

## UTPの血管平滑筋に及ぼす影響とその経路解明のための多面的検討

杉原, 恵美  
九州大学大学院歯学府歯学専攻全身管理歯科学

<https://doi.org/10.15017/18398>

---

出版情報：九州大学，2009，博士（歯学），課程博士  
バージョン：  
権利関係：



UTP の血管平滑筋に及ぼす影響と  
その経路解明のための多面的検討

2009 年

九州大学大学院歯学府 歯学専攻 全身管理歯科学

杉原 恵美

九州大学病院 特殊歯科総合治療部 全身管理歯科

安部 喜八郎 准教授

九州大学大学院歯学研究院 口腔常態制御学講座 口腔細胞工学分野

平田 雅人 教授

## 対象論文

本論文の一部は下記の論文に掲載する。

Dual signaling pathways involved in arterial tone regulation by extracellular UTP in the rat

Megumi Sugihara, Miho Matsuda, Shunichi Kajioka, Motohiro Nishida, Shinichi Ito, Ryosuke Inoue, Nouval Shahab, Seiji Naito, Yasuo Mori, Ryuji Inoue, Yushi Ito, Kihachiro Abe, Masato Hirata and Hiromitsu Morita

(投稿中)

## 目次

|       |    |
|-------|----|
| 要旨    | 3  |
| 緒言    | 5  |
| 材料と方法 | 7  |
| 結果    | 11 |
| 考察    | 30 |
| 謝辞    | 33 |
| 参考文献  | 34 |

## 要旨

本研究では、ラット大動脈、大脳動脈、腸間膜動脈の組織および単離平滑筋細胞を用いて、UTP の効果を検討した。全細胞型パッチクランプ法により、各血管の平滑筋細胞では UTP ( $\geq 10\mu\text{M}$ ) 投与によって内向き電流が観察された。この UTP により活性化される電流の電流—電圧曲線は内向き整流性を示し、典型的な P2X チャンネルの電流と類似していた。またこの電流は、UTP の分解産物である UDP ( $\geq 1\text{mM}$ ) および P2X チャンネルの代表的な活性化薬である  $\alpha, \beta$ -methylene ATP ( $\geq 100\text{nM}$ ) によっても活性化された。さらにはこの UTP 活性化電流は、G タンパク質作用薬である GTP $\gamma$ S (1mM) や GDP $\beta$ S (1mM) に感受性を示さなかったが、機能的な作用部位を認識する P2X<sub>1</sub> 抗体の投与により有意に抑制された。さらに、 $\alpha, \beta$ -methylene ATP と UTP は競合的にこの P2X<sub>1</sub> 様チャンネルに作用した。UTP 活性化電流は P2X チャンネルの選択的阻害薬である TNP-ATP や P2 受容体の一般的な阻害薬である suramin および PPADS の前投与、さらには非選択的陽イオンチャンネルの阻害薬である Gd<sup>3+</sup>、La<sup>3+</sup> の投与によっても抑制された。単一チャンネル解析の結果、UTP (1mM) および  $\alpha, \beta$ -methylene ATP (10 $\mu\text{M}$ ) により各々  $10.4 \pm 0.1\text{pS}$ 、および  $10.5 \pm 0.1\text{pS}$  とほぼ同様のコンダクタンスを示すチャンネルが活性化された。平滑筋に対する効果を観察する目的で内皮細胞を除去したラット大動脈を用いて張力測定法を行ったところ、UTP ( $\geq 10\mu\text{M}$ ) により一過性の収縮と引き続く持続性の収縮が観察された。細胞外 Ca<sup>2+</sup> を除去した細胞外液や TNP-ATP (30 $\mu\text{M}$ )、またはジヒドロピリジン感受性 Ca<sup>2+</sup> チャンネルの選択的阻害薬である nifedipine (10 $\mu\text{M}$ ) の前投与により、一過性の収縮はほぼ完全に抑制され、持続性収縮も一部が抑制された。また細胞外 Ca<sup>2+</sup> 除去状態で残存した持続性収縮は、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 貯蔵部位の Ca<sup>2+</sup> を枯渇させる thapsigargin (2 $\mu\text{M}$ ) の追加投与によりほぼ完全に消失した。収縮実験と同様に UTP によって引き起こされる二相性の細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃

度上昇が大動脈平滑筋細胞にて観察された。逆転写遺伝子増幅法およびウエスタンブロット法では、P2Y<sub>2</sub>、<sub>4</sub>、<sub>6</sub> 各サブタイプと同様に P2X<sub>1</sub> のメッセンジャーRNA とタンパク質レベルでの強い発現が上記のすべての動脈で観察された。以上の結果から、UTP は P2Y 受容体だけでなく P2X<sub>1</sub> 様チャネルの活性化も介して血管緊張度の調節を行っていることが示唆された。

## 緒言

アデノシン三リン酸 (ATP) はノルアドレナリンと共に神経伝達物質として血管周囲の交感神経から放出され、細胞膜電位上昇や血管収縮を引き起こす。ATP は血管内皮細胞、赤血球、白血球、血小板などからも放出され、細胞外情報伝達物質として血管緊張度の調節などに重要な役割を果たしている<sup>1)</sup>。

ウリジン三リン酸 (UTP) も血小板、内皮細胞、上皮細胞や神経終末などさまざまな細胞から放出され、細胞外から情報を伝達する。心血管系では、主に内皮細胞から低酸素状態や炎症時に放出されるが<sup>1)</sup>、内皮細胞の血管内腔側から放出されるため、血管平滑筋への到達には制限がかかる。ところが、血管破裂による出血や梗塞、粥状動脈硬化といった病的状態によって内皮細胞の機能が損なわれると UTP の血管平滑筋への作用は劇的に上昇する<sup>2-4)</sup>。

ヌクレオチド受容体 (P2 受容体) はイオンチャネル型 P2X 受容体チャネルと、GTP 結合タンパク質 (Gタンパク質) と共役する代謝調節型の P2Y 受容体とに分類される。UTP は P2X 受容体チャネルではなく P2Y 受容体の特異的に活性化する物質として認識されており、P2Y<sub>2</sub>、P2Y<sub>4</sub>、P2Y<sub>6</sub> を活性化することで IP<sub>3</sub> 受容体系のシグナル伝達経路を経て筋小胞体から Ca<sup>2+</sup> が放出され血管収縮を引き起こすと考えられている。しかしながら、近年、UTP は非選択的陽イオン電流を惹起し、それにより細胞膜の脱分極が起きて L 型 Ca<sup>2+</sup> チャネルが活性化され、細胞外 Ca<sup>2+</sup> が流入し血管収縮が起こるという報告がある<sup>5,6)</sup>。すなわち、UTP は P2Y<sub>2</sub>、P2Y<sub>4</sub>、P2Y<sub>6</sub> を活性化し、G<sub>q/11</sub> に関連するホスホリパーゼ C (PLC) やジアシルグリセロール (DAG) を介して TRPC3 チャネルを活性化する<sup>5,6)</sup>。しかしながら、同研究では UTP によって引き起こる陽イオン電流の電流-電圧曲線は内向き整流性を示しているが、TRPC3 チャネルは外向き整流性を示すことが知られている<sup>7)</sup>。以上の理由から、UTP が P2Y 受容体と同様に P2X 受容体チャネルにも作用するのではないかと考え、本研究を行った。

本研究ではパッチクランプ法、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  測定法、張力測定法、RT-PCR 法、ウエスタンブロット法といった様々な手法を用い、UTP がイオンチャネル型および代謝調節型の両方の P2 受容体つまり P2Y 受容体とともに P2X<sub>1</sub> 様チャネルを介してラット動脈の収縮性に影響を及ぼすという新しい知見を得た。

## 材料と方法

### 1. 組織・細胞の単離

10 ~ 11 週齢 Sprague-Dawley ラットをジエチルエーテルにて麻酔し、安楽死させた後に、頭部を切断した。開頭して大脳動脈を、また開腹し腸間膜動脈及び大動脈を摘出し、4°Cに冷却した生理的食塩水中に保存した。収縮実験に用いた大動脈は37°Cの恒温槽で保温し、酸素ガスを付加した状態の Krebs 溶液に保存した。摘出した組織は生理食塩水中でピンセット及び解剖用剪刀を用いて脂肪組織や結合組織をできるだけ取り除いた。細胞の単離は、まず低  $\text{Ca}^{2+}$  (0.5mM) 生理食塩水中でピンセット及び解剖用剪刀を用いて組織を断片化し、パパイン (0.5mg/mL) と 2 型コラゲナーゼ (2mg/mL)、(Worthington、米国) を含む 37°Cの恒温槽で保温した低  $\text{Ca}^{2+}$  (1mM、 $\text{Ca}^{2+}$ ) 生理的食塩水で処理し、低  $\text{Ca}^{2+}$  (0.5mM) 生理食塩水中で先の丸いピペットを用いた攪拌操作で機械的に単離した。その後、 $\text{Ca}^{2+}$  を添加し  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を 1.5mM とし、氷温で保存した。単離した細胞は 3 時間以内に使用した。

以上の処置は九州大学動物倫理委員会の規定に従い行った。

### 2. パッチクランプ法

全細胞型パッチクランプ法および単一チャネル記録法による膜電流の測定には、パッチクランプ用増幅器として Axopatch-1D (Axon Instrument、米国)、記録用コンピュータとして IBM コンピューターを、ソフトウェアとし pClamp v6.04 (Axon Instruments、CA) を使用した。またデジタルアナログ信号の変換機として、TL-1 (Axon Instruments、米国) を使用した。電流の波形記録には 1 kHz 低周波フィルターを通した後、5 kHz で数値化してコンピュータのハードディスクに保存した。解析ソフトウェアには Clampfit v.8.2 (Axon Instrument、米国) を用いて、全細胞型パッチクランプ法のデータは 300Hz の Gaussian フィルターを、単一チャネル記録法のデータは 8-pole

Bessel フィルターにて補正し解析した。全細胞型パッチクランプ法の連続記録および解析は PowerLab/4SP 増幅器および Chart 5 ソフトウェアを用いた。解析データの図表化には pClamp v8.1 (Axon Instrument、米国)、Corel draw v11.0 (コーレル)、Kaleidagraph v3.04 (ヒューリンクス) を用いた。なお、すべての測定は室温 (22~25°C) で行った。

### 3. 張力測定法

大動脈標本は解剖用剪刀とピンセットを用いて、短いリング状 (5 ~ 7mm の長さ, 1mm 幅) に切断し使用した。血管内皮細胞層は皺ったキムワイプ (日本製紙クレシア、東京) を濡らして水平運動を行い丁寧に除去した。内皮細胞層除去効果の確認には、acetylcholine による内皮依存性弛緩の有無を指標とした。すなわち、phenylephrine (1 $\mu$ M) による収縮の後に、acetylcholine (10 $\mu$ M) を投与し、弛緩反応が無い組織のみを使用して、測定を行った。血管張力の測定には以下の式を用いて標準化した。 $T_N = (T - T_0) / (L \times IC)$ 、 $T_N$  : 標準化した力 (g)、 $T$  : 実測値、 $T_0$  : 初期張力 (g)、 $L$  : 組織の長さ (mm)、 $IC$  : 内径 (mm)。データ記録には ソフトウェアは Chart 5、トランスデューサーは MLT050 / D (AD Instruments、米国)、増幅器は PowerLab/8SP を用いた。溶液は Minipuls3 ペリスタル・ポンプ (GILSON、米国) を用い、37°C に保温した溶液を 3 mL/min で灌流した。

### 4. 細胞内 $Ca^{2+}$ 測定法

$Ca^{2+}$  蛍光測定には、 $Ca^{2+}$  イメージ測定装置 (AQUACOSMOS : 浜松ホトニクス社、静岡) を使用した<sup>9)</sup>。氷温で単離した血管平滑筋細胞に fura-2 (2.5mM) を導入した後、ゼラチンコートしたガラス製の 35mm ディッシュに細胞を 5 分間室温で放置し、細胞外溶液は測定開始 2 分前に交換した。薬液はディッシュの中央部に滴下した。

