematic images of NHEKs (K1-K3) and DRG neuron (N4) were shown. Black arrow shows the position of the micropipette for stimulation. (D) The graph shows individual traces of self ratios of fluo-4 fluorescence in keratinocytes (K1-K3) and DRG neuron (N4) shown in C. Keratinocyte 1 was mechanically stimulated twice (arrowheads

S1 and S2) separated by 5 min. The first and second mechanical stimulation was performed in the absence and presence of 100 units/ml apyrase (gray horizontal bar).

Figure 4 Mechanical allodynia induced by an intraplantar injection of UTP in rats

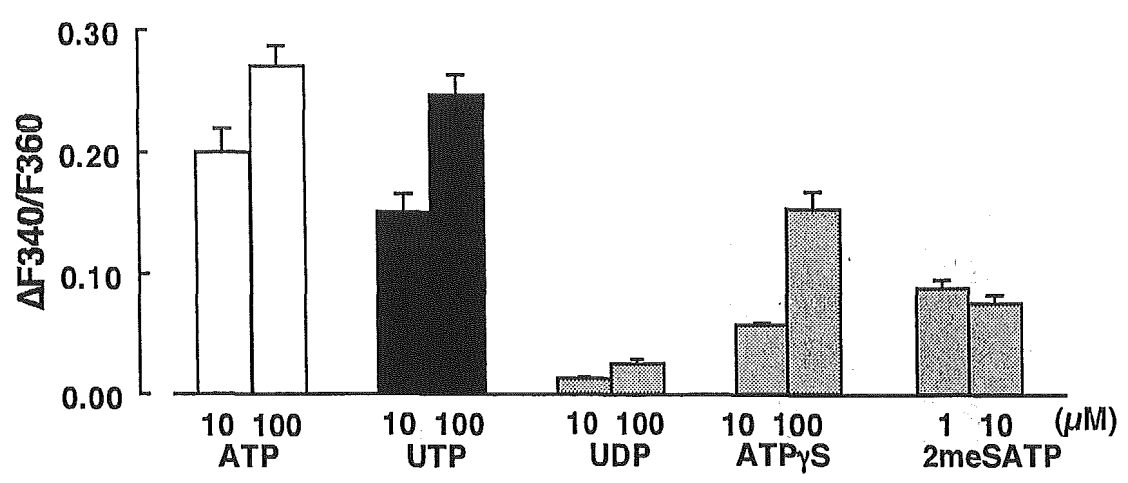
An injection of UTP into the plantar surface of the hindpaw produced mechanical allodynia in a concentration dependent fashion over a concentration range from 0.1 to 100 nmol/paw. Time course of the mean \pm s.e.m. paw withdrawal threshold (in g) for von Frey filaments after the UTP injection is shown.

