

G タンパク共役型プロテアーゼ受容体 PAR-2 (Protease-Activated Receptor-2) の外分泌腺における役割

西川 裕之

Roles of Protease-Activated Receptor-2 (PAR-2), a G Protein-Coupled Receptor, in Modulation of Exocrine Gland Functions

Hiroyuki NISHIKAWA

Research and Development Center, Fuso Pharmaceutical Industries, Ltd.,
2-3-30 Morinomiya, Joto-ku, Osaka 536-8523, Japan

(Received April 7, 2006)

Protease-activated receptor-2 (PAR-2), a G protein-coupled receptor, is activated by proteolytic unmasking of the N-terminal extracellular tethered ligand that presumably binds to the extracellular loop 2 of the receptor itself. PAR-2 is widely distributed in the mammalian body and plays various roles in biological events in the cardiovascular, respiratory, alimentary, and central neurons systems. PAR-2-activating peptides administered systemically to mice and rats trigger prompt salivation *in vivo*. In an *in vitro* study, PAR-2 agonists including the endogenous PAR-2 activator trypsin induce secretion of amylase and mucin from isolated rat parotid glands and sublingual glands, respectively. PAR-2-activating peptides administered systemically also modulate pancreatic exocrine secretion *in vivo* as well as *in vitro*. In the gastric mucosa, PAR-2 stimulation enhances secretion of mucus and pepsinogen and suppresses acid secretion. Tear secretion can also be caused by PAR-2-related peptides in PAR-2-dependent and -independent manners. PAR-2 thus plays a general or key role in the regulation of exocrine secretion. This review focuses on the physiologic and/or pathophysiologic roles of PAR-2 in glandular exocrine secretion. The possibility of PAR-2 as a target for drug development is also discussed.

Key words—protease (proteinase)-activated receptor (PAR)-2; exocrine gland; salivation; tear secretion; gastrointestinal tract; gastric secretion

1. はじめに

G タンパク質共役受容体 (G Protein-Coupled Receptor, GPCR) は、7 回膜貫通構造を有し 3 量体 G タンパク質を活性化することにより細胞外シグナルを細胞内へと伝達する。GPCR は受容体タンパク質の中で最大のスーパーファミリーを形成しており、現在臨床に用いられている約半数近くの薬物の作用点が GPCR であることから創薬における重要なターゲット分子の 1 つである。1991 年、GPCR に属し、それまでとは異なったメカニズムで活性化される protease-activated receptor (PAR) が発見された。その活性化メカニズムはセリンプロ

テアーゼによって細胞外に露出している N 末端ペプチド鎖が特定部位で切断され、新しく作り出された N 末端構造が tethered ligand として受容体自身の細胞外第 2 ループに結合することによって活性化されるといった非常にユニークなものである (Fig. 1(A)).¹⁻³⁾ トロンビン受容体として PAR-1⁴⁾ が発見されて以後、PAR-2、PAR-3 及び PAR-4 が相次いでクローニングされている。⁵⁻⁸⁾ これらのうち PAR-1、PAR-3 及び PAR-4 はトロンビンによって、PAR-2 はトリプシン、トリプターゼあるいは血液凝固第 VIIa 及び Xa 因子によって活性化される。^{1,9-11)} また、興味深いことに PAR-3 以外の PARs は、tethered ligand のアミノ酸配列に基づいて合成した 5-7 個のアミノ酸からなるオリゴペプチドによっても活性化することができる (Fig. 1(B)).^{1-5,7)}

PARs, 特に PAR-2 は様々な臓器、組織あるい

扶桑薬品工業株式会社研究開発センター (〒536-8523 大阪市城東区森之宮 2-3-30)