## 5. 逆転写遺伝子増幅法 (RT-PCR)

Trizol reagent (Invitrogen、米国) を用いて、ラット脳、大脳動脈、腸間膜動脈、大動脈組織切片から全 RNA を抽出し、DNA-free kit (Ambion Inc.、米国) を用いて DNase 処理を行った。逆転写反応は全 RNA (4 $\mu$ g) を Super Script III reverse transcriptase (Invitrogen、米国) を用いて行い、遺伝子増幅には 100ng の RT 産物を用いた。PCR プロトコールは以下のとおりで、94 $^{\circ}$ C-1 分間の後、94 $^{\circ}$ C-10 秒 (熱変性)、64 $^{\circ}$ C-30 秒 (アニーリング)、72 $^{\circ}$ C-1 分 (伸張反応) を各 30 サイクル行い、最終伸張反応を 72 $^{\circ}$ C-30 分行った。すべての PCR 反応には PCR high fidelity supermix (Invitrogen、CA) を用い、各遺伝子に特異的な塩基配列のプライマーを用いて行った。プライマーの塩基配列を示す。ラット P2X<sub>1</sub> (Gene ID、GI : 558239) ; フォワード・プライマー : ccttggetatgtggtgagagtc、リバーズ・プライマー : aggcaggatgtggagcaataagag、(382bp)、ラット P2Y<sub>2</sub> (GI : 38197685) ; フォワード・プライマー : ttccacgtcaccgcaccctcttattact、リバーズ・プライマー : cgattcccccaactcacacatacaaatgattg、(539bp)、ラット P2Y<sub>4</sub> (GI : 13928943) ; フォワード・プライマー : cttctctgctgggtgtttggtgtagta、リバーズ・プライマー : tccccgtgaagagatagagcactgga、(473bp)、ラット P2Y<sub>6</sub> (GI : 48675856) ; フォワード・プライマー : gccagttatggagcgggacaatgg、リバーズ・プライマー : aggaacaggatgctgccgtgtaggtg、(357bp)、ラット TRPC3 (GI : 4507686) ; フォワード・プライマー : gctggccaagctggccaa、リバーズ・プライマー : gaacacaagcagaccaggaaga、(475bp)。

## 6. ウェスタンブロット法

ラット脳、大脳動脈、腸間膜動脈、大動脈の組織切片を 1ml の緩衝液 [50mM HEPES buffer (pH 7.4)、150mM NaCl、5mM EDTA、1% Triton X-100、50mM sodium fluoride、40mM sodium  $\beta$ -glycerophosphate、2mM sodium orthovanadate、30mM

sodium pyrophosphate、protease inhibitors cocktail containing 5 $\mu$ g/ml pepstatin A、10 $\mu$ M leupeptin、1.7 $\mu$ g/ml aprotinin、50 $\mu$ M 4 - amidinophenylmethanesulfonyl fluoride] にてホモジナイズし、細胞抽出液を調製し、10% SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、polyvinylidene difluoride membrane (PVDF 膜) に転写した。膜は 5% (w/v) 脱脂粉乳溶液にてブロッキング後、それぞれの一次抗体 P2X<sub>1</sub> (1:500、Alomone、Jerusalem、Israel) と TRPC3 (1:500、Alomone、Jerusalem、Israel) を用いてインキュベートし、特異的な二次抗体を用い、ECL キット (Amersham Biosciences、Uppsala、Sweden) を用いて検出した。

## 7. 溶液組成、薬品

全細胞型パッチクランプ法、単一チャンネル記録に用いた細胞内液 (mM) : 140 CsCl、1.5 MgCl<sub>2</sub>、10 HEPES、10 glucose、10 EGTA (pH=7.2、Tris にて調整)、細胞外液: 140 NaCl、1.5 MgCl<sub>2</sub>、2 CaCl<sub>2</sub>、10 HEPES、10 glucose (pH=7.4、Tris)。幾つかの実験では、140 CsCl を 110 Cs - aspartate または 30 CsCl に置換して細胞内液に用いた。また、140 Na<sup>+</sup> を 140 *N*-methyl-D-glucamine に置換して細胞外液に用いた。電流固定法に用いた細胞内液 (mM) : 140 KCl、1.5 MgCl<sub>2</sub>、10 HEPES、10 glucose、1 EGTA (pH=7.4、Tris)。薬品は Y-tube により投与した<sup>10)</sup>。張力測定法には改良型 Krebs 溶液 (mM) : 121.9 NaCl、4.7 KCl、1.2 MgCl<sub>2</sub>、2.5 CaCl<sub>2</sub>、15.5 NaHCO<sub>3</sub>、1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、11.5 glucose (pH=7.4) を用いた。上記薬剤はすべて Sigma - aldrich (米国) より購入した。薬剤を加えた溶液は全て pH7.4 に調整した後に使用した。

## 8. 統計解析

すべてのデータは標準誤差を適用し、有意差は対応の無い 2 群間の *t* 検定および一元配置分散分析により解析した。

## 結果

### 1. UTP によって活性化される非選択的陽イオン電流

ラット大動脈より単離した平滑筋細胞を用い、血管平滑筋の静止膜電位付近である  $-60\text{mV}$  に電位固定し、全細胞型パッチクランプ法にて電流を測定した。UTP ( $1\sim 100\mu\text{M}$ ) の投与によって濃度依存的に一過性の内向き電流が活性化された (図1A)。UTP 投与直後から電流は活性化され、高濃度 UTP ( $\geq 100\mu\text{M}$ ) 投与時には急速不活性化型の電流が観察された。この電流の電流-電圧曲線は内向き整流性を示し (図1B)、逆転電位は  $9.1\pm 1.3\text{mV}$  ( $n=7$ ) で、細胞内  $\text{Cl}^-$  イオン濃度を  $143\text{mM}$  から  $33\text{mM}$  に変えてもほとんど変化しなかった ( $9.4\pm 1.9\text{mV}$ ,  $n=7$ )。一方、細胞外液の  $\text{Na}^+$  を *N*-methyl-D-glucamine に置換すると、この電流はほぼ完全に抑制された ( $2\text{mM Ca}^{2+}$  含有または  $\text{Ca}^{2+}$  除去溶液;  $93.7\pm 1.8\%$  または  $100\%$  抑制,  $n=5$ )。また、活性化と不活性化の時定数は UTP の濃度上昇に従い短縮し、脱感作から回復しなくなった (図2A および B)。このことより、以下の定量的実験では UTP 投与 4 回目以降に行った。電流固定法にて UTP ( $\geq 10\mu\text{M}$ ) は濃度依存的に電位上昇を引き起こし、電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルを活性化するのに十分な細胞膜の脱分極が惹起されることが示唆された (図2Ca と b) <sup>11)</sup>。

これらの結果から、UTP は急速不活性化型非選択的陽イオン電流を惹起し、過去に報告のあるラット尾動脈平滑筋細胞での  $\text{P2X}_1$  チャネル様電流とも非常に類似していた <sup>12)</sup>。

また、 $\text{P2X}_1$  チャネルの活性化薬である  $\alpha, \beta$ -methylene ATP' アデノシン三リン酸 (以下、 $\alpha, \beta$ -methylene ATP) によっても同様に急速不活性化型の内向き整流性を示す電流が惹起された (図1A)。この電流の濃度反応曲線は図3A に示す。他のウリジン誘導体である ウリジン二リン酸 (UDP)、ウリジン一リン酸 (UMP) およびウリジンでは、高濃度 UDP ( $\geq 1\text{mM}$ ) によっては内向き電流が惹起されたが、UMP ( $1\text{mM}$ ) とウリジン

(1mM) には全く感受性を示さなかった (図 3A)。Hill の式から、 $\alpha, \beta$ -methylene ATP の 50%有効濃度は  $0.55\mu\text{M}$  で、UTP の  $1.15\text{mM}$  比して非常に感受性が高いことから、より強力な活性化薬であることが示唆された。さらに、 $\alpha, \beta$ -methylene ATP 活性化電流は UTP 活性化電流によって抑制され、逆も同じように、UTP 活性化電流は  $\alpha, \beta$ -methylene ATP 活性化電流によって抑制された (図 3B)。以上のことから、両者の活性化薬は競合性を示すことが示唆された。これらの結果は、UTP が P2X チャンネルの活性化を介して陽イオン電流を活性化することを裏付けている。

大脳動脈、腸間膜動脈平滑筋細胞においても、 $\alpha, \beta$ -methylene ATP や UTP は内向き陽イオン電流を活性化した (図 4Aa と b)。電流密度はそれぞれ大動脈平滑筋で  $20.1 \pm 0.6\text{pA/pF}$ 、腸間膜動脈平滑筋で  $20.7 \pm 3.8\text{pA/pF}$ 、大脳動脈平滑筋で  $2.4 \pm 0.2\text{pA/pF}$  と様々であったが、 $\alpha, \beta$ -methylene ATP 活性化電流にて標準化するといずれの血管平滑筋細胞においても同様の結果が得られた (図 4B)。最大効果での反応を比較する目的で、以下の実験は高濃度 UTP (1mM) を用いて行った。

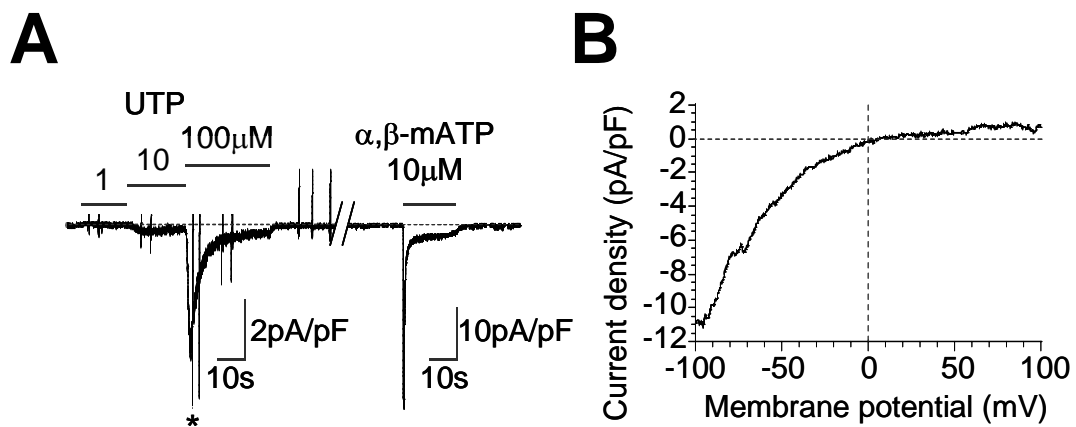


図1 UTPにより活性化される内向き整流性の陽イオン電流

A ; UTP および  $\alpha, \beta$ -methylene ATP ( $\alpha, \beta$ -m ATP) によって活性化される典型的な電流波形  
 B ; UTP によって活性化される電流の電流－電圧曲線

