

**Fig. 2** Visualization of release of ATP from NHEKs.

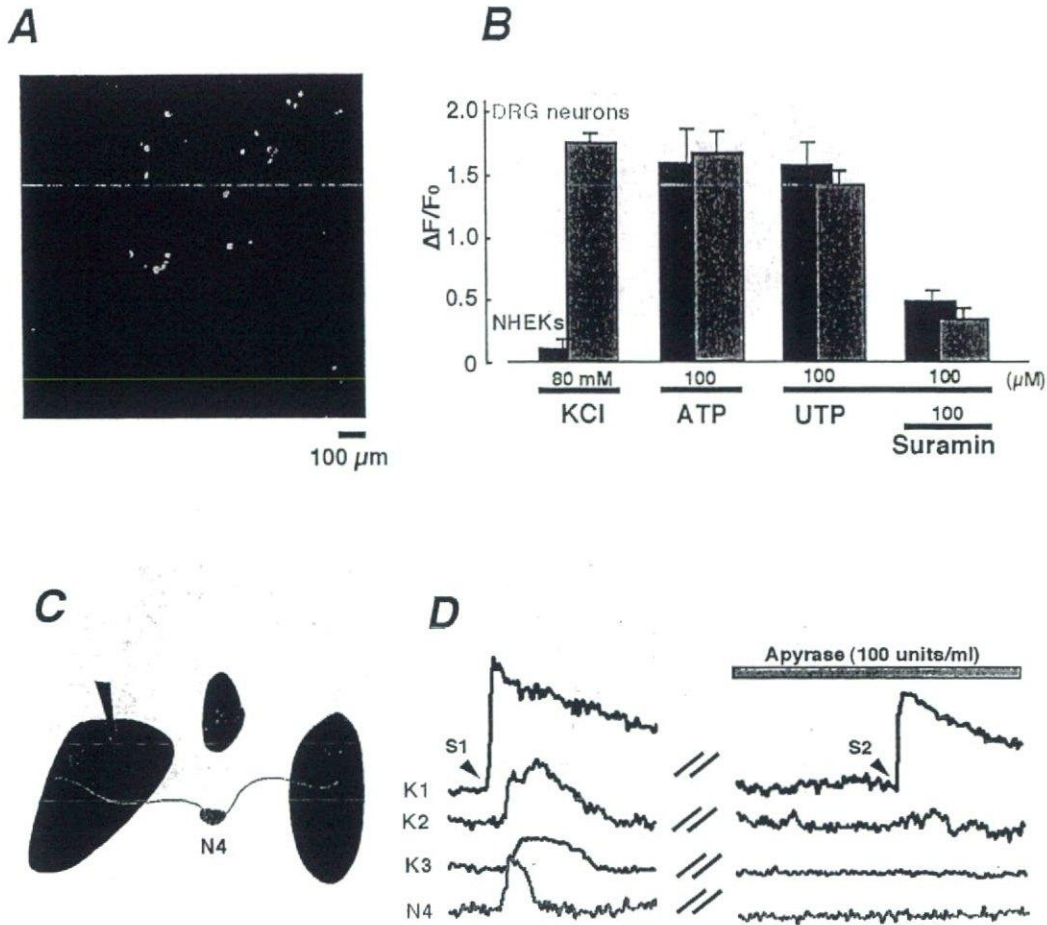
The images show photon counts (white dots) in a field of NHEKs bathed in luciferin-luciferase reagent before (C) and 30 s after (D) mechanical stimulation. Position of pipette is shown in a phase-contrast image of NHEKs (A). (B) A typical bioluminescence intensity-ATP concentration relationship in this 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.

(Fig. 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 ニューロンと NHEKs の共培養系を構築し、NHEKs と DRG ニューロンのコミュニケーションの有無を検討した。Anti-peripherin および anti-cytokeratin14 抗体を用いた二重染色法により、小型の C 線維および 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 (Fig. 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 ニューロンで  $[Ca^{2+}]_i$  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 (Fig. 3B)。P2Y<sub>2</sub> 作用薬 UTP で刺激を加えると、DRG ニューロンでも、NHEKs でも  $[Ca^{2+}]_i$  上昇が観察され、これは P2Y 受容体の拮抗薬 suramin で抑制された。

つまり小型 DRG ニューロンおよび NHEKs 両者共に機能的 P2Y<sub>2</sub> 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  $Ca^{2+}$  wave を伝播させる。したがって、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 ニューロン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  $Ca^{2+}$  イメージング法により、単一 NHEK の機械刺激により (Fig. 3C および Fig. 3D の K1),  $Ca^{2+}$  wave の伝播が近傍の NHEKs (Fig. 3D の K2 および K3) および DRG ニューロン (Fig. 3D の N4) に伝播すること、これが apyrase (Fig. 3D の右) および suramin ( $7.4 \pm 1.1\%$  of control,  $n=7$ ,  $p<0.01$ ) により抑制されたことから、NHEKs と DRG ニューロン間のコミュニケーションが ATP/P2Y<sub>2</sub> 受容体依存的に起きていることが明らかとなった (Fig. 3)。



**Fig. 3** ATP-mediated communication between DRG neurons and NHEKs.

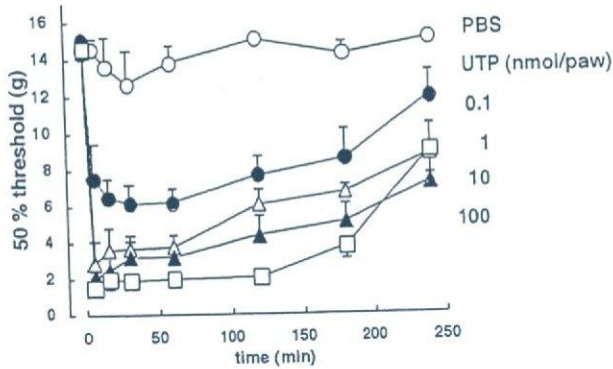
(A) After some Ca<sup>2+</sup> imaging experiments, cells were fixed and stained with anti-cytokeratin14 (red) and anti-peripherin (green) antibodies for confirming NHEKs and small-sized DRG neurons, respectively. (B) Summary of Ca<sup>2+</sup> responses obtained from self ratios of fluo-4 fluorescence 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<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 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).

## 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、P2Y<sub>2</sub> 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 P2Y<sub>2</sub> 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 P2X<sub>3</sub> および P2X<sub>2/3</sub> 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<sup>1,11,13,14</sup>。一方、初代培養 DRG ニューロンには P2Y<sub>2</sub> 受容体も存在していた。つまり、P2Y<sub>2</sub> 受容体作用薬 UTP の刺激

により初代培養神経細胞で [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇が惹起され、これは P2 受容体拮抗薬 suramin および PPADS で抑制された。興味深いことに、UTP による Ca<sup>2+</sup> 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 ニューロンで [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> を上昇させ<sup>10</sup>、cyclic AMP response element binding protein を活性化する<sup>6</sup> との先行実験データとよく一致している。

次に P2Y<sub>2</sub> 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



**Fig. 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 (g) for von Frey filaments after the UTP injection is shown.

