結腸の疼痛及び炎症におけるガス状情報伝達物質硫化水素の役割

坪田 真帆,* 川畑 篤史

Role of Hydrogen Sulfide, a Gasotransmitter, in Colonic Pain and Inflammation

Maho Tsubota* and Atsufumi Kawabata

*Division of Pharmacology and Pathophysiology, Kinki University School of Pharmacy,
3-4-1 Kowakae, Higashi-Osaka, Osaka 577-8502, Japan.*

(Received August 10, 2014)

Hydrogen sulfide (H_2S), the third known gaseous transmitter following nitric oxide and carbon monoxide, is generated by multiple enzymes including cystathionine- γ -lyase (CSE) *in vivo*. We previously demonstrated that H_2S activates $\text{Ca}_v3.2$ T-type Ca^{2+} channels expressed on sensory neurons, leading to hyperalgesia and facilitation of inflammation. Here, we describe the role of H_2S in processing of colonic pain and inflammation. Intracolonic (i.col.) administration of NaHS, an H_2S donor, to mice evoked colonic pain-like nociceptive behavior and referred hyperalgesia accompanied by phosphorylation of ERK in the superficial layers of spinal dorsal horn, a marker for excitation of nociceptive neurons. The pronociceptive effect of NaHS was abolished by inhibitors or knockdown of $\text{Ca}_v3.2$ and by an inhibitor of TRPA1, another target molecule of H_2S . In rats with colitis induced by 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS), on the other hand, repeated i.col. administration of NaHS prevented colonic ulcer and inflammatory symptoms, which were inhibited by ablation of capsaicin-sensitive sensory neurons or T-type Ca^{2+} channel inhibitor. NaHS, given i.col., caused phosphorylation of ERK in the spinal dorsal horn of rats with TNBS-induced colitis, but not of naïve rats. In TNBS-treated rats, $\text{Ca}_v3.2$ was upregulated in the dorsal root ganglia, while CSE was downregulated in the colon. Taken together, these findings suggest that inhibitors of the CSE/ H_2S / $\text{Ca}_v3.2$ or TRPA1 pathways might be useful for the treatment of colonic pain diseases such as irritable bowel syndrome, while H_2S donors or $\text{Ca}_v3.2$ activators might be useful for the treatment of inflammatory bowel disease including Crohn's disease.

Key words—hydrogen sulfide; $\text{Ca}_v3.2$; transient receptor potential ankyrin 1; visceral pain; colonic inflammation

1. はじめに

硫化水素 (hydrogen sulfide; H_2S) は、有毒な火山ガスの1つであり、登山者が高濃度の H_2S を吸引し、死亡する事故が稀に起こる。また、日本では2008年ごろに H_2S を用いた自殺が相次ぎ社会問題となった。このように H_2S は毒性の強いガスとして有名だが、哺乳動物の生体内で酵素的に生成され、一酸化窒素や一酸化炭素につぐ、第3のガス状情報伝達物質として機能していることが明らかにされている。

本稿では H_2S の産生経路及び標的分子について

概説し、内臓痛及び結腸炎症における役割についてわれわれの知見を中心に紹介する。

2. H_2S の産生経路

生体内における H_2S 濃度は、以前まではヒト血漿中に $50\ \mu\text{M}$ 、ラット脳組織中に $100\ \mu\text{M}$ 程度とされていたが、測定方法に問題があり、現在の改良された測定方法からマウス及びラットの肝臓及び脳組織中において数 nM ～数 μM 程度ではないかと考えられている。¹⁾ H_2S は、L-システインから pyridoxal-5'-phosphate 依存性に cystathionine- γ -lyase (CSE) あるいは cystathionine- β -synthase (CBS) によって生成されるほか、cysteine amino transferase (CAT) と 3-mercaptopyruvate sulfur-transferase (3MST) によっても産生される。^{2,3)} ごく最近では、ネガティブコントロール (陰性対照) として用いられていた D-システインを外来性に投与することで D-amino acid oxidase と 3MST によっ

The authors declare no conflict of interest.

近畿大学薬学部医療薬学科病態薬理学研究室 (〒577-8502 大阪府東大阪市小若江 3-4-1)

*e-mail: maho@phar.kindai.ac.jp

本総説は、日本薬学会第134年会シンポジウム S15 で発表した内容を中心に記述したものである。

Fig. 1. H₂S-generating Pathways in the Mammalian Body
CSE: cystathionine-γ-lyase, CBS: cystathionine-β-synthase, CAT: cysteine aminotransferase, 3MST: 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase.

て H₂S が産生される経路が新たに報告されている。⁴⁾ また、酵素反応以外に口腔内や腸内ではバクテリアによって H₂S が産生されることが知られており、それぞれ歯周病及び炎症性腸疾患への関与が示唆されている (Fig. 1)。⁵⁻⁸⁾

3. H₂S の標的分子

H₂S は、イオンチャネル、アデニル酸シクラーゼ、ホスホジエステラーゼ、MAP キナーゼ、一酸化窒素、一酸化窒素合成酵素、一酸化炭素合成酵素など多様な分子に作用することが明らかにされている。⁹⁾ イオンチャネルについては、カリウムチャネル、電位依存性カルシウムチャネル、transient receptor potential (TRP) チャネル及びクロライドチャネルなどが H₂S により活性化あるいは阻害されることが報告されている。⁹⁾ われわれは、パッチクランプ法により神経前駆様 NG108-15 細胞やマウス脊髄後根神経節 (dorsal root ganglia; DRG) 細胞において、H₂S 供与体である NaHS が低電位活性化型カルシウムチャネル、すなわち T 型カルシウムチャネルの 3 つのサブタイプ Ca_v3.1-3.3 のうち Ca_v3.2 を介する膜電流を増加させることを電気生理学的に証明し、H₂S/Ca_v3.2 系が痛みの発現及び神経突起伸長に関与することを明らかにしている。¹⁰⁻¹²⁾ さらに、H₂S による痛み発現には Ca_v3.2 に加えて transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) も関与する可能性が示唆されている。^{13,14)}

4. 疼痛制御における H₂S の役割

われわれは、ラット後肢足底内及び脊髄クモ膜下腔内に H₂S 供与体である硫化水素ナトリウム (sodium hydrogen sulfide; NaHS) を投与することにより機械的痛覚過敏が誘起されることを見出し、これは T 型カルシウムチャネル阻害薬及びアンチセ

ンス法による Ca_v3.2 のノックダウンにより消失することを明らかにしている。^{15,16)} また、ラット第 5 腰神経切断及び抗悪性腫瘍薬パクリタキセルによる神経障害性疼痛が CSE 阻害薬、T 型カルシウムチャネル阻害薬及び Ca_v3.2 のノックダウンにより抑制されることを報告し、第 5 腰神経切断による神経障害性疼痛モデルでは、脊髄 L4-6 レベルの DRG において Ca_v3.2 の発現誘導が認められることを証明している。¹⁷⁾ 一方、パクリタキセルによる神経障害性疼痛においては DRG 中の Ca_v3.2 の発現誘導は認められないが、後肢組織中の H₂S 量の増加及び Ca_v3.2 を阻害することが知られるアスコルビン酸量の低下が認められる。^{18,19)} これらの知見は、神経障害性疼痛の病態に H₂S/Ca_v3.2 系の機能亢進が関与することを示唆する。さらに、われわれは、結腸痛、膵臓痛及び膀胱痛を含む内臓痛に H₂S が関与していることを見出した。マウスにおいて、NaHS を結腸内へ投与することで結腸痛が誘起されるほか^{10,20,21)} セルレインの反復投与により誘起される膵炎に伴う膵臓痛及びシクロホスファミド腹腔内投与により生じる膀胱炎に伴う膀胱痛は、H₂S 合成酵素の 1 つである CSE の阻害薬及び T 型カルシウムチャネル阻害薬によって抑制される。^{20,21)} また、これらの膵炎及び膀胱炎発症マウスから摘出したそれぞれ膵臓及び膀胱組織では、CSE のタンパク発現量増加が認められる。^{20,21)}

TRPA1 チャネルを強制発現させた CHO 細胞において H₂S が細胞内カルシウム濃度を上昇させることが報告され、TRPA1 が H₂S の標的分子であることが示唆された。²²⁾ そこで、われわれは、H₂S の疼痛発現における TRPA1 の関与を検討し、NaHS の足底内投与により誘起される機械的痛覚過敏が TRPA1 阻害薬及び TRPA1 のノックダウンによっても抑制されることを証明し、¹³⁾ Ca_v3.2 に加えて TRPA1 が H₂S による痛覚過敏に関与することを明

坪田真帆

2005 年近畿大学薬学部薬学科卒業、2007 年近畿大学大学院薬学研究科博士前期課程修了、同年博士後期課程入学、2008 年近畿大学大学院薬学研究科博士後期課程中退、同年近畿大学薬学部病態薬理学研究室 (川畑篤史教授) 助手、2012 年同研究室にて博士 (薬学) 取得、2013 年より同研究室助教。研究テーマは「内臓痛発現のメカニズムについて」。

Fig. 2. Effect of Intracolonic Administration of NaHS in Conscious Mice

NaHS at 0.05–50 nmol/mouse (1–1000 μ M solution) in a volume of 50 μ L was administered intracolonic to mice. (A) Nociceptive behavior was observed for 30 min immediately after intracolonic (i.col.) administration. (B) Assessment of referred allodynia/hyperalgesia was performed 30 min after the administration. Data show the mean with S.E.M for 11–12 (A) or 9–16 (B). * p < 0.05, ** p < 0.01 vs. vehicle.¹⁰⁾

らかにした。同様に、TRPA1 ノックアウトマウスでは H_2S 誘起痛覚過敏が消失するとの知見も報告された。²³⁾ 一方、CSE によって内因性に産生される H_2S が関与するシクロホスファミド誘起膀胱炎に伴う膀胱痛や^{14,21)}セルレイン誘起脾炎に伴う脾臓痛は、TRPA1 阻害薬や TRPA1 のノックダウンの影響を受け難いとの知見を得ている。このことより、TRPA1 は正常状態で外来性に投与された H_2S 供与体による痛みには関与するが、炎症などの病態時に産生される内因性 H_2S による痛みの発症における役割は $Ca_v3.2$ に比べて小さいとわれわれは考えている。疼痛情報伝達において H_2S が促進的な役割を果たしていることは、われわれ以外のグループによっても確認されているが、^{24–26)} ラットにおいて、 H_2S が ATP 感受性カリウムチャネルを活性化することで結腸バルーン伸展刺激に対する侵害受容反応を抑制するとの報告もある。²⁷⁾ しかし、 H_2S には平滑筋弛緩作用があるため、これがバルーン刺激に対する反応性に影響を及ぼした可能性を否定できない。²⁸⁾

5. H_2S の結腸痛における役割

Laird らはマウスの結腸内に TRPV1 アゴニストであるカプサイシンを投与することにより下腹部への舐め行動などの内臓痛様侵害受容行動が認められ、von Frey filament による下腹部刺激に対する侵害受容反応の増加すなわち関連痛覚過敏が認められることを明らかにし、本モデルは結腸痛の評価に有用で

あることを示唆している。²⁹⁾ そこでわれわれは、カプサイシンの代わりに NaHS をマウス結腸内に投与し、同様の内臓痛様侵害受容行動と腹部関連痛覚過敏が誘起されることを見出した (Fig. 2)。これらの結果から、結腸内腔の H_2S は結腸痛を誘起することが明らかとなった。¹⁰⁾

末梢組織に痛み刺激を与えて侵害受容ニューロンを興奮させると数分以内に知覚神経が入力する部位の脊髄後角ニューロンの細胞体において extracellular signal-regulated kinase (ERK) のリン酸化が起こることが知られている。³⁰⁾ そこで NaHS の結腸内投与により、侵害受容ニューロンが実際に活性化されるか否かを調べるため、免疫染色法により脊髄のリン酸化 ERK の検出を試みた。NaHS をマウス結腸内に投与し 5 分後に灌流固定した脊髄を用いてリン酸化 ERK 染色を行ったところ、vehicle 処置マウスに比べ、NaHS を投与したマウスの脊髄切片において明らかに多くのリン酸化 ERK が検出された (Fig. 3)。さらに、リン酸化 ERK 陽性細胞数の合計値を脊髄 T13–L1, L2–L4 及び L5–S1 レベル毎に比較したところ、結腸からの侵害受容ニューロンが多く入力する T13–L1 及び L5–S1 レベルにおいて著しい増加が認められた。これらの結果より、結腸内の H_2S が侵害受容ニューロンを興奮させることが物質的にも裏付けられた。¹⁰⁾

次に、 H_2S による結腸痛の発現メカニズムを検討した。その結果、T 型カルシウムチャネル阻害薬及

Fig. 3. Phosphorylation of ERK in the Spinal Cord after i.col. Administration of NaHS in Mice

NaHS at 5 nmol/mouse or vehicle in a volume of 50 μ L was administered intracolonic to anesthetized mice. The spinal cord sections at T13-L1, L2-L4 and L5-S1 levels were prepared for immunostaining of phosphorylated ERK (p-ERK). (A, B) Typical microphotographs of p-ERK immunostaining in the spinal cord sections at T13-L1 levels after i.col. administration of NaHS in mice. (C) The number of p-ERK positive cells was determined bilaterally in total (laminae I-X) at T13-L1, L2-L4 or L5-S1 levels. Data show the mean with S.E.M for 16 (4 mice) slices. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. vehicle.⁽¹⁰⁾

び $\text{Ca}_v3.2$ のノックダウンにより, NaHS 誘起結腸痛及び腹部関連痛覚過敏が抑制され, NaHS 誘起結腸痛の発現に $\text{Ca}_v3.2$ の活性化が関与することが明らかになった.^{10,14)} この H_2S による $\text{Ca}_v3.2$ の活性化メカニズムはまだよく分かっていないが, $\text{Ca}_v3.2$ はチャネルのドメイン I の細胞外第 2 ループ 191 番目のヒスチジン残基に結合する亜鉛により恒常的に抑制されており,³¹⁾ H_2S はこの亜鉛抑制を解除することでチャネルを活性化するのではないかとわれわれは考えている. この仮説を裏付ける知見として, 亜鉛キレーターを結腸内に投与した場合, NaHS と同様の内臓痛様行動及び腹部関連痛覚過敏が誘起され, これらの反応は T 型カルシウムチャネル阻害薬により抑制されることを明らかにしている.³²⁾ 一方, NaHS 誘起結腸痛及び腹部関連痛覚過敏は TRPA1 阻害薬によっても抑制されることをわれわれ

は報告している.¹⁴⁾ この H_2S による TRPA1 活性化のメカニズムに関しては, TRPA1 分子の細胞内 N 末ドメイン中の 422 番目と 622 番目のシステイン残基 (ヒトでは 421 番目と 621 番目) をセリンに置き換えることで H_2S による細胞内カルシウム流入が消失することが報告されており,²³⁾ H_2S はこれらのシステイン残基の -SH 基を -SSH 基に変換する sulphhydration 反応を引き起こすことで³³⁾ チャネルの活性化を誘起するのではないかと考えられている.

6. H_2S の結腸炎症における役割

Wallace らは, 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) 誘起結腸炎ラットにおいて結腸内投与した NaHS が粘膜保護作用を示すことを報告している.³⁴⁾ この NaHS の結腸粘膜保護作用のメカニズムは未解明であったことより, われわれは NaHS による知覚神経興奮作用と粘膜保護作用の関連性について検討を行うことにした. 知覚神経は内臓痛の情報伝達に関与するだけでなく, 内臓炎症にも影響を及ぼすことが知られている. 知覚神経の過剰な興奮が神経因性炎症を誘起することはよく知られているが, 軽度の興奮により神経終末から遊離される神経ペプチドは細胞保護的に作用し消化管粘膜における炎症を抑制することが報告されている.^{35,36)} また, 上述のように, H_2S は主に $\text{Ca}_v3.2$ を介して知覚神経を興奮させることから, 結腸内投与した NaHS の保護効果に $\text{Ca}_v3.2$ を介する知覚神経の興奮が関与する可能性が考えられる. そこで, TNBS 誘起結腸炎モデルにおける H_2S の保護効果に知覚神経及び T 型カルシウムチャネルが関与するか否かを検討した. ラットの結腸内へ TNBS を投与し, 3 日後に摘出した結腸を観察したところ, 明らかな潰瘍と, 粘膜・粘膜下層の浮腫による結腸壁の肥厚が認められ, これらの病変は NaHS を TNBS 投与開始日より 1 日 2 回 4 日間反復投与することにより抑制された. 次に, カプサイシンの大量投与により一次知覚神経 C 線維の影響を除去したラットを用いて同様の検討を行ったところ, TNBS により生じた潰瘍に対する NaHS の抑制効果は消失した. さらに, 潰瘍及び炎症の程度をダメージスコアとして評価し, 粘膜浮腫の指標として結腸壁の厚さを測定したところ, TNBS により増加したダメージスコア及び結腸壁の肥厚は NaHS 処置により抑制され, この保護効果はカプサイシン処置によりほとんど消失

Fig. 4. Effect of Ethosuximide, a T-type Ca^{2+} Channel Blocker, on the Colonic Protection Caused by NaHS in Rats with TNBS-evoked Colitis

The rats received NaHS at $30 \mu\text{mol/kg}$ or vehicle twice daily for 4 d after TNBS. Ethosuximide at 50 mg/kg or vehicle was repeatedly administered i.p. to rats 45–60 min before each dose of i.col. NaHS or vehicle. (A) Typical photographs of the colon. (B, C) Visible damage of the colonic was scored on 0–10 scale (B), and the wall thickness of the middle part of the colon was measured with calipers (C). Data show the mean with S.E.M. for 6–16 rats.³⁷⁾

した。この結果より、TNBS 誘起結腸炎に対する NaHS の保護効果に知覚神経の興奮が関与することが示唆された。³⁷⁾ 次に、T 型カルシウムチャンネル阻害薬エトスクシミドを NaHS 処置前に投与すると、TNBS により生じた潰瘍に対する NaHS の抑制効果はほぼ完全に消失した [Fig. 4(A)]。また、ダメージスコア及び結腸壁の肥厚に対する NaHS の抑制効果もエトスクシミド処置により有意に抑制された [Figs. 4(B) and (C)]。これらの結果から、TNBS 誘起結腸炎に対する NaHS の保護効果に、T 型カルシウムチャンネルを介する知覚神経の興奮が関与することが明らかとなった。³⁷⁾

上述のように、マウスの結腸内に NaHS を投与

Fig. 5. Effects of TNBS Treatment on the Expression Levels of $\text{Ca}_v3.2$ in Rat DRG and of H_2S -forming Enzymes in Rat Colon