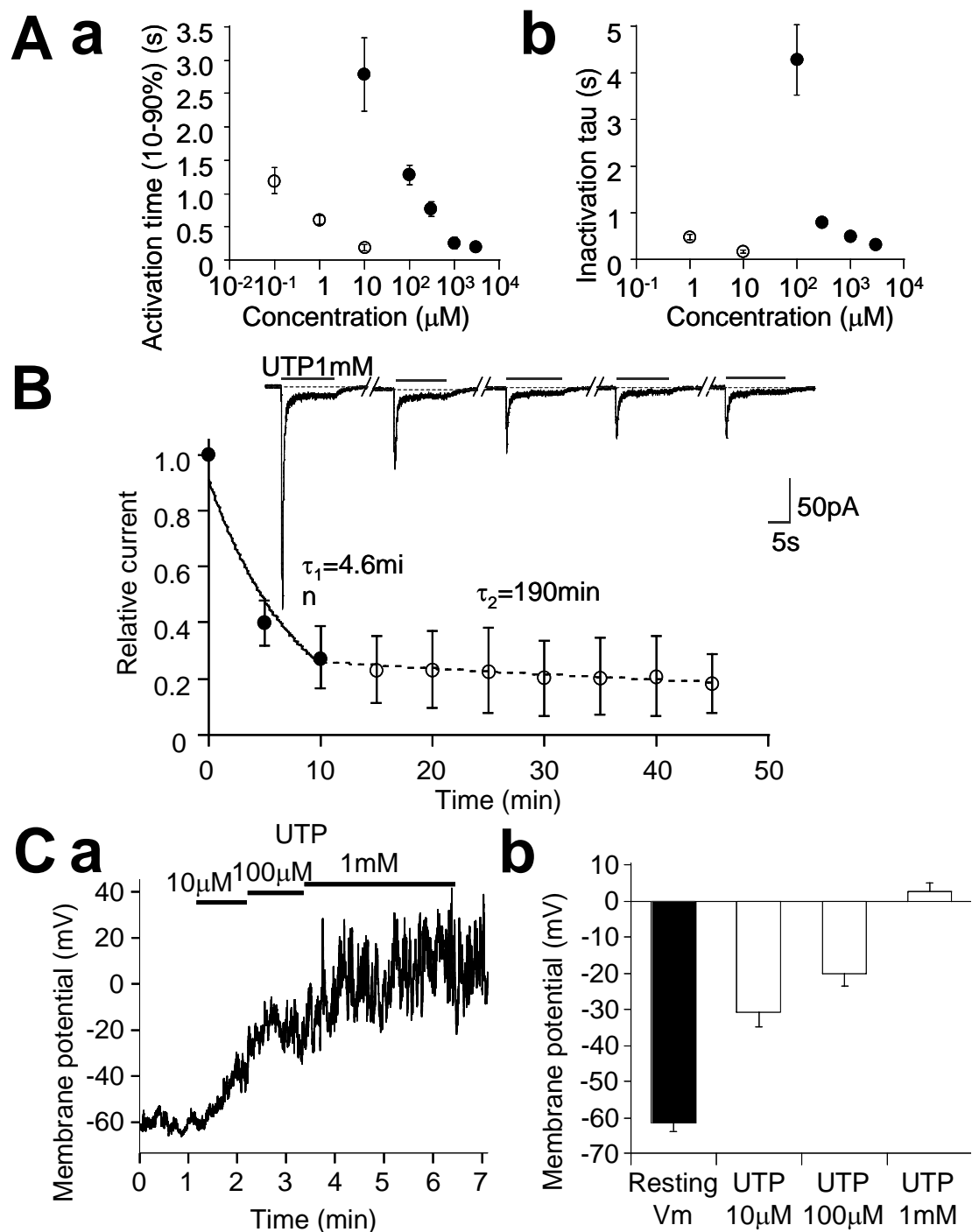


図2 UTPおよび  $\alpha, \beta$ -methylene ATPによって活性化される電流の生物物理学的特性と電流固定法を用いたUTPによる電位変化

Aa ; UTPおよび  $\alpha, \beta$ -methylene ATP各濃度での 10% ~ 90%活性化時間、Ab ; UTPおよび  $\alpha, \beta$ -methylene ATP各濃度での不活性化時定数 (○:UTP、●: $\alpha, \beta$ -methylene ATP)。B ; UTP (1mM) によって活性化された電流の減衰(脱感作) Ca ; 電流固定法を用いたUTPによる電位変化(代表的トレース) Cb ; 静止膜電位、UTP各濃度における上昇電位の平均

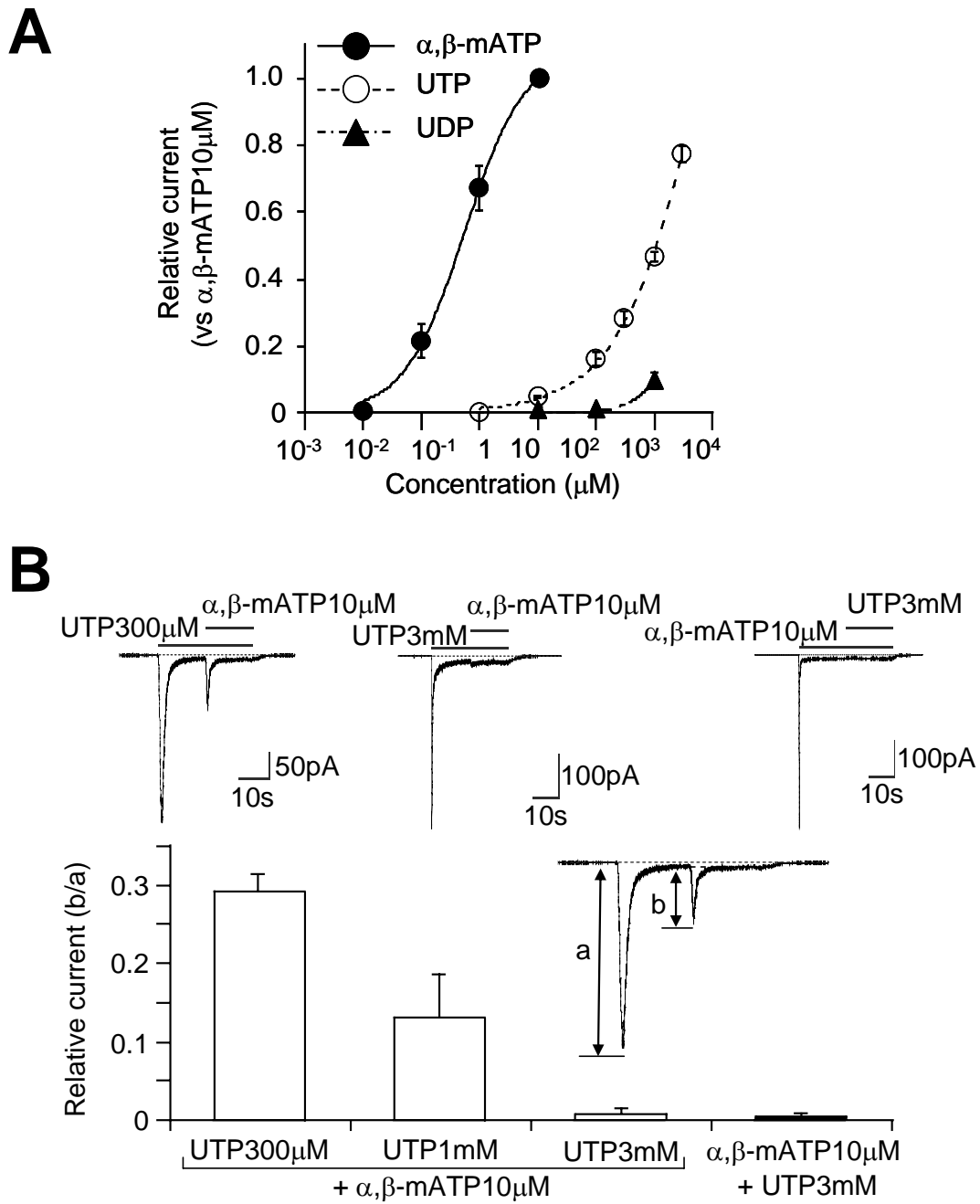


図 3  $\alpha, \beta$ -methylene ATP と UTP の作用

A ; UTP、UDP、 $\alpha, \beta$ -m ATP の濃度-反応曲線、 $\alpha, \beta$ -m ATP (10 $\mu$ M) 活性化電流で標準化し Hill の式 ( $I_{max} / (1 + K_d / [drug])^n$ 、[drug] : 薬剤濃度、 $K_d$  : 50% 活性化濃度、 $n$  : Hill 係数、 $I_{max}$  : 各薬剤の最大電流値) を適用 ● :  $\alpha, \beta$ -m ATP、○ : UTP、▲ : UDP B ;  $\alpha, \beta$ -methylene ATP と UTP の競合的拮抗作用

## Aa Cerebral Artery Myocyte

## b Mesenteric Artery Myocyte

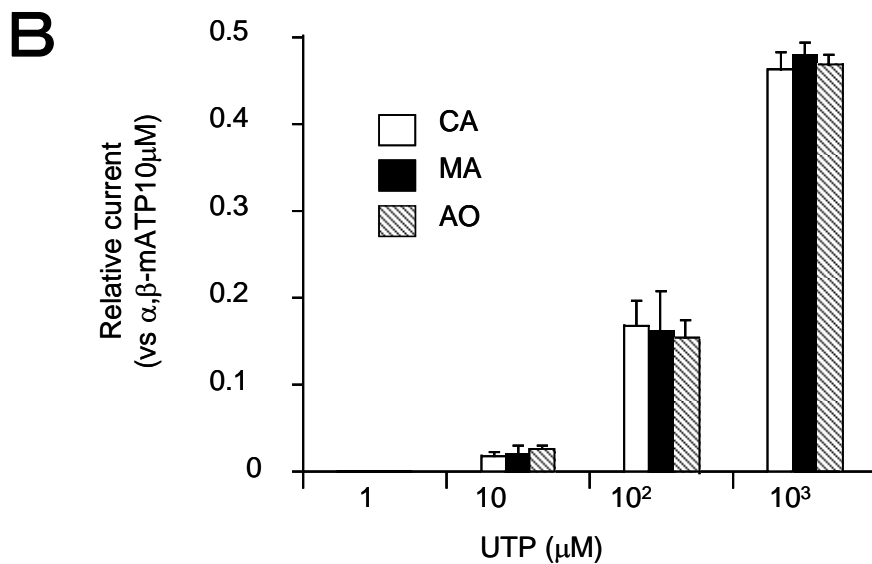
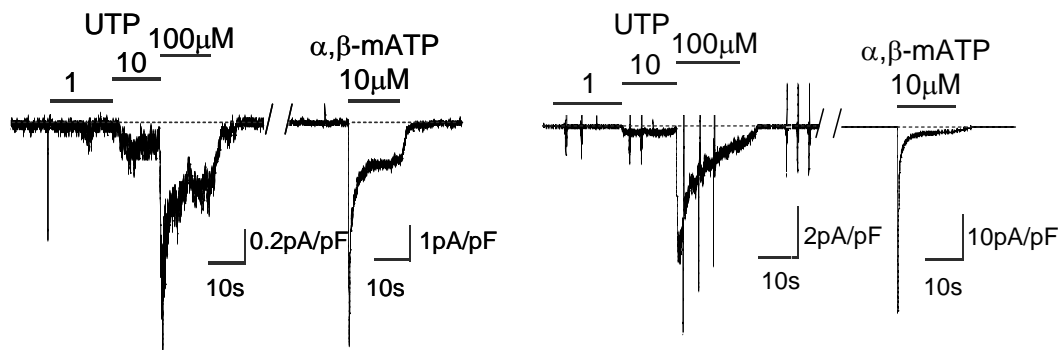


図4 大脳動脈、腸間膜動脈におけるUTPの効果

A ;ラット大脳動脈 (a)、腸間膜動脈 (b)平滑筋細胞におけるUTPおよびα,β-m ATPによって活性化される典型的な電流波形 B ;ラット大脳動脈(CA)、腸間膜動脈(MA)、大動脈(AO)におけるUTPの効果(α,β-m ATP 10μM 活性化電流により標準化) □:CA、■:MA、▨:AO(n=3~5)

## 2. UTP は P2X<sub>1</sub> 様チャンネルを活性化する

UTP により惹起される急速不活性化型電流が P2X チャンネルの活性化を介しているか否かを検証する目的で、非選択的 P2 受容体阻害薬である suramin、pyridoxal phosphate - 6 - azo (benzene - 2, 4 - disulfonic acid) (PPADS) と選択的 P2X 阻害薬である 2',3' - O - (2, 4, 6-trinitrophenyl) -ATP (TNP-ATP) の効果を検討した<sup>13, 14)</sup>。図 5A に示した様に、これらの 50%抑制濃度はそれぞれ 0.43 $\mu$ M、0.59 $\mu$ M、0.95 $\mu$ M で、Hill 係数はそれぞれ 1.3、1.1、0.9 (n=3~5)であった。興味深いことに、低濃度 suramin (100nM)では、電流の増強がみられた (141.1 $\pm$ 1.3%, n=3)。

