

平成18年度

政策創薬総合研究  
重点研究報告書（I）

# 目 次

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 …… 16
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 …… 21
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 …… 30
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 …… 40
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 …… 100
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 …… 126
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 …… 144
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 …… 154
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 …… 168
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 …… 181
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 …… 196
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 …… 208
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 …… 221
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 …… 235
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 …… 247
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 …… 262
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 …… 286
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 …… 300
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 …… 310
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 …… 318

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 …… 344
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 …… 358
KH31025	生薬及び漢方処方of科学的品質保証に関する研究	合田幸広 …… 373
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 …… 390
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 …… 402
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 …… 417
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 …… 435
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的手法の開発に関する研究	斎藤嘉朗 …… 449
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 …… 466
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 …… 481
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 …… 494
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 …… 509
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 …… 525
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 …… 537
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 …… 551
KH41038	ボ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 龍兒 …… 566
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 …… 576

## 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  
研究期間 平成 16 年 4 月～平成 19 年 3 月

### 研究要旨

炎症性疼痛では炎症組織での一次求心性神経 (DRG) 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。DRG 神経 C 線維にはイオンチャネル型以外にも代謝型 ATP 受容体が発現し、痛覚伝達に寄与している。DRG—脊髄後角細胞の興奮性シナプス後電流は、ATP によって正負二相性の制御を受ける。上位中枢では扁桃体中心核のプリン受容体が神経因性疼痛成立に關与している。原子間力顕微鏡により、各種受容体構造に関する高解像度解析手法の検討を行った。さらにミクログリアには P2Y6 受容体が発現し貪食作用を活性化させることを世界に先駆けて証明できた (Nature 印刷中)。

### 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) 兵庫医科大学解剖学第二講座 野口 光一
- (4) 佐賀大学医学部生体構造機能学講座 中塚 映政
- (5) 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
- (6) 東京大学大学院医学系研究科・生体医工学 安藤 讓二
- (7) 福島医科大学薬理学教室 松岡 功

### 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、多くの患者が痛みに苦しんでおり、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。

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解明に対して研究を進めた。

### 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 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。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。

**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。

**脊髄前角運動ニューロン標本における電気生理**：実験には Sprague-Dawley 系ラットを用い、ウレタン腹腔内投与 (12~15 g/kg) により深麻酔を施行した後、腰部レベルの椎弓切除を行った。脊髄を摘出した後、直ちに 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> で飽和した冷却した人工脳脊髄液 (2~4°C) を浸したシャーレに移し、実体顕微鏡下に硬膜を除去した後、全ての後根および前根を切除した。くも膜および軟膜を除去した後、浅い溝を形成したブロック状の寒天上に置き固定した。マイクロスライサを用いて厚さ 500 μm の脊髄横断スライスを作製した。切り出したスライスを記録用チャンバ内に移し、95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> で飽和した人工脳脊髄液を 5~10 ml/min の速度で灌流した。人工脳脊髄液の組成は、NaCl 117 mM, KCl 3.6 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, Glucose 11 mM であった。赤外線システムを備えた顕微鏡を用いて、テレビモニタ下に脊髄第 IX 層細胞からパッチクランプ記録を行った。まず低倍率の対物レンズを用いて、テレビモニタ下に脊髄第 IX 層を確認した。その後、高倍率 (40 倍) の水浸対物レンズに切り換え、脊髄第 IX 層細胞を確認し、パッチクランプ法を用いて、単一細胞から電気応答を記録した。記録用電極には、Cs sulfate 135 mM, KCl 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, EGTA 5 mM, HEPES 5 mM, TEA 5 mM, ATP 5 mM を充填した先端電極抵抗 5~8 MΩ のパッチ電極を用いた。得られた記録電流はパッチクランプ増幅器 (Axon 社製、Axopatch 200B) により増幅し、データ記録および解析用ソフト (Axon 社製、pClamp 9) を用いて、記録ならびに解析した。

**扁桃体スライス作成**：Ketamine (100-150 mg/kg ip) もしくは isoflurane (2-5%) 麻酔下に断頭し、全脳を摘出した。扁桃体を含む厚さ 400 μm の冠状断スライスを作成した。

**脚傍核スライス作成**：扁桃体スライスと同様に PB を含む厚さ 400 μm の冠状断スライスを作成した。

**孤束核スライス作成**：孤束核シナプス前 P2X<sub>4</sub> 受容体活性化による直接的グルタミン酸放出に関与するサブタイプを分子レベルで同定するため、P2X<sub>4</sub> 受容体ノックアウトマウス (1 腹すべて-) から、扁桃体スライスと同様に延髄孤束核 NTS を含む厚さ 400 μm の冠状断スライスを作成した。

**脳スライスからの興奮シナプス後電流測定**：記録用チャンバに扁桃体スライスを固定し、人工脳脊髄液によって維持し、パッチクランプ法で細胞膜電流を記録した。CeA ニューロンからの記録においては、CeA 背内側部に同心円双極刺激電極 (極間 100 μm) を設置し、0.1 Hz, 100 μs で定電流刺激した。また、PB ニューロンからの記録においては PB 腹外側部に刺激電極を設置して刺激した。NTS ニューロンからはテトロドトキシン (TTX) 存在下、微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC) を記録した。細胞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保存した。実験終了後、自作のソフトウェアで解析した。

**行動薬理学的手法**：測定対象となる部位 (後肢足底部) へフロンプレ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。

**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**：既報に従って行った。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。

**原子間力顕微鏡 (AFM) による P2X<sub>4</sub> 受容体の構造解析**：Wistar 系ラットを用い、脳組織をホモジナイズし、遠心により、受容体たんぱく質を含む分画を抽出した。その後、界面活性剤を用いて可溶化するとともに抽出対象の受容体たんぱく質に対する抗体を用いた抗体カラムを利用することにより、目的受容体たんぱく質の抽出・精製を行った。計測対象の受容体たんぱく質は、原子レベルで平坦なマイカ上に展開する。生理的環境下 (溶液中) で AFM 探針を走査することにより表面の凹凸を計測し、画像化する。探針とたんぱく質との間に働く弱い原子間力を検出することにより、分子レベルの分解能で構造観察が可能である。探針の走査スピードを変化させ、高速にすることにより、リアルタイムでの構造変化が測定できる。

## C 研究結果

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解明に対して研究を進めた。その結果、下記のように重要な知見が多く得られた。

#### (1)皮膚末梢組織

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 ATP 放出を引き起こし、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ので、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 ATP 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た。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/Ca<sup>2+</sup>以降のシグナルカスケードが、疼痛発生に関係している。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 ATP 分子を想定することが出来た。

#### (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 ATP 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 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。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 ATP 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-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、ATP 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 ATP 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 ATP 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 ATP 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 ATP 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。ATP 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 ATP 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、ATP 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、ATP 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 ATP 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 ATP 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 ATP 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、ATP 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。

#### (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、痛み情報は大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種の求心性入力が発射することが知られている。外側橋傍腕核 (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、脊髄橋外側腕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知見が得られた。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した報告 (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、疼痛以下の触感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。

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。このような強い抑制はオピオイド  $\mu$  受容体活性化によっては生じなかった。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。

さらに次の7項目に注目して研究を進めた。①神経因性疼痛モデル形成後何日後に CeA シナプス伝達増強は生じるか、②その時点で神経因性疼痛の原因を解除したとき扁桃体のシナプス伝達増強も消去されるか、③その初期の時点

