

シンポジウム 3

痛み研究最前線

痛みは化学的・熱・機械的刺激によって感覚神経終末が活性化されることによって惹起されるが¹⁾、こうした侵害性刺激受容体を有する感覚神経 (nociceptor) はトウガラシの主成分カプサイシンに感受性があることによっても特徴づけられるため²⁾、カプサイシン投与による細胞内Ca²⁺濃度上昇を指標とした発現クローニング法を用いてカプサイシン受容体遺伝子が単離された³⁾。そして、カプサイシン受容体 (VR1) がCa²⁺透過性の高い6回膜貫通型の非選択性陽イオンチャネルであり、カプサイシンのみならず同じく痛みを惹起する43度以上の熱や酸 (プロトン) によっても活性化される痛み刺激に対する多刺激受容体として機能することが明らかとなった^{3), 4)} (図)。単一チャネル電流記録からVR1が有効刺激によっておそらく直接活性化されるであろうことも判明した。これらの刺激は同時に存在することによってチャネル活性化に相乗的に作用することも見いだされた。カプサイシンはVR1の外因性リガンドであり内因性リガンドは明らかではないが、最近、内因性のカンナビノイド受容体リガンドであるアナンダミドやリポキシゲナーゼ産物はその候補として注目を浴びている^{5), 6)}。また、VR1のホモログであるVRL-1の遺伝子も単離され、VRL-1がカプサイシンや酸に感受性がなく、より高温 (52度以上) の熱によって活性化される新たな痛み受容体であることが明らかになった⁷⁾ (図)。VRL-1もCa²⁺透過性の高い6回膜貫通型の非選択性陽イオンチャネルであるが、VR1とは少し異なる電気生理学的性質を有する。VR1遺伝子は感覚神経のみに、さらに細胞径の小さな細胞 (おそらく無髄のC線維) に発現することがNorthern Blot法、in situ hybridization法によって明らかにされ³⁾、また、特異的抗体を用いてVR1蛋白質が感覚神経終末及び感覚神経が投射する脊髄後角表層に発現することが確かめられた⁴⁾。VRL-1は特

異的抗体を用いた解析から有髄のA δ 線維に発現することが分かった⁷⁾。これら2つの受容体と相同性の高い蛋白質はなく、新たな受容体ファミリーを形成するものと考えられている。

