

# ATPによる痒みの神経メカニズムの研究

九州大学大学院薬学研究院ライフノベーション分野

津田 誠

## 1. 目的

「痒み」は、掻きたいという欲望を起こさせる感覚である。生理学的には、引掻き行動を誘発させ、皮膚などに付着あるいは侵入する寄生虫などの外敵を除去する、生体防御機構の一つと想定されている。従来、痒みは単に弱い痛みとして認識され、その神経科学的研究は非常に遅れていた。しかし2007年、皮膚から脊髄に感覚情報を伝える一次求心性感覚ニューロンのC線維に発現するガストリン放出ペプチド (GRP) が痒みを特異的に誘発すること (Sun & Chen, 2007), その受容体GRPRを発現する脊髄後角神経もやはり痒み特異的であることが報告され (Sun et al, 2009), 痒みに特化した物質・神経回路の存在が示され、世界に大きな衝撃を与えた。それ以降、痒み刺激を特異的に受容・伝達する神経の特定が次々となされ (Han & Dong, 2014), 現在、痒みの神経メカニズムの解明に向けた世界的な研究潮流が生まれている。

ATPは、細胞内エネルギー源という普遍的な役割以外に、細胞外へ放出されて細胞間情報伝達物質としての役割を有する。ATPは細胞膜上に存在するATP受容体を介して情報を伝達する。ATP受容体は、イオンチャネル型のP2X受容体とGタンパク質共役型のP2Y受容体に大別される。一次求心性感覚ニューロンには複数のATP受容体が発現するが、その中でもC線維に局在するのがP2X受容体サブタイプのP2X3Rである (Chen et al, 1995)。現在までP2X3Rは痛みとの関連性が報告されてきたが、痒みに関する報告はない。そこで本研究では、痒みにおけるP2X3Rの役割について検討した。

## 2. 方法

実験には、C57BL/6マウス、GRPR欠損マウス、*Mrgpra3-Cre*マウスおよび*Rosa26-DTR*マウスを使用した。かゆみ行動は、マウスの頬に起痒薬物を投与し、後肢で投与部位を引っ掻く回数を40分間計測することで評価した (Cheekモデル (Roberson et al, 2013))。初代培養一次求心性ニューロンにおけるCa<sup>2+</sup>イメージング法では、3~4週齢マウスの第3頸髄 (C3) から第2胸髄 (T2) までの後根神経節 (DRG), および三叉神経節 (TG) を摘出し培養後、Ca<sup>2+</sup>感受性蛍光色素Fura2-AMを細胞内に取り込ませ、各種アゴニスト刺激による細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を測定した。免疫組織染色は、4%パラフォルムアルデヒドを灌流して組織固定を行い、DRG (C3~T2) およびTGの凍結切片を作製後、P2X3R抗体を用いて行った。*In vivo*において*MrgprA3*発現一次求心性ニューロンを抑制するため、Na<sup>+</sup>チャネル阻害剤QX-314 (Binshtok et al, 2007)を*MrgprA3*アゴニストであるクロロキン (CQ) と同時に投与することでQX-314を*MrgprA3*発現ニューロン内に取り込ませた。*MrgprA3*発現C線維サブポピュレーションの関与を検討するため、*Mrgpra3-Cre*マウスと*Rosa26-DTR*マウスを掛け合わせて*Mrgpra3-Cre;Rosa26-DTR*マウスを作成し、ジフテリア毒素を投与して*MrgprA3*発現ニューロンを除去した。

## 3. 結果

マウスの頬にP2X3Rアゴニストである $\alpha\beta\text{meATP}$ および内因性アゴニストであるATPを局所投与したところ、同部位への有意な引掻き行動が誘発された。その行動は、選択的P2X3R拮抗薬であるA317491の処置によって抑制された。したがって、P2X3Rの刺激により痒み行動が惹起される可能性が示唆された。

痒みを伝達するDRGおよびTGニューロンにおけるP2X3Rの発現を検証するために、2013年にNature Neurosci誌に報告された*MrgprA3*発現ニューロンに注目した (Han et al, 2013)。*Mrgpra3*プロモーター制御下でGFPを発現するトランスジェニックマウスのDRGおよびTGにおけるP2X3Rの免疫組織染色を行ったところ、GFP陽性ニューロンでP2X3Rが検出され、定量解析の結果、*Mrgpra3*発現ニューロンのうち、DRGでは62%が、TGでは45%がP2X3R陽性であった。さらに、*Mrgpra3*発現ニューロンでP2X3Rが機能しているかどうかを検討するため、初代培養DRGおよびTGニューロンを用いた細胞内Ca<sup>2+</sup>イメージング法を行った結果、*MrgprA3*アゴニストであるCQに反応するニューロンのうちDRGでは62%が、TGでは55%で $\alpha\beta\text{meATP}$ による細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇が観察された。

そこで、P2X3R刺激による痒み行動が*Mrgpra3*発現ニューロンを介しているかどうかを検証するため、QX-314によって*MrgprA3*発現ニューロン活動を抑制したマウスに $\alpha\beta\text{meATP}$ およびATPを投与した。その

結果、コントロールマウスと比較してQX-314処置マウスでは $\alpha\beta$ meATPとATPによる引掻き行動が著明に抑制された。さらに、*MrgprA3-Cre;Rosa26-DTR*マウス (Cre依存的にジフテリア毒素受容体DTRを発現するマウス) を作製し (Han et al, 2013), 同マウスにジフテリア毒素を投与して*MrgprA3*発現ニューロンを除去した後に、同様に $\alpha\beta$ meATPとATPを頬に投与したところ、これらによる引掻き行動が有意に抑制された。