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 (Fig. 4). この UTP によるアロディニアは、P2X<sub>2/3</sub> 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<sup>13)</sup>. UTP 投与直後から 240 分後までのアロディニアの総和を定量化して (AUC<sub>0-240</sub>: 0 ~ 240 分までのアロディニア値を AUC で示した), P2 受容体拮抗薬 PPADS の効果を検討したところ, PPADS の前処置は, このアロディニアを約 8 割抑制していた (AUC<sub>0-240</sub>: 22.8  $\pm$  5.9% of UTP alone, n=8, p<0.01). 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有意に抑制されたことから (AUC<sub>0-240</sub>: 49.7  $\pm$  9.1% of control rats, n=7, p<0.05), 小型のカプサイシン感受性一次求心性神経 (C 線維) 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, UTP が作用する P2Y<sub>2</sub> および P2Y<sub>4</sub>, また UTP の分解産物 UDP が作用する P2Y<sub>6</sub> 受容体が挙げられるが, P2Y<sub>2</sub> アンチセンスオリゴは UTP によるアロディニアを強く抑制するが (AUC<sub>0-240</sub>: 27.6  $\pm$  6.6% of UTP alone, n=8, p<0.01), P2Y<sub>4</sub> アンチセンスオリゴは影響しないこと (AUC<sub>0-240</sub>: 94.8  $\pm$  12.8% of UTP alone, n=7, p>0.05), P2Y<sub>6</sub> 作用薬 UDP はアロディニアを誘発しないことから (AUC<sub>0-240</sub>: 6.8  $\pm$  4.8% of UTP alone, n=8, p>0.05), P2Y<sub>2</sub> 受容体がアロディニア形成の責任受容体と考えられる.

P2Y<sub>2</sub> 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 (P2Y<sub>1</sub> あるいは P2Y<sub>2</sub>) 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<sup>7,12)</sup>. 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 (AUC<sub>0-240</sub>: 94.8  $\pm$  13.6% of UTP alone, n=8, p>0.05), また TRPV1 拮抗薬による影響を受けない (AUC<sub>0-240</sub>: 89.8  $\pm$  14.6% of UTP alone, n=6, p>0.05). したがって, 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 ニューロンには P2Y<sub>1</sub> 受容体が発現しており, この P2Y<sub>1</sub> 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<sup>8)</sup>. したがって, 同様のメカニズムが小型 DRG ニューロンの P2Y<sub>2</sub> 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 1/3 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 Ca<sup>2+</sup> 応答が認められる. アストロサイトでの ATP 反応には, P2Y<sub>1</sub> および P2Y<sub>2</sub> 受容体が介在し, G 蛋白質/PLC/InsP<sub>3</sub> 系の活性化が関与している<sup>5)</sup>. さらにアストロサイトは ATP を放出し, P2Y<sub>1</sub> および P2Y<sub>2</sub> 受容体を介して隣接するアストロサイトおよび神経細胞に Ca<sup>2+</sup> 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, P2Y<sub>1</sub> 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 1 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 P2Y<sub>2</sub> 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 P2Y<sub>2</sub> 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。

#### 文 献

- 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.,  $Ca^{2+}$  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. USA*, 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  $Ca^{2+}$  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. USA*, 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.

---

*Address for correspondence:* Schuichi Koizumi, Ph.D.  
 Division of Pharmacology, National Institute of Health Sciences  
 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan  
 Tel: 03-3700-1141 / Fax: 03-3707-6950

---

## G 蛋白質共役型 ATP 受容体と痛み

小泉修一 藤下加代子

津田 誠\* 井上和秀\*

国立医薬品食品衛生研究所薬理部

\*九州大学大学院薬学研究科薬効解析学講座

ペインクリニック

Vol.27 No.5 (2006.5) 別刷

真興交易(株)医書出版部

## G 蛋白質共役型 ATP 受容体と痛み

小泉 修一 藤下加代子

津田 誠\* 井上 和秀\*

国立医薬品食品衛生研究所薬理部

\*九州大学大学院薬学研究科薬効解析学講座

## 要 旨

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。この ATP とその受容体である P2 受容体を介する情報伝達は、知覚情報伝達と強くリンクしており、特にイオンチャネル型 P2X 受容体は、末梢および中枢の痛覚情報伝達との強い関連性から、特に注目されている。一次求心性神経には、G 蛋白質共役型 ATP 受容体である P2Y 受容体も存在しているが、P2Y 受容体と痛覚伝達に関しては情報が少ない。本稿では痛覚伝達と ATP に関し、特に P2Y 受容体に注目して最近の知見を報告する。

(ペインクリニック 27: 560-568, 2006)

キーワード: ATP, P2Y 受容体, 皮膚-知覚神経連関

## はじめに

ATP (アデノシン三リン酸) はあらゆる細胞に存在するエネルギーの通貨であるが、1993 年に最初の ATP 受容体 (P2 受容体) cDNA がクローニングされて以来、その細胞間情報伝達物質として役割が注目されている。P2 受容体は、イオンチャネル型 P2X 受容体と G 蛋白質共役型 P2Y 受容体に大別され、それぞれが 7 種類と 8 種類のサブタイプに分類されている (図 1)。これらは中枢・末梢を問わず、生体のあらゆる部分に多様に発現しており、そこでの種々の生理反応と密接にリンクしていると考えられている。ATP/P2 受容体が担う生理的役割に関してはまだまだ不明な点が多いが、現在、最も解明が進んでいる分野の一つが、痛覚情報伝達との

関連性である。1995 年に、イオンチャネル型 P2X 受容体サブクラスの P2X<sub>3</sub> 受容体が末梢一次求心性感覚神経に局在していることが明らかとされたのに端を発し<sup>1,2)</sup>、P2X<sub>3</sub> 受容体<sup>1-3)</sup>、さらには P2X<sub>2/3</sub> 受容体<sup>4)</sup>と、特に急性期の疼痛に関しての多くの知見が集積された。また、神経因性疼痛などの慢性疼痛の基礎的研究では、末梢一次求心性感覚神経である坐骨神経や脊髄神経などを人為的に損傷させる動物モデルがよく用いられるが、このような病態モデル動物で誘発される異痛症 (アロディニア) の発生および維持には、脊髄後角ミクログリアの P2X<sub>4</sub> 受容体の発現亢進が中心的な役割を果たしていることが明らかとなった<sup>5,6)</sup>。このように P2X 受容体系は、末梢の痛み発生・調節に大きく影響を与えるだけでなく、脊髄における知覚情報の伝達の制御と深く関連し、慢性疼痛発生・維持と強