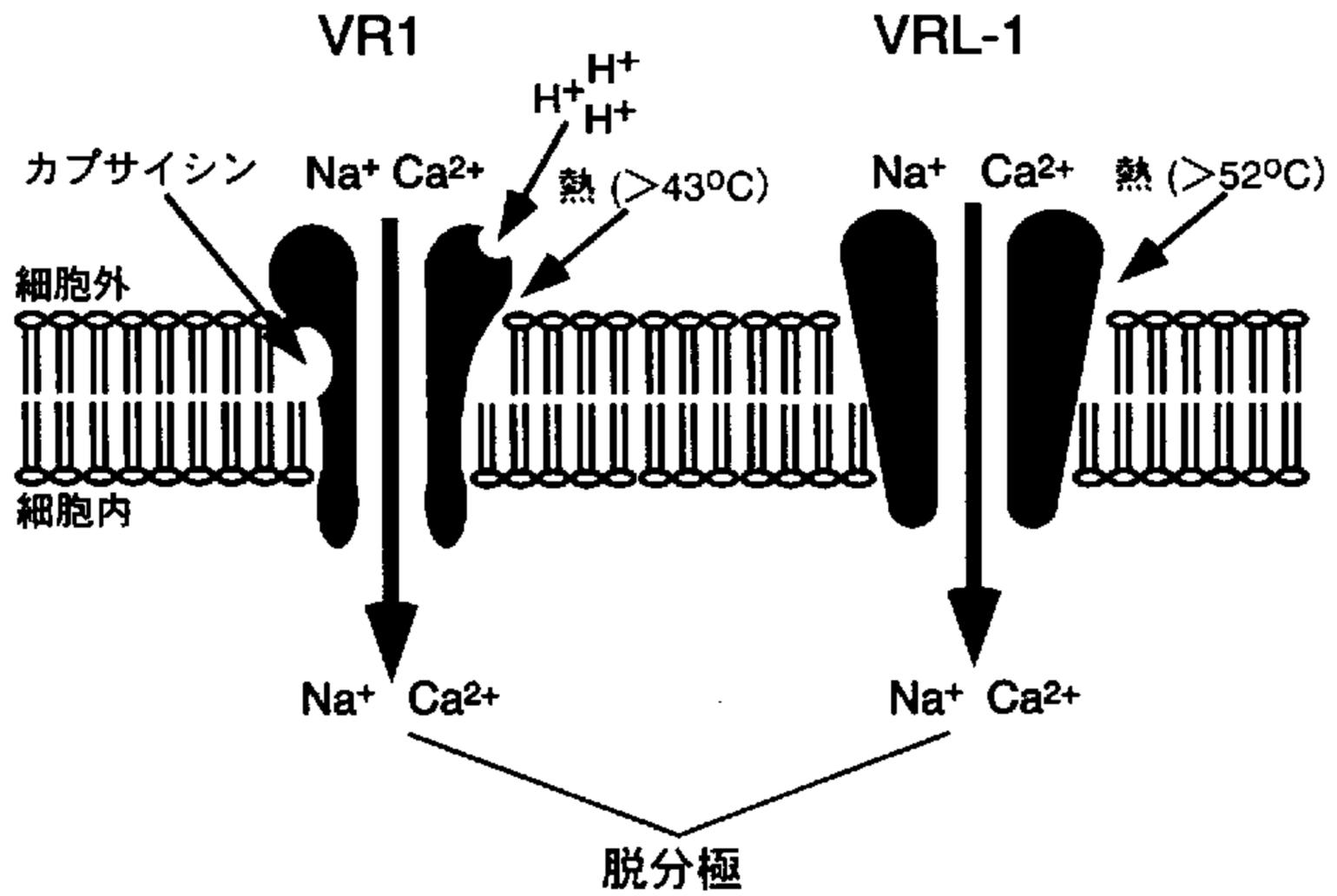


図. 感覚神経終末に発現するVR1, VRL-1の活性化機構

VR1が痛み受容体として機能することはVR1の強制発現系において検討されたが、ごく最近、VR1欠損マウスが作製され、その解析からVR1が生体内で多刺激痛み受容体として機能していることが個体レベルで確かめられた⁸⁾。3つの有効刺激がどのようにしてVR1を活性化するのは明らかではないが、プロトンによるVR1活性の制御に関与する重要な細胞外ドメインのアミノ酸が変異体解析によって明らかにされた⁹⁾。VR1活性は炎症等の細胞外環境の変化で大きく変化することが予想されるが、その制御機構の分子メカニズムに関して最新の知見を紹介したい。

参考文献

- 1) Wood, J. (ed): Capsaicin in the study of pain., p1-286, Academic press, London (1993)
- 2) Szallasi A and Blumberg P: Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol. Rev.* 51, 159-211 (1999)
- 3) Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD and Julius D: The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816-824 (1997)
- 4) Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI and Julius D: The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21, 531-543 (1998)
- 5) Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H-H, Sorgard M, Marzo VD, Julius D and Hogestatt ED: Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anadamide. *Nature* 400, 452-457 (1999)
- 6) Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee S-Y, Kang C-J, Jung J, Cho S, Min KH, Suh Y-G, Kim D and Oh U: Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: Endogenous capsaicin-like substances. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 97, 6155-6160 (2000)
- 7) Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake A and Julius D: A capsaicin receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398, 436-441 (1999)
- 8) Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeit KR, Koltzenburg M, Basbaum AI and Julius D: Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288, 306-313 (2000)
- 9) Jordt S-E, Tominaga M and Julius D: Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 97, 8134-8139 (2000)

ATP 受容体と痛み

○井上和秀, 津田誠, 小泉修一

国立医薬品食品衛生研究所薬理部

はじめに

ATP と痛みの関係については示唆する知見が臨床上で得られていたが、それは主として ATP 代謝物アデノシンによると一般的に考えられていた。しかし、1995 年 Chen らと Lewis らによって、三叉神経節および後根神経節 (DRG) にのみ特異的に発現しているイオンチャネル型 ATP 受容体である $P2X_3$ 受容体が発見され、その発現が一次求心性神経の中で痛覚を伝達する C 線維を特異的に破壊する知覚神経毒 capsaicin 処理により著しく抑制されることが報告され、ATP 受容体と痛みとの関連性が非常に注目された。我々はこれまでの ATP 受容体の研究実績を基に痛覚における ATP 受容体の研究に着手し、最近興味深い知見を得たので報告する。

