

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19219

研究課題名(和文) 脳における痒みの神経伝達機構と伝達経路の解析

研究課題名(英文) Analysis of the brain circuit and mechanism for itch processing

研究代表者

井上 明俊 (INOUE, Akitoshi)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：50709152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄や脳などの中枢における痒みの神経伝達機構は痛みに比べてほとんど明らかになっていない。本研究では脊髄におけるNMDA受容体のGluN2Bのリン酸化はヒスタミンやクロロキンなどの痒み伝達には重要であることを明らかにした。一方、セロトニンの痒み伝達はこれとは異なる機構により介されていた。このような異なる刺激による痒み伝達が脊髄においては異なる伝達経路を介しているのかを明らかにするためにテトラサイクリン発現誘導システムやIn-situと免疫染色の共染色を組み合わせた解析を行った。さらに、脳における痒み伝達経路を網羅的に探索するために慢性痒みモデルマウスを作製し、c-fosの発現解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Although itch and pain are intimately related and may share similar peripheral and central mechanisms, there is substantial evidence that itch and pain are transmitted via their own distinct pathways. By using mice with a knock-in mutation of the Tyr1472 site to phenylalanine of GluN2B (Y1472F-KI), we found that the phosphorylation of GluN2B subunit is important for itch transmission for various stimuli including histamine and chloroquine, although serotonin itch was transmitted by distinct pathways. To distinguish neuronal pathways in the spinal cord for each pain and itch stimulus, we conducted experiments using Tet-on/off systems or double staining with immunohistochemistry and In-situ hybridization. We also searched for brain regions concerning itch processing. We made chronic itch mouse model and analyzed c-fos expression globally in the full brain.

研究分野：痒み

キーワード：痒み NMDA受容体 GluN2B 脊髄

### 1. 研究開始当初の背景

従来、痒みは「弱い痛み」であると認識されていた。これは、末梢から脊髄における痒みの伝達経路が痛みと非常に似ていることが一因である。しかし、2007年に痒み伝達特異的な神経ペプチド Gastrin-releasing peptide (GRP)が発見されたのを機に、末梢や脊髄における痒み特異的な神経伝達経路の存在に注目が集まっている。報告者はこれまで NMDA 受容体の GluN2B サブユニットの 1472 番目の Tyr 残基をフェニルアラニンに置換したノックインマウス (GluN2B Y1472F-KI) を用いた解析を行い、三叉脊髄神経路角における痒み特異的なシグナル伝達に GluN2B サブユニットのリン酸化が重要であること、NMDAR の活性化は GRP 経路より上流で働くことを明らかにしてきた。

これまで痒みはヒスタミン系と非ヒスタミン系 (クロロキンやセロトニンなど) に分類され、これらは異なる分子機構で伝達されることが報告されている。報告者は Y1472F-KI マウスの解析にあたり、Y1472F-K マウスはクロロキンやヒスタミンなど様々な痒み物質への応答が低下する一方で、セロトニンへの痒み応答は正常であることを発見した。このように痛みと痒みのみならず、異なる痒み刺激においても異なる伝達機構、伝達経路を介していることが明らかになってきている。

脳においては、痛みの伝達経路の解析は非常に進んでおり、痛みの中枢経路や情動的側面に関わる領域などが明らかにされている。しかし、脳における痒みの伝達経路の研究は少なく、ヒトを対象にした脳機能イメージングが中心である。楔前部など痒み選択的に応答する領域も見つかっているが、前頭前野、帯状回、島、運動関連領域など、脳の多くの領域は痒みと痛みに対して非常によく似た活動パターンを示す。このため、痒みと痛みの認知の違いがどの脳領域で起こっているのか未だ不明である。

### 2. 研究の目的

本研究はマウスをモデルに脊髄や脳などの中枢における痒みの伝達経路、伝達機構を痛みと区別しながら明らかにしていくことを目的としている。特に脊髄においては GluN2B を介した痒み特異的な伝達機構を明らかにすること、様々な痒みや痛み刺激の伝達経路の違いを詳細に明らかにすることを目的とする。脳においては c-fos の発現に注目して急性や慢性の痒みにおいて特異的に応答する脳領域を網羅的に探索することを目的とする。

### 3. 研究の方法

**実験** GluN2B のリン酸化とセロトニンの痒み伝達の解析

Y1472F-KI マウスではヒスタミンやクロロキンなど様々な痒み物質注射に対する応答が野生型マウスに比べて低下するが、セロトニンに対する痒み応答は野生型と同様であ

った。この原因を明らかにするために、野生型と Y1472F-KI マウスを用いて c-fos 発現解析を行う。また、NR2B の選択的な阻害薬である CP101.606 や NR2B のリン酸化を阻害薬である PP2 の大槽内投与などの薬理的な解析を行い、セロトニンにおける痒み伝達は GluN2B を介した他の痒み伝達と異なる機構が使われているのかを明らかにする。

