

令和元年5月16日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08667

研究課題名（和文）In vivoパッチクランプ法と三次元電子顕微鏡を用いた脊髄痒覚シナプス機構解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanism of itch transmission to spinal cord using in vivo patch clamp and three-dimensional electron microscope.

研究代表者

歌 大介（Uta, Daisuke）

富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学）・助教

研究者番号：70598416

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：中枢における痒みの情報伝達機構の詳細は未だ不明である。そのため、in vivo記録法を用いて皮膚への痒み刺激により誘起される興奮性応答を詳細に解析した。さらに、痒み応答ニューロンを染色し、組織形態学的な解析も併せて行った。その結果、痒み応答ニューロンはdelayedやsustained repetitive発火パターンを示すことが分かり、組織形態学的に興奮性介在ニューロンであることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

痒みは非常に不快な感覚であり、特にアトピー性皮膚炎など慢性そう痒は既存薬物では効果を示さないことが多く患者のQOLを著しく低下させる。しかし、痒みの情報伝達機構は不明な点が多い。申請課題の研究成果により、痒みの情報伝達機構や、痒み受容ニューロンの特徴が明らかになった。このことは、今後慢性そう痒モデル動物を用いることで病態時の解析にも非常に役立つ成果である。更に、得られた成果は新規治療法、治療薬を開発するうえで重要な情報となりうる。

研究成果の概要（英文）：The mechanism for the itch transmission in the central nervous system remains unclear. The present study was designed to analyze pruritic synaptic responses evoked in spinal dorsal horn and cortex neurons of rodents by using an in vivo whole-cell patch-clamp and extracellular recording technique. The present main findings are that pruriceptive itch-sensitive afferent fibers evoke excitatory synaptic responses mainly onto delayed firing and sustained repetitive firing type neurons which are morphologically classified as the excitatory interneurons.

研究分野：神経生理学

キーワード：痒み 痛み in vivo patch clamp spinal dorsal horn 5-HT GRP electrophysiology

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

時に痒みは痛み以上に耐え難い感覚であるにもかかわらず、痛みに比べ脊髄における痒み情報の伝達やその調節機構の詳細は不明なことが多い。痒みの研究は行動薬理学的研究が主体で行われており、痒みの伝達機構の詳細は不明な点が多かった。近年、感覚情報の入り口である脊髄後角から細胞外記録法を用いて細胞の発火頻度の解析が行われ、Carstensらのグループが精力的に研究を進めている (Akiyama T, Merrill AW, Carstens MI, Carstens E. *J Neurosci.* 29(20):6691-6699, 2009)。しかし、脊髄への伝達経路、痒み情報を受容する細胞の形態組織学的特徴などはほとんど不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、*in vivo* パッチクランプ法を用いて痒みシナプス伝達機構の解析及び、記録細胞を染色し電子顕微鏡を用い組織形態学的解析を行い、痒み脊髄情報伝達機構の詳細の解明を試みた。

### 3. 研究の方法

本研究は、動物愛護・生命倫理の観点に十分配慮し、自然科学研究機構及び富山大学の定める規則に則り動物実験計画書を作成・提出し、富山大学動物実験委員会により承認を受けた後に開始した。又、実験動物に苦痛を与えないよう十分注意を払った。

(1) *In vivo* パッチクランプ記録法を用いた皮膚への痒み刺激誘起の脊髄シナプス応答の解析と薬理学的解析

ラットをウレタンで麻酔した後、椎弓切除を施行し脊髄を露出させ、定位固定装置で固定し、脊髄表面はKrebs液を灌流し、脊髄後角からホールセルパッチクランプ記録を行い、皮膚への痒み物質(5-HT)投与により誘起されるシナプス応答を詳細に定量解析した。更に、痒み特異的受容体として報告されているGRP受容体の阻害薬や興奮性情報伝達物質であるグルタミン酸の受容体阻害薬を投与し痒み情報伝達に關与する神経伝達物質や受容体の解析を行う。

#### (2) 痒み応答細胞の電気生理学的解析

*In vivo* パッチクランプ記録法により脊髄後角から記録した痒み応答細胞の電気生理学的特徴を解析するために、記録細胞に直接電流注入を行い記録細胞の発火パターンを解析し分類を行い、痒み応答細胞と非応答細胞での分布の違いについて解析を行う。

#### (3) 痒み応答細胞の形態組織学的解析

*In vivo* パッチクランプ記録法により脊髄後角から記録した痒み応答細胞を染色し、その形態や軸索投射部位を解析する。更に三次元電子顕微鏡を用いてシナプス構造の解析を合わせて行う。

### 4. 研究成果

(1) *In vivo* パッチクランプ記録法を用いた皮膚への痒み刺激誘起の脊髄シナプス応答の解析薬理学的解析

*In vivo* パッチクランプ記録法を用いて-70mVの電位固定下に脊髄表層から記録すると、全ての細胞で自発性の興奮性シナプス後電流(EPSC)が誘起された。皮膚へ侵害性刺激(機械的痛み刺激)や非侵害性刺激(機械的触刺激)など生理的的刺激を行い記録細胞の受容野を特定し、受容野に対し痒み物質(5-HT)を投与し、自発性EPSCに対するこれらの影響を観察した。これまでの申請者らの結果同様に、約3割の脊髄後角細胞で皮膚への痒み物質投与によりEPSCの長時間にわたる増強効果が見られた。引き続き、痒み情報伝達を担う神経伝達物質の解析を薬理学的に行った。痒み情報伝達を担う神経伝達物質としては、gastrin-releasing peptide (GRP)及びnatriuretic peptide B (Nppb)が知られている。そこで、皮膚への痒み物質投与によりEPSC増強効果が見られた細胞に対し、脊髄表面にGRP及びNppb受容体拮抗薬を灌流投与しEPSCへの影響を解析したが、EPSCの発生頻度及び振幅には有意な影響を与えていなかった。次に、興奮性伝達物質であるグルタミン酸のAMPA受容体拮抗薬を同様に投与したところEPSCが完全に抑制された。

#### (2) 痒み応答細胞の電気生理学的解析

痒み応答細胞と非応答細胞の特徴を調べるために電気生理学的特性の一つである発火パターンの解析などを行った。脊髄後角表層の細胞は主に4つの発火パターンに分類できることが報告されている。そのなかでも、痒み応答細胞ではdelayed firing、tonic firingの割合が痒み非応答細胞に比べ多い傾向にあった。一方で、静止膜電位などには痒み応答細胞と非応答細胞間で有意な差は認められなかった。

#### (3) 痒み応答細胞の形態組織学的解析

記録電極にbiocytinを添加し記録した痒み応答細胞を標識し、免疫染色を行い形態組織学的解析を行った。その結果、痒み応答細胞の細胞体は脊髄浅層に多く局在していた。この結果は、申請者がこれまでに得たc-Fos陽性細胞の解析結果と一致していた。痒み応答細胞の軸索投射

部位や樹状突起などの解析を行ったところ、多くの細胞では比較的特徴的な細胞形態をしていた。更にもその詳細を解析するため、三次元電子顕微鏡による微細構造の解析を行った。組織の固定方法など条件検討に膨大な時間がかかり、統計解析できるほどの例数は集まっていないが、現在引き続き解析を行っている。

#### (4) まとめ

本研究において、皮膚への痒み物質(5-HT)投与によって末梢で発生した活動電位が一部の脊髄浅層の膠様質細胞にシナプス入力し興奮性シナプス後電流(EPSC)の頻度を著明に増加させることが明らかとなった。痒み情報を伝える線維にはある種のTRPチャンネルが発現し、神経伝達物質は主にグルタミン酸が担っていることが明らかとなった。その一方で、痒み物質投与により増加したEPSCは痒みの情報伝達に重要と言われるgastrin-releasing peptide (GRP)及びnatriuretic peptide B (Nppb)の受容体拮抗では抑制されなかった。このことから、GRPやNppbは修飾的な役割を果たしていると考えられる。ついで、痒み応答細胞の電気生理学的特徴を調べたところ、痒み応答細胞は非応答細胞に比べdelayed firing、tonic firingの発火パターンを示す細胞の割合が多いことが明らかとなった。静止膜電位などには痒み応答細胞、非応答細胞で有意な差は見られなかった。次いで、痒み応答細胞の形態組織学的解析を行ったところ、痒み応答細胞の細胞体は脊髄後角浅層に存在し、痒み応答細胞その形態学的な分類を行うとある特徴的な細胞形態をしていた。更に、三次元電子顕微鏡によるシナプスレベルでの微細構造を試みており、現在統計学的解析を行うためのさらなる例数獲得に努めている。本研究におけるこれらの研究成果今後中枢における痒みのシナプス伝達機構の解明に非常に重要な結果であると思われる。また、得られた研究成果は、国内外の学会・英文科学誌に報告しており社会へ積極的に発信している。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計47件)

Li S, Andoh T, Zhang Q, Uta D, Kuraishi Y. 2-Microglobulin, interleukin-31, and arachidonic acid metabolites (leukotriene B4 and thromboxane A2) are involved in chronic renal failure-associated itch-associated responses in mice. *Eur J Pharmacol.*, 847:19-25, 2019

DOI: 10.1016/j.ejphar.2019.01.017.

Uta D, Hattori T, Yoshimura M. Effects of high concentration of naftopidil on dorsal root evoked excitatory synaptic transmission in substantia gelatinosa neurons of the rat spinal dorsal horn in vitro. *Int Neurolog J.*, 22 (4):252-259, 2018

DOI: 10.5213/inj.1836146.073.

Uta D, Taguchi T. Peripheral and spinal mechanisms of nociceptive transmission in a rat model of fibromyalgia. *Pain Res.* 32(4):280-287, 2018

DOI: <https://doi.org/10.11154/pain.32.280>

Andoh T, Li S, Uta D. Involvement of thromboxane A2 in interleukin-31-induced itch-associated response in mice. *Pharmacol. Rep.* 70(2):251-257, 2018

DOI: 10.1016/j.pharep.2017.10.001.

Oti T, Takanami K, Ito S, Ueda T, Matsuda KI, Kawata M, Soh J, Ukimura O, Sakamoto T, Sakamoto H. *Endocrinology.* 159: 1886-1896, 2018

DOI:

Uta D, Xie DJ, Hattori T, Kasahara KI, Yoshimura M. Effects of naftopidil on inhibitory transmission in substantia gelatinosa neurons of the rat spinal dorsal horn in vitro. *J Neurol Sci.* 380:205-211, 2017

DOI: 10.1016/j.jns.2017.07.030.

Andoh T, Maki T, Li S, Uta D. 2-Microglobulin elicits itch-related responses in mice through the direct activation of primary afferent neurons expressing transient receptor potential vanilloid 1. *Eur J Pharmacol.* 810:134-140, 2017

DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.07.007.

Uta D, Imoto K and Furue H. Actions of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) channel agonists on nociceptive synaptic transmission to spinal dorsal horn neurons in rat spinal cord: *In vitro* and *in vivo* patch-clamp analyses. *Pain Res.* 32(3):179-190, 2017

DOI: <https://doi.org/10.11154/pain.32.179>

Ohashi N, Uta D, Sasaki M, Ohashi M, Kamiya Y, Kohno T. Acetaminophen Metabolite N-Acylphenolamine Induces Analgesia via Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Receptors Expressed on the Primary Afferent Terminals of C-fibers in the Spinal Dorsal Horn. *Anesthesiology.* 127(2):355-371, 2017

DOI: 10.1097/ALN.0000000000001700.

Andoh T, Uta D, Kato M, Toume K, Komatsu K, Kuraishi Y. Prophylactic Administration of Aucubin Inhibits Paclitaxel-Induced Mechanical Allodynia via the Inhibition of

Endoplasmic Reticulum Stress in Peripheral Schwann Cells. Biol Pharm Bull. 40(4):473-78, 2017  
DOI: 10.1248/bpb.b16-00899.

Andoh T, Kobayashi N, **Uta D**, Kuraishi Y. Prophylactic topical paeoniflorin prevents mechanical allodynia caused by paclitaxel in mice through adenosine A1 receptors. Phytomedicine. 25:1-7, 2017  
DOI: 10.1016/j.phymed.2016.12.010.

Andoh T, Kato M, Kitamura R, Mizoguchi S, **Uta D**, Toume K, Komatsu K, Kuraishi Y. Prophylactic administration of an extract from Plantaginis Semen (chē qián z ĭ) and its major component aucubin inhibits mechanical allodynia caused by paclitaxel in mice. J Trad. Complement Med. 6(3):305-8, 2016  
DOI: 10.1016/j.jtcme.2015.12.001.