一方、UTP によって活性化される電流が P2Y 受容体に寄与している可能性を検証するため、Gタンパク質の不活性化薬である GDP $\beta$ S (1mM) および活性化薬である GTP $\gamma$ S (1mM) を用いて、UTP によって活性化される電流と G タンパク質との関連性について検討した。細胞内より GDP $\beta$ S および GTP $\gamma$ S のどちらを投与しても電流に影響はなかった(図 5B)。しかし、機能的に抑制効果のある P2X<sub>1</sub> 抗体<sup>15)</sup>投与により電流は有意に抑制された(図 5B)。ネガティブコントロールとして、P2X<sub>1</sub> 抗体に特異的な阻害ペプチドを同時投与した場合は、その抑制効果は消失した。以上の結果から、UTP により活性化される電流は、P2Y 受容体 - G タンパク質を介する経路ではなく、P2X<sub>1</sub> チャンネルとの関連性が強く示唆された。

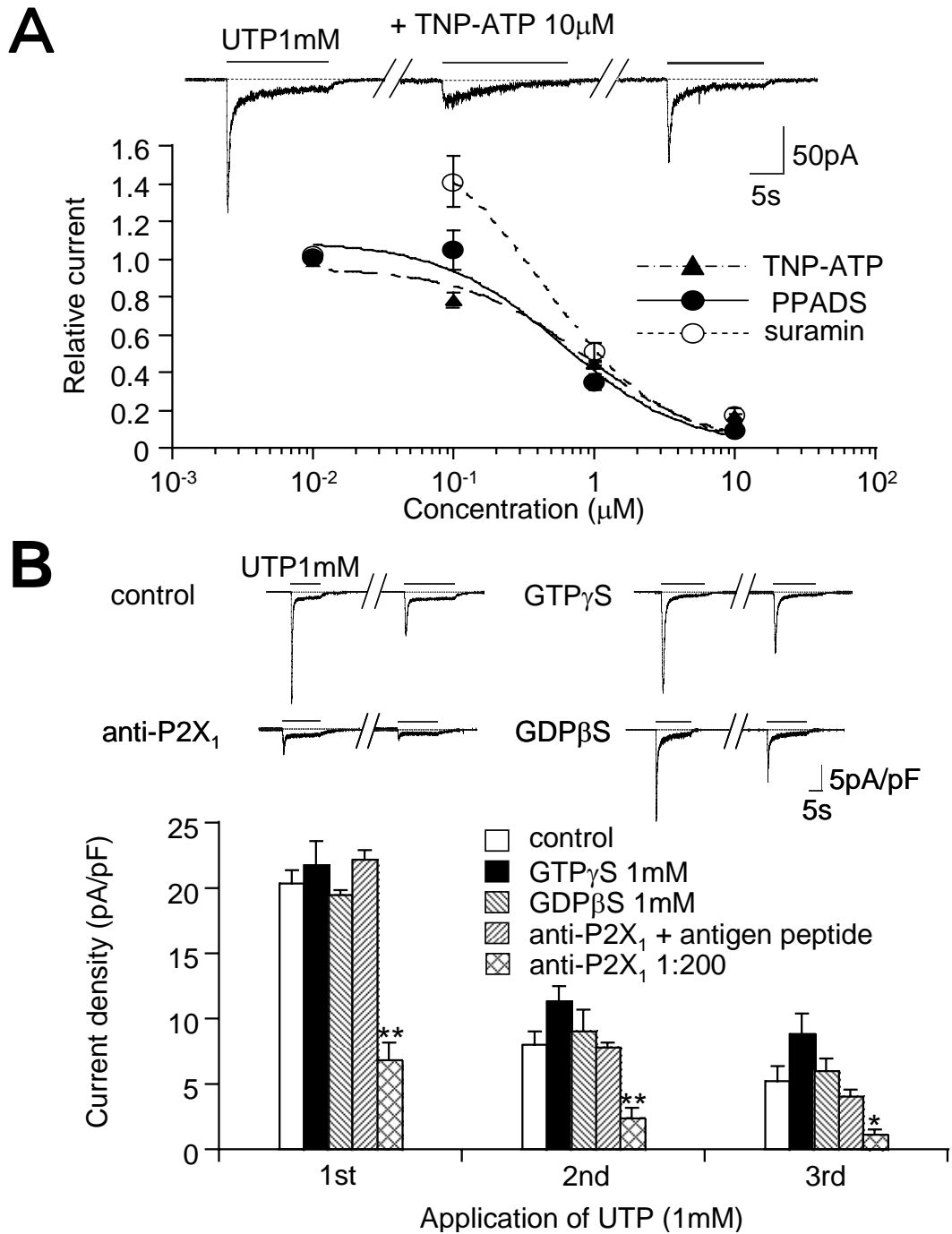


図 5 UTP によって活性化される電流における各種阻害薬、G タンパク質作用薬および機能的抗体の効果

A ; UTP によって活性化される電流に対する P2X および P2 受容体の阻害薬 (▲:TNP-ATP、○:suramin、●:PPADS) の効果 曲線は Hill の式 ( $(1 - I_{rest}) / \{1 + ([\text{drug}] / K_i)^n\} + I_{rest}$ , [drug] : 薬剤濃度、 $K_i$  : 50% 抑制濃度、 $n$  : Hill 係数、 $I_{rest}$  : 非抑制電流の割合) を適用 B ; 検定は一元配置分散分析により行った (\*\*:  $p < 0.01$ , \*:  $p < 0.05$ ) □: 対照、■: GTP $\gamma$ S (1mM)、▨: GDP $\beta$ S (1mM)、▧: P2X $_1$  抗体 + 阻害ペプチド、▩: P2X $_1$  抗体

### 3. TRP タンパクは UTP によって誘発される電流に関与しない

ラット冠動脈、大脳動脈にReverse permeabilization法にてアンチセンスプローブを導入した過去の研究結果では、UTPはP2Y受容体を介してTRPC3 様チャネルを活性化したという報告がある<sup>5,6)</sup>。しかし、TRPC3 のメッセンジャー RNA レベルでの発現は大脳動脈でかすかにみられただけであり、腸間膜動脈および大動脈では検出できず、タンパク質レベルでの発現はどの動脈においても認められなかった。TRPC3 のメッセンジャー RNA レベルでの発現が大脳動脈でかすかにみられたのは大脳動脈が他の動脈よりも筋層が薄いことから、内皮細胞の混在率が高かったためであると考えられた(図 6B)<sup>23)</sup>。また、ラット大動脈平滑筋細胞の細胞株である A7r5 を用いた RT-PCR 法の結果でも TRPC3 のメッセンジャー RNA レベルでの発現は認められなかったが、各動脈平滑筋細胞と同様のUTPによって活性化される電流は観察された(データ未提示)。

さらに、機能的に抑制効果のある TRPC3 抗体<sup>16)</sup>(図 6A)および TRPC3 に特異的な阻害薬である pyrazole 3<sup>17)</sup>(1 $\mu$ M ; 100.0 $\pm$ 1.5%, n=8) を投与しても電流に変化はみられなかった。そのうえ、UTP によって誘発される電流の薬理学的特性は TRPC3 チャネルやその相同体である TRPC6 チャネルとは明らかに異なっていた。すなわち UTP によって引き起こされる電流を抑制する Gd<sup>3+</sup> と La<sup>3+</sup> の 50%抑制濃度はそれぞれ 51.3 $\mu$ M と 21.8 $\mu$ M (各 n=3~5、図 6C)で、TRPC3 チャネルと TRPC6 チャネルに比して感受性が非常に低かった<sup>18-21)</sup>。また、TRP チャネルや他の非選択的陽イオンチャネルの阻害薬である SK&F96365 (30 $\mu$ M) や TRPC3 チャネルの阻害薬として知られている 2-aminoethyl diphenylborinate (2-APB ; 100 $\mu$ M) は抑制効果を示さなかった(SK&F96365 ; 102.8 $\pm$ 4.6%、2-APB ; 100.3 $\pm$ 2.6%、各 n=5)。

以上の結果は TRPC タンパクの関与を否定し、さらに、UTP により活性化される電流の分子実体は P2X<sub>1</sub> チャネルであることを示唆している。

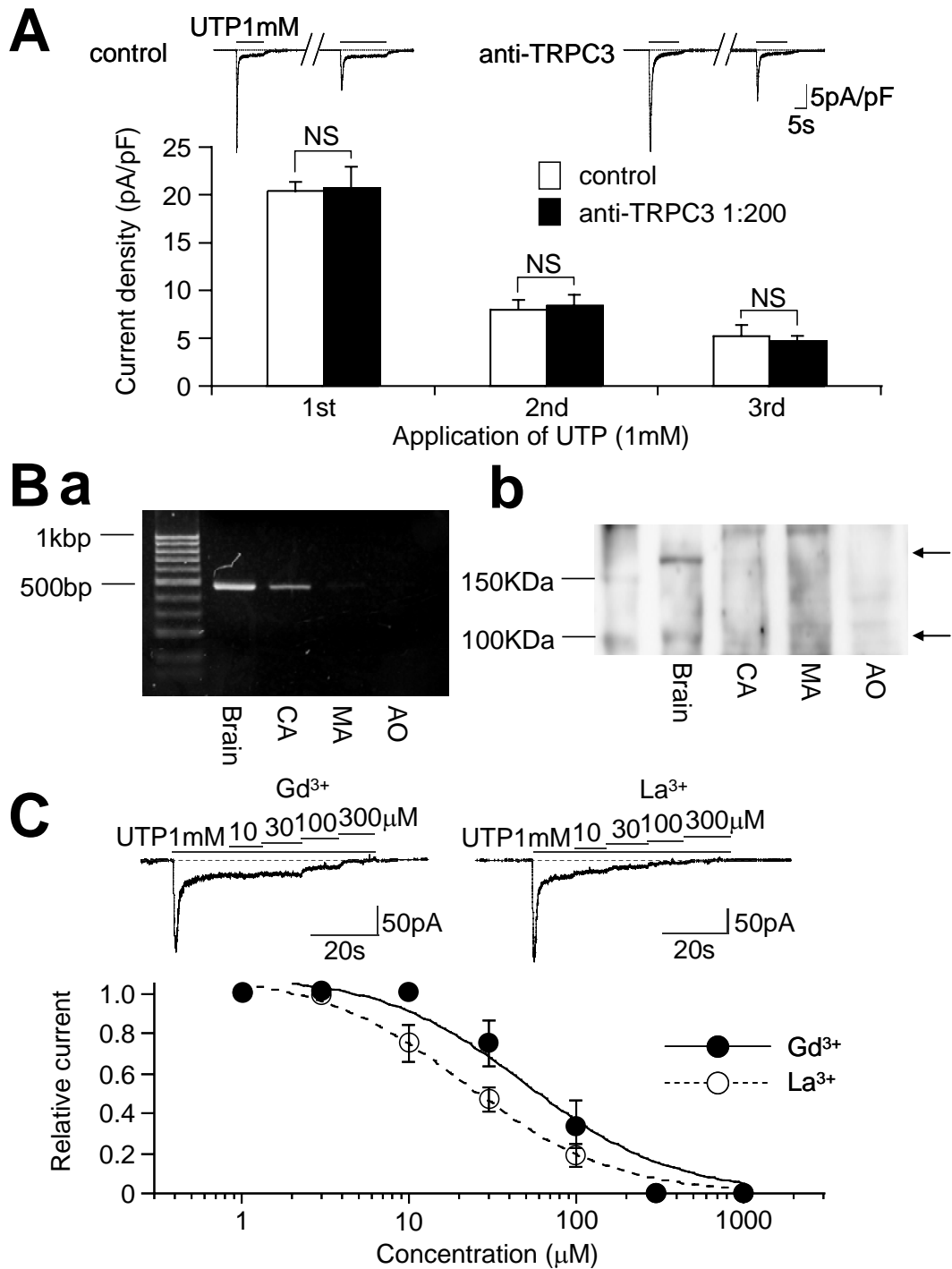


図6 UTP によって活性化される電流における TRPC3 チャンネルの関与

A ; 機能的抑制効果のある TRPC3 抗体の効果 □:対照、■:TRPC3 抗体 Ba ; RT-PCR 法による TRPC3 チャンネルの発現 Bb ; ウェスタンブロット法による TRPC3 チャンネルタンパクの発現 C ; 非選択的陽イオンチャンネル阻害薬 gadolinium (Gd<sup>3+</sup>), lanthanum (La<sup>3+</sup>) の効果 ● : Gd<sup>3+</sup>、○ : La<sup>3+</sup>