**実験** 脊髄における痒みや痛み伝達経路の識別

脊髄や三叉神経脊髄路角において痒み刺激 (ヒスタミン、クロロキン、セロトニン) や痛み刺激 (カプサイシン、AITC) に対する c-fos の発現位置は非常によく似ており、異なる細胞群において伝達されているのか区別するのは難しい。そこで Fos-tTA, TRE-hM4Di マウスを作製し、痒みや痛み刺激に応答した c-fos 発現ニューロンの人為的な活動抑制を行い、それにより他の痒みや痛み刺激に対する応答が変化するか解析する。さらに TRE プロモーター下でジフテリア毒素レセプター (DTR) と mcherry を発現する TRE-DTR-mcherry マウスを作製し、痒みや痛み刺激に応答した c-fos 発現ニューロンの破壊による行動変化を測定する。

**実験** In-situ ハイブリダイゼーションと免疫染色を組み合わせた痒みと痛みの伝達経路の識別

セロトニン、ヒスタミン、クロロキンなどの痒み伝達経路がそれぞれ異なるかを明らかにするために mRNA とタンパクの発現時間の差を利用し、In-situ ハイブリダイゼーションと免疫染色による発現比較解析を行う。c-fos の mRNA は 15 分で発現するが、1 時間後には発現は低下する。一方、c-fos のタンパクは 1 時間で発現が始まり、3 時間で発現が低下する。このため、痒み刺激を行い 2 時間後に再度痒み刺激を行った場合、2 度目の痒み刺激から 15 分後には 1 度目の痒み刺激に応答した c-fos のタンパク質と、2 度目の痒み刺激に応答した c-fos の mRNA の発現が見られると予測される。そこで c-fos の In-situ ハイブリダイゼーションと免疫染色による発現比較解析を行い異なる痒み刺激により c-fos の発現が誘導される細胞を比較する。

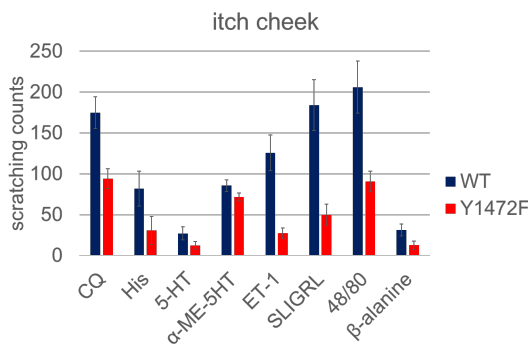
**実験** 慢性的な痒みマウスの作製と脳における痒み経路の探索

急性痒み刺激を行った脳では痒みへ応答部位だけでなく、恐怖などの刺激によるストレスで脳の多くの部位が活性化すると予想される。一方で慢性的な痒みモデルの場合は刺激から 24 時間以上経った脳を解析に用いるために c-fos 発現は恐怖を反映せず自発的な痒みによる脳活動を反映すると考えられる。そこで毛剃りした左頬にビタミン D3 のアナログ体である MC903 を一日一回、一週間頬に添付して慢性的な痒みモデルの作製を行う。この慢性的なモデルマウスにおける c-fos の発現を全脳にわたり測定する。

#### 4. 研究成果

##### 実験

セロトニン刺激による搔破行動と測定したところ野生型と Y1472F-KI マウスでは優位な差が見られなかった。同様に 5-HT<sub>2</sub> セロトニンレセプター-の作動薬である  $\alpha$ -メチルセロトニンに対しても野生型と Y1472F マウスでは優位な差が見られなかった(下図)。この原因を明らかにするためにセロトニン刺激による c-fos の発現解析を行ったところ、Y1472F-KI マウスは野生型と比較して  $\alpha$ -メチルセロトニンに対する c-fos の発現に変化は見られなかった。また、NR2B の選択的な阻害薬である CP101,606 や NR2B のリン酸化の阻害薬である PP2 の大槽内投与は、セロトニンに対する搔破行動に変化をあたえなかった。このことからセロトニンに対する痒み伝達において NR2B のリン酸化が重要ではないことが示唆された。三叉神経脊髄路角においてセロトニンは NMDA 受容体を介さない別経路で伝達されていると推測される(論文作成中)。



##### 実験

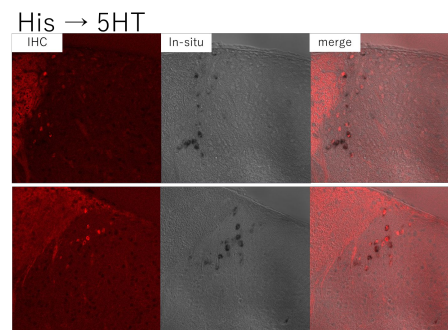
セロトニンがクロロキシンやヒスタミンとは異なる分子経路で伝達されることから、痒みと痛みだけでなく、同じ痒みであっても痒み刺激により異なる伝達経路を介すると推測される。そこで痒みや痛み刺激に反応した c-fos 発現ニューロンを人為的な活動抑制し、それにより引き続き痒みや痛み刺激に対する反応が変化するか解析することでこれらのニューロン群の区別を行おうと考えた。米国ジャクソン研究所から Fos-tTA, Fos-EGFP ダブルトランスジェニックマウスと TRE-hM4Di マウスを購入し、これらのマウスを掛け合わせ Fos-tTA, Fos-EGFP, TRE-hM4Di マウスを作製した。このマウスでは c-fos プロモーター下で分解促進型 GFP とテトラサイクリン制御性トランス活性化因子 tTA を発現する。tTA は DOX 非存在下で TRE プロモーターに結合し、Clozapine-N-Oxide (CNO) に反応して神経を抑制することができる hM4Di 受容体(ヒト M3 ムスカリン様アセチルコリン受容体由来の DREADD)を発現させる。実験 3 日前に DOX を抜いたマウスを用いて左頬に Saline、カプサイシン、クロロキシンを注射し c-fos 発現下で hM4Di の発現を誘導した。12 時間後に大槽内