ATP による DRG 神経細胞での応答

ATP 受容体と痛みの関連性を調べる一端として、後肢部から脊髄へ知覚情報を伝達する一次求心性神経の細胞体である L4-6 DRG 神経細胞を急性単離し、細胞体の大きさおよび capsaicin に対する反応性の有無から 3 種類に分類して ATP により誘発される内向電流を whole-cell patch clamp 法によりそれぞれ解析した。その結果、小型の capsaicin 感受性 DRG においては急激な脱感作を伴う電流が、中型の capsaicin 非感受性 DRG では脱感作を示さない電流がそれぞれ出現した。しかし、大型の細胞では ATP 誘発内向き電流が検出できなかった。P2X 受容体の遺伝子を導入した C6BU-1 細胞における電気生理学的検討と in situ hybridization 法を用いたラット DRG における P2X 受容体の局在性を検討した結果より、小型の capsaicin 感受性 DRG における ATP 誘発電流は $P2X_3$ ホモ受容体を、中型の capsaicin 非感受性 DRG では $P2X_{2/3}$ ヘテロ受容体を介することを

明かにした。したがって、ATP は少なくとも 2 種類の一次求心性神経を異なった P2X 受容体を介して活性化できることを示唆した。

P2X 受容体作動薬による疼痛反応

偽単極細胞である DRG 神経細胞は、細胞体から軸索を末梢側と中枢側へ 2 本伸ばしている。DRG 神経細胞で合成された受容体蛋白質は軸索内輸送により中枢および末梢端へ運ばれ、末梢側では皮膚や内臓へ入力して侵害受容器として、中枢側では脊髄後角へ入力して神経伝達物質の放出の制御体として機能する。そこで、我々は末梢および中枢側の P2X 受容体と痛みの関連性を *in vivo* において解析した。

末梢側

ラット後肢足底部に P2X 受容体作動薬 α,β -methylene ATP ($\alpha\beta$ meATP) を投与することで著明かつ用量依存的な自発痛と思われる投与側後肢の lifting および licking 行動 (nocifensive behavior), 熱刺激に対する痛覚過敏反応 (thermal hyperalgesia) および機械刺激に対する異痛反応 (mechanical allodynia: MA) が出現した。既知の疼痛誘発物質である BK, 5-HT および PGE₂ と比較したところ、nocifensive behavior は同程度、thermal hyperalgesia および mechanical allodynia は BK, 5-HT より強く、PGE₂ に匹敵する強度だった。今回の用量において $\alpha\beta$ meATP は浮腫を誘発しなかった。 $\alpha\beta$ meATP 誘発疼痛行動は、交感神経節後神経破壊薬 6-OHDA や肥満細胞脱顆粒薬 compound48/80 の処置によっていずれも影響を受けなかった。P2X 受容体拮抗薬 PPADS を足底部へ前処置することで疼痛行動は有意に抑制された。したがって、 $\alpha\beta$ meATP 誘発疼痛関連行動は投与部位に入力している一次求心性線維上の P2X 受容体の活性化が起因していると思われる。さらに興味深い点は、capsaicin 感受性神経を破壊したラットにおいては、 $\alpha\beta$ meATP 誘発 nocifensive behavior および thermal hyperalgesia は消失するが、mechanical allodynia は殆ど変化しなかった。また、capsaicin 感受性神経を破壊したラットから急性単離した DRG 細胞において、早い脱感作を伴った P2X₃ 受容体を介すると思われる内向き電流は消失するが、遅い脱感作を伴った P2X_{2/3} 受容体を介すると思われる内向き電流は変化しないことを電気生理学的手法により見出した。したがって、 $\alpha\beta$ meATP 誘発 nocifensive behavior および thermal hyperalgesia 発現には P2X₃ 受容体が、mechanical allodynia には P2X_{2/3} 受容体が関与し

ていると考えられる。以上の結果より、一次求心性神経末梢端の P2X 受容体は痛みの発生やその変調作用を有しており、また、痛みの表現型によって異なった P2X 受容体が役割を担っていることを示唆した。

中枢側

P2X 受容体作動薬 $\alpha\beta\text{meATP}$ をマウスの髄腔内へ投与することにより、熱刺激に対する痛覚過敏反応が誘発された。この痛覚過敏反応は P2X 受容体拮抗薬 PPADS および TNP-ATP により抑制され、また、P2X₁ 受容体作動薬では反応が出現しなかったことから、この痛覚過敏反応は P2X₃ 受容体を介していることを示唆した。さらに、開口放出阻害剤ボツリヌス毒素 BoTX-B や数種 NMDA 受容体拮抗薬により、用量依存的かつ著明に抑制された。これらの結果は、脊髄後角に入力する一次知覚神経中枢端に存在する P2X₃ 受容体の活性化が glutamate 遊離を誘発させ、遊離された glutamate による NMDA 受容体の活性化がこの痛覚過敏反応の発現機序である可能性を示唆した。

最後に

以上の知見から、一次求心性知覚神経における P2X 受容体は、末梢側においては痛みの発生および変調に、一方中枢側では痛みの変調にそれぞれ役割を担っていることが示唆される。ATP は神経伝達物質として供給されるだけでなく、組織細胞内や癌細胞内にも大量に存在していることから、組織損傷性疼痛や癌性疼痛において漏出した ATP が一次求心性神経の P2X 受容体を活性化し痛みを誘発している可能性は十分にあると思われる。今後は病態時の“ATP 受容体と痛み”について研究を進めて行かなければならない。

引用文献

Chen CC et al., Nature 377: 428-431 (1995).

Lewis C et al., Nature 377: 432-435 (1995).

疼痛生理と可塑性

○吉村 恵¹、伊藤彰敏²、古江秀昌¹、熊本栄一¹

1 佐賀医科大学、生理学 2 旭化成工業ライフサイエ

ンス総合研究所

【はじめに】

痛みは免疫系、内分泌系と共に、生体防御にとって重要な役割を果たしているが、特に急性期には主要な防御機構である。しかし、侵害性疼痛が、時になんらかの機転で持続し、痛みそのものが治療の対象となる事態が発生する。特に神経系の損傷を伴った場合には、末梢性あるいは中枢性の痛みの伝達回路に可塑的な変化が引き起こされる。これらは神経損傷を基盤として発症するため”神経因性疼痛 (neuropathic pain)”と呼ばれる。症例の多くは、消炎鎮痛剤や麻薬性鎮痛剤等にもしばしば抵抗性であるため、患者の苦痛は著しく、患者の QOL は大きく低下する。最近の報告によると、癌性疼痛を訴える患者の 40～70% が既に神経因性疼痛の状態に陥っているとの報告もあり、その発生機序を明らかにすることは、有効な治療薬や治療法の確立のためには急務である。

【神経因性疼痛】

神経系の異常によって引き起こされる神経因性疼痛には 1) 痛覚過敏 (hyperalgesia) — 弱い痛み刺激でも非常に強い痛みと感じる、2) アロディニア (allodynia) — 通常は痛みを引き起こさない刺激を強い痛みと感じる、3) 幻肢痛 (phantom limb pain) — 切断四肢に痛みを訴える、4) dyesthesia — 異常感覚を伴い発症する激的な痛みなどがある。これらの痛覚異常の発現には、神経系の感作 (sensitization)、すなわち神経の興奮性の亢進が主に関与していると考えられる。その発現部位として末梢性感作 (peripheral sensitization) と中枢性感作 (central sensitization) があるが、ここでは中枢性感作について、今まで報告された発生機序について簡単に述べ、最後に当教室における研究について紹介する。

【中枢性感作 (central sensitization) の発生機序】

今までいろいろな手法を用いて、中枢性感作の発現メカニズムが報告されてきた。そ

れには、1) wind up 現象、2) 第一次感覚線維の軸索発芽 (sprouting)、3) 受容体の内在化 (internarization)、4) サイレントシナプス、5) シナプス伝達効率の可塑的变化 (LTP および LTD)、6) 受容体発現のコントロールなどがあるが、以下には当教室で得られた受容体発現のメカニズムについて述べる。

【受容体発現のコントロール】

当教室では種々の疼痛モデル動物を用いて、脊髄での痛覚回路網の可塑的变化について検討を行ってきた。その中で、卵巣摘出ラットは、骨粗鬆症のモデルとして開発されたが、同時に痛覚過敏を引き起こす。臨床的には、カルシトニン_Rは骨粗鬆症に伴う痛みに対して鎮痛効果を示すことが知られているが、その作用機序は未だ明らかではない。そこで、このモデルラットの脊髄を用い、スライス標本と *in vivo* 標本を用いたパッチクランプ記録法で可塑的变化の発現機序を調べた。