*MrgprA3*発現一次求心性ニューロンは脊髄後角へ入力し痒みを伝達する (Han et al, 2013)。脊髄後角におけるGRPとその受容体GRPRを介したシグナル伝達経路はかゆみ特異的であることが知られている (Sun & Chen, 2007; Sun et al, 2009)。そこで、GRPR欠損マウスを用いて、 $\alpha\beta$ meATPおよびATPの投与によるかゆみ行動を評価した。その結果、野生型マウスと比較して、GRPR欠損マウスでは $\alpha\beta$ meATPおよびATPの投与による引掻き行動が顕著に抑制された。

#### 4. 考察

これまで細胞外ATPに応答する受容体および一次求心性感覚ニューロンに着目した痒み研究は皆無であることから、本研究では、細胞から個体レベルに至る研究から、P2X3Rを介した痒み応答の神経メカニズムを明らかにすることを目的とした。そして、一次求心性感覚ニューロンの中で痒みを伝達する神経線維として最近発見された*MrgprA3*発現C線維サブポピュレーションにP2X3Rが発現し、同ニューロンがP2X3R刺激による痒み行動に必須であることを初めて明らかにした。*MrgprA3*発現ニューロンは、カプサイシン受容体として知られるTRPV1陽性であるが、TRPV1アゴニストのレシニフェラトキシンでTRPV1陽性ニューロンを破壊したマウスでもP2X3R刺激による痒み行動は抑制されたことから支持される。また、*MrgprA3*発現ニューロンの約半数以上にP2X3Rが発現していることから、同ニューロンの活動にP2X3Rが大きな役割を果たしている可能性も示唆される。

P2X3R刺激による痒み行動がGRPR欠損マウスで抑制されたことから、脊髄後角へ入力する*MrgprA3*発現ニューロンからGRPが放出され、それが脊髄後角ニューロンのGRPRを刺激することが、P2X3Rによる痒み伝達経路であることが考えられる。この結果は、脊髄後角における*MrgprA3*発現ニューロン終末がGRPR陽性ニューロンと接していること (Han et al, 2013)、また、CQによる痒み行動がGRPR欠損マウスで著明に抑制されることから支持される (Sun & Chen, 2007)。しかし最近、GRPは脊髄後角内の介在ニューロンにも発現し (Gutierrez-Mecinas et al, 2014; Solorzano et al, 2015)、B型ナトリウム利尿ペプチド (Nppb) 発現一次求心性ニューロンが脊髄後角介在ニューロンからのGRPを放出するという経路の存在も報告されているため (Mishra & Hoon, 2013)、P2X3R刺激による痒み行動におけるこの経路の関与も今後明らかにしていく必要がある。

P2Xタンパク質は3分子会合して一つのイオンチャネルを形成するが、P2X3Rの場合、3分子のP2X3で構成されるホモ受容体と、P2X3とP2X2が混在したヘテロ受容体を形成することができる (Lewis et al, 1995)。そのP2X3/P2X2ヘテロ受容体は、P2X3ホモ受容体とは対照的に、ATPに対する応答が非常に持続的で、しかも脱感作を示さなくなる (Lewis et al, 1995)。したがって、慢性掻痒モデルにおけるP2X3発現ニューロンでのP2X2発現変化が今後の検討課題であると思われる。また、ケラチノサイトを機械刺激することで細胞外へATPが放出されることから (Koizumi et al, 2004)、その放出がアトピー性皮膚炎などの病態時に変化するののかも興味深い。

以上、本研究では、ATPが従来報告されていた痛みにおける役割に加えて、痒み物質としての新しい役割を有していることを初めて明らかにした。さらに、その神経経路として、一次求心性感覚ニューロンの中でも*MrgprA3*発現C線維サブポピュレーションと脊髄後角のGRP-GRPRシグナル系が重要であることも特定した。これらの成果から、P2X3R拮抗薬が新しい痒み治療薬となり得る可能性が考えられる。

#### 5. 参考文献

- Binshtok AM et al. (2007) Inhibition of nociceptors by TRPV1-mediated entry of impermeant sodium channel blockers. *Nature* 449: 607-610
- Chen CC et al. (1995) A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* 377: 428-431
- Gutierrez-Mecinas M et al. (2014) Expression of gastrin-releasing peptide by excitatory interneurons in the mouse superficial dorsal horn. *Mol Pain* 10: 79
- Han L and Dong X (2014) Itch mechanisms and circuits. *Annu Rev Biophys* 43: 331-355
- Han L et al. (2013) A subpopulation of nociceptors specifically linked to itch. *Nature Neurosci* 16: 174-182
- Koizumi S et al. (2004)  $Ca^{2+}$  waves in keratinocytes are transmitted to sensory neurons: the involvement of extracellular ATP and P2Y2 receptor activation. *Biochem J* 380: 329-338
- Lewis C et al. (1995) Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* 377: 432-435.
- Mishra SK and Hoon MA (2013) The cells and circuitry for itch responses in mice. *Science* 340: 968-971
- Roberson DP et al. (2013) Activity-dependent silencing reveals functionally distinct itch-generating sensory neurons. *Nat Neurosci* 16: 910-918
- Solorzano C et al. (2015) Primary afferent and spinal cord expression of gastrin-releasing peptide: message, protein, and antibody concerns. *J Neurosci* 35: 648-657
- Sun YG and Chen ZF (2007) A gastrin-releasing peptide receptor mediates the itch sensation in the spinal cord. *Nature* 448: 700-703