Tomomura S, Ebara S, Bagdasarian K, **Uta D**, Ahissar E, Meir I, Lampl I, Kuroda D, Furuta T, Furue H, Kumamoto K. Structure-function correlations of rat trigeminal primary neurons: Emphasis on club-like endings, a vibrissal mechanoreceptor. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 91(10):560-76, 2015  
DOI: 10.2183/pjab.91.560.

Kase D, **Uta D**, Ishihara H and Imoto K. Inhibitory synaptic transmission from the substantia nigra pars reticulata to the ventral medial thalamus in mice. Neurosci Res. 97:26-35, 2015  
DOI: 10.1016/j.neures.2015.03.007.

[学会発表](計 92 件)

**Uta D**, Hattori T, Andoh T, Kume T, Yoshimura M. Effects of naftopidil in substantia gelatinosa neurons of the rat spinal dorsal horn. The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (FAOPS2019). 2019

**Uta D**, Imoto K, Furue H. Firing pattern and morphological analysis of substantia gelatinosa neurons receiving TRPA1-expressing afferents in rat spinal dorsal horn. The 49th Natl Inst Physiol Sci (NIPS) International Symposium "Ion channels: looking back, seeing ahead". 2018

**Uta D**, Andoh T. Electrophysiological and behavioral analysis of a mouse model of atopic dermatitis. The 48th Annual Meeting of the Society for Neuroscience. 2018

**Uta D**, Andoh T, Imoto K, Furue H. Morphological characteristics of superficial spinal dorsal horn neurons receiving 5-HT-responsive afferents in the rat spinal cord. The 28th International Symposium of Itch. 2018

**Uta D**, Andoh T, Kuraishi Y, Imoto K, Furue H. A pruritogen 5-HT-induced itching on synaptic transmission in spinal superficial dorsal horn neurons - *In vivo* patch-clamp recording analyse-. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018). 2018

**Uta D**, Andoh T, Imoto K, Furue H. Firing pattern of superficial spinal dorsal horn neurons receiving 5-HT-responsive afferents in the adult rat spinal cord. The 27th International Symposium of Itch. 2017

**Uta D**, Yoshimura M, Kawatsu R, Imoto K and Furue H. Electrophysiological analysis of local anesthetic actions on nociceptive synaptic transmission in the adult rat spinal cord. IASP 16th World Congress on Pain. 2016

**Uta D**, Kato M, Toume K, Komatsu K and Andoh T. Repetitive intraperitoneal injection of aucubin reduces mechanical allodynia caused by paclitaxel in mice: An *in vivo* electrophysiological analysis. The First International Symposium on Toyama-Asia-Africa pharmaceutical Network (1<sup>st</sup> TAA-Pham Symposium). 2016

**Uta D**, Magoshi Y, Kuraishi Y and Andoh T. Analysis of itch-related responses evoked by cutaneous interleukin-31 administration in mice. The 26th International Symposium of Itch. 2016

**Uta D**, Andoh T, Kuraishi Y, Imoto K and Furue H. In vivo spinal synaptic responses and scratching behaviors evoked by cutaneous 5-HT application. 8th World Congress on Itch. 2015

**Uta D**. Evaluation of itch by in vivo patch clamp method. 8th World Congress on Itch. 2015

[図書](計 1 件)

歌 大介. 電気生理学的手法を用いた痛みの評価 (The evaluation of pain by using electrophysiological method). 月刊 PHARMSTAGE 17(8):68-72, 2017

[産業財産権]

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

富山大学大学院医学薬学研究部（薬学）応用薬理学教室ホームページ：

<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/phapha2/index.html>

富山大学研究者総覧：[http://evaweb.u-toyama.ac.jp/html/100000626\\_ja.html](http://evaweb.u-toyama.ac.jp/html/100000626_ja.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：安東 嗣修

ローマ字氏名：(ANDOH, tsugunobu)

所属研究機関名：富山大学

部局名：大学院医学薬学研究部（薬学）

職名：准教授

研究者番号（8桁）：50333498

研究分担者氏名：高浪 景子

ローマ字氏名：(TAKANAMI, keiko)

所属研究機関名：国立遺伝学研究所

部局名：系統生物研究センター

職名：助教

研究者番号（8桁）：70578830

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：坂本 浩隆

ローマ字氏名：(SAKAMOTO, hirotaka)

研究協力者氏名：木口 倫一

ローマ字氏名：(Kiguchi, norikazu)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。