【方法】

1) スライス標本を用いた研究—正常、卵巣摘出 (SNT) ラットおよび SNT にカルシトニン_Rを投与したラットから脊髄スライスに後根を付けた標本作製し、痛み情報が入力する膠様質細胞からパッチクランプ法で記録をおこなった。2) *in vivo* パッチクランプ法を用いた研究—ラットを麻酔下に気管切開を行い人工呼吸を行う。腰部の椎弓切除を行った後、脳脊髄固定装置にセットする。スライスと同様、膠様質細胞からパッチクランプ記録をおこない、皮膚刺激によって誘起されるシナプス応答を解析した。

【結果】スライスに付けた後根の刺激によって、A δ および C 線維を介する EPSC (興奮性シナプス後電流) が記録された。カルシトニン_R投与に伴う随伴症状からセロトニンの関与を推測し、セロトニンを灌流投与した。その結果、正常ラットではセロトニンは A δ および C 線維終末に働き伝達物質の放出を抑制した。ところが、卵巣摘出ラット脊髄では、セロトニンは A δ 線維からの伝達物質放出は正常と同様に抑制したが、C 線維からの放出は抑制しなかった。興味あることに、カルシトニン_R製剤を投与した卵巣摘出ラットでは、C 線維からの伝達物質放出は再び抑制された。このことは、卵巣摘出によって C 線維終末のセロトニン受容体が減少し、カルシトニン_R投与によって再び発現する事を示唆している。

次に、*in vivo* 標本におけるセロトニンの作用を検討した。膠様質細胞は皮膚への触および機械的痛み刺激によって EPSC の振幅と頻度が著明に増加したが、熱刺激には全く応答を示さなかった。この時の応答は触および痛み刺激によって有意差が認められな

ったが、SNT ラットでは、痛み刺激による応答が大きい傾向があった。次に、セロトニンを直接脊髄に投与してその作用を検討した。正常ラット脊髄への直接投与は、触および痛応答を抑制した。しかし、SNT ラット脊髄では、触刺激による応答は正常と同様に抑制されたが、痛み刺激による応答は抑制の程度がわずかであった。

【考察】脊髄膠様質は、脳幹に存在する縫線核からセロトニン性の下行性痛覚抑制系入力を受けているが、その作用部位として、末梢から痛み情報を伝える無髄のC線維の終末に作用し、伝達物質の放出を抑制している可能性が示唆された。SNT ラット脊髄においては、C線維終末のセロトニン受容体数が減少するため、伝達物質放出の抑制が起こらず、過剰な痛みの情報が膠様質細胞に入力する事になる。これが卵巣摘出ラットに見られる痛覚過敏の発生機序の一つであると考えられる。カルシトニンの投与による鎮痛作用は、減少したセロトニン受容体の再発現によるものと思われる。これを支持するものとしては、卵巣摘出によるエストロゲンの減少がトリガーとなり、ACTHの減少、副腎グルココルチコイドの低下を引き起こし、mRNAからのセロトニン受容体発現の抑制を示唆する報告が有る。また、カルシトニンはこの減少したACTHのレベルを元に戻すことが報告されている。更に、臨床的にカルシトニンの効果は急性には現れず、3週以上の反復投与が必要で有る事とも一致する。ここで用いた卵巣摘出モデルラットでは、セロトニン受容体の発現が可塑的に変化したが、他の受容体もセロトニンと同様にその発現がダイナミックにコントロールされているもの考えられる。今後、種々の受容体での報告が増えるものと推測される。

以上、概説してきた様に末梢からの入力変化が起こると、それが短時間のものであれば正常に復するが、長期に渡って持続すればサブタイプや受容体数の変化、ひいては回路網の変化が惹起されることを示している。最近の研究から、この可塑的变化は方向性のない無秩序なものではなく、神経系の生後発達の過程を繰り返している可能性がしめされている。もし、そうであるとすると、神経因性疼痛の原因となる可塑的变化も、実は障害を受けた感覚回路の再生過程の一つのステップであるとみなすことも出来る。また、代償機能であるかもしれない。しかし、機能的には激しい痛みを引き起こすことになり、本来求められる再生過程や代償機能であるとは当然いえない。将来、これらの可塑的变化をコントロールしている機構が明らかになれば、対症療法ではなく、より効果的な原因療法の開発、ひいては神経損傷の再生機構の解明にも繋がるものと考えられる。