#### 4. UTP によって活性化される単一チャネル活性

次に、アウトサイドアウト法を用いて単一チャネル記録を行った。保持電位  $-60\text{mV}$  にて、 $\alpha, \beta$ -methylene ATP は典型的な急速不活性化型の  $\text{P2X}_1$  様電流を、また UTP は持続電流を惹起した(図 7A)。しかし、この電流は単一チャネルコンダクタンスが非常に小さいため、保持電位  $-60\text{mV}$  では解析できなかった。そこで、傾斜上昇電圧 ( $+40\text{mV} \sim -160\text{mV}$ ) を用いて単一チャネルコンダクタンスの検討を行った。 $\alpha, \beta$ -methylene ATP および UTP により惹起される電流の単一チャネルコンダクタンスはそれぞれ  $10.5 \pm 0.1\text{pS}$  ( $n=5$ ) および  $10.4 \pm 0.1\text{pS}$  ( $n=5$ ) であった(図 7B)。また、各々の単一電流波形を 30 トレースずつ加算した波形は、どちらも全細胞型パッチクランプ法にて記録した電流波形に類似し、 $\text{P2X}_1$  様内向き整流性を示した(図 7C 対図 1B)。これらの結果からも  $\alpha, \beta$ -methylene ATP と UTP は同一の  $\text{P2X}$  様チャネルを活性化することが考えられた。

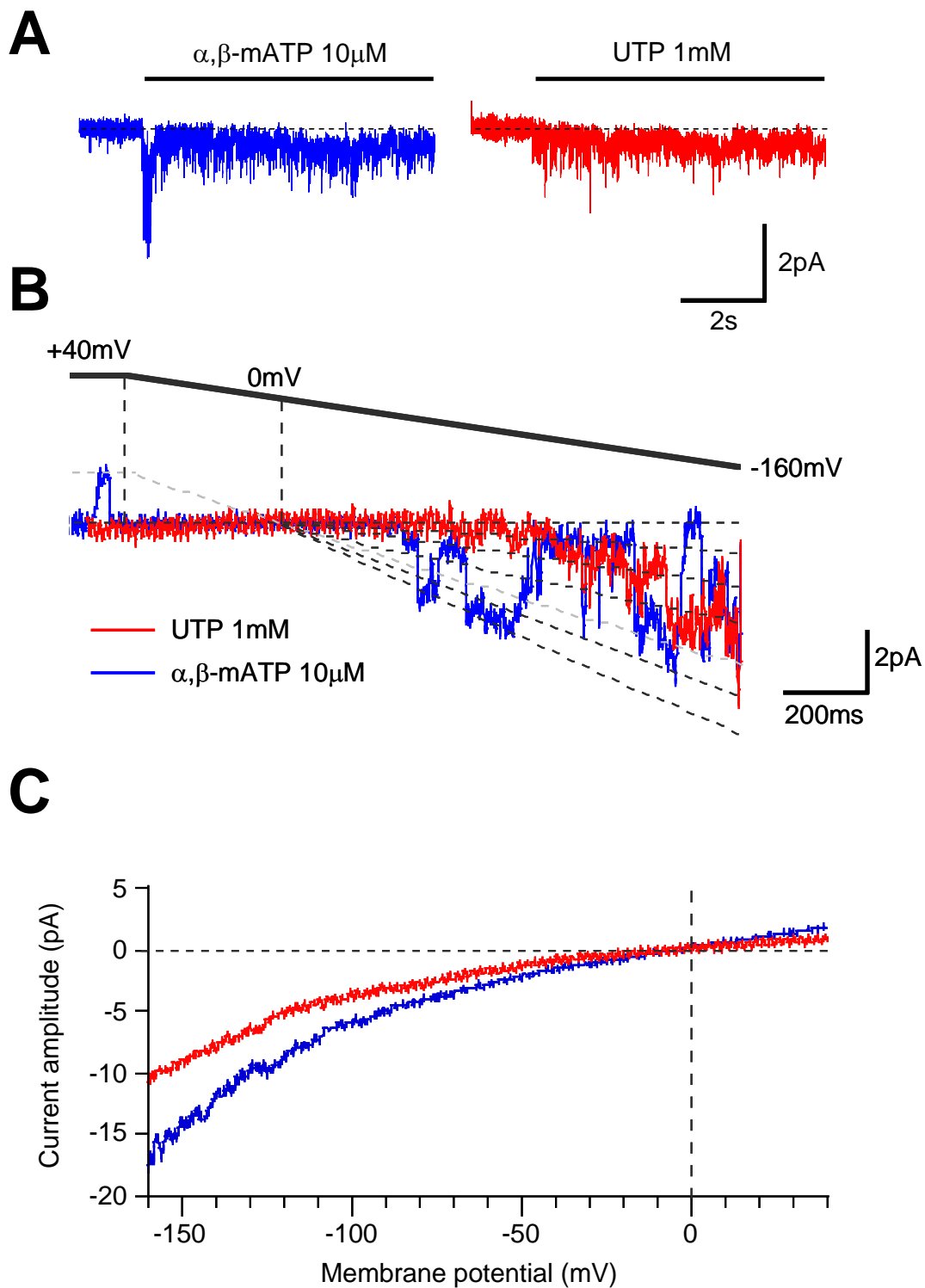


図7 UTPによって活性化される電流の単一チャネル記録

A ; アウトサイドアウト法による  $\alpha,\beta$  - methylene ATP と UTP によって引き起こされる電流の単一チャネル特性 B ; 傾斜上昇電圧 (+40~-160mV) による単一チャネル電流  $\alpha,\beta$ -methylene ATP および UTP は赤線および青線にて表示 C ; B のデータそれぞれ 30 トレースの合計波形

## 5. UTP はラット大動脈の収縮を引き起こす

UTP による大動脈リング標本を用いた収縮実験を行った。血管内皮細胞を除去し、UTP の効果を観察したところ、一過性収縮とそれに引き続く持続性収縮の 2 種類の収縮波形が記録された。一過性収縮は UTP (10 $\mu$ M) 投与時から定常的にみられた。一方、持続性収縮は UTP 1 $\mu$ M から 3mM まで濃度依存的にみられた (図 8Aa と b)。しかし、累積的に UTP を投与すると、一過性収縮はおそらく脱感作され、1mM で消失した (図 8Aa)。また、Ca<sup>2+</sup> 除去 Krebs 溶液を投与すると一過性収縮は消失し、持続性収縮は一部抑制されたが、Ca<sup>2+</sup> (2mM) を含む Krebs 溶液を再投与したところ、どちらの収縮も回復した。同様の効果が L 型 Ca<sup>2+</sup> チャネルの阻害薬である nifedipine (10 $\mu$ M) と P2X チャネル阻害薬である TNP - ATP (30 $\mu$ M) の投与下でも観察された (図 8Bb ; TNP-ATP の一過性収縮に対する効果は未提示)。Ca<sup>2+</sup> 除去溶液を投与したときに残存した持続性収縮に対して、筋小胞体からの Ca<sup>2+</sup> 放出を枯渇される目的で thapsigargin (TG) を用いた。5 分間、TG (2 $\mu$ M) を含む Ca<sup>2+</sup> 除去溶液を灌流し、その後、UTP を投与すると、持続性収縮もほぼ消失した (図 8Bc と d)。これらの結果から、UTP により活性化される一過性収縮は P2X<sub>1</sub> 様チャネルの活性化を介した膜脱分極による L 型 Ca<sup>2+</sup> チャネルからの Ca<sup>2+</sup> 流入によるものであると考えられた。一方、持続性収縮は電位依存性の Ca<sup>2+</sup> 流入と細胞内 Ca<sup>2+</sup> 放出の両方に依存しており、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 放出は P2X チャネル非依存的な P2Y 受容体の活性化を介し IP3 受容体の開口に起因するものであると考えられた (図 12)。

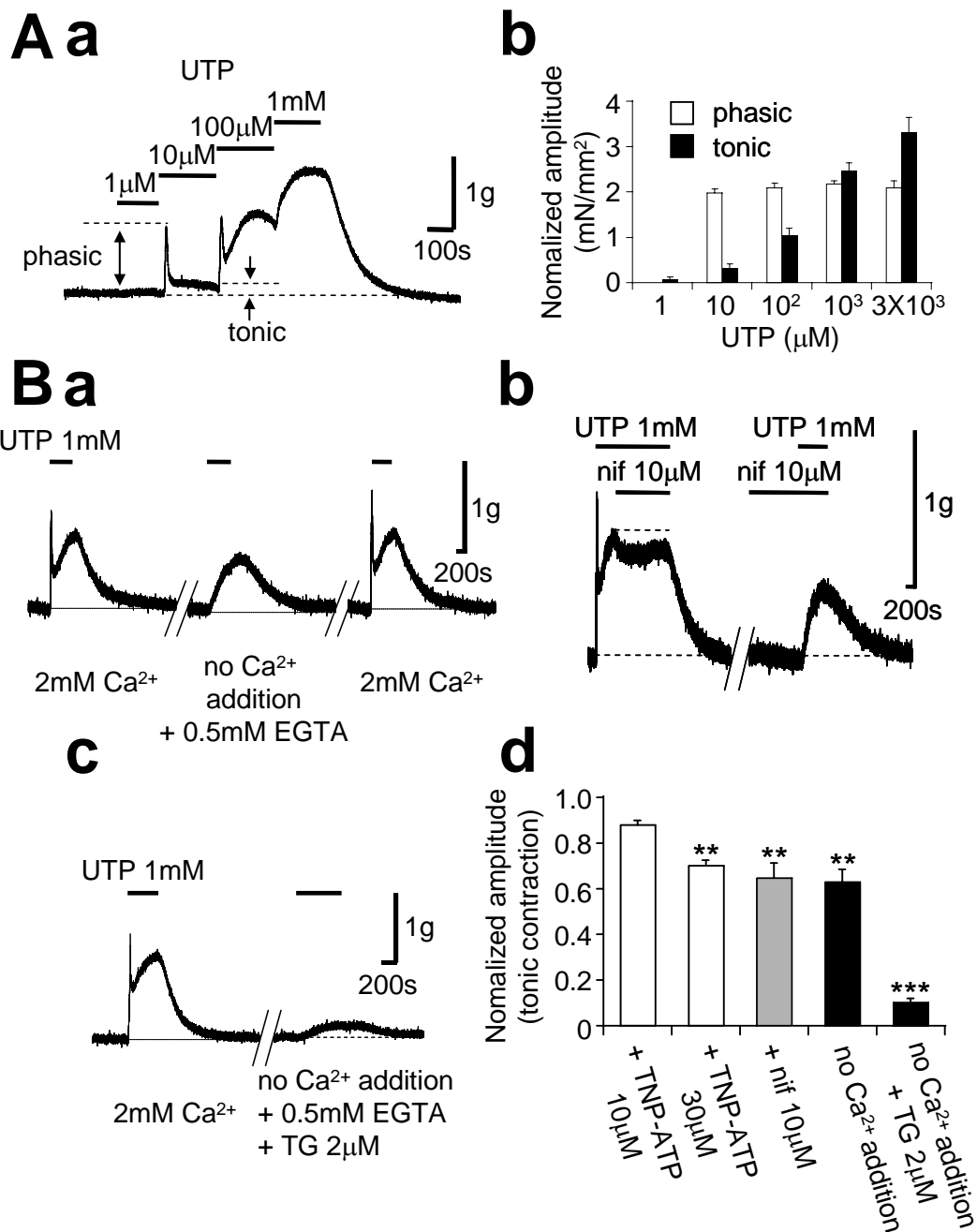


図8 UTPは内皮細胞を除去したラット大動脈リング標本を収縮させる

Aa ; UTPによって引き起こされる収縮の典型的なトレース(内皮細胞を除去したラット大動脈リング標本) Ab ; UTPによって引き起こされる一過性収縮(□)と持続性収縮(■)の濃度と収縮力の関係 B; 生理的食塩水(2mM Ca<sup>2+</sup>)とCa<sup>2+</sup>除去溶液 UTP収縮に対する効果 (a)、nifedipine (10μM)のUTP収縮に対する効果 (b)、Ca<sup>2+</sup>除去溶液+thapsigargin (2μM)のUTP収縮に対する効果 (c)、それぞれの代表的なトレース Bd ; TNP-ATP (n=4~6)、nifedipine (nif)、Ca<sup>2+</sup>除去溶液およびCa<sup>2+</sup>除去溶液+thapsigarginのUTP収縮に対する効果 (\*\* : p<0.01 \*\*\* : p<0.001)

## 6. 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 測定

UTP による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化を測定した。測定には fura-2 による蛍光測定法を用いた。大動脈平滑筋単離細胞を用いて、生理食塩水 (2mM  $\text{Ca}^{2+}$  含有) 中に UTP (1mM) を投与すると、一過性  $\text{Ca}^{2+}$  上昇もしくは  $\text{Ca}^{2+}$  振幅 ( $\text{Ca}^{2+}$  オシレーション) を伴う細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が細胞収縮とともに観察された (図 9Aa)。この細胞収縮の時間経過は、全細胞型パッチクランプ法による電流の時間経過とほぼ一致した (図 10)。一方、0.5mM EGTA を含む  $\text{Ca}^{2+}$  除去溶液中に UTP (1mM) を投与すると、一過性  $\text{Ca}^{2+}$  上昇はみられたが、 $\text{Ca}^{2+}$  振幅は減衰していった (図 9Ab)。さらに、最初の  $\text{Ca}^{2+}$  上昇開始までの時間は細胞によってばらつきがあった。また、 $\text{Ca}^{2+}$  除去溶液と生理食塩水 (2mM  $\text{Ca}^{2+}$  含有) では時間差があり、生理的食塩水 (2mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) では  $3.3 \pm 0.1$  秒 ( $n=186$ ) で、 $\text{Ca}^{2+}$  除去溶液では  $13.5 \pm 0.7$  秒 ( $n=93$ ) であった (図 9Ab)。TNP-ATP (10 $\mu$ M) でも遅延がみられ、その値は  $4.7 \pm 0.6$  秒 ( $n=48$ ) であった。それぞれの状態の典型的なトレース (11~18 トレース) を重ね合わせたところ、収縮実験と同様の結果が得られた (図 9B と図 8Ba、c)。これらの結果は UTP が  $\text{P2X}_1$ -L 型電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルそして  $\text{P2Y}$  受容体-G タンパク質-PLC 経路を介して平滑筋細胞の収縮を引き起こし、それぞれ細胞内外の  $\text{Ca}^{2+}$  放出を引き起こすことを示唆している。

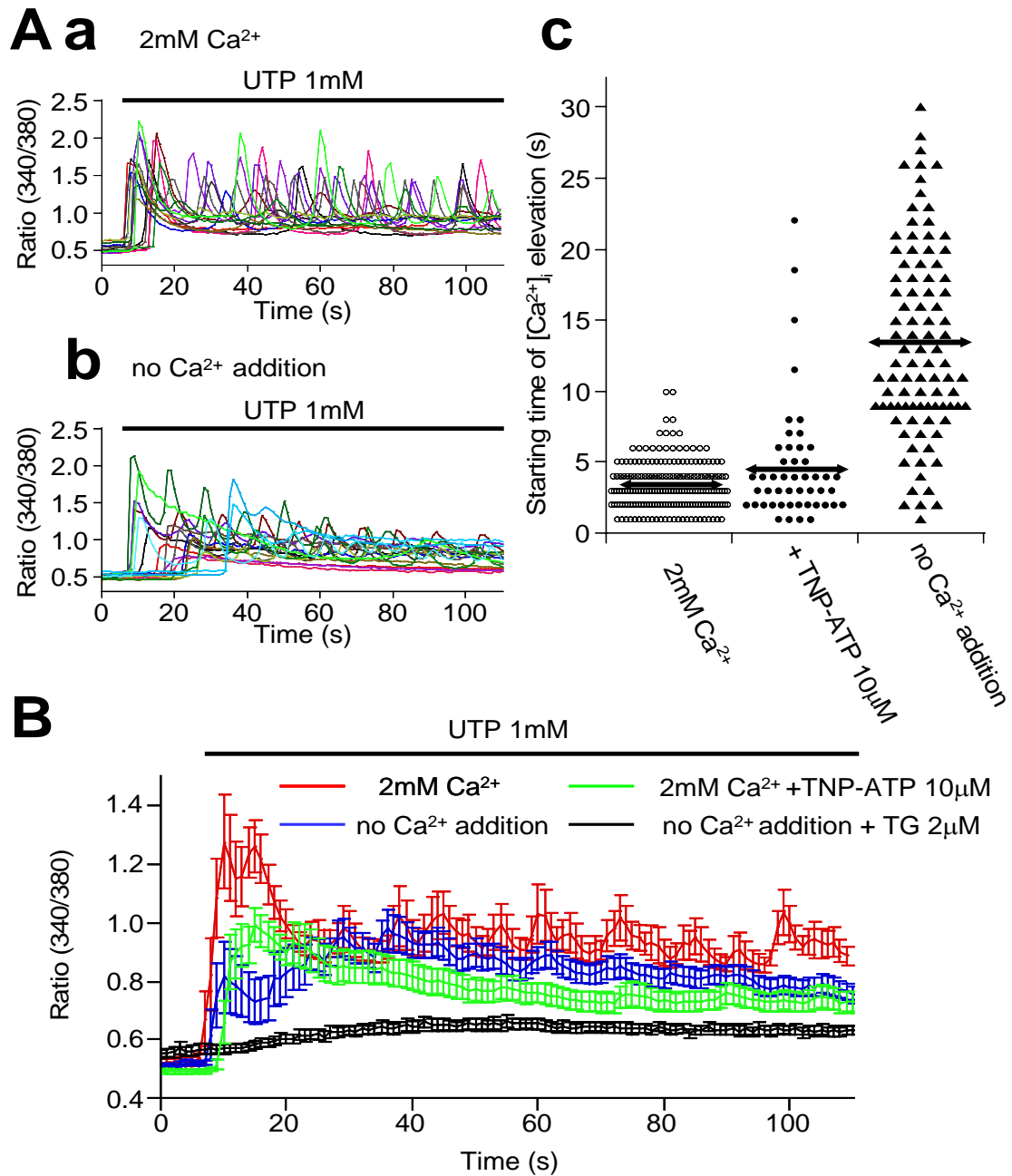
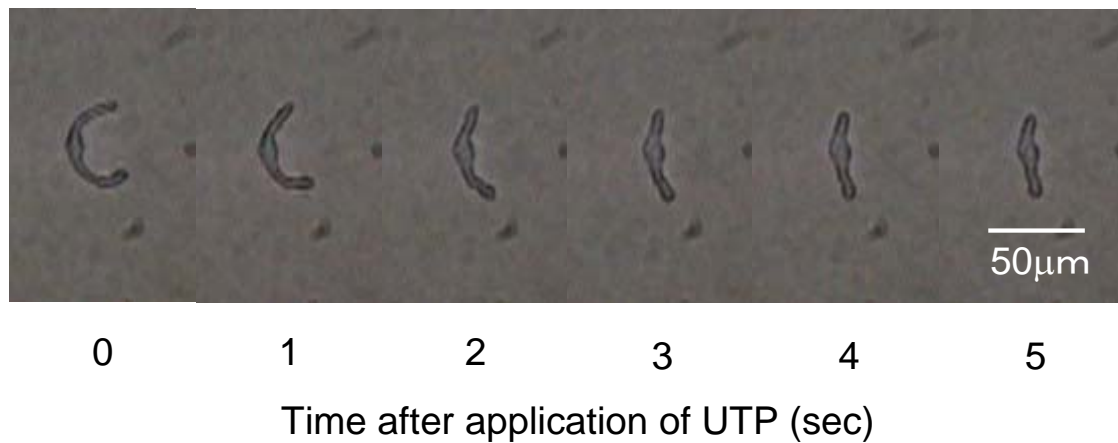


図9 大動脈平滑筋細胞の細胞内 Ca<sup>2+</sup> 測定

Aa ; 生理的食塩水 (2mM Ca<sup>2+</sup>) での UTP による細胞内 Ca<sup>2+</sup> 上昇 Ab ; Ca<sup>2+</sup> 除去溶液中での UTP による細胞内 Ca<sup>2+</sup> 上昇 Ac ; 生理的食塩水 (2mM Ca<sup>2+</sup>)、TNP-ATP (10µM) 添加生理食塩水および Ca<sup>2+</sup> 除去溶液中での UTP 投与後の細胞内 Ca<sup>2+</sup> 上昇開始時間の比較 B ; 生理的食塩水 (2mM Ca<sup>2+</sup>)、TNP-ATP (10µM) 添加生理食塩水、Ca<sup>2+</sup> 除去溶液中および thapsigargin (TG ; 2µM) 含有 Ca<sup>2+</sup> 除去溶液中での UTP による細胞内 Ca<sup>2+</sup> 上昇 (典型的な 11~18 トレースの合計)



**B**

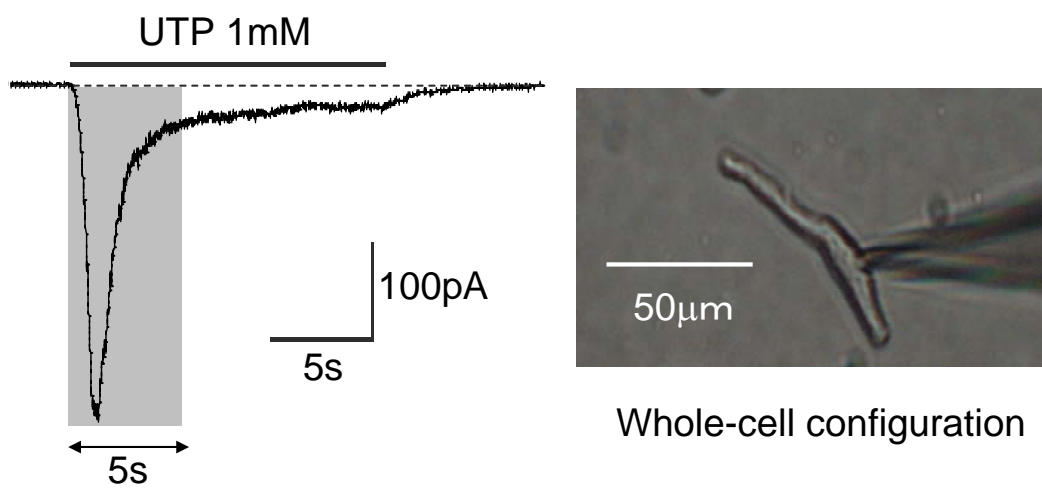


図 10 UTP による大動脈平滑筋細胞の収縮と電流波形との相同性

A ; UTP (1mM) による大動脈平滑筋細胞収縮の時間経過による形態変化 B ; 全細胞型パッチクランプ法での UTP (1mM) による内向き電流

## 7. ラット各種動脈における P2 受容体サブタイプの分布

最後に、RT-PCR 法を用いて、大脳動脈、腸間膜動脈、大動脈における P2 遺伝子の発現を検討した。すべての組織において、P2X<sub>1</sub> と P2Y<sub>2、4、6</sub> 受容体<sup>22)</sup> のメッセンジャー RNA レベルでの発現が観察された(図 11Aa、B)。また、ウエスタンブロット法にて P2X<sub>1</sub> チャンネルのタンパク質レベルでの発現がどの組織においても観察された(図 11Ab)。P2X<sub>1</sub> 抗体の阻害ペプチドにて前処理したところ、これらのバンドは全て消失した。

