

氏名	福井真人
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	薬博第542号
学位授与の日付	平成16年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科生命薬科学専攻
学位論文題目	脳内P2プリン受容体の侵害受容における役割に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 佐藤公道 教授 赤池昭紀 教授 辻本豪三

論文内容の要旨

痛みは、危害・傷害から身を守る生体防御反応として重要な役割を果たしているが、持続する痛みは、患者のQOLを低下させる最も大きな要因の一つであり、痛みそのものが治療の対象とされる。しかしながら、疾患によって従来の鎮痛薬では効果が不十分な場合もあることから、痛みのメカニズムをより詳細に解明することが非常に重要な課題となる。一方、アデノシン三リン酸(ATP)は、生体におけるエネルギー伝達体としての生理機能を有するだけでなく、その標的受容体(P2プリン受容体)を介して細胞間情報伝達物質として働くことが知られるようになった。P2受容体は、チャンネル内蔵型受容体(P2X)およびGタンパク共役型受容体(P2Y)に大別され、これまでに幾つかのサブタイプがクローニングされている。近年、P2X受容体刺激が末梢および脊髄で侵害受容促進をもたらすと多くの報告がなされ、痛みの発生、伝達あるいはその修飾に関与する新たな候補物質として注目されるようになった。しかしこの面での脳内P2プリン受容体の関与については殆ど報告がなかった。そこで著者は、脳内におけるP2受容体の侵害受容における役割について、主として行動薬理学的に検討し、以下の新知見を得た。

第一章 脳内P2X受容体の侵害受容における抑制的役割

脳内P2受容体の侵害受容における役割を明らかにするために、ATPおよび各種P2受容体作動薬をラットの側脳室内(i.c.v.)に投与し、各種侵害受容反応に対する影響を検討した。ATP(1, 100nmol)、 α, β -meATP(P2X_{1, 3, 2/3}選択的; 1-30nmol)、およびBz-ATP(P2X_s選択的; 1-30nmol)のi.c.v.投与により、機械的侵害受容閾値は薬物投与5分後で最大となる一過性の濃度依存的な上昇を示したが、 β, γ -meATP(P2X_i選択的; \leq 30nmol)のi.c.v.投与は有意な作用を示さなかった。一方UTP(P2X_s選択的; 10, 100nmol)をi.c.v.投与しても、機械的侵害受容閾値に有意な変化は観察されなかった。また、熱的侵害受容反応に対して、 α, β -meATP(10nmol)のi.c.v.投与により、hot plate testでは有意な抑制作用が観察されたが、tali flick testでは変化は見られなかった。また、P2X₃/P2X_{2/3}サブタイプ選択的拮抗薬A-317491(1nmol)のi.c.v.前投与により、 α, β -meATP(10nmol)の機械的侵害受容閾値上昇作用は有意に減弱された。さらに、A-317491(1nmol)単独のi.c.v.投与により、ホルマリンのラット足底内注射により惹起される疼痛行動、および酢酸の腹腔内注射により惹起されるライジング行動が共に有意に増加した。これらの結果は、ATPが脳内においては侵害受容に対して抑制的に機能していることを初めて示したものであり、本作用には、P2X受容体ファミリーの中でもP2X₃あるいはP2X_{2/3}サブタイプを介したメカニズムが重要であることが示唆される。

第二章 脳内P2X受容体を介した鎮痛作用における脳内 β_2 -アドレナリン受容体の関与

脳内P2X受容体を介した鎮痛作用のメカニズムを明らかにするため、生体の疼痛制御に重要な役割を果たすことが知られるノルアドレナリン(NA)神経の関与を検討した。 β アドレナリン受容体拮抗薬propranolol(10mg/kg)の皮下への前処置により、 α, β -meATP(10nmol)による鎮痛作用は有意に抑制されたが、 α アドレナリン受容体拮抗薬phentolamine(10mg/kg)によっては盛況を受けなかった。また、propranolol(100nmol)およびpropranolol(100nmol)

を脊髄くも膜下腔内へ前投与しても α, β -meATP による鎮痛作用に有意な変化は見られなかったが, propranolol (100 nmol) を i.c.v. へ前投与することにより, α, β -meATP による鎮痛作用は有意に抑制された。さらにその作用は, β_2 アドレナリン受容体拮抗薬 butoxamine (100 nmol) および ICI-118551 (100 nmol) の i.c.v. へ前投与により有意に抑制されたが, β_1 アドレナリン受容体拮抗薬 tenolol (100 nmol) によっては影響を受けなかった。これらの結果から, 脳内 P2X 受容体を介した鎮痛作用のメカニズムには, 脳内 β_2 -アドレナリン受容体の関与が示唆される。

第三章 脳内 P2X 受容体を介した鎮痛作用における青斑核由来ノルアドレナリン神経系の関与

脳内 P2X 受容体を介した鎮痛作用に関与する脳内 NA 神経系を明らかにするため, 青斑核由来の NA 神経を選択的に破壊することが知られる NA 神経毒 DSP-4 を腹腔内に前処置すると, α, β -meATP の両側青斑核への微量投与は, i.c.v. 投与の場合よりも低用量 (0.2, 2 nmol) において, 有意かつ顕著な鎮痛作用を惹起した。またその鎮痛作用は, P2X 受容体拮抗薬 PPADS (1 nmol) の青斑核内への同時投与により有意に拮抗された。次に, 青斑核内でのメカニズムを明らかにするために, 青斑核におけるグルタミン酸およびその受容体の関与を検討した。まず, in vivo マイクロダイアリシス法により測定した青斑核における細胞外グルタミン酸量は, 灌流液中への α, β -meATP (500 μ M) 適用によって有意に増加した。また, α, β -meATP (2 nmol) の両側青斑核への微量投与による鎮痛作用は, NMDA 受容体拮抗薬 MK-801 (2, 20 nmol) の同時投与により有意に抑制されたが, AMPA/kainate 受容体拮抗薬 CNQX (20 nmol) によっては影響を受けなかった。これらの結果から, 脳内 P2X 受容体を介した鎮痛作用には, 少なくとも一部, 脳内 NA 神経系の起始核の一つである青斑核が関与し, 青斑核内において P2X 受容体刺激を介して遊離されたグルタミン酸による NMDA 受容体の活性化が関与していることが示唆される。

