Functional roles of post-synaptic ATP P2X receptors in spinal deep dorsal horn neurons

Hiroaki Shiokawa¹, Terumasa Nakatsuka², Hidemasa Furue¹
Kazuhide Inoue³ and Megumu Yoshimura¹

¹Department of Integrative Physiology, Graduate School Medical Sciences, Kyushu University

²Department of Physiology, Faculty of Medicine, Saga University

³Division of Biosignaling, National Institute of Health Sciences

[Received 15 December 2004, Accepted 17 January 2005]

Abstract

ATP P2X receptor, a family of non-selective cation channels gated by extracellular ATP, may play an important role on synaptic transmission in CNS. It has been demonstrated that the activation of spinal P2X receptors results in thermal hyperalgesia and allodynia. Multiple subtypes of P2X receptors are expressed at the central terminals of primary afferents as well as postsynaptic dorsal horn neurons in the spinal cord. Our recent findings have shown that presynaptic P2X receptors enhance glutamate release at central terminals in dorsal horn. Although P2X receptors are also expressed at a subpopulation of dorsal horn neurons, it is still unknown which subtype of P2X receptors can functionally activate postsynaptic dorsal horn neurons. In this study, we demonstrate the distinct subtypes of P2X receptors are expressed at the postsynaptic sites of deep dorsal horn neurons using patch-clamp recordings in spinal cord slices. Bath application of ATP γ S (100 μ M), broad ATP analog induced inward currents in about 40% of deep dorsal horn neurons examined and significantly increased mEPSC frequency in almost all deep dorsal horn neurons. ATP γ S-induced inward currents were not inhibited by adding GDP- β -S into patch-pipette solution, which indicate that the ATP γ S-induced inward currents are not mediated by spinal P2Y receptors. Bath application of α,β -methylene ATP (100 μ M) did not induce any inward current, but increased mEPSC frequency in almost all deep dorsal horn neurons tested. In addition, these ATP γ S-induced inward currents were completely blocked by PPADS (10 μ M), but not by TNP-ATP (20 μ M). These results suggested that distinct subtypes of P2X receptors are expressed at both pre- and post-synaptic sites and that their activations enhance the excitability of spinal deep dorsal horn neurons in different manners.

Key words: ATP; P2X receptors; Spinal cord; Pain; Patch-clamp method

脊髄後角深層細胞に発現する ATP P2X 受容体の機能意義

塩川 浩輝¹ / 中塚 映政² / 古江 秀昌¹

井上 和秀³ / 吉村 恵¹

¹九州大学医学研究院統合生理学

²佐賀大学医学部医学科生体構造機能学

³国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部

はじめに

近年、ATP P2X 受容体は末梢における痛覚受容に関与するだけでなく、脊髄後角においても侵害性感覚情報を増強することが明らかとなり、その役割が大変注目されている¹⁻³⁾。脊髄後角は細胞形態や入力線維の違いなどから、第Ⅰ層から第Ⅵ層に分類されている。表層の脊髄第Ⅰ層ならびに脊髄膠様質(第Ⅱ層)は、末梢からの侵害性感覚情報を選択的に受容する細胞が集積している。一方、脊髄深層細胞である第Ⅲ～Ⅵ層細胞は、侵害性感覚情報のみならず様々な感覚情報の入力を受けている。特に、脊髄第Ⅴ層細胞は、脊髄第Ⅰ層細胞と同様に感覚情報をさらに中枢へ投射する脊髄視床路細胞が密に存在することが知られている。

脊髄後角表層あるいは深層細胞に入力する一次求心性線維終末に異なる P2X 受容体が発現している。そのシナプス前における P2X 受容体の活性化に伴って、神経終末から興奮性伝達物質であるグルタミン酸や神経ペプチドの放出を増強させ、脊髄後角細胞の興奮性を高めることを報告してきた^{1,2,4,8,9)}。一方、シナプス後細胞における ATP 受容体の役割に関して、これまでは主に脊髄表層細胞を対象に研究がなされてきた。脊髄膠様質細胞の約半数に ATP 受容体が発現しており、非選択性陽イオンチャネルの開孔によって内向き電流を生じるという報告がなされているが⁵⁻⁷⁾、その受容体の薬理学的特性などの詳細は明らかではない。さらに、脊髄後角深層のシナプス後細胞における ATP 受容体の役割を検討した研究は未だ報告されていない。今回、我々は脊髄後角深層のシナプス後細胞に発現する ATP 受容体に注目し、電気生理学および薬理的に解析を行った。

方 法

1. 脊髄横断スライスの作製

14～21 日齢の Sprague-Dawley 系ラットをウレタン腹腔内投与(1.2～1.5 g/kg)にて深麻酔を施行した後、腰仙部レベルの椎弓切除を行った。脊髄を摘出して、直ちに冷却した人工脳脊髄液(2～4℃)を浸したシャーレに移した。実体顕微鏡下に摘出脊髄の硬膜を除去した後、前根および後根を切除した。くも膜および軟膜を除去した後、浅い溝を形成した

Fig. 1 Effect of ATP γ S in lamina V neurons.

(A) In approximately 40% of lamina V neurons (19/52 cells), ATP γ S (100 μ M) produced inward currents and increased sEPSC frequency. (B) In approximately 60% of lamina V neurons (33/52 cells), ATP γ S (100 μ M) only increased sEPSC frequency.

ブロック状の寒天上に置き固定した。マイクロサライサーを用いて厚さ 500 μ m 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% O₂–5% CO₂ 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, NaH₂PO₄ 1.2 mM, CaCl₂ 2.5 mM, MgCl₂ 1.2 mM, NaHCO₃ 25 mM, Glucose 11 mM であった。

2. 細胞内記録

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Ⅴ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Ⅴ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Ⅴ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, CaCl₂ 0.5 mM, MgCl₂ 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 5～10 M Ω 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(HEKA 社製, EPC-9)により増幅し、データ記録および解析用ソフト(AD Instruments 社製, Maclab)を用いて、記録ならびに解析した。

Fig. 2 Dose-dependency of the ATP γ S-induced inward currents in lamina V neurons.

(A) The ATP γ S-induced inward currents were enhanced in amplitude with increasing concentrations. (B) Normalized amplitude of the ATP γ S-induced inward currents was plotted against the ATP γ S concentration. Vertical bar indicates S.E.M. (n=3-6).

結 果

脊髓後角神経細胞に発現する ATP 受容体の作用

脊髓第 V 層細胞からパッチクランプ記録を行い、膜電位を -70 mV で電位固定して電気応答を観察した。まず、代謝安定型の ATP 受容体作動薬である ATP γ S の作用を検討した。ATP γ S は P2X 受容体ならびに P2Y 受容体に作用する広作動域の ATP 受容体作動薬である。ATP γ S を脊髓スライス標本に 1 分間灌流投与すると、殆ど全ての脊髓第 V 層細胞において自発性興奮性シナプス後電流の発生頻度の増強作用が観察された (n=52)。この自発性興奮性シナプス後電流の発生頻度の増強作用は、シナプス前の P2X 受容体の活性化に伴う神経終末内シナプス小胞からの興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の遊離増強作用によることを過去に報告しているので (1,2,4,8,9)，その性質は調べなかった。また、記録した約 40% の細胞において、ATP γ S の灌流投与によって、自発性興奮性シナプス後電流の発生頻度の増強作用に加えて、内向き電流が誘起された (n=19, **Fig. 1A**)。ATP γ S (100 μ M) の灌流投与によって生じた内向き電流の平均膜電流の変化量は 10 ± 3 pA (n=19) であった。一方、残りの約 60% の細胞にお

Fig. 3 Voltage dependency of the ATP γ S-induced currents.

Amplitude of membrane currents in response to voltage pulses having a duration of 320 ms from -60 mV to $+40$ mV was plotted against voltages in the absence (filled triangles) and presence (open triangles) of ATP γ S (100 μ M). The current-voltage relationship for net ATP γ S current was estimated from the difference between the current responses in the absence and presence of ATP γ S (open circles).

Fig. 4 ATP γ S-induced inward currents in lamina V neurons were not mediated by P2Y receptors. P2Y agonists did not induce any inward current.

Fig. 5 ATP γ S-induced inward currents in lamina V neurons were not mediated by P2Y receptors. The ATP γ S-induced inward current did not change by the addition of GDP- β -S into the pipette solution.

Fig. 6 Effect of $\alpha\beta$ me-ATP in lamina V neurons.

(A) In approximately 40% of lamina V neurons, ATP γ S (100 μ M) induced inward currents and increased sEPSC frequency. In the same neurons, $\alpha\beta$ meATP (100 μ M) did not produce any inward current, but only increased sEPSC frequency. (B) In approximately 60% of lamina V neurons, ATP γ S (100 μ M) only increased sEPSC frequency. In the same neurons, $\alpha\beta$ meATP (100 μ M) did not induce any inward current, but only increased sEPSC frequency.

いて、自発性興奮性シナプス後電流の発生頻度の増強作用は観察されたが、内向き電流は発生しなかった ($n=33$, **Fig. 1B**).

ATP γ S の灌流投与によって生じる内向き電流は、ATP γ S の濃度の増加とともに大きくなった ($n=8$, **Fig. 2**). また、ATP γ S (100 μ M) の灌流投与によって内向き電流が観察される細胞において、ATP γ S

非存在下と ATP γ S (100 μ M) 存在下のそれぞれで電流-電圧関係を調べた. ATP γ S の作用によって膜コンダクタンスは電位依存性に増加し、ATP γ S 誘起膜電流の逆転電位は -1.3 ± 4.7 mV であった ($n=4$, **Fig. 3**). したがって、ATP γ S 投与によって生じる膜電流の変化には、シナプス後細胞に存在する非選択的陽イオンチャネルの関与が示唆された.

Fig. 7 Effects of P2X receptor antagonists on ATP γ S-induced inward current in lamina V neurons. TNP-ATP (20 μ M) did not significantly inhibit ATP γ S-induced inward currents. In contrast, ATP γ S-induced inward currents were completely abolished in the presence of PPADS (20 μ M).

ATP γ S の灌流投与によって生じる内向き電流に P2Y 受容体が関与しているかどうかを検討した。ATP γ S (100 μ M) によって内向き電流を生じた脊髄第 V 層細胞において、P2Y 受容体作動薬である UTP (100 μ 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 ($n=3$, Fig. 4)。また、異なる P2Y 受容体作動薬の 2MeSATP (100 μ M) を灌流投与しても、内向き電流は全く観察されなかった ($n=3$, Fig. 4)。さらに、ATP γ S の灌流投与によって生じる内向き電流に 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- β -S (2 mM) を加えて実験を行った。記録直後に ATP γ S (100 μ M) の灌流投与によって内向き電流を生じた脊髄後角深層細胞に対して、1 時間後に再度 ATP γ S (100 μ M) を灌流投与したが、内向き電流に変化は観察されなかった ($n=4$, Fig. 5)。したがって、脊髄後角深層細胞において ATP γ S によって生じた内向き電流は、細胞内 G 蛋白質を介していなかった。すなわち、ATP γ S

によって生じた内向き電流の発生には、P2Y 受容体ではなく、P2X 受容体を関与している可能性が推察された。

ATP γ 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 P2X 受容体が関与しているかを調べるために、薬理的に検討を行った。代謝安定型の P2X 受容体作動薬である α,β -methylene ATP (100 μ M) を灌流投与すると、殆ど全てにおいて自発性興奮性シナプス後電流の発生頻度の増強作用が観察されたが、内向き電流は全く観察されなかった ($n=12$, Fig. 6)。さらに、P2X 阻害薬の存在下において、ATP γ S によって生じる内向き電流の変化を観察した。P2X 受容体拮抗薬である PPADS (10 μ M) によって、ATP γ S (100 μ M) 投与によって生じる内向き電流は完全に阻害された ($n=5$, Fig. 7)。一方、異なる P2X 受容体拮抗薬である TNP-ATP (20 μ M) の存在下において、ATP γ S (100 μ M) 投与によって生じた内向き電流は全く阻害されなかった ($n=5$, Fig. 7)。

考 察

ATP 受容体が神経伝達物質として作用するという考え方が 1970 年代に提唱された。1993 年に ATP 受容体のクローニングを契機に ATP に関連する研究が盛んに行われ、様々な組織細胞に ATP 受容体が発現し、多様な生理作用を示すことが明らかとなっている¹³⁻¹⁷。ATP 受容体は P2X と P2Y に大別されるが、両者では全く構造が異なる。P2X 受容体がイオンチャネル型受容体であるのに対し、P2Y 受容体は G 蛋白質結合型受容体である。P2X 受容体はこれまでに 7 つの種類のサブユニット (P2X1 ~ 7) がクローニングされており、各々 400 ~ 600 個のアミノ残基からなる。各々のサブユニットは 2 回膜貫通型構造をとり、3 つのサブユニットが合わさって非選択性陽イオンチャネルを形成する。現在、単一のサブユニットからなる P2X1 ~ 5, P2X7 受容体と複数のサブユニットからなる P2X1/5, 2/3, 2/6, 4/6 受容体が機能的に認知されている。今回の実験結果において、記録した約 4 割の脊髄第 V 層細胞において、代謝安定型で P2X, P2Y 受容体に広く作用する ATP γ S の灌流投与によって、内向き電流が観察された。さらに、この内向き電流は P2Y 受容体ではなく、P2X 受容体を介していた。代謝安定型

の P2X 受容体作動薬である α,β -methylene ATP を投与すると、以前我々が報告した結果と同様に^{2,9)}、殆ど全ての脊髄第 V 層細胞において自発性興奮性シナプス後電流の発生頻度の増強効果が観察された。すなわち、脊髄第 V 層細胞のシナプス前には α,β -methylene ATP に感受性のあるサブタイプの P2X 受容体が発現しており、その活性化に伴って興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の遊離増強が起こったことが示唆された。しかしながら、 α,β -methylene ATP を灌流投与しても脊髄第 V 層細胞において内向き電流は観察されなかった。したがって、脊髄第 V 層のシナプス後細胞に発現し、内向き電流の発生に関与する P2X 受容体は、 α,β -methylene ATP に感受性がなく、シナプス前に発現する P2X 受容体と異なるサブタイプであると考えられた。さらに、ATP γ S 投与によって生じた内向き電流は、P2X 受容体拮抗薬の PPADS (10 μ M) によって完全に阻害されたが、TNP-ATP (20 μ M) には影響を受けなかった。これまでに様々な ATP 受容体作動薬や阻害薬の開発が行われてきたが^{13,14,16)}、いまだ各々のサブタイプに選択性の高い薬物がない。従来の ATP 研究の結果から薬理学的に考慮すると、脊髄第 V 層細胞のシナプス後細胞に発現している ATP 受容体のサブタイプは P2X5 もしくは P2X2/6 受容体であると推察された。

介在細胞を密に分布する脊髄膠様質において、約半数のシナプス後細胞に何らかの ATP 受容体が発現し、その活性化によって内向き電流を生じることが報告されている⁵⁾。また、この脊髄膠様質において、P2X 受容体は GABA や Glycine を含有する抑制性介在細胞に発現しており、その活性化に伴って GABA や Glycine などの抑制性神経伝達物質の放出を促進することが知られている¹⁰⁻¹²⁾。今回の結果から、脊髄第 V 層細胞のシナプス前には α,β -methylene ATP に感受性を有するサブタイプの P2X 受容体が発現し、その活性化によりグルタミン酸の遊離増強を惹起する。さらに、シナプス後細胞には P2X5、あるいは P2X2/6 受容体が発現しており、その活性化に伴って、直接的に脊髄第 V 層細胞が脱分極することが明らかとなった。このように様々なサブタイプの P2X 受容体が広く脊髄後角に分布しており、P2X 受容体は末梢からの感覚情報を多彩に修飾していることが示唆された。

結 語

脊髄後角深層細胞において、シナプス前とシナプス後細胞においては異なるサブタイプの P2X 受容体が発現しており、それぞれ異なった機序で感覚情報を修飾することが示唆された。