Expression of $\text{Ca}_v3.2$ protein in bilateral DRG at T12–L1 or L5–S1 levels (A) or of CSE and CBS protein in the middle part of the colon (B) from the rats 1 d after TNBS treatment or the control rats. Typical photographs of Western blotting are shown in the top, and the quantified data by densitometry are in the bottom. Data show the mean with S.E.M. for 4–5 rats.³⁷⁾

すると、侵害受容ニューロンの興奮によって脊髄後角における ERK のリン酸化が起こる。そこで、ラットにおいても結腸内腔の H_2S によって侵害受容ニューロンの興奮が起こるか否かを、脊髄後角における ERK リン酸化を指標に検討した。はじめに、正常ラットの結腸内に NaHS を投与し、リン酸化 ERK を免疫染色法により検出したところ、vehicle 投与群の脊髄の所見とほとんど差はなく、NaHS による脊髄 ERK リン酸化は認められなかった。そこで TNBS 投与 1 日後及び 3 日後のラット

Fig. 6. Summary of the Role of H₂S in Colonic Pain and Inflammation

L-Cys: L-cysteine, CSE: cystathionine-γ-lyase, NP: neuropeptides.

を用いて同様の実験を行ったところ、投与1日後のラットでは、結腸からの神経が入力する T13 レベル及び L6-S1 レベルの脊髄において、さらに、投与3日後のラットでは T13 レベルの脊髄において、NaHS による ERK リン酸化の増加が認められた。このリン酸化 ERK 陽性細胞数を各層毎にカウントしたところ、侵害受容ニューロンが多く投射している I-II 及び V-VI 層において有意な増加が認められた。さらに、この NaHS による ERK リン酸化の増加は、T 型カルシウムチャネル阻害薬であるエトスクシミドの前処置により抑制された。これらの結果から、ラットにおいては、正常時には結腸内の NaHS は神経興奮を誘起しないが、結腸炎の進行に伴って T 型カルシウムチャネルの感受性が増大し、結腸内の NaHS によって神経興奮が誘起される可能性が示唆された。³⁷⁾

最後に、TNBS 処置ラットの脊髄後根神経節における Ca_v3.2 の発現量又は結腸における H₂S 合成酵素 CSE 及び CBS の発現量を Western blot 法を用いて検討した。その結果、TNBS 処置ラットの T12-L1 及び L5-S1 レベルのいずれの DRG のにおいても Ca_v3.2 の発現量が有意に増加した。一方、結腸では TNBS 処置により CSE のタンパク発現量が有意に減少したが、CBS の発現量は変化しなかった (Fig. 5)。

以上の結果より、マウスの場合と異なり、ラットでは結腸炎のない状態では NaHS 結腸内投与による知覚神経の興奮は起こらないが、TNBS 誘起結腸炎の進行に伴い、結腸における CSE による H₂S 産生が低下する一方、知覚神経において Ca_v3.2 の発

現誘導が起こるため、結腸内投与した NaHS 由来の H₂S が Ca_v3.2 依存性に知覚神経を興奮させることでおそらく神経ペプチドの遊離を引き起こし、粘膜保護的に働く可能性が示唆された。³⁷⁾

7. おわりに

以上より、マウスでは結腸内腔の H₂S は一次知覚神経に発現する Ca_v3.2 と TRPA1 を活性化することにより結腸痛を誘起することが明らかとなった。一方、ラットでは、正常時には結腸内腔の H₂S による神経興奮は起こらないが、TNBS 誘起結腸炎ラットでは、知覚神経において Ca_v3.2 の発現誘導が起こっており、外来性に結腸内へ供給した H₂S は Ca_v3.2 を介して知覚神経を興奮させることで結腸炎を抑制することが示唆された (Fig. 6)。実験動物において得られたこれらの知見がヒトにおいてどの程度反映されるかは、今後の検討を待たなければならないが、過敏性腸症候群などの慢性的な内臓痛が問題となる疾患の治療に H₂S/Ca_v3.2 及び TRPA1 系を阻害する薬物が有効である可能性、さらに、クローン病を含む炎症性腸疾患の治療に H₂S ドナーや Ca_v3.2 を活性化する薬物が有用である可能性が考えられる。

本研究は近畿大学動物実験委員会の承認の下、実施されたものである。

REFERENCES

- 1) Kimura H., *Front. Physiol.*, **3**, 101 (2012).
- 2) Wang R., *FASEB J.*, **16**, 1792-1798 (2002).
- 3) Shibuya N., Mikami Y., Kimura Y., Nagahara N., Kimura H., *J. Biochem.*, **146**, 623-626

- (2009).
- 4) Shibuya N., Koike S., Tanaka M., Ishigami-Yuasa M., Kimura Y., Ogasawara Y., Fukui K., Nagahara N., Kimura H., *Nat. Commun.*, **4**, 1366 (2013).
 - 5) Persson S., Edlund M. B., Claesson R., Carlsson J., *Oral Microbiol. Immunol.*, **5**, 195–201 (1990).
 - 6) Huycke M. M., Gaskins H. R., *Exp. Biol. Med.* (Maywood), **229**, 586–597 (2004).
 - 7) Ohge H., Furne J. K., Springfield J., Sueda T., Madoff R. D., Levitt M. D., *FEMS Microbiol. Lett.*, **228**, 137–142 (2003).
 - 8) Roediger W. E., Moore J., Babidge W., *Dig. Dis. Sci.*, **42**, 1571–1579 (1997).
 - 9) Wang R., *Physiol. Rev.*, **92**, 791–896 (2012).
 - 10) Matsunami M., Tarui T., Mitani K., Nagasawa K., Fukushima O., Okubo K., Yoshida S., Takemura M., Kawabata A., *Gut*, **58**, 751–761 (2009).
 - 11) Nagasawa K., Tarui T., Yoshida S., Sekiguchi F., Matsunami M., Ohi A., Fukami K., Ichida S., Nishikawa H., Kawabata A., *J. Neurochem.*, **108**, 676–684 (2009).
 - 12) Tarui T., Fukami K., Nagasawa K., Yoshida S., Sekiguchi F., Kawabata A., *J. Neurochem.*, **114**, 512–519 (2010).
 - 13) Okubo K., Matsumura M., Kawaishi Y., Aoki Y., Matsunami M., Okawa Y., Sekiguchi F., Kawabata A., *Br. J. Pharmacol.*, **166**, 1738–1743 (2012).
 - 14) Tsubota-Matsunami M., Noguchi Y., Okawa Y., Sekiguchi F., Kawabata A., *J. Pharmacol. Sci.*, **119**, 293–296 (2012).
 - 15) Kawabata A., Ishiki T., Nagasawa K., Yoshida S., Maeda Y., Takahashi T., Sekiguchi F., Wada T., Ichida S., Nishikawa H., *Pain*, **132**, 74–81 (2007).
 - 16) Maeda Y., Aoki Y., Sekiguchi F., Matsunami M., Takahashi T., Nishikawa H., Kawabata A., *Pain*, **142**, 127–132 (2009).
 - 17) Takahashi T., Aoki Y., Okubo K., Maeda Y., Sekiguchi F., Mitani K., Nishikawa H., Kawabata A., *Pain*, **150**, 183–191 (2010).
 - 18) Okubo K., Takahashi T., Sekiguchi F., Kanaoka D., Matsunami M., Ohkubo T., Yamazaki J., Fukushima N., Yoshida S., Kawabata A., *Neuroscience*, **188**, 148–156 (2011).
 - 19) Okubo K., Nakanishi H., Matsunami M., Shibayama H., Kawabata A., *Br. J. Pharmacol.*, **166**, 1058–1068 (2012).
 - 20) Nishimura S., Fukushima O., Ishikura H., Takahashi T., Matsunami M., Tsujiuchi T., Sekiguchi F., Naruse M., Kamanaka Y., Kawabata A., *Gut*, **58**, 762–770 (2009).
