

令和 6 年 10 月 4 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16114

研究課題名（和文）新規一次感覚ニューロンの生理的・病理的役割の解明

研究課題名（英文）Identification and characterization of CD34-positive DRG neuron

研究代表者

小池 太郎 (KOIKE, Taro)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：00735590

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：後根神経節（Dorsal root ganglion: DRG）には複数のサブタイプのDRGニューロンが存在し、受容する感覚がそれぞれ異なる。申請者はマウスDRGにおいてCD34抗体に陽性を示すニューロンを発見し、形態学的手法により、当該ニューロンの特性を解析した。CD34陽性ニューロンの多くは、C線維低閾値機械受容ニューロンマーカー陽性であった。さらに神経トレーシング実験の結果より、有毛部皮膚には分布するが無毛部皮膚には分布しない事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、CD34陽性ニューロンを同定しその形態学的特徴を明らかにしたことにある。DRGニューロンはサブタイプごとに適切な神経回路を形成する事で、外界の情報を中枢神経に伝える。本研究は、感覚受容メカニズムの研究に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Dorsal root ganglion (DRG) neurons exhibit heterogeneity, with multiple subtypes that differ in their sensory receptor profiles. We identified neurons in the mouse DRG that were positive for anti-CD34 antibody and investigated morphological features to characterize these neurons. The majority of CD34-positive neurons exhibited C-fiber low-threshold mechanoreceptor neuron markers, VGLUT3 and TH. CD34-positive nerve terminals were localized in PKCg-positive cell layer in the dorsal horn, which is a marker of the ventral part of lamina II. Moreover, neuron-tracing experiments suggested that CD34 neurons innervate the hairy skin but are not distributed in the hairless skin.

研究分野：末梢神経

キーワード：一次感覚ニューロン Dorsal root ganglion CD34

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小型後根神経節 (DRG) ニューロンは、細胞体が小型であり、髄鞘を形成しないシュワン細胞に被われ、中枢端は脊髄後角の第 1 層から 2 層に投射するという特徴がある。この中で疼痛に関与するとされているニューロンは、ペプチドタイプ (Calcitonin gene-related peptide [CGRP], Substance P [SP] 陽性) と、非ペプチドタイプ (イソレクチン B4 [IB4] 陽性) の 2 種類に分けられ、さらに受容体やイオンチャネルの発現に基づきサブタイプに分けられる。また、痛覚ではなく触覚を受容する小型 DRG ニューロン (C 線維低閾値機械受容ニューロン) の存在も知られている。

申請者はマウス DRG に、血球系幹細胞や線維芽細胞のマーカーとしてよく用いられる CD34 抗体に陽性を示し、広汎性ニューロンマーカー (NeuN, PGP9.5, HuC, HuD) に陽性を示し、さらに電顕的にもニューロンの特徴 (遊離リボソーム) を示す小型の DRG ニューロンが存在する事を発見した。末梢神経組織において CD34 は神経内膜中の線維芽細胞に発現するとの報告があるが、ニューロンにおける発現を示した報告は無い。よってこのニューロンが新規、疼痛関連、もしくは機械受容に関与する事が考えられた。

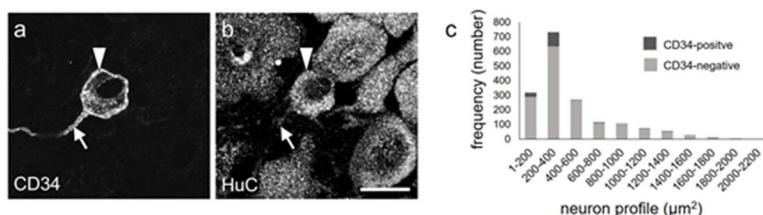


図 1 CD34 陽性ニューロン (a, b) と細胞体の大きさ (c)。

2. 研究の目的

CD34 陽性ニューロンはこれまでに報告があるニューロンと異なる細胞であるか否かを確認し、その脊髄投射領域を解析する事を目的とした。

3. 研究の方法

ニューロンのサブタイプ解析

大型の DRG ニューロンは Neurofilament200 (NF200) 陽性であり触・圧感覚を受容し、小型のものは CGRP 陽性、または IB4 陽性の侵害受容ニューロン、および Tyrosine hydroxylase (TH) と Vesicular glutamine transporter3 (VGLUT3) 陽性の C 線維低閾値機械受容ニューロン 3 つに大別される。これらのマーカー分子に対する抗体と CD34 抗体を用いた多重免疫組織化学により、サブタイプの解析を行なう。

ニューロン数計測

有毛部皮膚である体幹・四肢支配する C4 および L1 レベルの DRG と、無毛部皮膚である手掌または足底を支配する C8 および L4 レベルの DRG において、免疫組織化学を施し、サブタイプ特異的マーカー分子と CD34 に陽性を示すニューロンの数を計測した。

脊髄投射領域の解析

脊髄後角は、1 層が CGRP に、II 層背側が IB4 に、II 層腹側が PKCγ に陽性を示す。これらのマーカー分子に対する抗体と CD34 抗体による免疫組織化学により、当該ニューロンが投射する層を同定する。また、末梢神経に指向性が高く EGFP を発現するアデノ随伴ウイルス (AAV) を皮膚に投与し、当該ニューロンとの重なりを見る事で、当該ニューロンが分布する皮膚領域を解析する。

4. 研究成果

ニューロンのサブタイプ解析

マーカー分子に対する抗体を用いた免疫組織化学により、CD34 陽性ニューロンのサブタイプ解析を行なったところ、71.98 ± 2.60% (n = 3) が TH もしくは VGLUT3 陽性を示し、1.19 ± 0.45% (n = 3) は NF200 陽性であった (図 2)。このことから CD34 陽性ニューロンのほとんどが C 線維機械受容ニューロンである事が判明した。CD34 陽性反応は血管内皮細胞や線維芽細胞にも認められたが、ニューロンの形態学的特徴 (細胞体が大きく、核は正円形を示す) と異なっていた事から容易に計測から除外することが出来た。

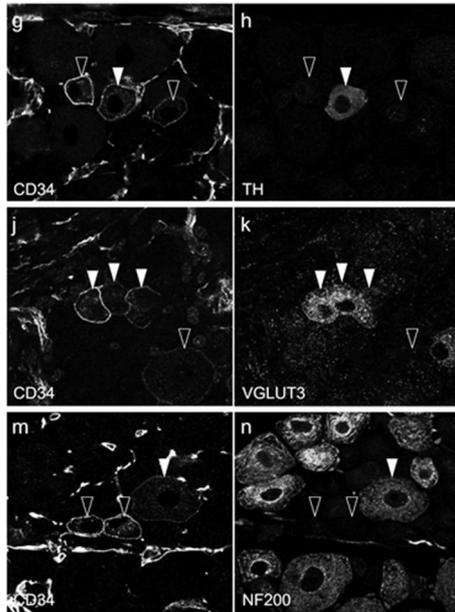


図2 CD3 とマーカー分子の多重染色。
CD34 陽性ニューロンは TH、VGLUT3、
NF200 に陽性を示す。

TH と VGLUT3 は C 線維機械受容ニューロンのマーカー分子であるとされているが、両者が共通のニューロンに発現しているか否かは不明である。さらに、TH 陽性 C 線維機械受容ニューロンはレベルによって数が異なる事が報告されている。本研究では、有毛部皮膚を支配する DRG ニューロンが存在する C4 および L1 レベルの DRG、および有毛部と無毛部皮膚を支配する DRG ニューロンが存在する C8 および L4 レベルの DRG において、TH、VGLUT3、および CD34 の多重染色を行い、これらの関係を解析した。C4、L1、および L4 レベルにおいては TH かつ VGLUT3 二重陽性のものが優位に多かった。一方で C8 レベルでは TH かつ VGLUT3 二重陽性の物に加え、VGLUT3 単独陽性を示すものが優位に多く存在した(図3)。CD34 は TH 単独陽性ニューロンにはほとんど認められなかったが、TH かつ VGLUT3 二重陽性と VGLUT3 単独陽性ニューロンには高確率で認められた(図3)。

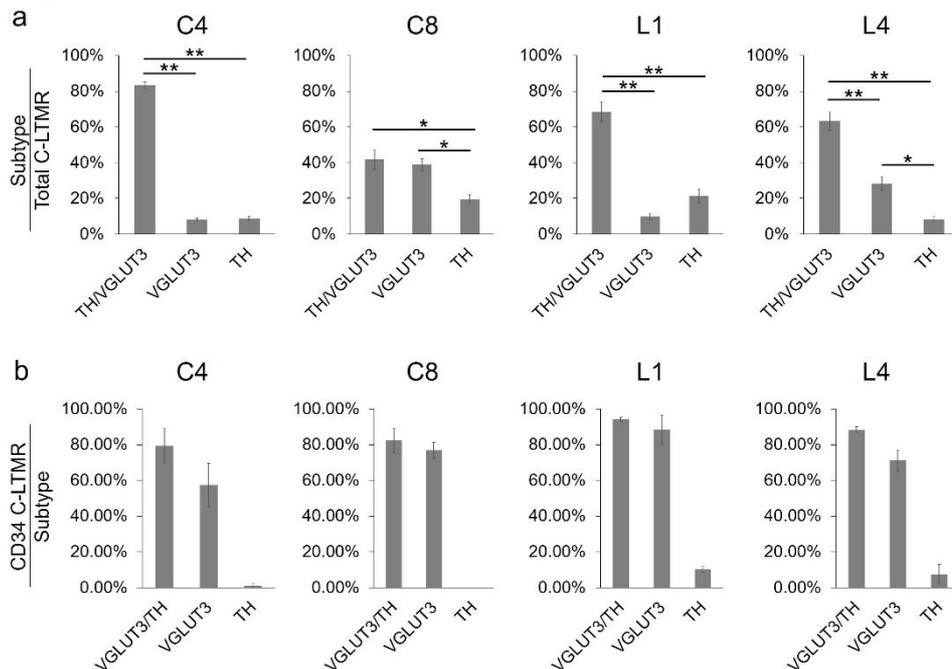


図3 C 線維低閾値機械受容ニューロンにおける TH と VGLUT3 の陽性率 (a)、
各マーカー陽性 C 線維線維機械受容ニューロンにおける CD34 陽性率 (b)

脊髄投射領域の解析

脊髄後角における CD34 陽性ニューロンの投射部位を、各種マーカー分子を用いて解析した。C4、C8、L1、および L4 レベルの脊髄において、CD34 は第 I 層マーカーおよび第 II 層背側マーカーである CGPR、IB4 とは共局在せず、第 II 層腹側マーカーである PKC γ 陽性領域に認められた。さらに、C4、および L1 レベルでは、第 II 層腹側の全領域に CD34 が認められたのに対し、C8 レベルと L4 レベルでは第 II 層腹側の内側領域で CD34 が認められなかった(図4)。この CD34 陰性領域に対応する皮膚領域を同定するため、無毛部皮膚である手掌および足底を支配する DRG 二

ニューロンを AAV により標識後、脊髄を観察した。CD34 陰性領域には EGFP 陽性軸索が認められたことから (図 5)、CD34 陽性ニューロンは無毛部皮膚である手掌と足底には分布せず、有毛部皮膚に分布する事が示された。

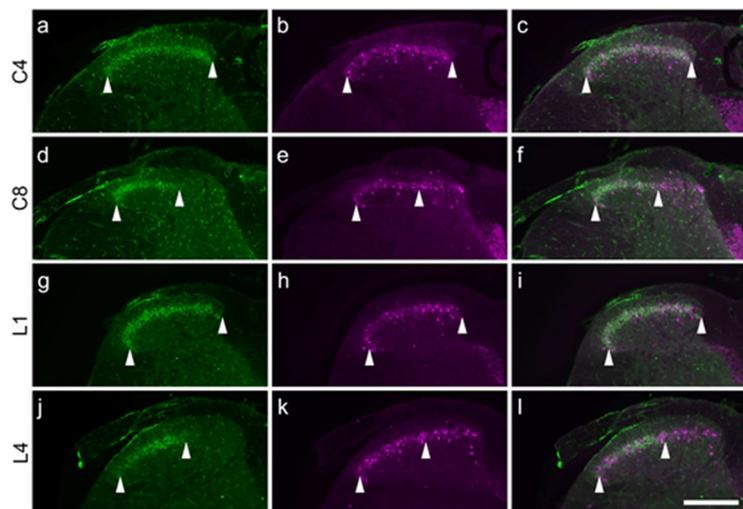


図 4 脊髄後角における CD34 の分布。CD34 (左) PKC γ (中央) 重ね合わせ (右)。鏃は CD34 陽性領域の両端を示す。

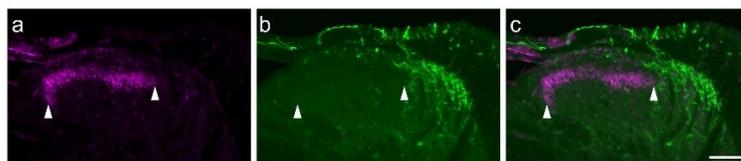


図 5 C8 レベル脊髄における CD3 と手掌支配ニューロン。CD34 (左) EGFP (中央) 重ね合わせ (右) 鏃は CD34 陽性領域の両端を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Koike T, Sato T, Oe S, Hayashi S, Seki-Omura R, Nakano Y, Iwashita H, Sato Y, Hirahara Y, Kitada M	4. 巻 1846
2. 論文標題 CD34 distribution in C-fiber low threshold mechanoreceptors in the mouse dorsal root ganglion and spinal cord	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2024.149227	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koike T, Ebara S, Tanaka S, Kase M, Hirahara Y, Hayashi S, Oe S, Nakano Y, Kitada M, Kumamoto K	4. 巻 386
2. 論文標題 Distribution, fine structure, and three-dimensional innervation of lamellar corpuscles in rat plantar skin.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 477-490
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-021-03525-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小池太郎、大江総一、林真一、関亮平、中野洋輔、北田容章
2. 発表標題 マウス一次感覚ニューロンにおけるCD34陽性ニューロンの同定
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小池太郎、榎原智美、田中進、平原幸恵、林真一、大江総一、関亮平、中野洋輔、北田容章、熊本賢三
2. 発表標題 ラット足底皮膚の層板小体の分布と接地部位の相関
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小池 太郎, 田中 進, 加瀬 政彦, 平原 幸恵, 林 真一, 大江 総一, 中野 洋輔, 北田 容章
2. 発表標題 Array tomographyとCLEMを用いた神経突起周囲サテライトグリア細胞の観察
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関