References

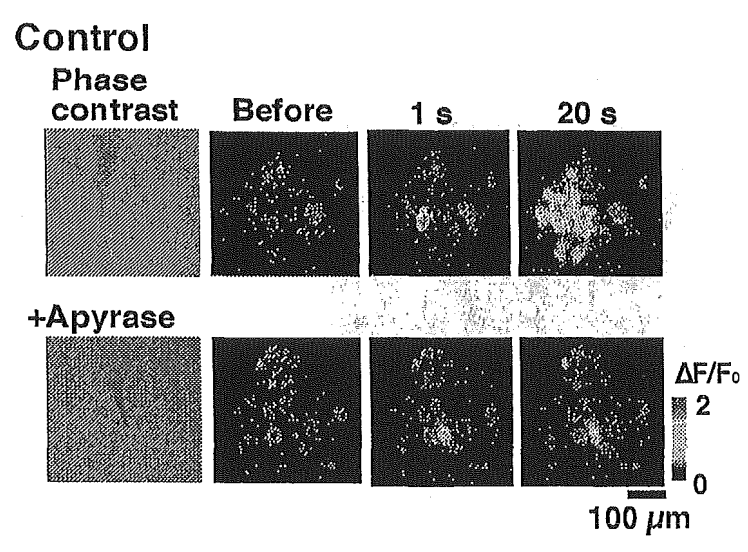
- 1) Cockayne, D.A., Hamilton, S.G., Zhu, Q.M., Dunn, P.M., Zhong, Y., Novakovic, S., Malmberg, A.B., Cain, G., Berson, A., Kassotakis, L., Hedley, L., Lachnit, W.G., Burnstock, G., McMahon, S.B., Ford, A.P., Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice, *Nature*, 407 (2000) 1011-1015.
- 2) Denda, M., Inoue, K., Fuziwara, S., Denda, S., P2X purinergic receptor antagonist accelerates skin barrier repair and prevents epidermal hyperplasia induced by skin barrier disruption, *J Invest Dermatol*, 119 (2002) 1034-1040.
- 3) Dixon, C.J., Bowler, W.B., Littlewood-Evans, A., Dillon, J.P., Bilbe, G., Sharpe, G.R., Gallagher, J.A., Regulation of epidermal homeostasis through P2Y2 receptors, *Br J Pharmacol*, 127 (1999) 1680-1686.
- 4) Greig, A.V., Linge, C., Terenghi, G., McGrouther, D.A., Burnstock, G., Purinergic receptors are part of a functional signaling system for proliferation and differentiation of human epidermal keratinocytes, *J Invest Dermatol*, 120 (2003) 1007-1015.
- 5) Koizumi, S., Fujishita, K., Inoue, K., Shigemoto-Mogami, Y., Tsuda, M., Inoue, K., Ca²⁺ waves in keratinocytes are transmitted to sensory neurons: the involvement of extracellular ATP and P2Y2 receptor activation, *Biochem J*, 380 (2004) 329-338.
- 6) Molliver, D.C., Cook, S.P., Carlsten, J.A., Wright, D.E., McCleskey, E.W., ATP and UTP excite sensory neurons and induce CREB phosphorylation through the metabotropic receptor, P2Y2, *Eur J Neurosci*, 16 (2002) 1850-1860.
- 7) Moriyama, T., Iida, T., Kobayashi, K., Higashi, T., Fukuoka, T., Tsumura, H., Leon, C., Suzuki, N., Inoue, K., Gachet, C., Noguchi, K., Tominaga, M., Possible involvement of P2Y2 metabotropic receptors in ATP-induced transient receptor potential vanilloid receptor 1-mediated thermal hypersensitivity, *J Neurosci*, 23 (2003) 6058-6062.
- 8) Nakamura, F., Strittmatter, S.M., P2Y1 purinergic receptors in sensory neurons: contribution to touch-induced impulse generation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (1996) 10465-10470.
- 9) Peier, A.M., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Moqrich, A., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Story, G.M., Colley, S., Hogenesch, J.B., McIntyre, P., Bevan, S., Patapoutian, A., A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes, *Science*, 296 (2002) 2046-2049.
- 10) Sanada, M., Yasuda, H., Omatsu-Kanbe, M., Sango, K., Isono, T., Matsuura, H., Kikkawa, R., Increase in intracellular Ca²⁺ and calcitonin gene-related peptide release through metabotropic P2Y receptors in rat dorsal root ganglion neurons, *Neuroscience*, 111 (2002)

- 413-422.
- 11) Souslova, V., Cesare, P., Ding, Y., Akopian, A.N., Stanfa, L., Suzuki, R., Carpenter, K., Dickenson, A., Boyce, S., Hill, R., Nebunius-Oosthuizen, D., Smith, A.J., Kidd, E.J., Wood, J.N., Warm-coding deficits and aberrant inflammatory pain in mice lacking P2X3 receptors, *Nature*, 407 (2000) 1015-1017.
 - 12) Tominaga, M., Wada, M., 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 (2001) 6951-6956.
 - 13) Tsuda, M., Koizumi, S., Kita, A., Shigemoto, Y., Ueno, S., Inoue, K., Mechanical allodynia caused by intraplantar injection of P2X receptor agonist in rats: involvement of heteromeric P2X2/3 receptor signaling in capsaicin-insensitive primary afferent neurons, *J Neurosci*, 20 (2000) RC90.
 - 14) Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Salter, M.W., Inoue, K., P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury, *Nature*, 424 (2003) 778-783.

4



3



C

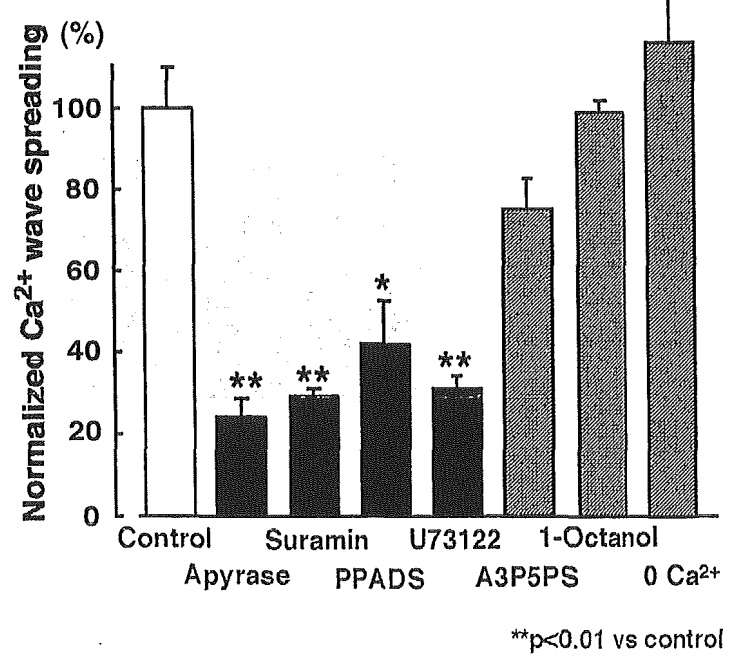


Fig. 1 Koizumi et al.