におけるシナプス増強に NMDA 受容体機能の亢進が関与しているか、④脊髄後角から投射を受け、CeAに投射する中継核である橋脚核 (PB) から扁桃体の投射経路はどのように扁桃体に入力するか、⑤PB シナプス伝達はプリン受容体の活性化によりどのような影響を受けるか、⑥慢性疼痛依存的なシナプス伝達増強を示す CeAにおいて、グルタミン酸受容体 mRNA の発現に変化はあるか、また、その発現分布に差異はあるか、および、⑦内臓痛情報の受容神経核である延髄孤束核 (NTS) において我々が見出したシナプス前 P2X 受容体チャネル活性化によるグルタミン酸放出促進に中枢神経系で最も豊富に発現している P2X4 受容体は関与しているか。以下、それぞれの項目に応じて結果を述べる。

#### ①神経因性疼痛モデル形成後何日後に CeA シナプス伝達増強は生じるか

急性関節炎モデル動物において関節炎痛成立6時間後に CeA シナプス伝達増強が生じるとする報告がある。脊髄神経結紮による神経因性疼痛の発症経過はこれよりも遅いと考えられるため、CeA シナプス伝達増強がどの時点で成立するか、脊髄神経結紮の1日後、および2日後に脳スライスを作成し左右の CeA における PB-CeA シナプス後電流を記録して比較した。その結果、CeA シナプス伝達増強は、脊髄神経結紮の1日後よりも後に形成され、2日後には確実に生じている事実が確認された。

#### ②神経因性疼痛の原因解除によって扁桃体のシナプス伝達増強は消去されるか

この問題に答えるために、異痛症が成立した脊髄神経結紮1日目の動物において軸索圧迫解除術施行した(治療群と呼ぶ)。これらの群において結紮1週間後、異痛症閾値は非手術群とほぼ同程度まで高値に回復したが、その動物の CeA において、PB-CeA シナプス伝達の効率は、結紮側依存的に亢進したままであった。

#### ③初期のシナプス増強に NMDA 受容体機能の亢進が関与しているか

異痛症が成立した脊髄神経結紮1日目の動物においては CeA シナプス伝達増強がまだ生じておらず、また、2日目の動物においては NMDA 受容体電流の遮断によってシナプス後電流振幅の減少が見られる動物が一部見られた。後述するように、この結果は、神経因性疼痛成立後の数日以内に極めてダイナミックな CeA シナプス伝達効率およびその機構の変化が生じていることを示しており、その変化過程が個体ごとに大きく異なっているために24時間ごとの計測を行う本研究計画では捉えきれなかった可能性がある。

#### ④CeA における PB 由来神経の投射経路の可視化

CeAに投射するPB由来の求心路をDiIを用いて標識した。PB由来の経路はCeAの腹内側からCeAに接近し、CeAに接する近傍でCeA内の外側内包部に向けて分岐した軸索を伸ばす事実が明らかになった。したがって、現在までに得られた求心路電気刺激の所見は確かにこの経路を刺激して得られたものであることが確認された。

#### ⑤PB におけるシナプス伝達に及ぼすプリン受容体作動薬の影響

PBにおけるシナプス伝達に関する知見は現在までにほとんどない。しかし、特に神経因性疼痛を形成した動物のPBにおいて脊髄後角由来PB投射がどのような性質をもち、どのような制御を受けているのかを解明することは、本研究で見られた CeA シナプス伝達増強の生理学的意義を明らかにし、それに及ぼすプリン受容体活性化の影響を検討する上で必須である。PBを含む脳幹スライスを作成し、PB外側部からニューロンを記録し、その近傍を電気刺激したところ、興奮性ならびに抑制シナプス後電流が記録された。このうち興奮性シナプス後電流に及ぼすATP(100 μM)の作用を検討したところ、強い振幅の減弱が生じた(適用前の約40%まで)。この減少はアデノシン A<sub>1</sub> 受容体遮断薬 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX; 1 μM)の存在下にほぼ消失したため、ATPから細胞外変換されたアデノシンが A<sub>1</sub> 受容体を活性化させて生じたものと考えられる。ところがこの時、2回連続刺激(刺激間隔100ms)によって生じる2つのシナプス後電流振幅比(paired pulse ratio, PPR)を計算したところ、PPRはATPによって大きな影響を受けなかった。PBのシナプス伝達制御機構の解明は今後の疼痛研究の重要な課題である。

#### ⑥神経因性疼痛モデル CeA におけるグルタミン酸受容体 mRNA 発現の評価

上述したように、脊髄神経結紮の1日後に圧迫解除した動物において、結紮1週間後においてもPB入力および結紮側依存的にCeAシナプス伝達は亢進していた。そこで、この結紮1週間後においてCeAをバンチアウトし、AMPA型グルタミン酸受容体チャネルの主要サブユニットであるGluR1サブユニットmRNA発現量を定量評価した。GADPHの発現量に対する相対的mRNA発現量には、大きな左右差は認められなかった。神経因性疼痛による影響を受けないと考えられる海馬CA3における発現量を同様に測定し、それに対する比率を求めた。左右CeAにおけるGluR1受容体mRNA発現量には有意の差異は認められなかった。この方法は、CeA全体のmRNAを採取するため、その一部(外側内包部)の、限局されたシナプスにおいての



み観察されるシナプス伝達増強に關与する責任分子の発現量の変化を検出するには適切ではない可能性がある。そこで、神経因性疼痛モデルを作成し、結紮1日後に圧迫解除した動物において結紮1週間後に扁桃体切片を作成し、AMPA型グルタミン酸受容体サブユニットGluR1およびGluR2のmRNA発現をin situ hybridization法で観察した。その結果、GluR1遺伝子の発現が、結紮反対側(本研究においては右側)、すなわち、シナプス伝達増強が生じている側のCeA、特にその中でもPBからの侵害受容性求心入力を多く受けている外側内包部において対側よりも増加している所見が得られた。

#### ⑦NTSシナプス前P2X受容体チャネル活性化によるグルタミン酸放出促進

P2X4受容体サブユニット欠損マウス10匹から作成した脳幹スライスを用いて、小型NTSニューロン24例を記録し、TTX存在下 $\alpha\beta$ -methylene ATP 100 $\mu$ Mを投与した。17ニューロンにおいて顕著なmEPSC頻度の増大が観察されたため、このグルタミン酸放出促進作用はP2X4受容体サブユニットを含まないP2X受容体の活性化によって生じていると結論した。

#### (5) 脊髄前角運動ニューロンにおけるATP受容体の機能

頸髄症・椎間板ヘルニア・変形性脊椎症など日常遭遇する疾患から、後縦靭帯骨化症・脊髄腫瘍など稀な疾患までを含めると広義の脊髄損傷を呈するものは数多い。特に、外傷性脊髄損傷は急激に四肢や体幹の運動・知覚麻痺を呈し、著しくADL(Activity of Daily Life)を低下させる。運動・知覚麻痺の主原因は直接外力による脊髄神経細胞の損傷であるが、遅発性に生じてくる脊髄浮腫を伴う虚血によって麻痺は急激に拡大する。急性期の遅発性脊髄障害への対策は非常に重要であり、長らく副腎皮質ステロイドホルモンの大量療法が施行されてきたが、副作用も多く、新しい作用機序を有する治療薬の登場が待ち望まれている。脳虚血や脳外傷に伴う中枢神経細胞の遅発性神経障害にはグルタミン酸が深く関与していることが知られているが、近年、脊髄損傷の急性期治療薬としてP2X受容体阻害薬が有効であることがNature Medicine誌に報告された(Wang et al, 10: 821-827, 2004)。本論文によると、脊髄損傷に伴って傷害組織から長時間にわたって大量に遊離されるATPによって、脊髄運動ニューロンはプリン受容体を介して脱分極し、最終的にはアポトーシスに至る。しかしながら、脊髄運動ニューロンのシナプス伝達において、どのようにプリン受容体が作用するか全く知られていない。そこで、我々は脊髄スライス標本を作製して脊髄第IX層細胞にホールセル・パッチクランプ法を適用し、脊髄運動ニューロンにおけるプ

リン受容体の機能的役割について検討を行った。

その結果、電位固定法を用いて保持膜電位を-70mVに固定して、代謝安定型のATP受容体広作動域作動薬であるATP $\gamma$ S(100 $\mu$ M)を灌流投与すると、約40%の脊髄第IX層細胞において内向き電流と自発性シナプス後電流の振幅と発生頻度の増強が観察された。このATP $\gamma$ Sの灌流投与によって脊髄第IX層細胞に生じる内向き電流は、ATP $\gamma$ Sの濃度の増加とともに大きくなった。また、ATP $\gamma$ Sの灌流投与によって脊髄第IX層細胞に生じる内向き電流はNa<sup>+</sup>チャネル阻害薬であるtetrodotoxin(0.5 $\mu$ M)により影響を受けなかった。さらに、ATP $\gamma$ Sをグルタミン酸受容体阻害薬であるCNQX(10 $\mu$ M)とAP5(50 $\mu$ M)存在下において灌流投与しても、脊髄第IX層細胞において内向き電流が観察された。ATP $\gamma$ 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プリン受容体が関与しているかを調べるために、薬理的な検討を行った。ATP $\gamma$ Sによって内向き電流が観察される脊髄第IX層細胞にP2X受容体作動薬である $\alpha\beta$ -methylene ATP(100 $\mu$ M)ならびにBzATP(100 $\mu$ 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。同様に、ATP $\gamma$ S(100 $\mu$ M)によって内向き電流が観察される脊髄第IX層細胞にP2Y2、P2Y4受容体作動薬であるUTP(100 $\mu$ M)ならびにP2Y6受容体作動薬であるUDP(100 $\mu$ M)を投与しても内向き電流は観察されなかった。一方、ATP $\gamma$ S(100 $\mu$ M)によって内向き電流が観察される脊髄第IX層細胞にP2Y1、P2Y12、P2Y13受容体作動薬である2-methylthio ADP(100 $\mu$ M)を灌流投与すると同様の内向き電流が観察された。また、ATP $\gamma$ S灌流投与によって生じた内向き電流はP2Y1受容体拮抗薬であるMRS2179(30 $\mu$ M)の存在下において完全に阻害されたが、ATP $\gamma$ S灌流投与による自発性シナプス後電流の振幅と発生頻度の増強作用はMRS2179によって影響しなかった。さらに、ATP $\gamma$ Sの灌流投与によって脊髄第IX層細胞に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 $\beta$ -S(2mM)を加えて実験を行った。記録直後にATP $\gamma$ S(100 $\mu$ M)の灌流投与によって内向き電流を生じた脊髄第IX層細胞に対して、1時間後に再度ATP $\gamma$ S(100 $\mu$ M)を灌流投与したところ、内向き電流の振幅は有意に抑制された。したがって、脊髄後角深層細胞においてATP $\gamma$ Sによって生じた内向き電流は、細胞内G蛋白質を関与していた。

#### (6) ミクログリアでのATP受容体相互作用の研究

神経障害性の神経因性疼痛の発症は脊髄ミクログリアのP2X<sub>4</sub>受容体の発現が亢進することに起因しているが、他のミクログリアP2受容体の疼痛への関与はよくわかっていない。P2Y<sub>6</sub>受容体リガンドであるUDPを髄腔内投与

すると神経因性疼痛が抑制されることが報告されているが (Okada et al., JPET, 303,66-73,2002)、ミクログリアとの関連性は明らかと成っていない。そこで本年度は、ミクログリアの P2Y<sub>6</sub> 受容体の生理・病態生理的役割を明らかとし、痛みとの関連性を明らかとすることを目的とした。RT-PCR により、培養ミクログリア細胞には、以前から報告されていた P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2Y<sub>12</sub> 受容体以外に P2Y<sub>6</sub> 受容体が強く発現していることが明らかとなった。P2Y<sub>6</sub> 受容体は Western blotting 法によって蛋白質レベルでも検出することが出来た。カルシウムイメージング法により、UDP により、濃度依存的なミクログリア [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇が観察され、これは PLC/InsP<sub>3</sub> を介した Ca<sup>2+</sup>遊離に起因していた。P2Y<sub>6</sub> 受容体刺激により、P2X<sub>4</sub> 受容体の活性化が影響されるか否かを明らかにする目的から、ATP-activated current (P2X<sub>4</sub> 受容体) に対する UDP の作用をホールセルパッチクランプ法により検討した。P2X<sub>4</sub> 受容体の活性化は UDP を 3,000 μM という高濃度まで上昇させても影響を受けなかった。そこで、ミクログリアの形態及び機能変化と UDP/P2Y<sub>6</sub> 受容体の検討を行った。ミクログリアは UDP の刺激により、即座にその形態を変化させ、突起を伸ばし、また液胞状の構造を内部に形成した。また、濃度依存的に (3-1,000 μM) 貪食能を亢進させることが明らかとなった。この UDP 誘発貪食能亢進は、P2Y<sub>6</sub> 受容体拮抗薬 MRS2578 及び P2Y<sub>6</sub> 受容体アンチセンスオリゴにより P2Y<sub>6</sub> 受容体をノックダウンすることにより抑制された。さらに、細胞を傷害時には、細胞外に P2Y<sub>6</sub> 受容体リガンドである UDP が放出されることも明らかとなった (Nature 印刷中)。

#### (7) 原子間力顕微鏡 (AFM) による P2X<sub>4</sub> 受容体等の構造解析

ER 膜に存在し、細胞内のカルシウム濃度調整を担う IP<sub>3</sub> 受容体は、カルシウムの有無でその 4 量体構造を劇的に変化させる。我々は、単一受容体レベルでのカルシウム有無による受容体の構造変化について、溶液中での AFM 計測により、単一の受容体での構造変化を計測する技術を確立した。これまで生理的環境下での受容体たんぱく質の構造変化の観測は、たんぱく質の取り扱いの難しさと、その柔らかさにより、極めて困難であった。我々は、計測時の AFM 探針にかかる力を抑え、最適化することにより、計測に成功した。4 量体構造が観測できる。さらに、探針のスキャンを高速化することにより、リアルタイムの構造変化計測に取り組んだ。我々は、この方法を用いて ATP と神経活動に関連した受容体の時間的構造変化の測定に取り組んだ。その結果、受容体のサブユニットレベルで時空間的に変化する様子が明らかとなった。これにより、原子間

力に基づく受容体のリアルタイム高感度トポロジー解析を行うための基礎技術を確立することができた。今後、ATP 受容体についてさらに検討をすすめ、リガンドとの結合様式を含めた分子間相互作用、結合サイト解析を通し、受容体構造と機能との相関性について明らかにして行く予定である。

## D 考察

### (1) 皮膚末梢組織

皮膚では代謝型 P2Y<sub>2</sub> 受容体が非常に高濃度に発現しており、機械刺激により ATP 放出を引き起こし、P2Y<sub>2</sub> 受容体を介して C 線維に伝わるのが明らかとなった。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ので、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 ATP 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 P2Y<sub>2</sub> 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た。P2Y<sub>2</sub> 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、P2Y<sub>2</sub> 受容体とリンクした Gq/11 活性化、PLC/InsP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup>以降のシグナルカスケードが、疼痛発生に関係している。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 ATP 分子を想定することが出来た。

### (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 ATP 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 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。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 ATP 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 P2X<sub>3</sub> 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 P2X<sub>3</sub> 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-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、ATP 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 ATP 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 ATP 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 ATP 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 ATP 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。ATP 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 ATP 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、ATP 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、ATP 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 ATP 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 ATP 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。本結果は生理的状态下で、脊髄後角における ATP 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、生理的状态下では、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、ATP 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。

(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、痛み情報は大腦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種の求心性入力投射することが知られている。外側橋傍腕核 (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、脊髄橋外側腕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知見が得られた。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、疼痛以下の触感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。

神経因性疼痛によって生じる CeA シナプス伝達増強は、モデルの作成後 1~2 日後から成立することも本研究により明らかとなった。これは、既に報告されている関節炎痛および内臓痛モデルにおける 6~8 時間という時間よりも大幅に長い。その原因として、(1) 神経因性疼痛においては脊髄神経結紮後、ミクログリアの凝集、P2X 受容体発現の亢進とその活性化による BDNF 分泌の亢進、そして、GABAA 受容体電流反転電位の脱分極方向へのシフト、

という過程によって異痛症閾値が低下する。これらの過程が起こるために数時間から 1 日の時間が必要である。および、(2) 神経因性疼痛モデルは異痛症をその主徴としており、自発痛は少ないとされている。したがって、脊髄後角侵害受容性ニューロンから PB ニューロンへ、次いで PB ニューロンから CeA ニューロンへの興奮性シナプス伝達は、手術後の歩行や自発的運動に伴って活性化されていくと考えられる。これらの理由によって CeA シナプス伝達の増強に 2 日程度の時間が必要であったと解釈されるが、異痛症閾値はすでに結紮翌日には有意に低下しているので、この CeA シナプス伝達増強に他のモデルよりも長い時間が必要であった事実には上記の (2) の機構が大きく寄与していると考えられる。この解釈は、したがって、CeA シナプス伝達増強の成立には、CeA に投射する侵害受容性入力がある程度の時間以上持続して入力することが必須であることを示唆する。

一方、脊髄神経結紮の 24 時間後に圧迫解除術を施行したところ、約 1 週間後までに異痛症閾値の回復が見出された。これは本研究において用いられた脊髄神経結紮術の際、末梢側を切断しないことによって可能となった実験系である。その一方、その 1 週間後の時点において作製した脳スライスにおいて、CeA シナプス伝達は増強したままであった。さらにこのとき、AMPA 型グルタミン酸受容体 GluR1 サブユニットの mRNA 発現が、PB からの入力を受ける外側内包部特異的に亢進している可能性が見いだされた。これらの結果を総合すると、慢性疼痛における扁桃体シナプス伝達増強の固定化に関し、以下のようなシエーマを描くことができる。

- ① 神経障害
- ② (約 24 時間後) 神経因性疼痛の成立
- ③ (さらに約 24 時間後) CeA シナプス伝達の増強開始とともに増強固定化のスイッチが入る。
- ④ (数日後) CeA シナプス伝達増強の AMPA 受容体の局所的発現亢進を伴う固定化

ここで注目すべきことは、神経障害が生じた後、最初の 1~2 日の間に、その 1 週間後に CeA シナプス伝達の増強が固定されるか否かが決定するという事実である。これは本年度の研究で初めて明らかになった極めて重要な新知見である。この増強固定化のスイッチがいったいどのような分子機構で構成されているのかを明らかにすることは今後の重要な課題である。

#### (5) 脊髄前角運動ニューロンにおける ATP 受容体の機能

現在、日本には脊髄損傷によって寝たきりや車椅子の生活を強いられている患者が 10 万人以上おり、さらに毎年

約5千人があらたに脊髄損傷を負っている。発生原因としては交通事故がほぼ半数であり、続いて転落・転倒、スポーツ外傷などがこれに続く。脊髄損傷に対する有効な治療法はなく、患者は残された機能の維持のためにリハビリテーションを行ない、生活のために電動車椅子などの生活支援を受けている。脊髄損傷では四肢や体幹に麻痺が生じるだけでなく、尿路感染症、褥瘡の予防、関節の拘縮など多くの合併症を併発するので、治療に難渋することが多い。また、脊髄損傷によって重度の麻痺がおきると、患者の殆どが生きていく意欲を一時的に失ってしまうため、家族や医療者による精神的な支えが必要となる。脊髄損傷による麻痺の主な原因は直接外力による脊髄神経細胞の一次損傷であるが、遅発的に生じてくる脊髄浮腫を伴う虚血によって組織損傷は急速に拡大し、麻痺は進行する（二次損傷）。直接外力による不可逆的な脊髄神経細胞損傷は治療困難であるが、急性期における遅発性脊髄障害への対策は非常に重要であり、新規治療法が待ち望まれている。これまでに脊髄損傷の急性期治療薬として、グルタミン酸受容体拮抗薬やカルシウムチャネル拮抗薬などが実験的に有効であることが示されたが、いまだ臨床には応用されていない。2004年、Nature Medicine 誌に脊髄損傷の急性期治療にP2X<sub>4</sub>受容体阻害薬が有効であると報告されて、脊髄損傷におけるプリン受容体の関与がはじめて指摘された。以上の結果より、約半数の脊髄第IX層細胞のシナプス後細胞においてP2Y<sub>1</sub>受容体が発現しており、脊髄損傷によって遊離されるであろう細胞外ATPによって脊髄運動ニューロンはP2Y<sub>1</sub>受容体を介して脱分極することが明らかとなった。したがって、脊髄損傷の急性期における遅発性神経障害にP2Y<sub>1</sub>受容体が深く関与している可能性が示唆された。また、ATP<sub>β</sub>S (100 μM) を灌流投与することによって、脊髄第IX層細胞において内向き電流のみならず自発性シナプス後電流の振幅と発生頻度の増強が観察された。この増強作用はP2Y<sub>1</sub>受容体拮抗薬によって影響を受けなかったため、他のサブタイプのプリン受容体を介していることが推察された。

#### (6) ミクログリアでのATP受容体相互作用

神経因性疼痛の発症は脊髄ミクログリアのP2X<sub>4</sub>受容体の発現が亢進することに起因している。また、P2Y<sub>6</sub>受容体リガンドUDPの髄腔内投与により神経因性疼痛が抑制されることが報告されている(Okada et al., JPET. 303, 66-73, 2002)。P2Y<sub>6</sub>受容体が神経細胞にほとんど発現していないことを考慮すると、UDPはミクログリアに作用して、神経因性疼痛を抑制した可能性が推測される。そこで、P2X<sub>4</sub>受容体の活性化に対するUDP/P2Y<sub>6</sub>受容体の役割を検討したが、UDP

は高濃度(3,000 μM)まで上昇させても、P2X<sub>4</sub>受容体の活性化には影響しなかった。従って、UDPの神経因性疼痛を抑制する作用点は、ミクログリアのP2X<sub>4</sub>受容体とは別の点である可能性が示唆された。

UDPはP2Y<sub>6</sub>活性化を介して、ミクログリアの貪食能亢進を引き起こすことが明らかとなった。傷害された細胞や、壊死細胞片を取り除く作業は、その後の神経新生、細胞増殖等の脳機能の回復、さらに脳の恒常性維持のために非常に重要である。このUDP/P2Y<sub>6</sub>受容体を介した細胞貪食能の亢進と神経因性疼痛抑制との関連性は、今後明らかとする課題として残された。

#### (7) 原子間力顕微鏡(AFM)によるP2X<sub>4</sub>受容体等の構造解析

受容体解析にAFMを用いることにより、単一受容体レベルでの構造解析が可能であるばかりでなく、リアルタイムでの動的構造変化の計測が可能であることを示した。これにより、原子間力に基づくプリン受容体のリアルタイム高感度トポロジー解析を行うための基礎技術を確立することができ、構造と機能の相関性を調べる上での強力なツールを手に入れたことになる。今後、ATPおよびその受容体の分子間相互作用解析をさらに進め、構造と機能の相関性を明らかにするとともに、神経/シナプス活動との関わりを追究し、疼痛制御技術の開発など、新たな臨床面への応用に向けた展開や、創薬開発への発展が期待される。

## E 結論

代謝型ATP受容体であるP2Y<sub>2</sub>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P2X<sub>3</sub>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<sub>3</sub>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、ATP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。神経因性慢性疼痛動物モデルを使用し、慢性化した異痛症によって扁桃体中心核において生じるシナプス伝達増強とその固定化の分子細胞機構の解明を試みた。その結果、神経因性疼痛成立の数日以内に扁桃体シナプス伝達増強の固定化過程が誘発され、それは疼痛応答の治療後においても進行するという新事実を明らかに

した。さらに、その情動性痛み情報の中継核である橋脚傍核における興奮性シナプス伝達をATPが効率的に抑制する事実を見出した。本PBシナプス伝達もしくはPBニューロンは、痛み誘発情動応答の固定を予防するための重要な治療標的になる可能性がある。

脊髄損傷の急性期に、プリン受容体阻害薬によって損傷範囲を限局化できれば、脊髄損傷患者のADLおよびQOLを改善し、さらに、近い将来に応用されると期待されている脊髄再生医療の有効性も高めることができる。

神経因性疼痛発現の鍵分子である脊髄ミクログリアP2X<sub>4</sub>受容体と、神経因性疼痛抑制と関連している脊髄ミクログリアP2Y<sub>6</sub>受容体の相互作用について検討を加えた。UDPの神経因性疼痛抑制作用はP2X<sub>4</sub>受容体の制御とは独立したものと考えられた。UDP/P2Y<sub>6</sub>受容体刺激はミクログリアの貪食能の亢進を引き起こしたが、本機能と神経因性疼痛との関連性は今後明らかとする課題である。

## F 研究発表

(原著論文)

1. M. Kawamura, C. Gachet, K. Inoue, and F. Kato. Direct excitation of inhibitory interneurons by extracellular ATP mediated by P2Y<sub>1</sub> receptors in the hippocampal slice. *J Neurosci*, 24, 10835-10845, 2004
2. T. Nakatsuka, H. Shiokawa, T. Fujita, K. Inoue, M. Yoshimura and E. Kumamoto. The interaction of ATP and adenosine in spinal nociceptive transmission. *Pain Res* 19, 133-139, 2004
3. Y. Shinozaki, S. Koizumi, S. Ishida, J. Sawada, Y. Ohno and K. Inoue. Cytoprotection against oxidative-stress-induced damage of astrocytes by extracellular ATP via P2Y<sub>1</sub> receptors. *Glia* 49, 288-300, 2004
4. S. Ishida, Y. Shigemoto-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. *Biochem. Pharmacol.* 68, 2177-2186, 2004
5. T. Nishimaki-Mogami, M. Ueno, T. Fujino, Y. Sato, N. Tamehiro, Y. Kawahara, K. Shudo 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. S. Koizumi, K. Fujishita, K. Inoue, Y. Shigemoto-Mogami, M. Tsuda and K. Inoue. Ca<sup>2+</sup> waves in keratinocytes are transmitted to sensory neurons: the involvement of extracellular ATP and P2Y<sub>2</sub> receptor activation. *Biochem. J* 380, 329-338, 2004
7. T. Suzuki, I. Hide, K. Ido, A. Inoue, S. Kohsaka, K. Inoue and Y. Nakata. Production and release of neuroprotective TNF by P2X<sub>7</sub> receptor-activated microglia. *J Neurosci*, 24, 1-7, 2004
8. 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* 45, 89-95, 2004
9. Hiroki Yamanaka, Koichi Obata, Tetsuo Fukuoka, Yi Dai, Kimiko Kobayashi, Atsushi Tokunaga and Koichi Noguchi. Tissue plasminogen activator in primary afferents induces dorsal horn excitability and pain response after peripheral nerve injury. *Eur. J. Neurosci*, 19, 93-102, 2004.
10. Hu Wang, Yi Dai, Tetsuo Fukuoka, Hiroki Yamanaka, Koichi Obata, Atsushi Tokunaga, Koichi Noguchi. Enhancement of stimulation-induced ERK activation in the spinal dorsal horn and gracile nucleus neurons in rats with peripheral nerve injury. *Eur. J. Neurosci*, 19, 884-890, 2004.
11. Yi Dai, Tetsuo Fukuoka, Hu Wang, Hiroki Yamanaka, Koichi Obata, Atsushi Tokunaga 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
12. K. Obata and K. Noguchi. MAPK activation in nociceptive neurons and pain hypersensitivity. *Life Sci*, 74, 2643-2653, 2004.
13. Yi Liu, Koichi Obata, Hiroki Yamanaka, Yi Dai, Tetsuo Fukuoka, Atsushi Tokunaga, Koichi Noguchi. Activation of extracellular signal-regulated protein kinase in dorsal horn neurons in the rat neuropathic intermittent claudication model. *Pain*, 109, 64-72, 2004
14. Koichi Obata, Hiroki Yamanaka, Yi Dai, Toshiyuki Mizushima, Tetsuo Fukuoka, Atsushi Tokunaga, Hideki Yoshikawa, Koichi Noguchi. Contribution of degeneration of motor and sensory fibers to pain behavior and the changes in neurotrophic factors in rat dorsal root ganglion. *Exp. Neurol*, 188, 149-160, 2004
15. Yi Dai, Tomoko Moriyama, Tomohiro Higashi, Kazuya Togashi, Kimiko Kobayashi, Hiroki Yamanaka, Makoto Tominaga, Koichi Noguchi. PAR2-mediated potentiation of TRPV1 activity reveals a mechanism for proteinase-induced inflammatory pain. *J. Neurosci*, 24, 4293-4299, 2004
16. Koichi Obata, Hiroki Yamanaka, Yi Dai, Toshiyuki Mizushima, Tetsuo Fukuoka, Atsushi Tokunaga, Koichi

- Noguchi, Activation of extracellular signal-regulated protein kinase in the dorsal root ganglion following Inflammation near the nerve cell body, *Neuroscience*, 126, 1011-1021, 2004
17. Toshiya Tachibana, Hiroyuki Ogura, Atsushi Tokunaga, Yi Dai, Hiroki Yamanaka, Daisuke Seino and Koichi Noguchi, Plasma Membrane Calcium ATPase Expression in the Rat Spinal Cord, *Mol. Brain Res*, 131, 26-32, 2004
18. Koichi Obata, Hiroki Yamanaka, Yi Dai, Toshiyuki Mizushima, Tetsuo Fukuoka, Atsushi Tokunaga, Koichi Noguchi, Differential activation of MAPK in injured and uninjured DRG neurons following chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats, *Eur. J. Neurosci*, 20, 2881-2895, 2004
19. Koichi Obata, Hiroki Yamanaka, Kimiko Kobayashi, Yi Dai, Toshiyuki Mizushima, Hirokazu Katsura, Tetsuo Fukuoka, Atsushi Tokunaga, Koichi Noguchi, Role of the MAPK activation in injured and intact primary afferent neurons for mechanical and heat hypersensitivity after spinal nerve ligation, *J. Neurosci*, 24, 10211-22, 2004
20. Kawamura M, Gachet C, Inoue K, Kato F, Direct excitation of inhibitory interneurons by extracellular ATP mediated by P2Y1 receptors in the hippocampal slice, *J Neurosci* 24: 10835-10845, 2004
21. Shigetomi E, Kato F, Action potential-independent release of glutamate by Ca<sup>2+</sup> entry through presynaptic P2X receptors elicits postsynaptic firing in the brainstem autonomic network. *J Neurosci* 24:3125-3135, 2004
22. Kato F, Kawamura M, Shigetomi E, Tanaka J, Inoue K, ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: synaptic purinoceptors: the stage for ATP to play its "dual role", *J Pharmacol Sci* 94, 107 – 111, 2004
23. Kato F, Shigetomi E, Yamazaki K, Tsuji N, Takano K, A dual-role played by extracellular ATP in frequency-filtering of the nucleus tractus solitarii network, *Adv Exp Med Biol* 551: 151-156, 2004
24. T. Sokabe, K. Yamamoto, N. Ohura, H. Nakatsuka, K. Qin, S. Obi, A. Kamiya, and J. Ando: Differential regulation of urokinase-type plasminogen activator expression by fluid shear stress in human coronary artery endothelial cells. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 287:H2027-H2034, 2004
25. Y. Asano, S. Ichioka, M. Shibata, J. Ando, T. Nakatsuka: Sprouting from arteriovenous shunt vessels with increased flow. *Med. Biol. Eng. Comput.* 42:1-5, 2004
26. E. Warabi, Y. Wada, H. Kajiwara, M. Kobayashi, N. Koshiba, T. Hisada, M. Shibata, J. Ando, M. Tsuchiya, T. Kodama, and N. Noguchi: Effect on endothelial cell gene expression of shear stress, oxygen concentration, and low-density lipoprotein as studied by a novel flow cell culture system. *Free Radic. Biol. Med.* 37:682-694, 2004
27. Matsuoka I and Ohkubo S (2004) 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.
28. Nakanishi H, Ohkubo S, Ono T, Matsuoka I and Nakahata N (2004) A comparative study on contractile responses of rabbit and guinea pig vasa deferentia to electrical field stimulation. *Fukushima J Med Sci* 50:55-64.
29. Takano S, Hoshino Y, Li L, Matsuoka I, Ono T and Kimura J (2004) Dual roles of 5-hydroxytryptamine in ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 9:43-50.
30. Watanabe Y, Iwamoto T, Matsuoka I, Ono T, Shigekawa M and Kimura J (2004) Effects of amiodarone on mutant Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchangers expressed in CCL 39 cells. *Eur J Pharmacol* 496:49-54.
31. Yoshimura M, Furue H, Nakatsuka T, Matayoshi T, Katafuchi T. Functional reorganization of the spinal pain pathways in developmental and pathological conditions. *Novartis Found Symposium* 261, 116-131, 149-54 (2004)
32. Nakatsuka T, Shiokawa H, Fujita A, Inoue K, Yoshimura M, Kumamoto E, The interaction of ATP and adenosine in spinal nociceptive transmission. *Pain Research* 19, 133-139 (2004)
33. 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)
34. 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)
35. K.Torimitsu, N.Kasai, Y.Furukawa, Magnesium effect on neural activities in vitro. *Clinical Calcium*, 14(8), 26(1204)-33(1211), 2004
36. 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
37. 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
- 38 T.Kanayasu-Toyoda, T. Fujino, T. Oshizawa, T. Suzuki, T. Nishimaki-Mogami, Y. Sato, J. Sawada, K. Inoue, K.Shudo and T. Yamaguchi. HX531, a retinoid X receptor antagonist, inhibited the 9 $\alpha$ is retinoic acid-induced binding with steroid receptor coactivator-1 using surface plasmon resonance. *J Steroid Biochem. Mol. Biol.* 94:303-309, 2005
39. 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. *Glia*, 52, 98-107, 2005.
40. 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
41. 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
42. 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.
43. N.Tamehiro, Y.Sato, T.Suzuki, T.Hashimoto, Y.Asakawa, S.Yokoyama, T.Kawanishi, Y.Ohno, K.Inoue, T.Nagao, T. 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
44. Coull JAM, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y. BDNF from microglia mediates the shift in neuronal anion gradient that underlies neuropathic pain. *Nature* 438, 1017-1021, 2005
45. 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
46. 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, 2005
47. Akiko Ogawa, Yi Dai, Hiroki Yamanaka, Koichi Iwata, Hitoshi Niwa, Koichi Noguchi, Ca<sup>2+</sup>/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
48. 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
49. 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, 2005.
50. Yi Dai, Hu Wang, Akiko Ogawa, Hiroki Yamanaka, Koichi Obata, Atsushi Tokunaga and Koichi Noguchi, Ca<sup>2+</sup>/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, 2005.
- 51 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.
52. 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).
53. K. Yamamoto, T. Sokabe, T. Watabe, K. Miyazono, J. Yamashita, S. Obi, N. Ohura, A. Matsushita, A. Kamiya, and J. Ando: Fluid shear stress induces differentiation of Flk-1 positive embryonic stem cells into vascular endothelial cells in vitro. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 288:H1915-H1924, 2005
54. H. Huang, Y. Nakayama, K. Qin, K. Yamamoto, J. Ando, J. Yamashita, H. Itoh, K. Kanda, H. Yaku, Y. Okamoto, Y. Nemoto: Differentiation from embryonic stem cells to vascular wall cells under in vitro pulsatile flow loading. *J. Artif. Organs* 8:110-118, 2005
55. Y.M. Chen, N. Shiraishi, H. Satokawa, A. Kakugo, T. Narita, J.P. Gong, Y. Osada, K. Yamamoto, and J. Ando: Cultivation of



- endothelial cells on adhesive protein-free synthetic polymer gels. *Biomaterials* 26:4588-4596, 2005
47. Maeda S, Matsuoka I, Iwamoto T, Kurose H and Kimura J. Down-regulation of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger by fluvastatin in rat cardiomyoblast H9c2 cells: involvement of RhoB in Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger mRNA stability. *Mol Pharmacol* 68:414-420, 2005
49. Asano K, Okawa T, Matsuoka I, Suzuki Y and Sato. A Effects of sex steroids on expression of adenylyl cyclase messenger RNA in rat uterus. *J Endocrinol Invest* 28:357-362, 2005
50. Ohkawara H, Ishibashi T, Sakamoto T, Sugimoto K, Nagata K, Yokoyama K, Sakamoto N, Kamioka M, Matsuoka I, Fukuhara S, Sugimoto N, Takawa Y and Maruyama Y. Thrombin-induced rapid geranylgeranylation of RhoA as an essential process for RhoA activation in endothelial cells. *J Biol Chem* 280:10182-10188, 2005
51. Shikama Y, Shichishima T, Matsuoka I, Jubinsky PT, Sieff CA and Maruyama Y. Accumulation of an intron-retained mRNA for granulocyte macrophage-colony stimulating factor receptor common beta chain in neutrophils of myelodysplastic syndromes. *J Leukoc Biol* 77:811-819, 2005.
56. Nakatsuka T, Chen M, Takeda D, King C, Ling J, Xing H, Ataka T, Vierck C, Yeziarski R, Gu JG. Substance P-driven feed-forward inhibitory activity in the mammalian spinal cord. *Molecular Pain* 1: 20, 1-9 (2005)
57. 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 Research* 20, 105-110 (2005)
58. Tamae A\*, Nakatsuka T\*, 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. *Journal of Physiology* 568, 243-253 (2005)
59. Fujita T, Kawasaki Y, Koga A, Nakatsuka T, Kumamoto E. Modulation of endomorphins of nociceptive transmission in rat spinal dorsal horn neurons. *Peptide Science* 2004, 223-226 (2005)
60. Yue H-Y, Fujita T, Koga A, Kawasaki Y, Matsumoto N, Nakatsuka T, Kumamoto E. Bee venom peptide Melittin enhances spontaneous glutamatergic excitatory transmission in the rat spinal dorsal horn. *Peptide Science* 2004, 227-230 (2005)
61. Nakatsuka T, Sonobe H, Takeda D, Koga A, Fujita T, Kumamoto E. Substance P actions on synaptic transmission in the rat spinal dorsal horn. *Peptide Science* 2004, 231-234 (2005)
56. 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 Research* 20, 1-7 (2005)
57. 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
58. 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
59. 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
60. 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
61. Nishimaki-Mogami T, Kawahara Y, Tamehiro N, Yoshida T, Inoue K, Ohno Y, Nagao T, Une M. Alpha-bile alcohols function as farnesoid X receptor antagonists. *Biochem Biophys Res Commun.* 339:386-91, 2006
62. Nasur-Tada K, Koizumi S, Tsuda M, Kumifusa E., Inoue K. Possible involvement of increase in spinal fibronectin following peripheral nerve injury in upregulation of microglial P2X4, a key molecule for mechanical allodynia. *Glia* 53, 769-775, 2006
63. 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. *J Physiology* 573:753-763, 2006
64. Tozaki-Saitoh H, Koizumi S, Sato Y, Tsuda M, Nagao T, Inoue K. Retinoic acids increase P2X2 receptor expression through the 5'-flanking region of P2rx2 gene in rat pheochromocytoma PC-12 cells. *Mol Pharmacol.* 70:319-28, 2006
65. Y. Shinozaki, S. Koizumi, Y. Ohno, T. Nagao and K. Inoue. Extracellular ATP counteracts the ERK1/2-mediated death-promoting signaling cascades in astrocytes. *Glia*, 54: 606-618, 2006
66. Suzuki T, Hide I, Matsubara A, Hama C, Harada K, Miyano K, Andra M, Matsubayashi H, Sakai N, Kohsaka S, Inoue K, Nakata Y. Microglial  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors drive a phospholipase CIP3 pathway and modulate

- the cell activation toward a neuroprotective role. *J Neurosci Res* 83: 1461-1470, 2006
67. Suzuki T, Nishimaki-Mogami T, Kawai H, Kobayashi T, Shinozaki Y, Sato Y, Hashimoto T, Asakawa Y, Inoue K, Ohno Y, Hayakawa T, Kawanishi T. Screening of novel nuclear receptor agonists by a convenient reporter gene assay system using green fluorescent protein derivatives. *Phytomedicine* 13:401-11, 2006
68. 小泉修一 (2006) グリア細胞によるシナプス伝達制御に関する研究. *ブレインサイエンス・レビュー2006* (伊藤正男、川合述史 編)、105-120.
69. 小泉修一、藤下加代子、津田誠、井上和秀 (2006) G蛋白質共役型 ATP 受容体と痛み. *ペインクリニック*、27、560-568.
70. 小泉修一、藤下加代子、津田誠、井上和秀 (2006) ATP を介した皮膚ケラチノサイト間情報連絡と痛み. *Pain Research*、21、133-139.
71. Katsuki R, Fujita T, Koga A, Liu T, Nakatsuka T, Nakashima M, Kumamoto E. Tramadol, but not its major metabolite (mono-O-demethyl tramadol) depresses compound action potentials in frog sciatic nerves. *British Journal of Pharmacology* 149, 319-327 (2006).
72. Nakatsuka T\*, Shiokawa H\*, Furue H, Tsuda M, Katafuchi T, Inoue K, Yoshimura M (\*: equal contribution). Direct excitation of deep dorsal horn neurones in the rat spinal cord by the activation of postsynaptic P2X receptors. *Journal of Physiology* 573, 753-763 (2006).
73. Nakatsuka T, Gu JG. P2X purinoceptors and sensory transmission. *Pflügers Archiv; European Journal of Physiology* 452, 598-607 (2006).
74. Nakatsuka T, Koga S, Fujita T, Inoue K, Kumamoto E. Role of P2X receptors in regulating pain transmission in the spinal cord. *Pain Research* 21, 103-110 (2006).
75. Fujita T, Nakatsuka T, Koga A, Liu T, Kumamoto E. Role of proteinase-activated receptor agonist peptides in regulating nociceptive transmission to substantia gelatinosa neurons in the adult rat spinal cord. *Peptide Science* 2005, 299-302 (2006).
76. Liu T, Fujita T, Koga A, Nakatsuka T, Kumamoto E. Enhancement by bee venom peptide melittin of spontaneous GABAergic and glycinergic inhibitory transmission in substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal cord. *Peptide Science* 2005, 295-298 (2006).
77. Yamazaki K, Shigetomi E, Ikeda R, Nishida M, Kiyonaka S, Mori Y, Kato F. Blocker-resistant presynaptic voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels underlying glutamate release in mice nucleus tractus solitarius. *Brain Res*, 2006; 1104: 103-13.
78. K. Torimitsu, Neurology Overview, *Proceeding of IMG2006, New Perspectives in Magnesium Research*, 333-337, 2006
79. K. Torimitsu, Nano-bio interface -neural and molecular functions-, *Advances in Science and Technology*; 53, 91-96, 2006
80. K. Sumitomo, H. Nakashima, M. Kobayashi, K. Torimitsu, C. S. Ramanujan, J. F. Ryan, First steps towards the development of a new biooptoelectronic device with a functioning protein on a silicon substrate, *NTT Technical Review*; 4(9), 40-47, 2006
81. N. Kasai, A. Shimada, T. Nyberg, K. Torimitsu, Fabrication of an electrochemical sensor array for 2D H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> imaging, *Electrochemistry* 74, 628-631, 2006
82. Nakatsuka H, Sokabe T, Yamamoto K, Sato Y, Hatakeyama K, Kamiya A, and Ando J. American Shear stress induces hepatocyte PAI-1 gene expression through cooperative Sp1/Ets-1 activation of transcription. *Journal of Physiology; Gastrointest. Liver Physiol.* 291:G26-G34, 2006
83. Mackley JR, Ando J, Herzyk P, and Winder SJ. Phenotypic responses to mechanical stress in fibroblasts from tendon, cornea and skin. *Biochemical Journal*, 396:307-316, 2006
84. Nakamura M, Mie M, Funabashi H, Yamamoto K, Ando J, and Kobatake E. Cell-surface-localized ATP detection with immobilized firefly luciferase. *Analytical Biochemistry*, 352:61-67, 2006
85. Koichi Obata, Hirokazu Katsura, Jun Sakurai, Kimiko Kobayashi, Hiroki Yamanaka, Yi Dai, Tetsuo Fukuoka, Koichi Noguchi. Suppression of the p75 neurotrophin receptor in uninjured sensory neurons reduces neuropathic pain after nerve injury. *J. Neurosci*, 26, 11974-11986, 2006
86. Hirokazu Katsura, Koichi Obata, Toshiyuki Mizushima, Jun Sakurai, Kimiko Kobayashi, Hiroki Yamanaka, Yi Dai, Tetsuo Fukuoka, Masafumi Sakagami, Koichi Noguchi. Activation of Src-family kinases in spinal microglia contributes to mechanical hypersensitivity after nerve injury. *J. Neurosci*, 26, 8680-8690, 2006
87. Ayako Takahashi, Atsushi Tokunaga, Hiroki Yamanaka, Takashi Mashimo, Koichi Noguchi, Ichiro Uchida. Two types of GABAergic miniature inhibitory postsynaptic currents in mouse substantia gelatinosa neurons. *Eur. J. Pharmacol.*, 553, 120-128, 2006
88. Wan-Jun Zhu, Yi Dai, Tetsuo Fukuoka, Hiroki Yamanaka, Kimiko Kobayashi, Koichi Obata, Shenglang Wang and Koichi

- Noguchi. Agonist of PAR2 increases painful behavior produced by  $\alpha\beta$ -methyleneATP. *Neuroreport* 17, 1257-61, 2006
89. Kimiko Kobayashi, Tetsuo Fukuoka, Hiroki Yamanaka, Yi Dai, Koichi Obata, Atsushi Tokunaga, and Koichi Noguchi. Neurons and glial cells differentially express P2Y receptor mRNAs in the rat dorsal root ganglion and spinal cord. *J. Comp. Neurol.*, 498, 443-454, 2006
90. Daisuke Seino, Atsushi Tokunaga, Toshiya Tachibana, Shinichi Yoshiya, Yi Dai, Koichi Obata, Hiroki Yamanaka, Kimiko Kobayashi and Koichi Noguchi. The role of ERK signaling and the P2X receptor on mechanical pain evoked by movement of inflamed knee joint. *Pain*, 123, 193-203, 2006
91. Hiroki Yamanaka, Koichi Obata, Kimiko Kobayashi, Yi Dai, Tetsuo Fukuoka, and Koichi Noguchi. Alternation of the cell adhesion molecule L1 expression in a specific subset of primary afferent neurons contributes to neuropathic pain. *Eur. J. Neurosci*, 25, 1097-1111, 2007
92. Hiroyuki Ogura, Toshiya Tachibana, Hiroki Yamanaka, Kimiko Kobayashi, Koichi Obata, Yi Dai, Shinichi Yoshiya and Koichi Noguchi. Axotomy increases plasma membrane  $Ca^{2+}$  pump isoform4 in primary afferent neurons. *Neuroreport*, 18, 17-22, 2007
93. T. Nyberg, A. Shimada, K. Torimitsu, Ion conducting polymer microelectrodes for interfacing with neural networks, *J. Neurosci. Methods*, 160 16-25, 2007
94. M. Kobayashi, K. Sumitomo, K. Torimitsu, Real-time imaging of DNA-streptavidin complex formation in solution using a high-speed atomic force microscope, *Ultramicroscopy*, 107, 184-190, 2007
95. C. S. Ramanujan, K. Sumitomo, M. R. R. de Planque, H. Hibino, K. Torimitsu, J. F. Ryan, Self-assembly of vesicle nanoarrays on Si: a potential new route to high-density functional protein arrays, *Appl. Phys. Lett.*, 90, 033901, 2007
96. Ikeda R, Takahashi Y, Inoue K, Kato F. NMDA receptor-independent synaptic plasticity in the central amygdala in the rat model of neuropathic pain. *Pain* 127:161-172, 2007
97. Ohsawa K, Irino Y, Nakamura Y, Akazawa C, Inoue K, Kohsaka S. Involvement of P2X(4) and P2Y(12) receptors in ATP-induced microglial chemotaxis. *Glia*. 55:604-616, 2007
98. Ikeda R, Takahashi, Y, Inoue K, Kato F, NMDA receptor-independent synaptic plasticity in the central amygdala in the rat model of neuropathic pain, *Pain*, 127: 161-72, 2007
99. Kono Y, Shigetomi E, Inoue K, Kato F, Facilitation of spontaneous glycine release by anoxia potentiates NMDA receptor current in the hypoglossal motor neurons of the rat. *Eur J Neurosci*, 2007; in press.
100. 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. *Journal of Physiology* in press
101. Koizumi, S., Shigemoto-Mogami, Y., Nasu-Tada, K., Shinozaki, Y., Ohsawa, K., Tsuda, M., Joshi, B.V., Jacobson, K.A., Kohsaka, S. and Inoue, K. (2007) UDP acting at P2Y<sub>6</sub> receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature*, in press.
102. Kosugi M, Nakatsuka T, Fujita T, Kuroda Y, Kumamoto E. Activation of TRPA1 channel facilitates excitatory synaptic transmission in substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal cord. *Journal of Neuroscience* (in press).
103. Liu T, Fujita T, Nakatsuka T, Kumamoto E. Phospholipase A<sub>2</sub> activation enhances inhibitory synaptic transmission in the rat substantia gelatinosa. *Pain Research* (in press).
104. Nohda K, Nakatsuka T, Takeda D, Miyazaki N, Nishi H, Sonobe H, Yoshida M. Selective vulnerability to ischemia in the rat spinal cord - A comparison between ventral and dorsal horn neurons. *Spine* (in press).
105. Nakatsuka T, Fujita T, Kumamoto E. P2X receptors and pain sensations. Cellular and molecular mechanisms for the modulation of nociceptive transmission in the peripheral and central nervous systems. *Research Signpost* (in press).
- 106 Toshiyuki Mizushima, Koichi Obata, Hirokazu Katsura, Jun Sakurai, Kimiko Kobayashi, Hiroki Yamanaka, Yi Dai, Tetsuo Fukuoka, Takashi Mashimo, Koichi Noguchi. Intensity-dependent activation of extracellular signal-regulated protein kinases (ERK) 5 in sensory neurons contributes to pain hypersensitivity. *J Pharmacol Exp Ther*, In Press

## 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

---

平成18年度  
政策創薬総合研究  
重点研究報告書(Ⅰ)

平成19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