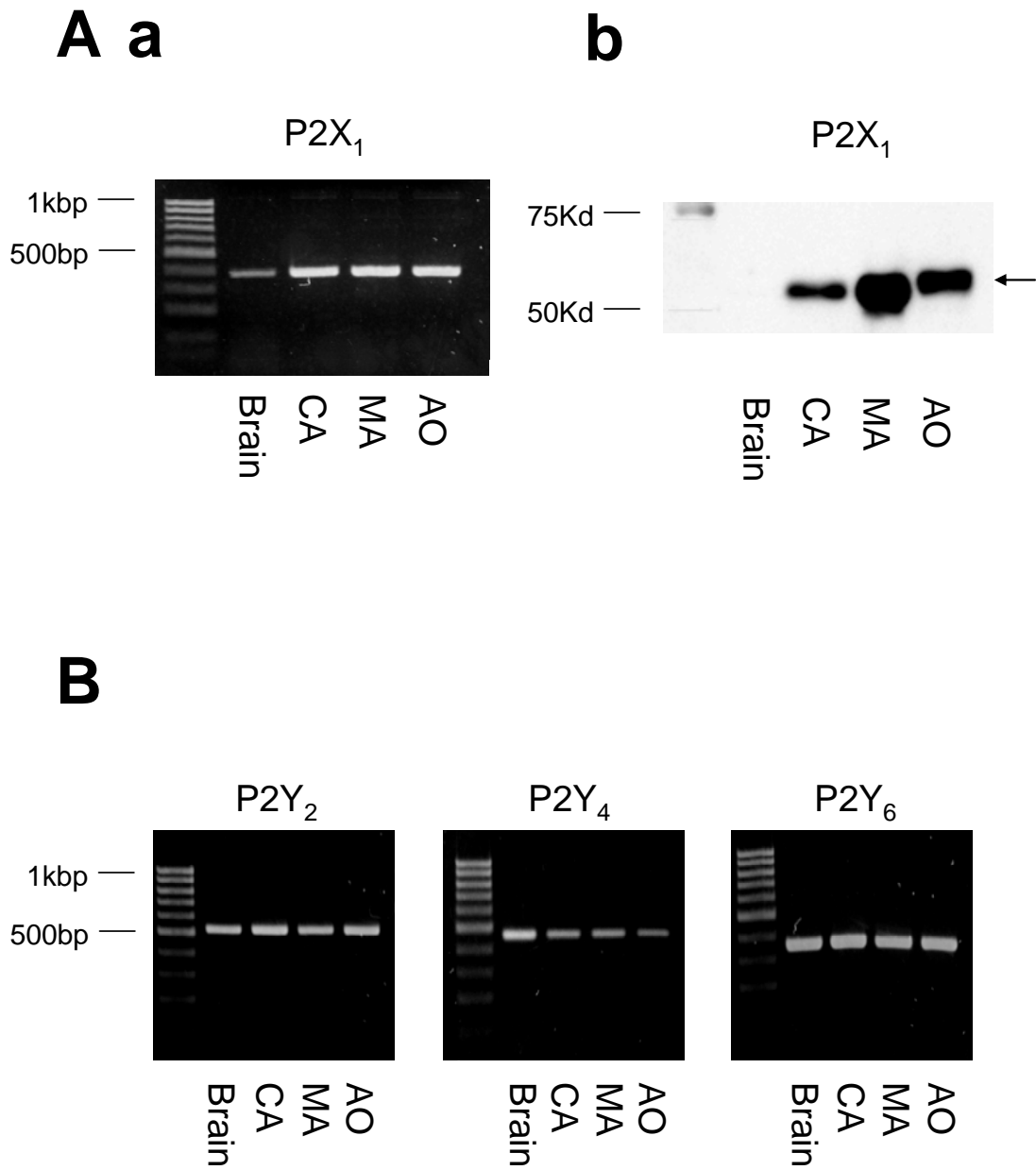


図 11 大脳動脈、腸間膜動脈、大動脈における P2 受容体の発現

Aa ; RT-PCR 法による P2X<sub>1</sub> チャンネルの発現 Ab ; ウェスタンブロット法による P2X<sub>1</sub> チャンネルタンパクの発現 B ; RT-PCR 法による P2 Y<sub>2、4、6</sub> の発現 [ラット脳、大脳動脈(CA)、腸間膜動脈(MA)、大動脈(AO)]

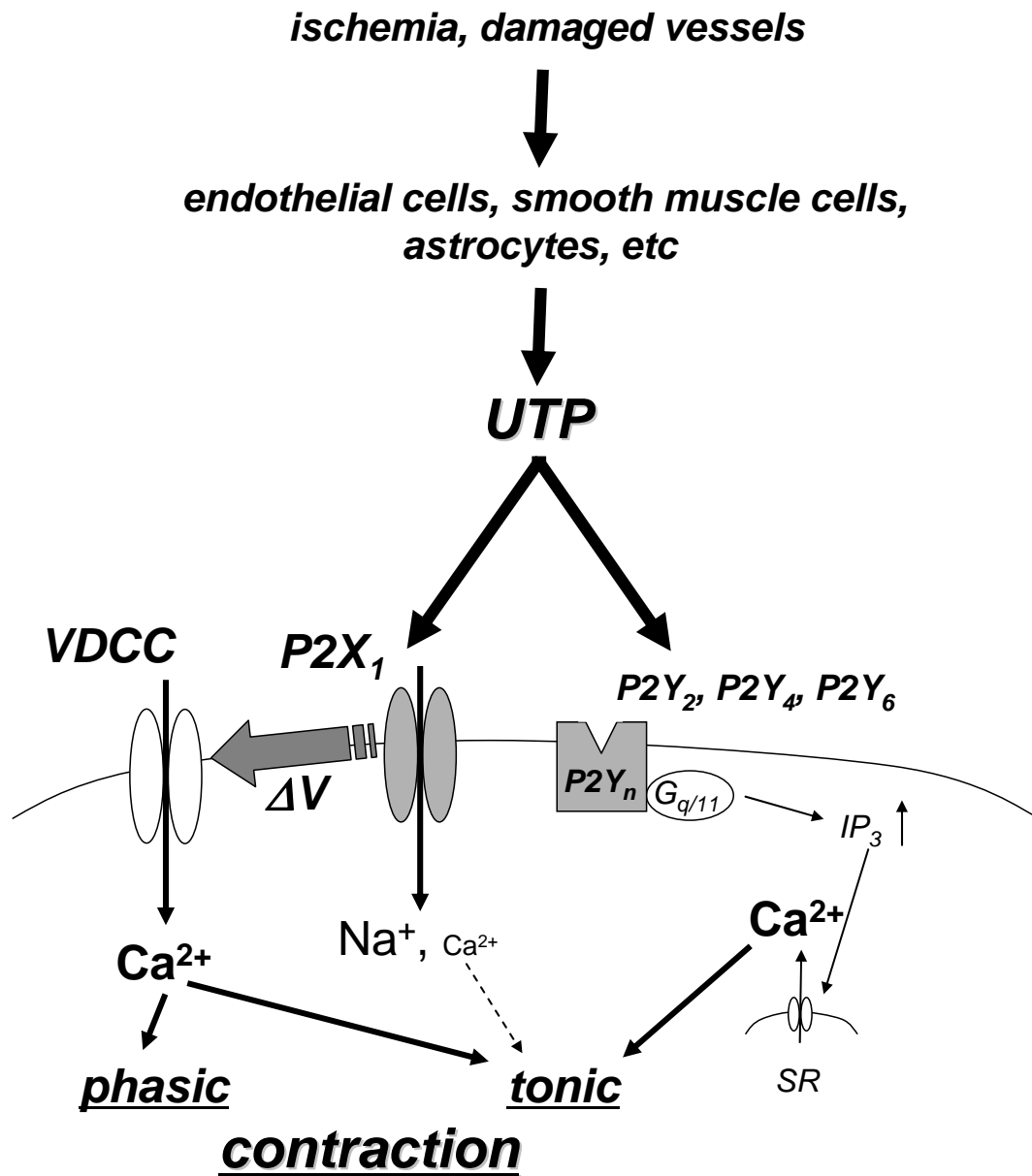


図 12 UTP による血管緊張度の調節の模式図

VDCC : 電位依存性 Ca<sup>2+</sup> チャンネル、P2Y<sub>n</sub> : P2Y<sub>2</sub>、P2Y<sub>4</sub>、P2Y<sub>6</sub>、IP<sub>3</sub> : イノシトール 1、4、5 三リン酸、SR : 筋小胞体、ΔV : 脱分極

## 考察

本研究で明らかになった点は以下のとおりである。1) UTP は急速不活性化型の内向き電流を惹起し、この電流は P2X チャンネル活性化薬や阻害薬である  $\alpha, \beta$ -methylene ATP、TNP-ATP や強力な非選択的陽イオンチャンネル阻害薬 (gadolinium と lanthanum) によって薬理的な感受性を示した。2) UTP により活性化される電流は機能的抑制効果のある P2X<sub>1</sub> 抗体により抑制されたが、G 蛋白質作用薬 (GDP $\beta$ S や GTP $\gamma$ S) や TRPC3 の特異的阻害薬である pyrazole 3、機能的抑制効果のある TRPC3 抗体ではどちらも抑制効果を示さなかった。3) UTP と  $\alpha, \beta$ -methylene ATP は単一チャンネル記録にてほぼ同じ単一チャンネルコンダクタンスを示した (UTP:  $10.4 \pm 0.1$ 、 $\alpha, \beta$ -methylene ATP :  $10.5 \pm 0.1$  pS)。4) UTP は細胞外 Ca<sup>2+</sup> 感受性 (P2X チャンネルの活性化→脱分極→L型電位依存性 Ca<sup>2+</sup> チャンネル) と Ca<sup>2+</sup> 非感受性 (P2Y 受容体の活性化→細胞内 Ca<sup>2+</sup> 放出) の二重の細胞応答を介して大動脈平滑筋を収縮させた。5) P2X<sub>1</sub> チャンネルの強い発現が RT-PCR 法、ウエスタンブロット法にてラット大脳動脈、腸間膜動脈、大動脈で確認された。

現在まで UTP は P2Y 受容体 (P2Y<sub>2, 4, 6</sub>) の活性化薬として考えられてきた<sup>1)</sup>。しかしながら、本研究で UTP は P2X<sub>1</sub> 様チャンネルをも活性化し、nifedipine 感受性電位作動性 Ca<sup>2+</sup> チャンネルの開口により、一過性の収縮とそれに引き続く持続性の収縮と二相性の収縮を引き起こすことが明らかとなった。この結果は McLaren ら<sup>22)</sup> により報告されているラット尾動脈平滑筋での結果からも支持される<sup>24)</sup>。さらに、腸間膜動脈平滑筋においては局所で交感神経の電場刺激によって P2X<sub>1</sub> チャンネルが活性化し、一過性の神経—筋接合部での Ca<sup>2+</sup> 流入 (jCaTs) と随伴する一過性収縮と  $\alpha$ -アドレナリン受容体の活性化による持続性収縮が起こるという報告がある<sup>25)</sup>。また、これらの jCaTs に伴う血管径の減少は P2X<sub>1</sub> チャンネル欠損マウスでは完全に消失するという報告がある<sup>26)</sup>。加えて、Morita らはモルモットの腸間膜動脈において、ATP は P2Y 受容

体(P2Y<sub>1</sub> および P2Y<sub>11</sub> 様受容体)を活性化し、G<sub>s</sub> / protein kinase A (PKA) および G<sub>q/11</sub> / protein kinase C (PKC) 経路を介して、ニフェジピン非感受性電位依存性 Ca<sup>2+</sup> チャンネルを抑制および増強という相反した作用調節を行っている<sup>27, 28)</sup>。よって、種や脈管構造の部位による P2 サブタイプのばらつきはあるとしても、ATP や UTP により P2X (P2X<sub>1</sub>) チャンネルと P2Y 受容体の両方が活性化することは、血管緊張の調節を行う上で共通のメカニズムであると考えるのは妥当である。