<Special Article> Peripheral and central mechanisms of pain: recent developments  
G-protein coupled-P2Y receptors and Pain  
Schuichi Koizumi, et al  
Division of Pharmacology, National Institute of Health Sciences

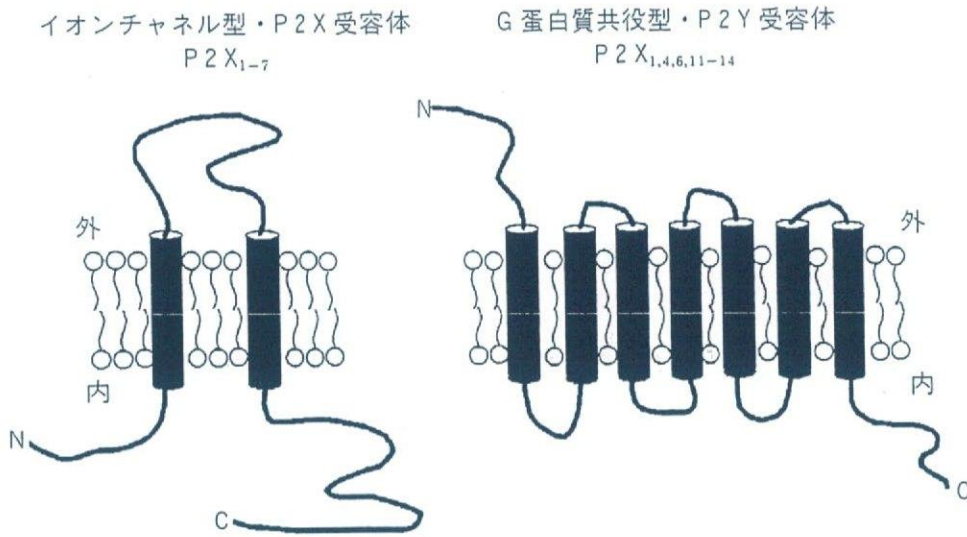


図1 ATP 受容体の模式図

イオンチャネル型 P2X 受容体は P2X<sub>1-7</sub> の 7 種類, G 蛋白質共役型 P2Y 受容体は P2Y<sub>1,2,4,6,11-14</sub> の 8 種類が知られている

く関わっている重要な分子である。一方、一次求心性神経およびその周辺細胞には G 蛋白質共役型 P2Y 受容体も存在していることが明らかとなったが、P2Y 受容体と痛覚伝達に関する報告は少ない。本稿では、一次求心性神経の痛覚伝達と ATP との関連性について、特に P2Y 受容体に注目して最近の知見を報告する。

### 1. DRG の P2Y 受容体

一次求心性神経には P2Y 受容体も発現している。P2Y 受容体と知覚情報の伝達に関する最初の知見は、Nakamura と Strittmatter<sup>7)</sup> の報告である。彼らは P2Y<sub>1</sub> 受容体 mRNA が、大型後根神経節細胞 (dorsal root ganglion : DRG) 神経細胞のマーカーである RT-97 に陽性の細胞に発現していることを見出した。さらに、P2Y<sub>1</sub> 受容体を強制発現させたアフリカツメガエル卵母細胞では、触刺激により惹起される内向電流を、低濃度 ATP (1 μM 未満) が強く増強する。また、カエル下肢皮膚の触刺激による

感覚神経の興奮も ATP で顕著に増大し、ATP 受容体拮抗薬 (suramin : pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2', 4'-disulfonic acid (PPADS)) および ATP 分解酵素 apyrase により消失する。また、マウスの急性単離 DRG 細胞においても、比較的大型の DRG 神経細胞で、ATP 刺激により細胞内カルシウム濃度上昇が認められ、InsP<sub>3</sub> 受容体拮抗薬および小胞体 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 阻害薬により消失する。当研究室においても同様の結果を得ており、これらの知見は、P2Y<sub>1</sub> 受容体が Aβ 線維由来の非侵害性刺激 (触刺激) の伝達制御に深く関与している可能性を示唆している。

前述したように、P2X<sub>3</sub> 受容体は小型 DRG 神経細胞<sup>1,2)</sup> に、P2X<sub>2</sub> および P2X<sub>3</sub> 受容体は中型の DRG 神経細胞<sup>4)</sup> に強く発現している。痛覚を伝えるこれらの小型 DRG 神経細胞に、P2Y 受容体は発現しているのだろうか? ATP で小型および中型 DRG 神経細胞を刺激して、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) 変化を観察すると、80% 程度の DRG 神経細胞で [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇が観察され