e-mail: h-nishikawa@fuso-pharm.co.jp

本総説は、平成 17 年度日本薬学会近畿支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

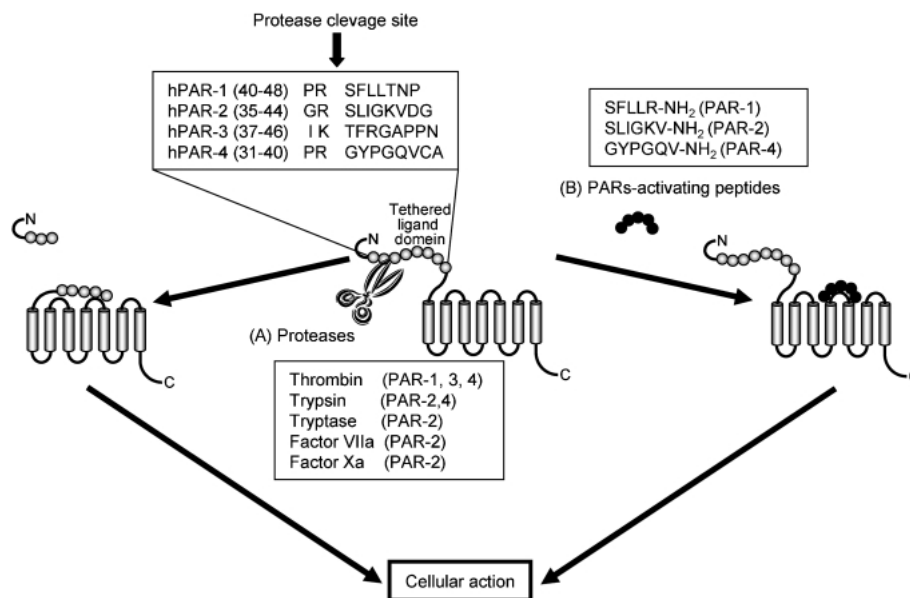


Fig. 1. Mechanisms for Enzymatic and Non-enzymatic Activation of PARs

は細胞に発現し、特に循環器系、呼吸器系、消化器系あるいは中枢神経系における種々の生理あるいは病態生理に深く関与している。PARsの一般的機能については、既に優れた総説^{1-3,12-14}が多数あるのでそちらを参照して頂きたい。本総説では涙液分泌を始めとする外分泌機能の制御におけるPAR-2の役割を中心に紹介する。

2. PAR-2と涙液分泌

われわれは、RT-PCR法によりラットの涙腺においてPAR-2 mRNAが豊富に発現していることを認め、PAR-2と涙液分泌の関係について検討した。ラット・マウス型PAR-2活性化ペプチドであるSLIGRL-NH₂をラットに全身性投与すると用量依存的に涙液分泌が誘起されたが、SLIGRL-NH₂のアミノ酸配列を完全に逆配列構造にしたPAR-2非活性型コントロールペプチドであるLRGILS-NH₂の投与では涙液分泌はみられなかった。¹⁵⁾一方、SLIGRL-NH₂の1位と2位のアミノ酸のみを逆配列にしたLSIGRL-NH₂は、上述の完全逆配列ペプチドと同様にPAR-2を全く活性化することができないが、SLIGRL-NH₂と同程度の涙液分泌亢進作用を示した。また、ヒト型PAR-2活性化ペプチドであるSLIGKV-NH₂は、SLIGRL-NH₂(ラット・マウス型)よりも作用は弱いが涙液分泌を誘起した。ところが、ラット・マウス型の場合とは異なり、SLIGKV-NH₂のアミノ酸配列を完全に逆配列にし

たVKGILS-NH₂及び1位と2位のアミノ酸のみを逆配列にしたLSIGKV-NH₂は、いずれも涙液分泌を全く誘起しなかった。¹⁵⁾このようにPAR-2関連ペプチドのうち、PAR-2活性化ペプチドであるSLIGRL-NH₂、SLIGKV-NH₂とPAR-2非活性型ペプチドであるLRGILS-NH₂のみが涙液分泌活性を有することが分かった。これらのPAR-2関連ペプチドによる涙液分泌にPAR-2が関与するか否かを明らかにするためには、PAR-2アンタゴニストを用いた拮抗実験を行うべきであるが、現在に至っても十分な特異性及び効力を有するPAR-2アンタゴニストは利用できる状態にはない。そこで、われわれはPAR-2関連ペプチドを用いた脱感作実験を行うことによりPAR-2の関与について検討した。ラットにSLIGRL-NH₂を全身性投与した直後に再度SLIGRL-NH₂を投与すると、2度目に投与したSLIGRL-NH₂の涙液分泌作用は消失し、脱感作現象が認められた(Fig. 2(A)).¹⁵⁾同様にLSIGRL-NH₂の前処置により2度目に投与したLSIGRL-NH₂の涙液分泌作用は阻止された(Fig. 2(C)).¹⁵⁾そこで、SLIGRL-NH₂の前処置後にLSIGRL-NH₂を投与すると、涙液分泌作用は一部抑制されたが完全には阻止されなかった(Fig. 2(B)).¹⁵⁾一方、LSIGRL-NH₂の前処置はSLIGRL-NH₂の涙液分泌亢進作用には全く影響を与えなかった(Fig. 2(D)).¹⁵⁾これらの結果から、SLIGRL-NH₂は主に

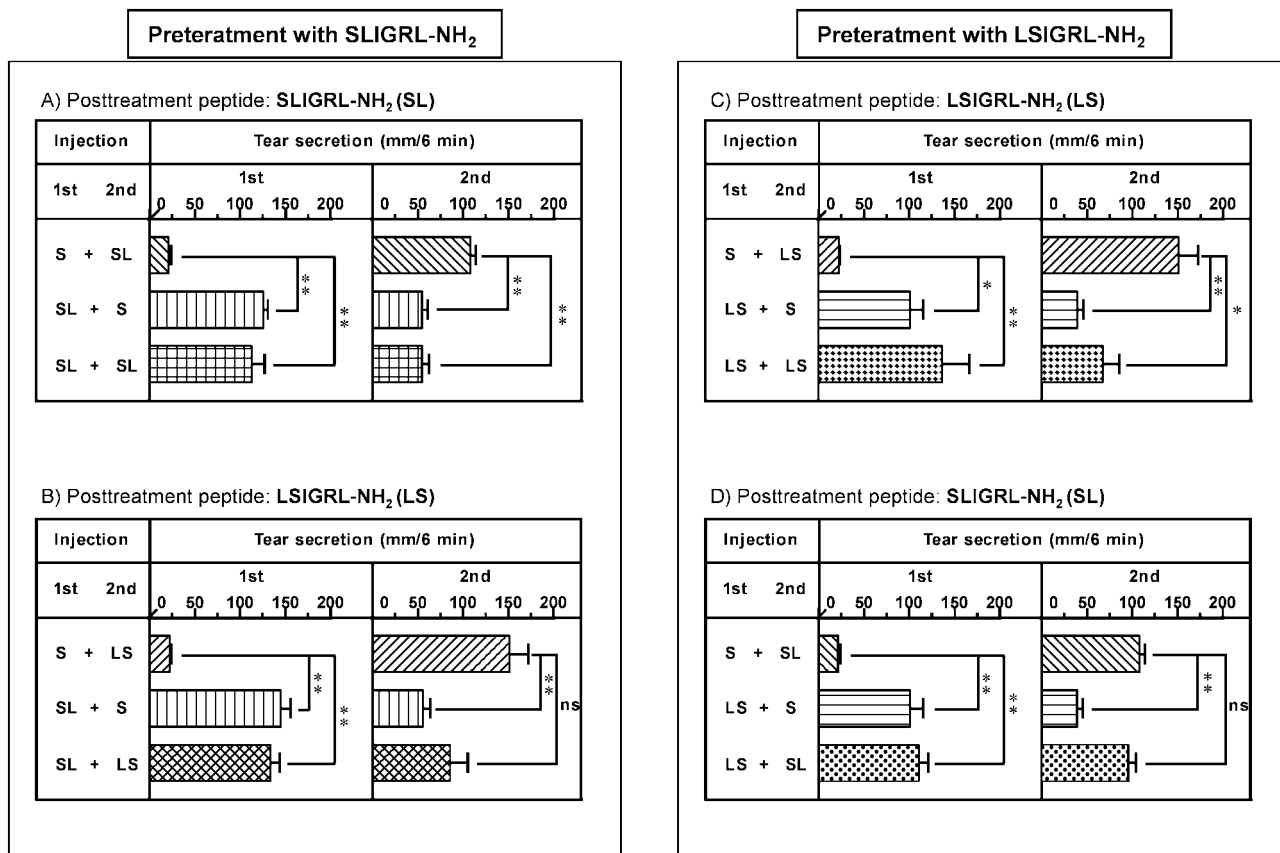


Fig. 2. Effects of Pretreatment with SLIGRL-NH₂ (SL) or LSIGRL-NH₂ (LS) on Tear Secretion Caused by Subsequent Administration of SL or LS in Anesthetized Rats

S: vehicle. **p*<0.05 and ***p*<0.01. ns: not significant. Reproduced from Ref. 15.

PAR-2 を活性化することにより涙液分泌を誘起すると推察されるが、LSIGRL-NH₂ の作用は PAR-2 とは異なる未知のメカニズムを介したものと考えられる (Fig. 3). また、上述のように SLIGRL-NH₂ の前処置が LSIGRL-NH₂ の作用を一部抑制したことより、SLIGRL-NH₂ は PAR-2 以外に、LSIGRL-NH₂ の標的分子にも一部作用しているかもしれない (Fig. 3). そこで、われわれは種々の阻害実験を行うことにより SLIGRL-NH₂ と LSIGRL-NH₂ の涙液分泌亢進作用の特徴をさらに比較検討した. その結果、LSIGRL-NH₂ による涙液分泌亢進は抗ムスカリン薬アトロピンあるいは自律神経節遮断薬ヘキサメトニウムによって完全に阻止されたが、SLIGRL-NH₂ 及び SLIGKV-NH₂ による涙液分泌亢進はアトロピンによって若干小さくなったもののほとんど抑制されなかった.¹⁵⁾ このことから、LSIGRL-NH₂ は副交感神経系の活性化を介して涙液分泌を亢進させるのに対して、SLIGRL-NH₂ 及び SLIGKV-NH₂ の涙液分泌亢進には副交感神経系

はほとんど関与しないと考えられる (Fig. 3). 一方、SLIGRL-NH₂ 及び LSIGRL-NH₂ はいずれも肥満細胞を脱顆粒させる¹⁶⁻¹⁸⁾ ことより、これらペプチドの涙液分泌亢進作用に肥満細胞が関与する可能性も考えられる. しかし、SLIGRL-NH₂ 及び LSIGRL-NH₂ による涙液分泌亢進は、compound 48/80 の反復前投与により肥満細胞を枯渇させたラットにおいても抑制されないことから、肥満細胞の関与は否定されている.¹⁵⁾ また、PAR-2 はカプサイシン感受性神経に存在し、その活性化により痛みを惹起¹⁹⁾ したり、胃粘膜保護作用を示す²⁰⁾ ことから、SLIGRL-NH₂ の涙液分泌作用にもカプサイシン感受性神経が関与する可能性が考えられる. しかし、カプサイシンの大量投与によりカプサイシン感受性神経を破壊したラットにおいても涙液分泌亢進作用が認められたことから、カプサイシン感受性神経の関与は否定されている (投稿準備中).

上記の知見より、PAR-2 アゴニストである SLIGRL-NH₂ あるいは PAR-2 非活性型ペプチドで

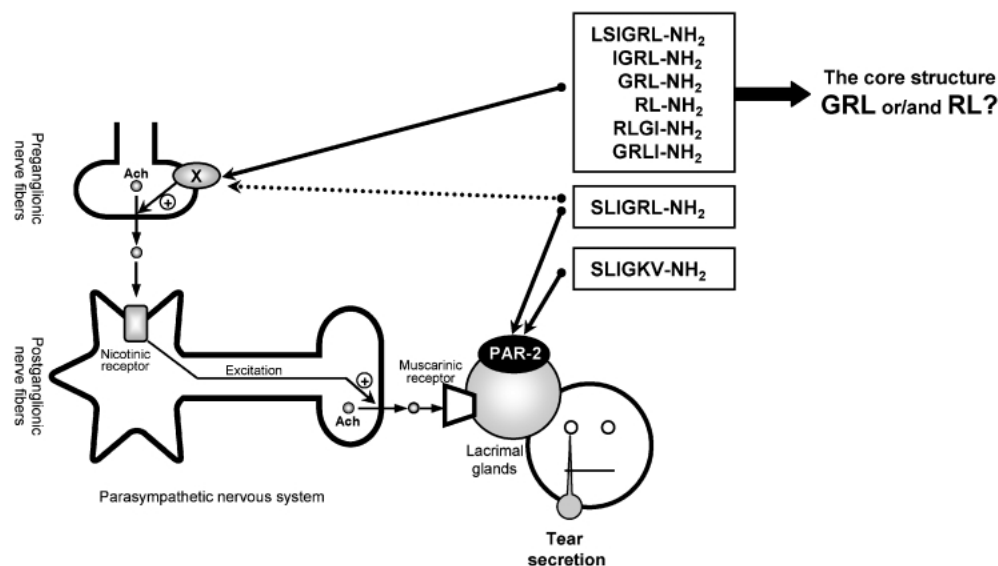


Fig. 3. Summary of Screening of Peptides Consisting of the Constituent Amino Acids of LSI GRL-NH₂ and Sites of Action of Each Peptide

Reproduced from Ref. 15.

ある LSI GRL-NH₂ がシェーグレン症候群やドライアイなどの涙液分泌異常を示す疾患に対する治療薬として利用できる可能性が考えられる。しかし、PAR-2 は種々の臓器細胞に存在し多様な生理機能あるいは病態に複雑に関与していることから、PAR-2 の活性化により予期しない有害反応が起こる危険性も考慮しなくてはならない。そこでわれわれは、PAR-2 アゴニストよりも、むしろ PAR-2 非活性型の LSI GRL-NH₂ の涙液分泌作用に着目し、構造活性相関研究により LSI GRL-NH₂ の作用発現に重要な基本構造の解析を試みた。その結果、LSI GRL-NH₂ の N 末端側のアミノ酸 2 つを除いた I GRL-NH₂ が涙液分泌を亢進させ、その作用はアトロピンにより抑制されることを見出した。¹⁵⁾ すなわち、LSI GRL-NH₂ の涙液分泌作用には I GRL 構造が重要であると考えられる。そこで I, G, R, L の 4 つのアミノ酸のランダムな組み合わせによる 23 種類の tetrapeptide を合成して検討を進めたところ、RLGI-NH₂ 及び GRLI-NH₂ の 2 つのペプチドにもアトロピン感受性の涙液分泌亢進作用が認められた。さらに、I GRL-NH₂ の 1-3 位のアミノ酸からなる tripeptide である IGR-NH₂ は涙液分泌亢進作用を示さなかったが、2-4 位のアミノ酸からなる GRL-NH₂ は涙液分泌亢進作用を示し、この作用もアトロピンにより抑制された。また、GRL-NH₂ に比べ弱い作用ではあったが、dipeptide である RL-

NH₂ も涙液分泌を惹起した。このことから LSI GRL-NH₂ の涙液分泌亢進作用には RL の配列が最低限必要であることが明らかとなった（投稿準備中）（Fig. 3）。この dipeptide の基本構造から涙液分泌亢進作用を有する低分子化合物の設計、合成、さらに標的分子の同定に発展させることができれば創薬への可能性が広がる。さらに、点眼による適用にも応用可能な低分子化合物を見出すことができれば、涙液分泌異常を伴う各種疾患の治療への臨床応用も可能になるのではないかと考えている。

3. PAR-2 と唾液分泌

ラットの耳下腺、舌下腺及び顎下腺には PAR-2 が豊富に発現している。^{1,21,22)} *In vivo* において PAR-2 活性化ペプチドである SLI GRL-NH₂ を始めとするいくつかの PAR-2 活性化ペプチドはマウスに静脈内投与することにより投与 1 分後をピークとする唾液分泌を誘起するが、前述の涙液分泌の場合とは異なり、PAR-2 非活性型コントロールペプチドである LSI GRL-NH₂ は唾液分泌を全く誘起しない。²²⁾ 一方、PAR-1 特異的活性化ペプチドである TFLLR-NH₂ を全身投与しても唾液分泌は起こらない。²²⁾ さらに、PAR-2 活性化ペプチドの N 末のセリン残基をフロイル基に置換した 2-furoyl-LI GRL-NH₂ は、SLI GRL-NH₂ の約 100 倍の唾液分泌活性を有し、^{23,24)} その作用は PAR-2 ノックアウトマウスにおいて完全に消失する。²³⁾ また、*in vitro* にお

いて、SLIGRL-NH₂あるいは*N-trans*-cinnamoyl-LIGRL-ornithine-NH₂などのPAR-2特異的活性化ペプチドに加え、PAR-2の内因性活性化酵素であるトリプシンにより、耳下腺スライスからのアミラーゼの分泌が亢進する。²²⁾一方、PAR-1活性化ペプチドであるTFLLR-NH₂やA (parafluoro-)FR-(cyclohexyl-)A-citrulline-Y-NH₂, PAR-4活性化ペプチドであるGYPGKF-NH₂及びPAR-1, -3, -4の内因性活性化酵素であるトロンピンには、そのような作用はみられない。²²⁾さらに、PAR-2アゴニストは摘出した舌下腺からのムチン分泌も亢進させる。²¹⁾*In vivo*でのPAR-2アゴニストによる唾液分泌亢進はアトロピン、フェントラミン、プロプラノロール及びインドメタシンによって抑制されないことから、この作用はムスカリン受容体、 α 及び β 受容体さらには、プロスタグランジンの産生を介したのではなく、²²⁾また、カプサイシン感受性神経系の関与も否定されている。²⁰⁾このようにPAR-2の活性により、涙液分泌のみならず唾液分泌が亢進することからPAR-2はシェーグレン症候群の治療薬開発のターゲットとして非常に興味深い分子である。

4. PAR-2と胃液分泌

*In vivo*においてPAR-2活性化ペプチドであるSLIGRL-NH₂を全身性投与すると胃粘液分泌が惹起されるが、PAR-2非活性型コントロールであるLSIGRL-NH₂は無効である。²⁰⁾この胃粘液分泌亢進作用はシクロオキシゲナーゼ阻害剤であるジクロフェナックでは抑制されないが、カプサイシン感受性神経の破壊によって抑制される。²⁰⁾さらに、カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)のCGRP₁受容体、あるいはニューロキニンAの受容体であるNK2を遮断することによって抑制される。²⁰⁾このことから胃粘液分泌亢進作用の発現には内因性プロスタグランジンは関与せず、胃粘膜に存在するカプサイシン感受性神経の活性化が重要であることが判明した。すなわち、感覚神経終末に存在すると考えられるPAR-2が活性化されることにより、CGRP及びニューロキニンAが遊離され、それぞれCGRP₁及びNK2受容体を介して胃粘液分泌が誘起されることが明らかとなった(Fig. 4)。²⁰⁾

PAR-2は胃酸分泌の調節にも関与している。麻醉ラットにPAR-2活性化ペプチドであるSLIGRL-

NH₂を全身性投与しても胃酸の基礎分泌に変化はみられないが、²⁵⁾カルバコール、pentagastrin、あるいは2-deoxy-D-glucoseにより惹起される胃酸分泌の亢進は、PAR-2活性化ペプチドにより抑制される。²⁵⁾このPAR-2活性化ペプチドの胃酸分泌抑制作用はインドメタシンによって阻止されず、また、カプサイシンの大量投与によっても抑制されない²⁵⁾ことから、内因性プロスタグランジン及びカプサイシン感受性神経の関与は否定されている(Fig. 4)。また、SLIGRL-NH₂はラット胃における重炭酸イオンの分泌を促進させるが、十二指腸では重炭酸イオン分泌に影響しない(投稿準備中)。一方、PAR-2特異的抗体を用いた免疫染色によりPAR-2はラット胃粘膜において主細胞に豊富に発現することが証明され、²⁶⁾また、PAR-2アゴニストであるSLIGRL-NH₂の反復投与によりペプシノーゲンの分泌が促進されることも明らかとなっている。²⁶⁾このペプシノーゲン分泌亢進作用は、プロトンポンプ阻害薬であるオメプラゾールにより抑制されないことから胃酸分泌に依存したのではない。²⁶⁾また、このペプシノーゲン分泌亢進作用はカプサイシン感受性神経の破壊、一酸化窒素合成酵素阻害剤L-ニトロアルギニンメチルエステル(L-NAME)及びアトロピンにより阻害されないことから、カプサイシン感受性神経、一酸化窒素及び副交感神経系の関与も否定されており、恐らく主細胞に発現しているPAR-2が直接活性化された結果ペプシノーゲン分泌が亢進したものと考えられる(Fig. 4)。²⁶⁾このことよりPAR-2は攻撃因子的な面を併せ持つと考えられるが、PAR-2の活性化によりペプシノーゲンからペプシンへの変換に重要な胃酸の分泌が抑制される²⁵⁾ため、通常の条件下では攻撃因子的な面はあまり考慮しなくてもよいかもしれない(Fig. 4)。

このようにPAR-2は胃粘膜において非常に複雑な役割を演じているが、第一義的には胃粘膜保護の方向に機能している。実際、PAR-2活性化ペプチドにより塩酸・エタノールあるいはインドメタシンによる胃粘膜障害が軽減されるが、これは主にカプサイシン感受性神経の活性化を介したものである。²⁰⁾さらに、PAR-2は血管内皮細胞に発現し、その活性化により血管内皮由来過極因子(EDHF)依存的に*in vitro*では胃動脈の弛緩、^{27,28)}*in vivo*では胃粘膜血流増加を誘起する。²⁰⁾これらのことより、

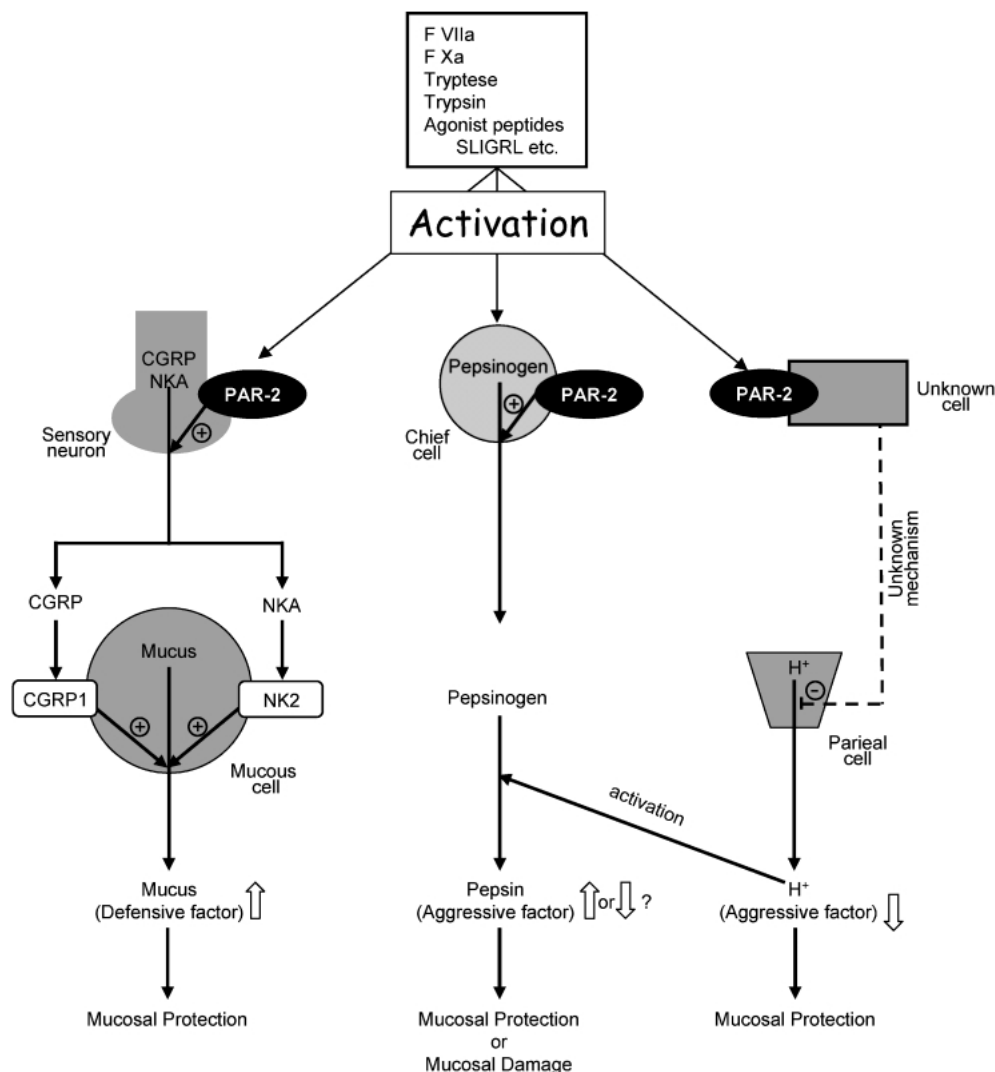


Fig. 4. Role for PAR-2 in Regulating the Secretion of Gastric Juice in the Gastric Mucosa
Reproduced from Ref. 13.

PAR-2は胃粘膜障害治療薬開発のための有力なターゲット分子であると考えられる。

5. PAR-2と膵液分泌

*In vivo*においてPAR-2アゴニストは膵液分泌を一過性に亢進させたのち、一時的に抑制し、その後持続的に亢進させる。²²⁾一方、PAR-2アゴニストは*in vitro*及び*in vivo*のいずれにおいても膵臓からのアミラーゼ分泌を亢進させる。^{29,30)}さらに、PAR-2の活性化により膵管上皮細胞のクロライドイオンチャネルが活性化されることも報告されている。³¹⁾このようにPAR-2は膵臓においても外分泌の調節に深く関与している。

6. おわりに

上述のようにPAR-2は種々の外分泌の生理機能

調節あるいは病態の発症において重要な役割を担っている。今後、より特異的で非ペプチド性のPAR-2アゴニストあるいはアンタゴニストが開発されれば、シェーグレン症候群を含む種々の外分泌異常を伴う疾患に対する新しい治療薬になり得る可能性があるものと考えられる。

謝辞 本研究の遂行にあたり、ご懇切なるご指導とご鞭撻を賜り、さらに、本総説を執筆するにあたり、貴重な助言を賜りました近畿大学薬学部川畑篤史教授に心より感謝申し上げます。

また、本総説で紹介した筆者の研究成果は、近畿大学薬学部生体機能病因解明学研究室及び扶桑薬品工業(株)研究開発センターにおいて得られたもので

す。これら実験に協力を頂きました生体機能病因解明学研究室講師関口富美子先生、大学院生並びに卒業実験生の皆様、さらに扶桑薬品(株)研究開発センターの皆様にご心よりお礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Kawabata A., *Expert Rev. Mol. Med.*, **2002**, 1-17 (2002).
- 2) Macfarlane S. R., Seatter M. J., Kanke T., Hunter G. D., Plevin R., *Pharmacol. Rev.*, **53**, 245-282 (2001).
- 3) Hollenberg M. D., Compton S. J., *Pharmacol. Rev.*, **54**, 203-217 (2002).
- 4) Vu T. K., Hung D. T., Wheaton V. I., Coughlin S. R., *Cell*, **64**, 1057-1068 (1991).
- 5) Nystedt S., Emilsson K., Wahlestedt C., Sundelin J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 9208-9212 (1994).
- 6) Ishihara H., Connolly A. J., Zeng D., Kahn M. L., Zheng Y. W., Timmons C., Tram T., Coughlin S. R., *Nature*, **386**, 502-506 (1997).
- 7) Xu W. F., Andersen H., Whitmore T. E., Presnell S. R., Yee D. P., Ching A., Gilbert T., Davie E. W., Foster D. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 6642-6646 (1998).
- 8) Kahn M. L., Zheng Y. W., Huang W., Bigornia V., Zeng D., Moff S., Farese Jr. R. V., Tam C., Coughlin S. R., *Nature*, **394**, 690-694 (1998).
- 9) Molino M., Bainton D. F., Hoxie J. A., Coughlin S. R., Brass L. F., *J. Biol. Chem.*, **272**, 6011-6017 (1997).
- 10) Camerer E., Huang W., Coughlin S. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 5255-5260 (2000).
- 11) Ossovskaya V. S., Bunnett N. W., *Physiol. Rev.*, **84**, 579-621 (2004).
- 12) Nishikawa H., Kawabata A., *Drug Dev. Res.*, **60**, 9-13 (2003).
- 13) Nishikawa H., Kawabata A., *Surg. Front.*, **12**, 135-143 (2005).
- 14) Steinhoff M., Buddenkotte J., Shpacovitch V., Rattenholl A., Moormann C., Vergnolle N., Luger T. A., Hollenberg M. D., *Endocr. Rev.*, **26**, 1-43 (2005).
- 15) Nishikawa H., Kawai K., Tanaka M., Ohtani H., Tanaka S., Kitagawa C., Nishida M., Abe T., Araki H., Kawabata A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **312**, 324-331 (2005).
- 16) Nishikawa H., Kawabata A., Kuroda R., Nishida M., Kawai K., *Jpn. J. Pharmacol.*, **82**, 74-77 (2000).
- 17) Steinhoff M., Corvera C. U., Thoma M. S., Kong W., McAlpine B. E., Caughey G. H., Ansel J. C., Bunnett N. W., *Exp. Dermatol.*, **8**, 282-294 (1999).
- 18) D'Andrea M. R., Rogahn C. J., Andrade-Gordon P., *Biotech. Histochem.*, **75**, 85-90 (2000).
- 19) Steinhoff M., Vergnolle N., Young S. H., Tognetto M., Amadesi S., Ennes H. S., Trevisani M., Hollenberg M. D., Wallace J. L., Caughey G. H., Mitchell S. E., Williams L. M., Gepetti P., Mayer E. A., Bunnett N. W., *Nat. Med.*, **6**, 151-158 (2000).
- 20) 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).
- 21) Kawabata A., Morimoto N., Nishikawa H., Kuroda R., Oda Y., Kakehi K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **270**, 298-302 (2000).
- 22) Kawabata A., Nishikawa H., Kuroda R., Kawai K., Hollenberg M. D., *Br. J. Pharmacol.*, **129**, 1808-1814 (2000).
- 23) Kawabata A., Kanke T., Yonezawa D., Ishiki T., Saka M., Kabeya M., Sekiguchi F., Kubo S., Kuroda R., Iwaki M., Katsura K., Plevin R., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **309**, 1098-1107 (2004).
- 24) Kawabata A., Oono Y., Yonezawa D., Hiramatsu K., Inoi N., Sekiguchi F., Honjo M., Hirofuchi M., Kanke T., Ishiwata H., *Br. J. Pharmacol.*, **144**, 212-219 (2005).
- 25) Nishikawa H., Kawai K., Nishimura S., Tanaka S., Araki H., Al-Ani B., Hollenberg M. D., Kuroda R., Kawabata A., *Eur. J. Pharmacol.*, **447**, 87-90 (2002).
- 26) Kawao N., Sakaguchi Y., Tagome A., Kuroda R., Nishida S., Irimajiri K., Nishikawa H., Kawai K., Hollenberg M. D., Kawabata A., *Br. J. Pharmacol.*, **135**, 1292-1296 (2002).
- 27) Kawabata A., Nakaya Y., Kuroda R., Wakisaka M., Masuko T., Nishikawa H., Kawai K., *Br. J. Pharmacol.*, **140**, 247-254 (2003).

-
- 28) Kawabata A., Nakaya Y., Ishiki T., Kubo S., Kuroda R., Sekiguchi F., Kawao N., Nishikawa H., Kawai K., *Life Sci.*, **75**, 2689–2702 (2004).
- 29) Kawabata A., Kuroda R., Nishida M., Nagata N., Sakaguchi Y., Kawao N., Nishikawa H., Arizono N., Kawai K., *Life Sci.*, **71**, 2435–2446 (2002).
- 30) Bohm S. K., Kong W., Bromme D., Smeekens S. P., Anderson D. C., Connolly A., Kahn M., Nelken N. A., Coughlin S. R., Payan D. G., Bunnett N. W., *Biochem. J.*, **314**, 1009–1016 (1996).
- 31) Nguyen T. D., Moody M. W., Steinhoff M., Okolo C., Koh D. S., Bunnett N. W., *J. Clin. Invest.*, **103**, 261–269 (1999).