以上, 著者は, 脳内 P2X 受容体の活性化は, 脳内 β_2 -アドレナリン受容体を介して, 侵害受容に対して抑制的に作用し, 従来報告のあった末梢/脊髄レベルでの促進的作用とは対照的であることを初めて明らかにした。さらに, その抑制作用の発現に重要な脳領域として青斑核を特定すると共に, 青斑核内の P2X 受容体を介した作用機序の一部を明らかにした。これらの成果は, 脳内での侵害受容における ATP の役割の一端を明らかにしたものであり, 新規疼痛治療薬の開発に重要な基礎的知見を提供するものである。

論文審査の結果の要旨

人類は未だ痛みを完全にコントロールする術を手にしていない。これを手中にするために痛みとその制御のメカニズムをより詳細に解明することが必要である。アデノシン三リン酸 (ATP) は, 生体におけるエネルギー伝達体としての機能のみならず P2 プリン受容体 (イオンチャネル内蔵型 P2X と G タンパク共役型 P2Y) を介して細胞間情報伝達物質としても機能することが明らかにされつつある。近年, P2X 受容体が末梢組織および脊髄レベルで痛みの発生, 伝達に寄与するしい機構として注目されるつつある。しかし, 脳内での P2 プリン受容体の痛みとの関連については不明であった。著者は, 主として行動薬理学的方法を用いて P2 プリン受容体の侵害受容における役割を検討し, 以下の新知見を得た。

第一章 脳内 P2X 受容体の侵害受容における抑制的役割

ラットの側脳室内に ATP, α, β -meATP (P2X_{1, 3, 2/3} 選択的作動薬), Bz-ATP (P2Xs 選択的作動薬) を 1 - 100 nmol の範囲内で投与すると, 機械的侵害受容閾値は投与 5 分後で最大となる一過性の濃度依存的な上昇を示したが, β, γ -meATP (P2X₁ 選択的作動薬), UTP (P2Xs 選択的作動薬) の投与では有意な作用は生じなかった。また, α, β -meATP の側脳室内投与は, hot-plate 法では有意な抑制作用を発現したが, tali-flick 法では変化が見られなかった。一方, P2X₃/P2X_{2/3} 選択的拮抗薬 A-317491 あるいは P2X₃ 受容体に対するアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドを側脳室内に前処置しておくこと α, β -meATP の機械的侵害受容閾値上昇作用は有意に抑制された。さらに, A-317491 単独の側脳室内投与により, ホルマリン足底内注射および酢酸腹腔内注射によって誘発される侵害受容性反応は有意に増強された。これらの結果は, ATP が脳内においては侵害受容に対して抑制的に働くことを初めて実証したものであり, 本作用には, P2Xs の中でも P2X₃, P2X_{2/3} を介するメカニズムが重要であることを示唆している。

第二章 脳内 P2X 受容体を介した鎮痛作用における脳内 β_2 -アドレナリン受容体の関与

プラプラノロールの皮下前処置により α, β -meATP による鎮痛作用は有意に抑制されたが, フェントラミン皮下前処置

では影響を受けなかった。また、脊髄くも膜下腔内にプラプラノロール、フェントラミンを前処置しても α, β -meATP の鎮痛作用は有影響されなかった。さらに、側脳室内へのプラプラノロールあるいは β_2 -アドレナリン受容体拮抗薬の前処置により有意に抑制されたが、 β_1 -アドレナリン受容体拮抗薬のそれでは無効であった。これらの結果は、脳内 P2X 受容体を介した鎮痛作用発現への脳内 β_2 -アドレナリン受容体の寄与を示唆している。

第三章 脳内 P2X 受容体を介した鎮痛作用における青斑核由来ノルアドレナリン神経系の関与

青斑核由来のノルアドレナリン (NA) 神経を選択的に破壊する DSP-4 の腹腔内に前処置により α, β -meATP の鎮痛作用は有意に減弱された。 α, β -meATP を両側青斑核内へ微量投与すると側脳室内投与の場合よりも低用量で、著明且つ有意な鎮痛作用が惹起された。この作用は、P2Xs 受容体拮抗薬 PPADS あるいは NMDA 受容体拮抗薬 MK-801 との青斑核内同投与によって抑制されたが、AMPA/kainate 受容体拮抗薬 CNQX によっては影響されなかった。一方、in vivo マイクロダイアリス法により測定した青斑核内細胞外グルタミン酸濃度は、灌流液中への α, β -meATP の適用により一過性に有意に上昇した。これらの結果は、脳内 P2X を介した侵害受容抑制作用には、少なくとも一部、脳内 NA 神経系の起始核の一つである青斑核が関与し、同核内での P2X 刺激を介して遊離されたグルタミン酸による NMDA 受容体の活性化が寄与していることを示している。

以上の成果は、侵害受容における脳内 ATP, P2X_{3, 2/3} 受容体の役割の一端を明らかにしたものであり、新規疼痛治療薬開発の基礎的知見として有用であると考えられる。

よって、本論文は博士 (薬学) の論文として価値あるものと認める。

更に、平成16年2月26日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。