に CNO を注射し hM4Di を活性化させ、30 分後に左頬に再度クロロキシンを注射した。コントロールの Saline 注射と比較してカプサイシン、クロロキシン注射は共に 2 度目のクロロキシン注射に対する搔破行動を低下させたが、カプサイシンとクロロキシンで変化は見られなかった。カプサイシン注射により頬への炎症が見られたため、カプサイシン注射後のクロロキシン応答の低下はこの炎症による痒み応答の低下が原因である可能性が考えられた。現在痒みと痛みの刺激の組み合わせを変え解析を行っている。痒み刺激に反応して c-fos を発現したニューロンに Tet 発現誘導システムを用いてジフテリア毒素レセプターを発現させ、領域特異的に破壊することができれば hM4Di を用いた神経活動抑制よりもはっきりと痒みや痛みの神経回路を識別することができる。そこで、先端モデル動物支援の元、TRE プロモーター下でジフテリア毒素レセプター (DTR) と mcherry を発現する TRE-DTR-mcherry マウスを作製した。現在このマウスを用いた解析を行っている。

##### 実験

In-situ ハイブリダイゼーションと免疫染色による痒み経路の比較

セロトニンの伝達経路とヒスタミンやクロロキシンの伝達経路が異なるかを明らかにするために mRNA とタンパクの発現時間の差を用いて In-situ ハイブリダイゼーションと免疫染色による発現比較解析を行った。 $\alpha$ -メチルセロトニンやヒスタミンを注射し、2 時間後に再度  $\alpha$ -メチルセロトニンやヒスタミンを注射し、15 分後に固定した三叉神経脊髄路角を用いて In-situ ハイブリダイゼーションと免疫染色の二重染色を行った(下図)。ヒスタミン-ヒスタミンや  $\alpha$ -メチルセロトニン- $\alpha$ -メチルセロトニンの組み合わせにおいても二重染色される割合が低く同じ細胞が同じ刺激に反応しているというコントロールを取ることが難しかった。これは In-situ ハイブリダイゼーションと免疫染色の感度の差が大きいためであると推測された。そこで現在、上述の Fos-tTA, Fos-EGFP, TRE-DTR-mcherry マウスを作製して GFP と mcherry の発現時間の差を利用した伝達経路の区別を行っている。



##### 実験

慢性的な痒みマウスの作製と脳における痒み経路の探索

毛剃りした左頬にビタミン D3 のアナログ体である MC903 を一日一回、一週間頬に添付して慢性的な痒みモデルの作製を行った。1 週間のコンディショニングにより頬に乾燥や表皮肥大化や炎症メディエーターである TSLP の mRNA の発現増加が見られ、それに伴い自発的な搔破行動が見られた。一方、Y1472F マウスは野生型と同様の搔破行動を示した。この搔破行動はコンディショニングを止めて5日後にも見られることから従来のドライスキンモデルなどに比べて強い慢性的な痒みのモデルであると考えられた。慢性的な痒みモデルにおいては痒みの伝達物質である GRP への応答の上昇などの可塑性が見られるかを GRP の大槽内投与により解析したが可塑性は見られなかった。現在、このマウスを用いて脳における c-fos 発現解析を行っている。発現解析には一週間のコンディショニング後に 12 時間ケージに戻し、コンディショニングの際の恐怖による c-fos の発現が元に戻り、自発的な痒みによる c-fos の発現が続いている脳を用いた。MC903 処置マウスにおいては痛み応答に関わる傍小脳脚核 (PB) や体性感覚野、外側扁桃体において強い c-fos の発現が見られた。さらに、これまで痛みへの関連が着目されていない扁桃体レンズ核下部や parasubthalamic nucleus などにも強い c-fos 発現が見られた。一方、無処置のマウスやエタノールによるコントロールマウスにおいても視床や視床下部、大脳基底核においては c-fos の発現が見られ、痒みによる神経活動と比較するのは困難であった。これらの領域が慢性的な痒みによるものなのか更なる解析を行っている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Phosphorylation of NMDA receptor GluN2B subunit at Tyr1472 is important for trigeminal processing of itch. Inoue A., Uchida H., Nakazawa T., Yamamoto T., and Ito S. Eur J Neurosci. 44, 2474-2482, 2016 査読あり

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：

国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www3.kmu.ac.jp/medchem/access.html>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
井上 明俊 (INOUE, Akitoshi)  
関西医科大学・医学部・助教  
研究者番号：50709152

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし