

平成 22 年 5 月 13 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20700348  
 研究課題名（和文） ニューロン・グリア実時間同時イメージングによる脊髄神経可塑性の解析  
 研究課題名（英文） The neuronal plasticity in the spinal dorsal horn revealed by simultaneous imaging of neuronal and glial activity  
 研究代表者  
 池田 弘（IKEDA HIROSHI）  
 福井大学・大学院工学研究科・准教授  
 研究者番号：80377473

研究成果の概要（和文）：本研究では、痛覚過敏モデル動物を用いて脊髄後角におけるグリア細胞の形態および数の変化、神経興奮へのグリア細胞の作用、グリア細胞の活動性の変化について、特にグリア細胞に存在する P2X 受容体の 1 つである P2X<sub>4</sub> 受容体に注目して実験を行った。実験の結果、グリア細胞で形態の肥大化、数の増加が見られた。また、ノーマルラットに比べて、P2X<sub>4</sub> 受容体を介したカルシウムシグナルがより多くのグリア細胞で見られ、より活性化されていることがわかった。また、グリア細胞の活動の抑制や P2X<sub>4</sub> 受容体の阻害は、神経興奮を減少させた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined the change of morphology of glial cells, the contribution of glial cells to the neuronal excitation and the change of glial activity especially P2X<sub>4</sub> receptors in the rat spinal dorsal horn under hyperalgesia. In the neuropathic pain, the number of activated form of microglia and the Ca<sup>2+</sup> signals via P2X<sub>4</sub> receptor are increased, and the neuronal excitation evoked by single-pulse stimulation was decreased glial inhibitor or P2X receptor antagonist.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経・筋肉生理学

キーワード：痛覚, グリア細胞, イメージング, シナプス可塑性, 脊髄後角

## 1. 研究開始当初の背景

痛覚過敏は、痛覚刺激を受け取る末梢の病巣が原因ではなく、その信号を脳へと伝える中継点である脊髄ニューロンの可塑性によって起こると考えられている。古くからニュー

ロンの補助的役割を担っていると考えられてきたグリア細胞が、実際は積極的にニューロン間のシナプス伝達に関わっていることが最近わかってきた。痛覚の処理系に関しても、脊髄内のグリア細胞の活性化が、痛覚過

敏に重要であることが示唆され、現在、国内外の多くの研究者によって盛んに研究が行われている (Tsuda et al., 2003)。それらの研究の主なものは、免疫染色などによるグリア細胞の染色、グリア細胞に存在するたんぱく質や酵素の染色による研究である。しかし、これらの手法では、たんぱく質や酵素がどのような機能によって痛覚過敏に関与しているのかを明らかにするのは難しい。したがって、グリア細胞の活動の変化、ニューロン活動の変化をリアルタイムに計測する技術が必要となる。

## 2. 研究の目的

脊髄での可塑性にグリア細胞がどのような機序で関与しているのかをカルシウムシグナルと膜電位変化のリアルタイムイメージング法を組み合わせ、明確に示すことを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、3種類の痛覚過敏モデル動物を用いて、活性型ミクログリアが見られるかを免疫染色でミクログリアを染色することによって調べた。また、膜電位感受性色素を用いた光イメージングによって神経興奮がノーマルラットに比べて増強しているかを時空間的に解析した。また、活性型ミクログリアの脊髄内での分布と、神経興奮が増強している領域は同様の領域なのかを調べた。また、神経興奮がプリン受容体の拮抗薬の阻害薬によって抑制を受けるのかを調べた。さらに、 $P2X_4$ 受容体からのカルシウムイオンの流入が見られるかを共焦点顕微鏡を用いたカルシウムイメージングによって調べた。

## 4. 研究成果

### 1. グリア細胞の免疫染色

脊髄後角のミクログリアの数の増加および肥大化が神経損傷、ホルマリンを肢裏へ注射したラットの同側で見られたが、フロイント完全アジュバント (CFA) を肢裏へ注射したラットでは、そのような変化は見られなかった。また、神経損傷ラットでは、そのような変化は外側で顕著であり、ホルマリンラットでは内側で顕著であった (Fig. 1)。

### 2. 神経興奮の光イメージング

全ての痛覚過敏ラットで神経興奮の増強が見られ、いずれもモデルも顕著な増強は外側で見られた。従って、神経損傷ラットでは免疫染色の結果と領域が一致するが、ホルマリンラットでは領域に違いが見られることがわかった (Fig. 2)。また、CFA ラットでは、免疫染色によって活性型のミクログリアが見られなかったにも関わらず、神経興奮の増強が見られたことより、ミクログリアが関与

せずに増強が起きると考えられる。また、神経損傷ラットの神経興奮はミクログリアの抑制剤によって大きく減少したが、ノーマルおよびその他のモデル動物ではほとんど変化が見られなかった (Fig. 3)。さらに、神経損傷ラットの神経興奮は、 $P2X_{1,2,3,5,7}$ 受容体の選択的拮抗薬ではほとんど変化は見られないが、 $P2X_{1-4}$ 受容体の選択的拮抗薬では大きく減少した。このことより、神経損傷ラットで見られる神経興奮の増強にはミクログリアの  $P2X_4$ 受容体が関与していると考えられる。しかし、その他のモデル動物では、 $P2X_4$ 受容体以外のプリン受容体の関与が考えられる。

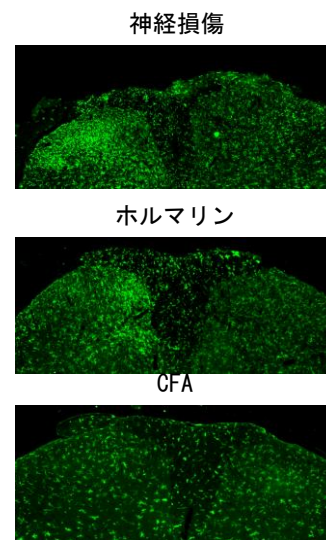


Fig. 1 Immunoreactivity of OX42 in the spinal dorsal horn

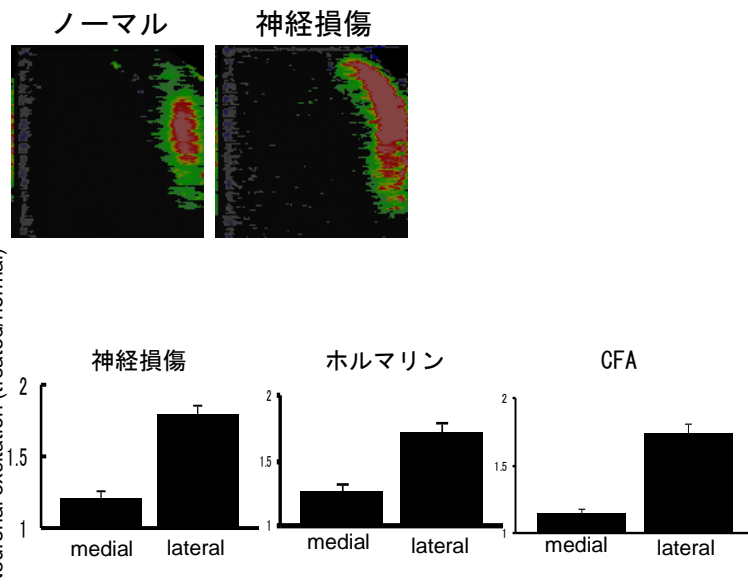


Fig.2 Neuronal excitation in the spinal dorsal horn

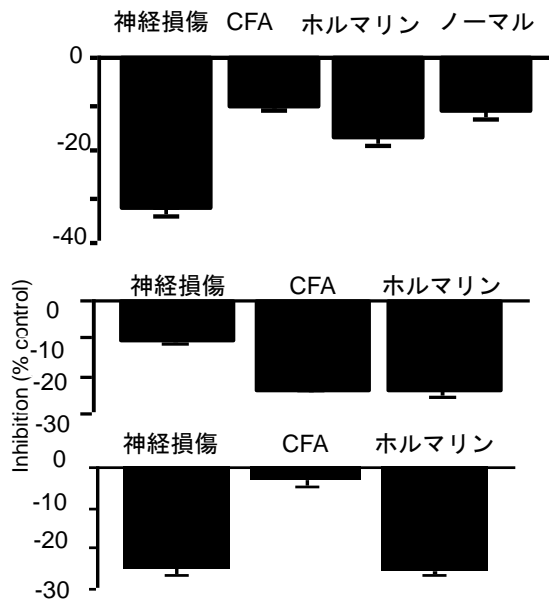


Fig.3 The effect of minocycline on neuronal excitation

### 3. カルシウムイメージング

ミクログリアの  $P2X_4$  受容体を介した活動が神経損傷ラットで促進されているのかを調べるために、カルシウムイメージングによって、細胞内カルシウム濃度上昇を  $P2X$  受容体の作用薬である ATP を還流することによって調べた。神経損傷ラットとノーマルラットの脊髄スライスに ATP を還流すると、ノーマルラットに比べて神経損傷ラットの方が多くの細胞でカルシウムシグナルが見られた (Fig. 4, 5)。さらに、神経損傷ラットのカルシウムシグナルは、 $P2X_{1,2,3,5,7}$  受容体の選択的拮抗薬ではほとんど変化は見られないが、 $P2X_{1-4}$  受容体の選択的拮抗薬では大きく減少した (Fig. 6)。このことより、神経損傷ラットのミクログリアでは、 $P2X_4$  受容体の数が増加、あるいは機能の促進が起き、その結果、多くの  $Ca^{2+}$  が細胞内へと流入することができ、そのような変化が神経興奮の増強をもたらしているのではないかと考えられる。

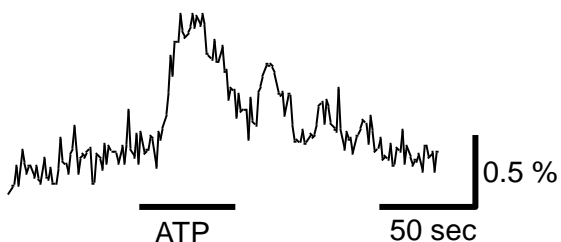
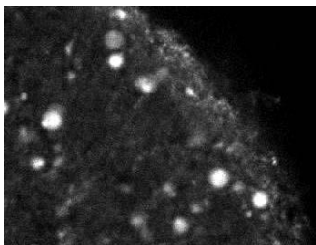


Fig.4 ATP-induced  $Ca^{2+}$  response

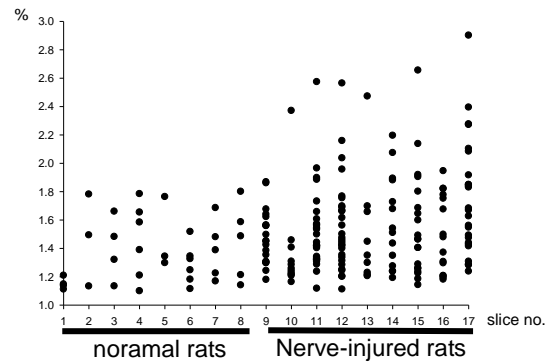


Fig.5 The number of cells which showed ATP-induced  $Ca^{2+}$  response

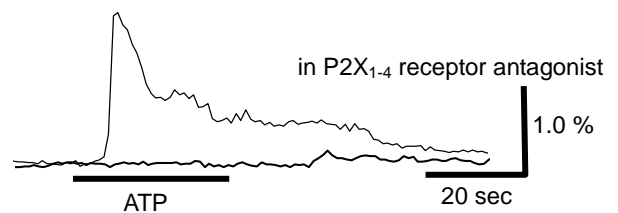


Fig.6 Inhibition of ATP-induced  $Ca^{2+}$  response by  $P2X$  receptor antagonist

### 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 3 件)

1. Ikeda H, Kiritoshi T, Murase K. Synaptic plasticity in the spinal dorsal horn. *Neuroscience Research* (2009).
2. Ikeda H, Kiritoshi T, Murase K. Effect of excitatory and inhibitory agents and a glial inhibitor on optically-recorded primary-afferent excitation. *Molecular Pain* 4:39 (2008).
3. Ikeda H, Nishi R, Murase K. Glia-mediated facilitation of neuronal excitation in the spinal dorsal horn in arthritic rats. *Pain Research* 23, 151-157 (2008).

[学会発表] (計 19 件)

1. Tanaka T, Suzumura Y, Ikeda H, Murase K, The effect of odor on anxiety behavior and related brain region revealed by c-fos staining. 36<sup>th</sup> International congress of physiological science (2009).
2. Ikeda H, Murase K, Role of glial cells in the facilitation of optically-recorded neuronal excitation in the rat spinal dorsal horn. 36<sup>th</sup> International congress of physiological science (2009).
3. Kiritoshi T, Ikeda H, Murase K, Protein kinase A-dependent long-term facilitation of optically recorded neuronal excitation

- in the rat central amygdala. 36<sup>th</sup> International congress of physiological science (2009).
4. 池田弘, 村瀬一之, 切通考貴, 痛覚と神経可塑性: イメージングによる解析, 第31回日本疼痛学会 (2009).
  5. 切通考貴, 池田弘, 村瀬一之, 光学的計測法による扁桃体中心核における長期増強の計測, 第31回日本疼痛学会 (2009).
  6. Kiritoshi T, Ikeda H, Murase K, Long-term potentiation in the rat central nucleus of amygdala revealed by the optical imaging. 31st Annual Meeting of the Japan neuroscience Society (2008).
  7. Kiritoshi T, Ikeda H, Murase K, Propagation and long-term facilitation of neuronal excitation in the rat central nucleus of amygdala revealed by the optical imaging. 38<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Neuroscience (2008).
  8. Yamamoto S, Ikeda H, Murase K, The plastic change of neuronal excitation in the amygdala under persistent pain. 31st Annual Meeting of the Japan neuroscience Society (2008).
  9. Tanaka T, Ikeda H, Murase K, The effect of odor on anxiety and c-Fos expression in the brain. 31st Annual Meeting of the Japan neuroscience Society (2008).
  10. Asakawa Y, Ikeda H, Murase K, Change of the anxious behavior and the c-Fos expression in the brain by plant-derived fragrance. 31st Annual Meeting of the Japan neuroscience Society (2008).
  11. Tanaka T, Ikeda H, Murase K, The effect of odor on anxiety and c-Fos expression in the brain. 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (2008).
  12. Hasegawa T, Ikeda H, Murase K, Pain-related fear and imaging brain activity. 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (2008).
  13. Asakawa Y, Ikeda H, Murase K, Change in anxious behavior and the c-Fos expression in the brain by a plant-derived fragrance alpha-pinene. 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (2008).
  14. Yamamoto S, Ikeda H, Murase K, The plastic change of neuronal excitation in the amygdala under persistent pain. Japan Neuroscience Society (2008)
  15. Nishi R, Ikeda H, Murase K, Contribution of glia on the facilitation of neuronal excitation in the spinal dorsal horn of arthritis rats revealed by the optical imaging and the immunohistochemistry. Japan Neuroscience Society (2008)
  16. Kiritoshi T, Ikeda H, Murase K, Long-term potentiation in the rat central nucleus of amygdala revealed by the optical imaging. Japan Neuroscience Society (2008)
  17. Asakawa Y, Ikeda H, Murase K, Change of the anxious behavior and the c-Fos expression in the brain by plant-derived fragrance. Japan Neuroscience Society (2008)
  18. Ikeda H, Murase K, Functional change of glial cells in the spinal dorsal horn under inflammatory pain. Japan Neuroscience Society (2008)
  19. Tanaka T, Ikeda H, Murase K, The effect of odor on anxiety and c-Fos expression in the brain. Japan Neuroscience Society (2008)
- [図書] (計0件)  
[産業財産権]  
○出願状況 (計0件)  
○取得状況 (計0件)  
[その他]  
なし
6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
池田 弘 (IKEDA HIROSHI)  
福井大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号: 80377473
- (2) 研究分担者  
なし
- (3) 連携研究者  
なし