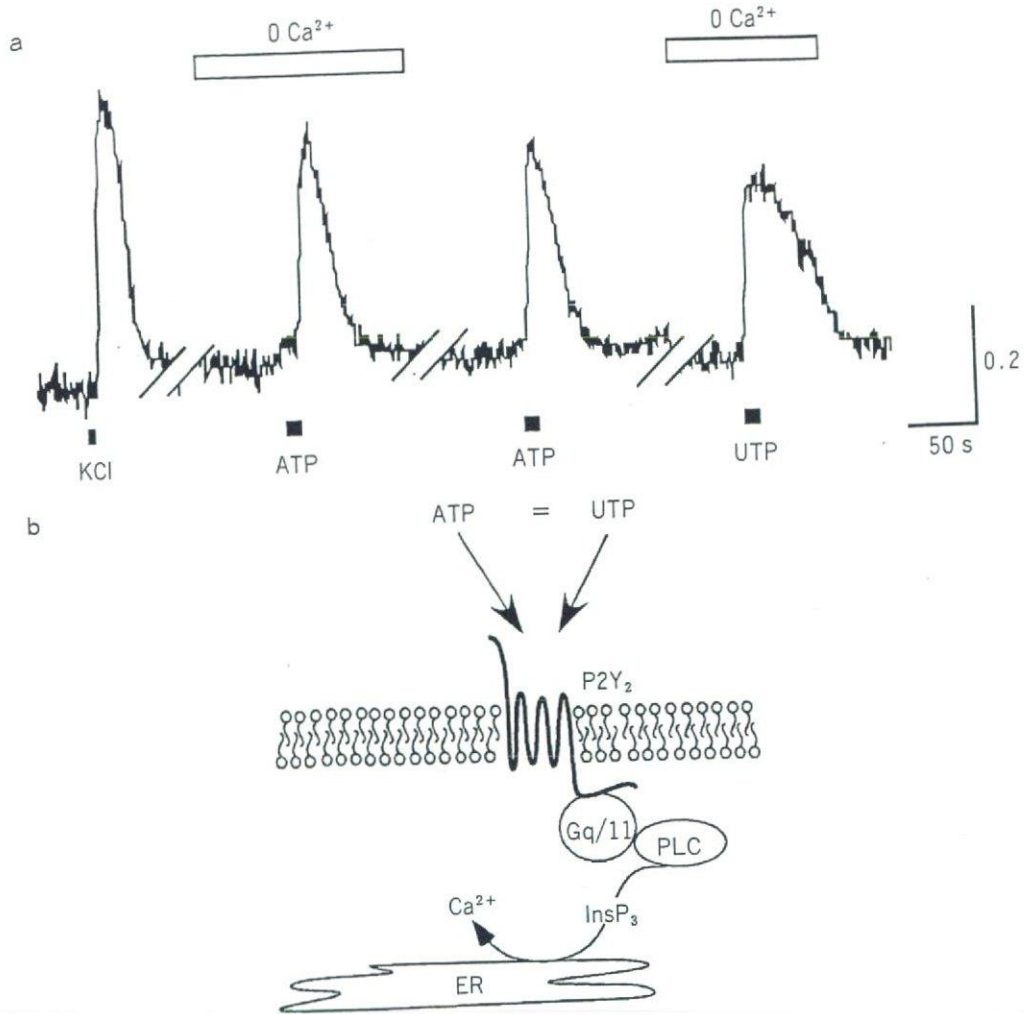


図2 ATPおよびUTPにより惹起される小型DRG神経細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇

- a: Fura 2法により測定した小型DRG神経細胞 $[Ca^{2+}]_i$ 変動の代表例。ATP (100  $\mu$ M) により惹起される $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、細胞外 $Ca^{2+}$ 除去 ( $0 Ca^{2+}$ ) 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 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に関与する責任受容体 $P2Y_2$ 受容体の模式図。 $P2Y_2$ 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 1, 4, 5-trisphosphate ( $InsP_3$ ) が産生され、小胞体 (ER)  $InsP_3$ 受容体から $Ca^{2+}$ が放出される。ATPおよびUTPは同程度の強さでこの受容体を活性化する

る。興味深いことに、これらの $[Ca^{2+}]_i$ 応答は、細胞外 $Ca^{2+}$ を除いても観察され、また、phospholipase C (PLC) 阻害薬 U73122、小胞体 $Ca^{2+}$ -ATPase阻害剤 cyclopiazonic acid (CPA) および $P2$ 受容体拮抗薬 suraminで抑制された。さらに、uridine 5'-diphosphate

(UTP)によってもほぼ同様の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が認められた(図2)。したがって、小型DRG神経細胞には、PLC/ $InsP_3$ 系と共役したUTP感受性の $P2Y$ 受容体、つまり $P2Y_2$  ( $P2Y_4$ )受容体が共発現している(図2b)。 $P2Y_2$ 受容体は、ATPおよびUTPによりほぼ同程度の強さで

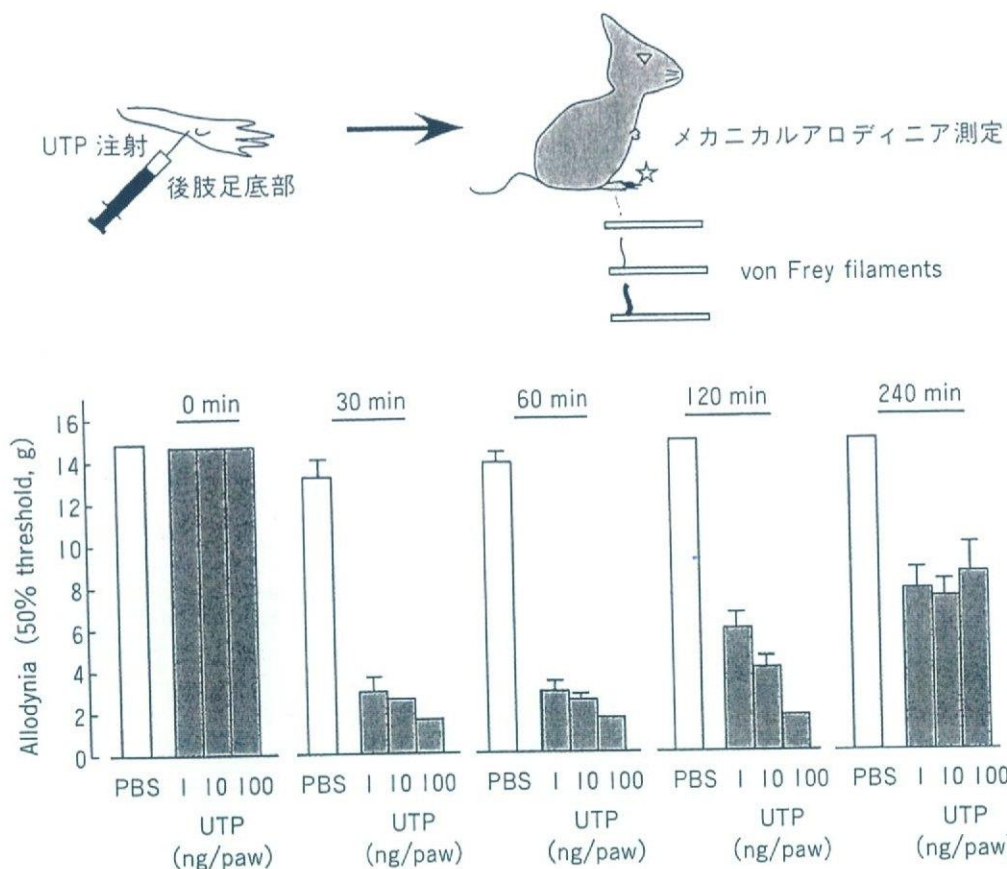


図3 UTPにより惹起される痛み行動

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 および 240 分後のアロディニア。値は 50% 閾値 (g) を示す

活性化される。これは、小型の DRG 神経細胞で UTP が細胞内  $Ca^{2+}$  動員を惹起するという報告によっても支持される<sup>8,9)</sup>。興味深いことには、UTP 応答 DRG 神経細胞の多くが、TRPV1 受容体作用薬カプサイシンにも応答したことである。これらの知見は、P2X 受容体系だけでなく、P2Y 受容体、特に P2Y<sub>2</sub> 受容体が痛覚伝達の制御と関係していることを強く示唆するものである。

## 2. 痛みと P2Y 受容体

DRG 神経細胞の P2Y<sub>1</sub> 受容体を刺激すると、

N 型電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネル<sup>10)</sup> および P2X<sub>3</sub> 受容体<sup>11)</sup> が抑制され、知覚情報の伝達が阻害される。それでは、UTP 刺激によって P2Y<sub>2</sub> 受容体を活性化すると、知覚情報はどのように制御されるのだろうか？痛みは出るのだろうか。最近、われわれは、ラットの後肢足底部に UTP を投与し、太さの異なる von Frey filament で一次求心性神経を刺激することで、触刺激に対する痛み応答、アロディニアが発現することを見出した(図3)。同様のアロディニアは、中型 DRG 神経細胞に存在する P2X<sub>2/3</sub> 受容体を刺激した場合にも惹起されるが<sup>4)</sup>、UTP により惹起されるアロディニアは同程度かそれ以上の強さ

であり、また、その持続時間はより長かった。UTPによるアロディニアは、P2受容体拮抗薬PPADSにより消失し、さらにPLC阻害剤U73122およびCaキレート剤BAPTA-AMによっても抑制される。これらの阻害様式は、DRG神経細胞でのUTPによる細胞内Ca<sup>2+</sup>動員の阻害様式と一致しており、両者が同じP2Y受容体を介している可能性が示唆される。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ることから、カプサイシン感受性一次求心性神経(C線維)がUTPにより興奮し、アロディニアを惹起しているものと考えられる。この点も、*in vitro*の結果と一致している。候補として挙げられる責任受容体は、UTPに感受性のP2Y<sub>2</sub>、P2Y<sub>4</sub>、P2Y<sub>6</sub>受容体である。しかし、P2Y<sub>6</sub>受容体作用薬UDPはアロディニアを誘発しないことから、P2Y<sub>6</sub>受容体の関与は考えにくい。さらに、P2Y<sub>2</sub>受容体を減少させるためにラットの脊髄くも膜下腔内へP2Y<sub>2</sub>アンチセンスオリゴヌクレオチドを投与すると、UTPによるアロディニアはほぼ完全に抑制される。一方、P2Y<sub>4</sub>アンチセンスオリゴヌクレオチドでは全く影響がない。したがって、UTPはC線維のP2Y<sub>2</sub>受容体を介して、アロディニアを発現していることが示された。

### 3. 痛み伝達のメカニズム

P2Y<sub>2</sub>活性化が、いかにしてアロディニアを引き起こすかに関しては不明である。先行する報告で、Tominagaらは、P2Y受容体(P2Y<sub>1</sub>あるいはP2Y<sub>2</sub>)刺激によりTRPV1の応答の感受性が亢進すること<sup>12)</sup>、また熱刺激に対する痛み行動が亢進すること<sup>13)</sup>を報告している。つまり、P2Y受容体はTRPV1をエフェクターとして痛み情報を伝えているのである。P2Y受容体刺激によるTRPV1応答増強反応にはprotein kinase C (PKC)の活性化が必要だが、UTPによるアロディニアはPKC阻害薬に全く影響さ

れず、さらにTRPV1阻害薬による影響も受けない。また、DRG神経細胞におけるカプサイシンによる[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇もUTPで変化がないことから、UTPによるアロディニアには、TRPV1は関与していないと推察される(図4)。したがって、メカニカルアロディニア発現にはTRPV1感受性亢進とは別のメカニズムが関係している可能性が考えられる。またMolliverらは、P2Y<sub>2</sub>受容体刺激により小型DRG神経細胞が脱分極し、活動電位を発生すること<sup>14)</sup>、つまりP2Y<sub>2</sub>受容体刺激が、痛み伝達に関わる小型DRG神経細胞を直接興奮させるというメカニズムを提唱している。交感神経節細胞のP2Y<sub>2</sub>受容体でも同様のメカニズムが提唱されている。さらに、前述したように、大型DRG神経細胞にはP2Y<sub>1</sub>受容体が発現しており、このP2Y<sub>1</sub>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<sup>7)</sup>。小型DRG神経細胞にも種々の機械応答センサーが存在していることから、同様のメカニズムが小型DRG神経細胞のP2Y<sub>2</sub>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、UTPはP2Y<sub>2</sub>受容体を介して小型のDRG神経細胞で転写因子のCREB(cyclic AMP response element binding protein)を活性化する。これらの知見は、P2Y<sub>2</sub>受容体が転写レベルでも痛みの伝達を制御している可能性を示唆するもので非常に興味深い。このように、小型のDRG神経細胞に存在しているP2Y受容体は、痛み伝達の調節に重要な役割を果たしているようであるが、その痛み伝達の調節メカニズムの詳細は、まだ不明な点も多く残されている。

一方、UTPおよびUDPは神経因性疼痛に対して抑制効果も有している。Okadaらは、UTPやUDPをラットの神経因性疼痛モデルで脊髄くも膜下腔内へ投与することで、神経損傷によるアロディニアが抑制されることを報告してい

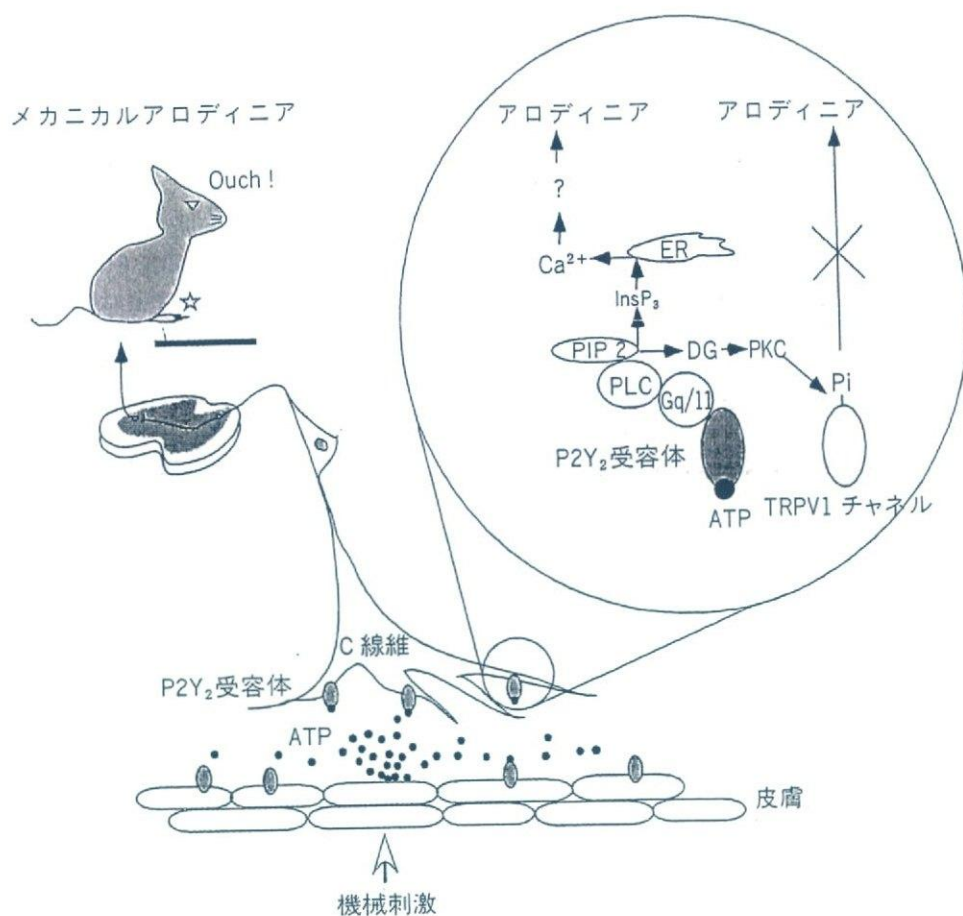


図4 まとめ (模式図)

皮膚は、機械刺激等の物理刺激および損傷等により 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 線維には P2Y<sub>2</sub> 受容体が強く発現している。小型一次求心性神経 P2Y<sub>2</sub> 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 および細胞内 Ca<sup>2+</sup> が、その発現に重要な役割を果たす

る<sup>15)</sup>。また、UTP および UDP は正常動物でも鎮痛効果を示す。この UTP と UDP の標的 P2Y 受容体が同一かどうかは不明だが、同じ P2Y 受容体系でも、脊髄 P2Y<sub>6</sub> 受容体はむしろ鎮痛作用とリンクした分子である可能性が強い。

#### 4. ATP のソースおよ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、先に述べたように、一次求心性神経は P2X 受容体および 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 および anti-cytokerain 14 抗体を用いた二重染色法により、小型の C 線維および 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

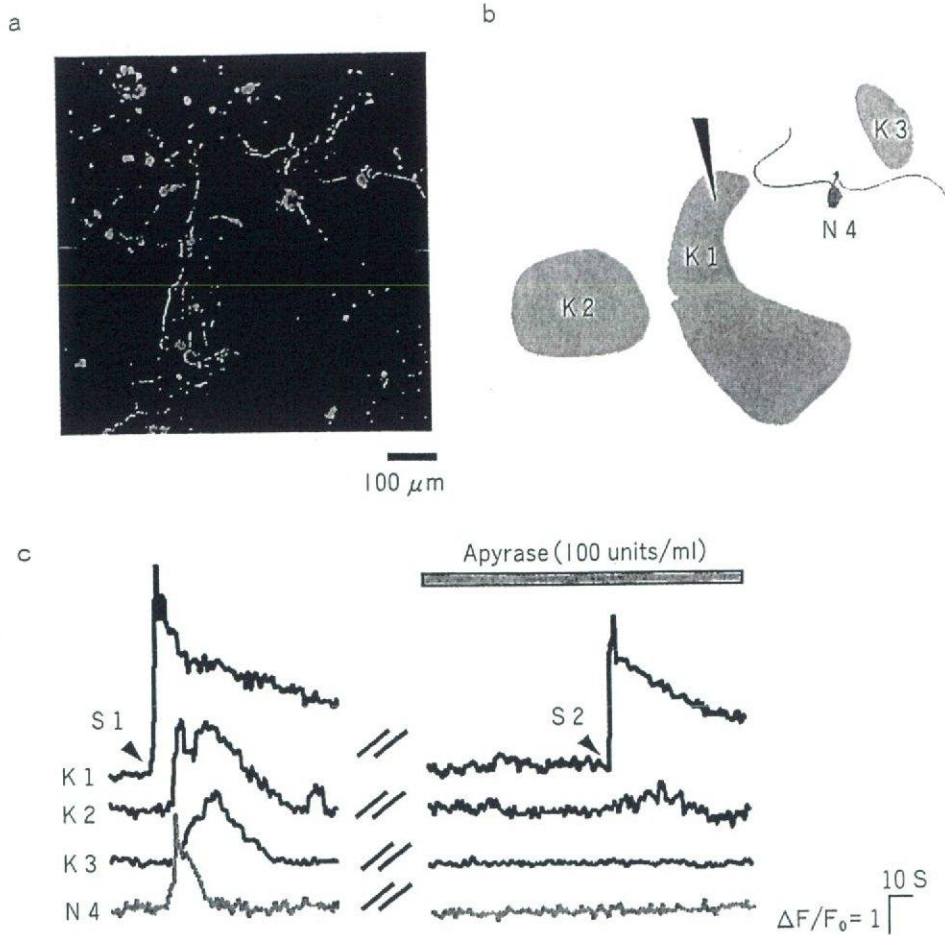


図5 ATPによるDRG神経-表皮ケラチノサイト (NHEK) 間  
コミュニケーション

- a: DRG 神経細胞および 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 および K3) へ, さらには近傍の DRG 神経細胞 (N4) にも  $Ca^{2+}$  wave として伝播した。
- c: この  $Ca^{2+}$  伝播は, ATP 分解酵素 apyrase によりほぼ消失した。  $[Ca^{2+}]_i$  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  $\Delta F/F_0$  で表した

5 a). この時, 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  $[Ca^{2+}]_i$  上昇が観察されたが, cytokeratin 14 陽性 NHEKs では応答が観察されなかった。  $P2Y_2$  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 神経細胞および NHEKs 両者ともに機能的  $P2Y_2$  受容体を発現していることが明らかとなった。

ATP およびそのアナログで 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、P2Y<sub>2</sub>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 および P2Y<sub>2</sub>受容体作用薬 UTP による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 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<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇が観察され、これはタイムラグを経て周囲の NHEKs へ Ca<sup>2+</sup>wave となって伝播した。この Ca<sup>2+</sup>wave 伝播は P2 受容体拮抗薬および ATP 分解酵素 apyrase 存在下で、ほぼ消失する。したがって、機械刺激による Ca<sup>2+</sup>wave の伝播には、ATP および P2Y<sub>2</sub>受容体活性化が重要であること、つまり機械刺激に反応して ATP が放出され、拡散し、周囲の NHEKs の P2Y<sub>2</sub>受容体が活性化されることにより、Ca<sup>2+</sup>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<sup>16)</sup>、実際に、NHEKs が機械刺激に反応して 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<sup>2+</sup>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<sup>2+</sup>wave の伝播が近傍の DRG 神経細胞に伝播すること、これが apyrase および 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/P2Y<sub>2</sub>受容体依存的に起きていることが明らかとなった (図 5c)。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<sup>17)</sup>。これは、皮膚からの ATP を介する情報が、P2X 受容体を介した経路によっても 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などの情報を 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、P2Y<sub>1</sub>および P2Y<sub>2</sub>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<sup>18)</sup>、中枢神経系ではアストロサイトが ATP を放出して、周辺神経細胞およびグリア細胞の機能を調節していること<sup>19)</sup>、などの報告から、部位によっては、グリア細胞が ATP の供給源として、痛み伝達を制御する重要な細胞であると考えられる。

#### 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/P2Y<sub>2</sub>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、機械刺激に反応して ATP を放出し、P2Y<sub>2</sub>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 P2Y<sub>2</sub>受容体を活性化すること、DRG 神経細胞 P2Y<sub>2</sub>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、紫外線照射などにより、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 受容体群をどのよう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ように痛み情報が修飾されるのかなど、今後明らかにすべき課題は多く残されている。

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 P2X<sub>2/3</sub> receptor signaling in capsaicin-insensitive primary afferent neurons. *J Neurosci* 20 : RC 90, 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 USA* 93 : 10465-10470, 1996
- 8) Sanada M, Yasuda H, Omatsu-Kanbe M, et al : Increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> 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 Ca<sup>2+</sup> response is spatio-temporally 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 USA* 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 USA* 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

※ ※ ※

# グリア細胞による シナプス伝達制御の研究

keywords ▶▶▶ ATP、P2 受容体、グリア細胞、  
アストロサイトーニューロン連関、海馬

小泉 修一

国立医薬品食品衛生研究所 薬理部室長



## はじめに

「Stars at last (ついにスターに)」。これは、最近の『Trends in Neuroscience』の総説「アストロサイトの新しい役割」につけられたサブタイトルである<sup>1)</sup>。星状を呈することから命名された星状膠細胞“アストロサイト”は、まさに脳機能研究のスターになりつつある。

これまでダイナミックな脳機能研究はニューロンの研究として展開されてきた。もちろん、脳のダイナミックな情報処理・発信機能を直接的に担っているのはニューロンであり、その複雑なニューロン回路網が多様な脳機能と直接的にリンクしていることは疑いようがないが、脳にはほかに多くの非ニューロン細胞が存在している。これらニューロン以外の細胞が脳内に豊富に存在するという事実は、19世紀末にニューロン説を唱えた Cajal (1852 ~ 1934) の時代からすでによく知られた事実でもある。このうち神経膠細胞(グリア細胞)は、分化、再生および修復などのキーワードとともに最近特に注目されている細胞であるが、ごく最近までニューロンの物理的支持、栄養因子放出や老廃物除去など、ニューロン活動を支える裏方として働いていると考えられるにすぎなかった。ましてや、脳機能のダイナミズムに関与するとは想像すらできなかった。

しかし、ごく最近、このグリア細胞が、なんとシナプス伝達そのものを制御し得るとして注目を集めている<sup>2)</sup>。

ヒト脳には、ニューロンの約10倍にも及ぶ多数のグリア細胞が存在する。なかでも数的優位を呈するアストロサイトは、ニューロンに寄り添い、ほとんどのシナプスを取り巻くように存在して各種の神経伝達物質に即時的に応答し、しかも活動依存的にグルタミン酸およびATPなどの液性伝達物質を放出する“信号発信機能”を有する。これらの事実は、グリア細胞—ニューロン間の積極的なコミュニケーションが脳機能のダイナミズムに重要である可能性を強く示唆するものである。

一方、ATPは“エネルギーの通貨”としてあまねく細胞内に存在するが、多くの組織で細胞外情報伝達物質として働く。1993年に最初の形質膜上のATP受容体蛋白質(P2受容体)cDNAがクローニングされ<sup>3)</sup>、現在ではイオンチャネル型P2X受容体7種類(P2X1~7)、代謝型P2Y受容体8種類(P2Y1、2、4、6、11~14)が知られ、脳をはじめほとんどの組織でその発現が確認されている。

筆者らは、神経系における神経伝達物質ATPの機能を研究してきたが、ごく最近になって、ATPがニューロンからグリア細胞へも情報を伝達すること、各種グリア細胞の多彩な機能を制御すること、さらにグリア細胞間情報伝達をも担っていることに気づき、神経伝達物質ATPはグリア細胞間およびニューロン—グリア細胞間の連絡をつかさどる重要な分子である、との考えにいたった。特にアストロサイトはきわめて低濃度のATPに応答し、刺激依存的にATPを放出する。これらの知見は、ATPがアストロサイトからシナプスへ即時的に情報を伝えている可能性、つまり「アストロサイトがATPを介してシナプス伝達を制御している」という作業仮説を提起させるものである。筆者は、ATPを切り口として、アストロサイト—ニューロン間コミュニケーションの生理学および薬理的性質を示し、“静なる巨人”グリア細胞のシナプス伝達における動的な側面およびその重要性を明らかにすることを試みた。

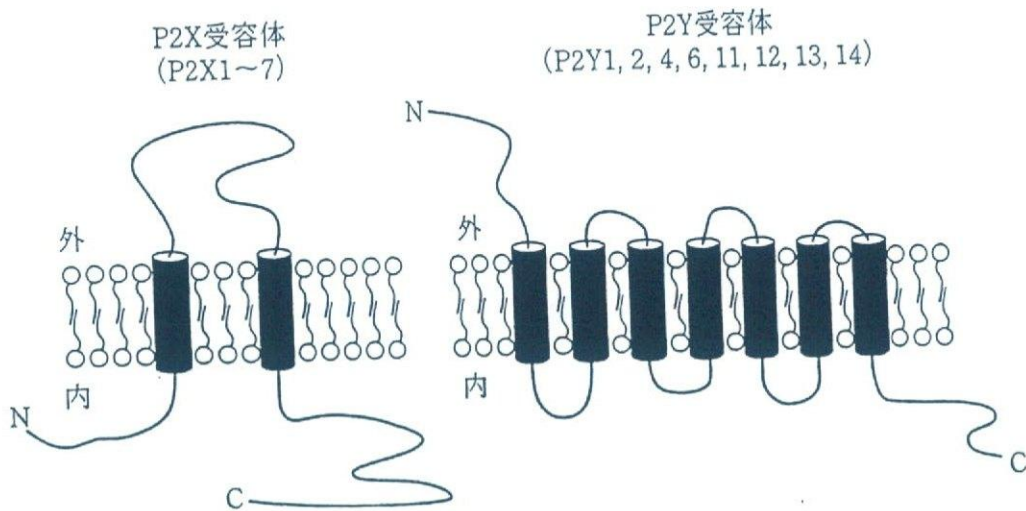


図1 P2受容体  
ATP受容体(P2受容体)は、イオンチャネル型P2X受容体と代謝型P2Y受容体に分類され、それぞれ7および8種類のサブクラスが報告されている。

## 1. ATP受容体“P2受容体”

ATPはあまねく細胞内に存在する“エネルギーの通貨”である。このように細胞の生死を決定するような貴重な物質が細胞外に放出され、情報伝達物質としても機能するという大胆な発想は、すでに1970年代初頭には提唱されていた<sup>4)</sup>。しかし、伝達物質として確たる市民権を得たのは、最初のATP受容体蛋白質(P2受容体)cDNAがクローニングされた1993年以降であるといえる<sup>3)</sup>。

P2受容体は、大きく2つのファミリー、すなわちイオンチャネル型P2Xおよび代謝型P2Yファミリーに分類される(図1)。P2Xファミリー(P2X1~7)は膜2回貫通型の蛋白質構造をもち、3分子が会合して非選択性陽イオンチャネルを形成すると考えられており、7種類のサブユニットの異なる組み合わせにより少なくとも11種類のチャネル蛋白質として機能していることが知られている<sup>5)</sup>。それに対して、P2YファミリーはG蛋白質共役型受容体スーパーファミリーに属し、P2Y1、2、4、6、

11～14が認知されている。前4者はGq/11と(P2Y11はGsとも)、後4者はGiと共役している。

内在性のリガンドはアデニンヌクレオチドATPおよびピリミジンヌクレオチドUTPであるが、その代謝物であるADPおよびUDPもそれぞれリガンドとしてある種のP2受容体サブクラスに作用する。また最近では、ヌクレオチド糖であるUDP-グルコース<sup>6,7)</sup>や、2分子のヌクレオチドがポリリン酸で結合した内因性因子が作用する受容体も発見され<sup>8)</sup>、ヌクレオチド関連物質は伝達物質として実に多様な生理機能と関連しているようである。

## 2. 脳内グリア細胞とアストロサイト間情報連絡 “gliotransmission”

ヒトは、ニューロンに対するグリア細胞の存在比が、ほかの生物、ほかの哺乳類と比べても格段に大きい。この事実は、グリア細胞が進化にともなってその存在比を増大させ、高度な精神活動を支えている可能性を提起するものである。脳内グリア細胞は大きく分けて3種類、星状膠細胞(アストロサイト)、乏突起膠細胞(オリゴデンドロサイト)および小膠細胞(ミクログリア)からなる。小脳のバークマングリア、網膜のミュラー細胞など部位特異的なアストロサイト様細胞もある。本稿では、特にアストロサイトに注目して話を展開する。

アストロサイトは、名前が示すように星形で、脳内でもっとも数の多いグリア細胞である。その役割は多岐にわたっている。たとえば、多くのサイトカイン、成長因子受容体が発現していることから、脳内の炎症・傷害時に応答し機能していることが、また種々のトランスポータの発現とシナプス周囲を取り囲むような存在形態から、神経伝達物質の除外・イオン恒常性保持機能との関連が示唆されている。

さらに注目すべき点は、アストロサイトはほとんどすべての神経伝達物質受容体を発現しており、各種神経伝達物質に即時的に応答すること、

また種々の細胞外液性因子を放出することである。アストロサイトは非興奮性細胞であり、各種イオンチャネルを発現しているが活動電位を発生しない。しかし、アストロサイトは巨大なネットワークを形成し、細胞内および細胞間に伝播する“ $\text{Ca}^{2+}$  wave ( $\text{Ca}^{2+}$ 波)”を介して互いにコミュニケーションをとっていることが知られている。これは細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{CaCa}^{2+}]_i$ ) 上昇が、時間・空間的にずれながら波のように細胞内および細胞間を伝わる現象である。

そして、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  波は、主にイノシトール三リン酸 ( $\text{InsP}_3$ ) 受容体を介する小胞体からの自己再生的な  $\text{Ca}^{2+}$  遊離により形成される。一方、細胞間  $\text{Ca}^{2+}$  波は、コネキシン 43 などのギャップ結合を介して  $\text{Ca}^{2+}$  イオンやセカンドメッセンジャーが細胞間を移動するという説と<sup>9)</sup>、グルタミン酸および ATP など細胞外液性因子が放出・拡散することに起因するという説があり<sup>10)</sup>、現在は後者の考え方が主流である。このような、細胞外因子によるアストロサイトーアストロサイトコミュニケーションは、ニューロン間コミュニケーションの“neurotransmission”に対応して、“gliotransmission”と呼ばれる。

初代培養アストロサイトに外から ATP 刺激を加えると、ほとんどの細胞で大きな  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇が観察される。ATP は、アストロサイトの増殖<sup>11)</sup>、DNA 合成<sup>12)</sup>、突起形成および突起伸展など、増殖および形態変化を制御していると考えられている。これらの応答は P2Y 受容体を介し、ERK1/2MAP リン酸化酵素や  $\text{Ca}^{2+}$  非依存的蛋白質リン酸化酵素 C などの細胞内情報伝達系が関与している<sup>13)</sup>。そして、ATP により惹起される  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇は、P2Y1 受容体および P2Y2 受容体の活性化により、Gq/11 蛋白質とリンクしたフォスホリパーゼ C (PLC) / $\text{InsP}_3$  を介した細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵部位からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離によるものであり、結果として容量性  $\text{Ca}^{2+}$  流入をも引き起こし、持続的な非常に大きな細胞内  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇として観察される<sup>14)</sup>。

この  $\text{Ca}^{2+}$  応答は  $\text{Ca}^{2+}$  波となって周囲の細胞に伝播するが、前述した

ように細胞間  $\text{Ca}^{2+}$  波は、これまでグリア細胞間のギャップ結合を介して  $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{InsP}_3$  が拡散することにより誘発されたと考えられてきた<sup>9)</sup>。しかし、グルタミン酸刺激によりアストロサイトの  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇が惹起されること、グルタミン酸が  $\text{Ca}^{2+}$  依存的にアストロサイトから放出されることより、自己再生的な  $\text{Ca}^{2+}$  依存的グルタミン酸放出など液性因子の放出と拡散が  $\text{Ca}^{2+}$  波の伝播に必須ではないかと考えられるようになってきた。このことは、グリア細胞由来の液性因子がグリア細胞間、さらにはニューロン-グリア細胞間の情報伝達物質として機能していることを強く示唆するものである。

しかし最近の研究では、 $\text{Ca}^{2+}$  波伝播に関しては、グルタミン酸よりもむしろ ATP の放出と拡散が主因と考えられている。実際、単一アストロサイトを軽く機械刺激すると、まず被刺激細胞で  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  が上昇し、これは数秒のタイムラグを経て周囲のアストロサイトに伝播する (図 2A 上)。ATP 分解酵素アピラーゼ (apyrase)、ATP 受容体拮抗薬の suramin は、この  $\text{Ca}^{2+}$  波伝播を消失させる (図 2A 下)。

さらに詳細な薬理的検討により、この  $\text{Ca}^{2+}$  波伝播には、P2Y1 受容体および P2Y2 受容体の活性化と、それに引き続くストアからの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離が必須であることが明らかとなった。ルシフェリン-ルシフェラーゼと高感度カメラを用いて ATP を画像化すると、ATP は確かに被刺激部位から放出・拡散され、その伝播速度は  $\text{Ca}^{2+}$  波と相関していた (図 2B、D)。これは、内在性 ATP 放出および P2Y 受容体活性化が、アストロサイト間の  $\text{Ca}^{2+}$  波形成に中心的役割を果たしていることを強く示唆する結果である。

従来報告のように、グルタミン酸も  $\text{Ca}^{2+}$  波に関与し得る。アストロサイトの  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇を惹起するグルタミン酸と ATP の最小有効濃度が約 50 倍異なることから、アストロサイトはこのような感受性の差を利用して細胞外因子を使い分け、情報伝達を制御していると考えられる。また、 $\text{Ca}^{2+}$  波がギャップ結合を介して伝播する成分もあると考えられる