低酸素や炎症のような病態生理学的状態では、UTP や ATP は内皮や平滑筋細胞から放出される<sup>1, 29)</sup>。また、培養した線維芽細胞において低酸素状態では、エクトヌクレオチダーゼの活性が低下し、ATP 濃度が上昇するという興味深い報告がある<sup>30)</sup>。これらのメカニズムは局所の細胞外 UTP や ATP 濃度を増加させるのに寄与している可能性がある。細胞の UTP 濃度は ATP 濃度の約 10% といわれており<sup>29)</sup>、血小板から放出される局所の ATP 濃度は 15 ~ 20μM と Beige らによって報告されている<sup>31)</sup>。したがって、UTP は約 1.5 ~ 2.0μM 放出されると推測できる。これは平滑筋収縮を引き起こす P2X<sub>1</sub> 受容体を活性化するのに十分な濃度ではないかもしれない。しかしながら、血管内圧またはそれによる伸展刺激(機械刺激)によって直接 PLC 共役型受容体が活性化したり、受容体活性化薬の感受性が著しく増強したりすることがわかっている<sup>32, 33)</sup>。したがって、血圧のような機械刺激存在下で、低濃度 UTP が PLC 共役型 P2Y 受容体を活性化する可能性は排除できない。実際、本研究でも P2X<sub>1</sub> チャンネルの阻害薬である TNP-ATP が張力を与えていない状態、すなわちパッチクランプ法下での UTP 活性化電流へ与える効果と、1g の負荷を与えて行った張力測定法での効果とを対比させたところ、張力測定法では主に P2X<sub>1</sub> に寄与している一過性収縮を完全に抑制するが、P2X<sub>1</sub> チャンネルと P2Y 受容体に寄与する持続性収縮では抑制効果が低かった。この結果から、機械刺激は P2Y 受容体を介する情報伝達を優先的に増強し、P2X<sub>1</sub> チャンネルと比較して持続性収縮を増加させることが示唆される。このことは、

生体内で UTP による血管の緊張制御がどの濃度範囲でどの P2 受容体を活性化していくのかを探る、将来の重要な課題となると考えられる。

炎症時、細胞の腫脹や組織でのうっ血は細胞膜張力または細胞周囲の組織内圧を上昇させる可能性がある。さらに、UTP 放出を増加させ P2X<sub>1</sub> チャネルと P2Y 受容体近傍の機械的感受性を増加させる可能性もある。これらの現象は血管損傷時にさらに顕著に起こり、損傷した細胞から大量の UTP や ATP が放出され、P2X<sub>1</sub> チャネルと P2Y 受容体の活性化を介して、局所の血管緊張に影響している可能性がある。低酸素状態の細胞でも細胞内 ATP レベルは通常 20 ~ 30% 程度の 3mM 以上もあると言われている<sup>34)</sup>。したがって、損傷した細胞からは少なくとも 300μM の UTP が放出されることになる。これは P2X<sub>1</sub> チャネルと P2Y 受容体を活性化するのに十分な量である (図 1、2、3、8)。興味深いことに、くも膜下出血モデルウサギでは、擬似的にくも膜下出血を起こした状態から 24 時間後に、大脳動脈の UTP による収縮力が健全ウサギのものに比して、低濃度 (1~3μM) でのみ増強が起こったという報告がある<sup>35)</sup>。この反応は、処置後 10 分では観察されなかったことから、慢性的なものであると考えられ、くも膜下出血後の血管内圧上昇に引き続く脳血管攣縮に関連付けることができると考えられた。このような病変での現象は、病態生理学的状態で、UTP によって引き起こされる異常な血管反応の増強が意義あるものであると強く考えさせられる。

結論として、本研究では細胞外 UTP によって P2X<sub>1</sub> チャネルと P2Y 受容体の両者が活性化されること、また、それにより、ニフェジピン感受性 Ca<sup>2+</sup> チャネルを介した Ca<sup>2+</sup> 流入や筋小胞体からの細胞内 Ca<sup>2+</sup> 放出によって二相性の血管収縮が引き起こされることが明らかとなった。以上の結果から、虚血状態や梗塞、くも膜下出血時などにおける UTP による異常な血管応答が病態生理学的な役割を示している可能性があり、動脈における UTP 受容体 (P2X<sub>1</sub> と P2Y) が虚血や炎症性血管障害、血管損傷時の有望な標的となる可能性が示唆された。

## 謝辞

本研究に際して、終始熱心なご指導をいただきました森田 浩光先生(九州大学病院 特殊歯科総合治療部 全身管理歯科)に深く感謝いたします。そして、温かく見守っていただき、折に触れてご指導、ご討議いただきました平田 雅人教授(九州大学大学院歯学研究院 口腔細胞工学)、伊東 祐之教授(熊本保健科学大学 保健科学部)、安部 喜八郎准教授(九州大学病院 特殊歯科総合治療部 全身管理歯科)に深く感謝いたします。また、本研究を遂行するにあたりまして、ご指導、ご助言いただきました、松田 美穂先生(九州大学大学院歯学研究院 口腔細胞工学)、井上 良介先生(九州大学病院 特殊歯科総合治療部 全身管理歯科)に深く感謝いたします。最後に、九州大学大学院歯学研究院 口腔細胞工学、九州大学病院特殊歯科総合治療部 全身管理歯科の皆様にご心より感謝いたします。

## 参考文献

1. Erlinge D, Burnstock G. P2 receptors in cardiovascular regulation and disease. *Purinergic Signal*. 2008;4(1):1-20.
2. Burnstock G. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacol Rev*. 2006;58(1):58-86.
3. Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*. 1998;50(3):413-492.
4. Kuriyama H, Kitamura K, Itoh T, Inoue R. Physiological features of visceral smooth muscle cells, with special reference to receptors and ion channels. *Physiol Rev*. 1998;78(3):811-920.
5. Welsh DG, Brayden JE. Mechanisms of coronary artery depolarization by uridine triphosphate. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280(6):H2545-2553.
6. Reading SA, Earley S, Waldron BJ, Welsh DG, Brayden JE. TRPC3 mediates pyrimidine receptor-induced depolarization of cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(5):H2055-2061.
7. Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature*. 2003;426(6966):517-524.
8. North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev*. 2002;82(4):1013-1067.
9. Usachev YM, Marchenko SM, Sage SO. Cytosolic calcium concentration in resting and stimulated endothelium of excised intact rat aorta. *J Physiol*. 1995;489 ( Pt 2):309-317.
10. Morita H, Shi J, Ito Y, Inoue R. T-channel-like pharmacological properties of

- high voltage-activated, nifedipine-insensitive  $\text{Ca}^{2+}$  currents in the rat terminal mesenteric artery. *Br J Pharmacol.* 2002;137(4):467-476.
11. Fleischmann BK, Murray RK, Kotlikoff MI. Voltage window for sustained elevation of cytosolic calcium in smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(25):11914-11918.
  12. Benham CD, Tsien RW. A novel receptor-operated  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable channel activated by ATP in smooth muscle. *Nature.* 1987;328(6127):275-278.
  13. Gever JR, Cockayne DA, Dillon MP, Burnstock G, Ford AP. Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch.* 2006;452(5):513-537.
  14. Virginio C, Robertson G, Surprenant A, North RA. Trinitrophenyl-substituted nucleotides are potent antagonists selective for P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>3</sub>, and heteromeric P2X<sub>2/3</sub> receptors. *Mol Pharmacol.* 1998;53(6):969-973.
  15. Mironneau J, Coussin F, Morel JL, Barbot C, Jeyakumar LH, Fleischer S, Mironneau C. Calcium signalling through nucleotide receptor P2X<sub>1</sub> in rat portal vein myocytes. *J Physiol.* 2001;536(Pt 2):339-350.
  16. Albert AP, Pucovsky V, Prestwich SA, Large WA. TRPC3 properties of a native constitutively active  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable cation channel in rabbit ear artery myocytes. *J Physiol.* 2006;571(Pt 2):361-369.
  17. Kiyonaka S, Kato K, Nishida M, Mio K, Numaga T, Sawaguchi Y, Yoshida T, Wakamori M, Mori E, Numata T, Ishii M, Takemoto H, Ojida A, Watanabe K, Uemura A, Kurose H, Morii T, Kobayashi T, Sato Y, Sato C, Hamachi I, Mori Y. Selective and direct inhibition of TRPC3 channels underlies biological activities of a pyrazole compound. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(13):5400-5405.
  18. Boulay G, Zhu X, Peyton M, Jiang M, Hurst R, Stefani E, Birnbaumer L.

- Cloning and expression of a novel mammalian homolog of Drosophila transient receptor potential (Trp) involved in calcium entry secondary to activation of receptors coupled by the Gq class of G protein. *J Biol Chem.* 1997;272(47):29672–29680.
19. Zhu X, Jiang M, Birnbaumer L. Receptor-activated  $\text{Ca}^{2+}$  influx via human Trp3 stably expressed in human embryonic kidney (HEK)293 cells. Evidence for a non-capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry. *J Biol Chem.* 1998;273(1):133–142.
  20. Trebak M, Bird GS, McKay RR, Putney JW, Jr. Comparison of human TRPC3 channels in receptor-activated and store-operated modes. Differential sensitivity to channel blockers suggests fundamental differences in channel composition. *J Biol Chem.* 2002;277(24):21617–21623.
  21. Inoue R, Okada T, Onoue H, Hara Y, Shimizu S, Naitoh S, Ito Y, Mori Y. The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular  $\alpha(1)$ -adrenoceptor-activated  $\text{Ca}^{(2+)}$ -permeable cation channel. *Circ Res.* 2001;88(3):325–332.
  22. Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev.* 2006;58(3):281–341.
  23. Kamouchi M, Philipp S, Flockerzi V, Wissenbach U, Mamin A, Raeymaekers L, Eggermont J, Droogmans G, Nilius B. Properties of heterologously expressed hTRP3 channels in bovine pulmonary artery endothelial cells. *J Physiol.* 1999;518 Pt 2:345–358.

24. McLaren GJ, Sneddon P, Kennedy C. Comparison of the actions of ATP and UTP and P(2X<sub>1</sub>) receptors in smooth muscle of the rat tail artery. *Eur J Pharmacol.* 1998;351(1):139–144.
25. Lamont C, Vainorius E, Wier WG. Purinergic and adrenergic Ca<sup>2+</sup> transients during neurogenic contractions of rat mesenteric small arteries. *J Physiol.* 2003;549(Pt 3):801–808.
26. Lamont C, Vial C, Evans RJ, Wier WG. P2X<sub>1</sub> receptors mediate sympathetic postjunctional Ca<sup>2+</sup> transients in mesenteric small arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291(6):H3106–3113.
27. Morita H, Cousins H, Onoue H, Ito Y, Inoue R. Predominant distribution of nifedipine-insensitive, high voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channels in the terminal mesenteric artery of guinea pig. *Circ Res.* 1999;85(7):596–605.
28. Morita H, Sharada T, Takewaki T, Ito Y, Inoue R. Multiple regulation by external ATP of nifedipine-insensitive, high voltage-activated Ca<sup>(2+)</sup> current in guinea-pig mesenteric terminal arteriole. *J Physiol.* 2002;539(Pt 3):805–816.
29. Anderson CM, Parkinson FE. Potential signalling roles for UTP and UDP: sources, regulation and release of uracil nucleotides. *Trends Pharmacol Sci.* 1997;18(10):387–392.
30. Gerasimovskaya EV, Ahmad S, White CW, Jones PL, Carpenter TC, Stenmark KR. Extracellular ATP is an autocrine/paracrine regulator of hypoxia-induced adventitial fibroblast growth. Signaling through extracellular signal-regulated kinase-1/2 and the Egr-1 transcription factor. *J Biol Chem.* 2002;277(47):44638–44650.
31. Beigi R, Kobatake E, Aizawa M, Dubyak GR. Detection of local ATP release

- from activated platelets using cell surface-attached firefly luciferase. *Am J Physiol.* 1999;276(1 Pt 1):C267-278.
32. Inoue R, Jensen LJ, Jian Z, Shi J, Hai L, Lurie AI, Henriksen FH, Salomonsson M, Morita H, Kawarabayashi Y, Mori M, Mori Y, Ito Y. Synergistic activation of vascular TRPC6 channel by receptor and mechanical stimulation via phospholipase C/diacylglycerol and phospholipase A2/omega-hydroxylase/20-HETE pathways. *Circ Res.* 2009;104(12):1399-1409.
  33. Mederos y Schnitzler M, Storch U, Meibers S, Nurwakagari P, Breit A, Essin K, Gollasch M, Gudermann T. Gq-coupled receptors as mechanosensors mediating myogenic vasoconstriction. *EMBO J.* 2008;27(23):3092-3103.
  34. Pearce WJ. Mechanisms of hypoxic cerebral vasodilatation. *Pharmacol Ther.* 1995;65(1):75-91.
  35. Debdi M, Seylaz J, Sercombe R. Early changes in rabbit cerebral artery reactivity after subarachnoid hemorrhage. *Stroke.* 1992;23(8):1154-1162.