 - 21) Matsunami M., Miki T., Nishiura K., Hayashi Y., Okawa Y., Nishikawa H., Sekiguchi F., Kubo L., Ozaki T., Tsujiuchi T., Kawabata A., *Br. J. Pharmacol.*, **167**, 917–928 (2012).
 - 22) Streng T., Axelsson H. E., Hedlund P., Andersson D. A., Jorðt S. E., Bevan S., Andersson K. E., Högestätt E. D., Zygmunt P. M., *Eur. Urol.*, **53**, 391–400 (2008).
 - 23) Ogawa H., Takahashi K., Miura S., Imagawa T., Saito S., Tominaga M., Ohta T., *Neuroscience*, **218**, 335–343 (2012).
 - 24) Cunha T. M., Dal-Secco D., Verri W. A. Jr., Guerrero A. T., Souza G. R., Vieira S. M., Lotufo C. M., Neto A. F., Ferreira S. H., Cunha F. Q., *Eur. J. Pharmacol.*, **590**, 127–135 (2008).
 - 25) Velasco-Xolalpa M. E., Barragan-Iglesias P., Roa-Coria J. E., Godinez-Chaparro B., Flores-Murrieta F. J., Torres-Lopez J. E., Araiza-Saldana C. I., Navarrete A., Rocha-Gonzalez H. I., *Neuroscience*, **250**, 786–797 (2013).
 - 26) Li L., Xie R., Hu S., Wang Y., Yu T., Xiao Y., Jiang X., Gu J., Hu C. Y., Xu G. Y., *Mol. Pain*, **8**, 89 (2012).
 - 27) Distrutti E., Sediari L., Mencarelli A., Renga B., Orlandi S., Antonelli E., Roviezzo F., Morelli A., Cirino G., Wallace J. L., Fiorucci S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **316**, 325–335 (2006).
 - 28) Distrutti E., Cipriani S., Renga B., Mencarelli A., Migliorati M., Cianetti S., Fiorucci S., *Mol. Pain*, **6**, 36 (2010).
 - 29) Laird J. M., Martinez-Caro L., Garcia-Nicas E., Cervero F., *Pain*, **92**, 335–342 (2001).
 - 30) Ji R. R., Baba H., Brenner G. J., Woolf C. J., *Nat. Neurosci.*, **2**, 1114–1119 (1999).
 - 31) Nelson M. T., Woo J., Kang H. W., Vitko I., Barrett P. Q., Perez-Reyes E., Lee J. H., Shin H. S., Todorovic S. M., *J. Neurosci.*, **27**, 8250–8260 (2007).
 - 32) Matsunami M., Kirishi S., Okui T., Kawabata

- A., *Neuroscience*, **181**, 257–264 (2011).
- 33) Mustafa A. K., Gadalla M. M., Sen N., Kim S., Mu W., Gazi S. K., Barrow R. K., Yang G., Wang R., Snyder S. H., *Sci. Signal.*, **2**, ra72 (2009).
- 34) Wallace J. L., Vong L., McKnight W., Dickey M., Martin G. R., *Gastroenterology*, **137**, 569–578 (2009).
- 35) Kawabata A., Kinoshita M., Nishikawa H., Kuroda R., Nishida M., Araki H., Arizono N., Oda Y., Kakehi K., *J. Clin. Invest.*, **107**, 1443–1450 (2001).
- 36) Fiorucci S., Mencarelli A., Palazzetti B., Distrutti E., Vergnolle N., Hollenberg M. D., Wallace J. L., Morelli A., Cirino G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 13936–13941 (2001).
- 37) Matsunami M., Kirishi S., Okui T., Kawabata A., *J. Physiol. Pharmacol.*, **63**, 61–68 (2012).