文 献

- 1) Gu, J.G. and MacDermott, A.B., Activation of ATP P2X receptors elicits glutamate release from sensory neuron synapses, *Nature*, 389 (1997) 749-753.
- 2) Nakatsuka, T. and Gu, J.G., ATP P2X receptor-mediated enhancement of glutamate release and evoked EPSCs in dorsal horn neurons of the rat spinal cord, *J. Neurosci.*, 21 (2001) 6522-6531.
- 3) Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Salter, M.W. and Inoue, K., P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury, *Nature*, 424 (2003) 778-783.
- 4) Nakatsuka, T., Furue, H., Yoshimura, M. and Gu, J.G., Activation of central terminal vanilloid receptor-1 receptors and α,β -methylene-ATP-sensitive P2X receptors reveals a converged synaptic activity onto the deep dorsal horn neurons of the spinal cord, *J. Neurosci.*, 22 (2002) 1228-1237.
- 5) Li, J. and Perl, E.R., ATP modulation of synaptic transmission in the spinal substantia gelatinosa, *J. Neurosci.*, 15 (1995) 3357-3365.
- 6) Bardoni, R., Goldstein, P.A., Lee, C.J., Gu, J.G. and MacDermott, A.B., ATP P2X receptors mediate fast synaptic transmission in the dorsal horn of the rat spinal cord, *J. Neurosci.*, 17 (1997) 5297-5304.
- 7) Li, P., Calejesan, A.A. and Zhuo, M., ATP P2x receptors and sensory synaptic transmission between primary afferent fibers and spinal dorsal horn neurons in rats, *J. Neurophysiol.*, 80 (1998) 3356-3360.
- 8) Nakatsuka, T., Tsuzuki, K., Ling, J.X., Sonobe, H. and Gu, J.G., Distinct roles of P2X receptors in modulating glutamate release at different primary sensory synapses in rat spinal cord, *J. Neurophysiol.*, 89 (2003) 3243-3252.
- 9) Nakatsuka, T., Shiokawa, H., Fujita, T., Inoue, K., Yoshimura, M. and Kumamoto, E., The interaction of ATP and adenosine in spinal nociceptive transmission, *Pain Research*, 19 (2004) 133-139.
- 10) Jo, Y.H. and Schlichter, R., Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons, *Nat. Neurosci.*, 2 (1999) 241-245.
- 11) Hugel, S. and Schlichter, R., Presynaptic P2X receptors facilitate inhibitory GABAergic transmission between cultured rat spinal cord dorsal horn neurons, *J. Neurosci.*, 20 (2000) 2121-2130.

- 12) Labrakakis, C., Tong, C.K., Weissman, T., Torsney, C. and MacDermott, A.B., Localization and function of ATP and GABAA receptors expressed by nociceptors and other postnatal sensory neurons in rat, *J. Physiol.*, 549 (2003) 131-142.
- 13) North, R.A. and Surprenant, A., Pharmacology of cloned P2X receptors, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 40 (2000) 563-580.
- 14) North, R.A., Molecular physiology of P2X receptors, *Physiol. Rev.*, 82 (2002) 1013-1067.
- 15) North, R.A. and Barnard, E.A., Nucleotide receptors., *Curr. Opin. Neurobiol.*, 7 (1997) 346-357.
- 16) Khakh, B.S., Burnstock, G., Kennedy, C., King, B.F., North, R.A., Seguela, P., Voigt, M. and Humphrey, P.P., International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits, *Pharmacol. Rev.*, (2001) 107-118.
- 17) Collo, G., North, R.A., Kawashima, E., Merlo-Pich, E., Neidhart, S., Surprenant, A. and Buell, G., Cloning of P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels, *J. Neurosci.*, 16 (1996) 2495-2507.

Address for correspondence: Hiroaki Shiokawa, M.D.

Department of Integrative Physiology, Graduate School Medical Sciences, Kyushu University
Maidashi 3-1-1, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

Tel: +81-92-642-6089; FAX: +81-92-642-6093