

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：34417

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659322

研究課題名(和文)多光子励起顕微鏡による痛みのゲートコントロール説の遺伝子改変マウスでの実証

研究課題名(英文) Study on gate control theory of pain by two-photon microscopy using gene-engineered mice.

研究代表者

伊藤 誠二 (ITO, Seiji)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：80201325

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：さまざまな皮膚感覚は脊髄後角で選抜され、侵害的な刺激は脳皮質で痛覚として認識される。本研究では、脊髄後角における痛覚の選別機構を明らかにするために、神経回路網を蛍光可視化できる遺伝子改変マウスと多光子励起顕微鏡を用いて、長時間変化を追跡できる *in vivo* イメージング系を確立した。ホルマリンによる炎症性疼痛モデルで、30分後から4時間まで脊髄後角で神経線維の蛍光強度やブクダの増加を *in vivo* で検出した。さらに、Ca²⁺センサー蛍光タンパクを発現させたトランスジェニックマウスで機械刺激、熱刺激、触覚刺激に反応する脊髄後角ニューロンの解析を行い、刺激応答曲線を作成した。

研究成果の概要(英文)：Peripheral stimuli in the skin are selected in the dorsal horn of spinal cord, and noxious stimuli are recognized as pain in the brain. In order to clarify the selection mechanism in the spinal cord, we established the imaging system for the spinal network which can chase for a long time *in vivo* using two-photon microscopy and gene-engineered mice expressing fluorescent protein. In this study, we demonstrated that intensity of neurites and puncta in the spinal cord increased for 30 min to 4 hours after injection of formalin in the foot, and that a network of neurons which respond to mechanical, touch, and thermal stimuli to the skin was visualized *in vivo* in fluorescent protein-expressing mice.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・疼痛学

キーワード：多光子励起顕微鏡 脊髄後角 一次求心性線維 ゲートコントロール説 *in vivo* イメージング トランスジェニックマウス 痛覚 神経回路網

1. 研究開始当初の背景

(1) 皮膚感覚は一次求心性線維を介して脊髄後角に伝達され、侵害刺激は閾値をこえると脊髄視床路を經由して大脳皮質で痛覚として認識される。脊髄後角における痛覚の発生機構を説明するために、Melzack と Wall (*Science*, 150:971, 1965) が提唱した第 II 層 膠様質 (SG) の興奮性、抑制性 2 種類のシナプス結合の総和による痛みのゲート・コントロール説が概念的に広く受け入れられ、これまで膨大な疼痛研究がなされてきた。

ゲート・コントロール説では A β 線維を介する触覚と A δ と C 線維を介する痛覚が伝達経路で明確に区別され、健全な状態では触覚刺激が痛覚を和らげるとされているが、帯状疱疹後神経痛や神経障害性疼痛など病的状態では触覚刺激が痛覚となるアロディニアを生じる。

末梢からの皮膚感覚の中継地となる脊髄後角は一次求心性線維の入力だけでなく、上位中枢へ出力する投射ニューロン、皮膚感覚の入力を修飾する介在ニューロン、上位中枢から脳への出力を調節する下行性抑制ニューロン間のシナプスが複雑に絡み合って神経回路網を形成する。

(2) 最近の神経回路網を蛍光可視化できる遺伝子改変マウスの作製、多光子励起顕微鏡などの技術的進歩により、これまで検証する手段がなかったこの疼痛研究の長年の根源的問題ゲート・コントロール説を検証するという本研究の着想に至った。

(3) 大脳では、多光子励起顕微鏡を用いて脳定位装置に固定した様々なモデル動物の大脳の神経機能、神経回路網を解析する *in vivo* イメージングが進んでいるが、脳脊髄液に浮遊している脊髄は呼吸、拍動のため、脊髄後角の *in vivo* イメージングに成功していなかった。

2. 研究の目的

ゲート・コントロール説を実証するために、脊髄後角の神経回路網を可視化できるレポーターマウスを用いて多光子励起顕微鏡下に神経回路網を構成するニューロン群の皮膚刺激に対する応答をリアルタイムに形態学的・機能的にイメージングする系を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 形態学的 *in vivo* イメージングは神経組織特異的に YFP タンパクを発現する *thy1-YFP* マウス、機能的 *in vivo* イメージングは Ca²⁺ センサー蛍光タンパクを子宮内遺伝子導入したマウスをレポーターマウスとして用いた。

(2) 麻酔下に、レポーターマウスの椎体を 1 つ外して、Ca²⁺ センサー蛍光タンパクを子宮内遺伝子導入したマウスを呼吸の影響がないように固定し、横腹 (L1) にブラシによる

触覚刺激、ピンチによる機械的刺激、赤外線による熱刺激を加えて、脊髄後角でのニューロンの応答を多光子励起顕微鏡で観察した。

(3) ホルマリンを *thy1-YFP* マウスの下肢の複数箇所注入して、炎症性疼痛モデルを作製し、脊髄後角での形態変化を多光子励起顕微鏡で経時的に追跡した。

4. 研究成果

(1) 脊椎 2 ヶ所でしっかり固定し、多光子励起顕微鏡のレンズを脊髄に近づけるためのクランプを考案し、さらに脊髄を寒天で固定して、多光子励起顕微鏡下に最大 6 時間経時的に変化を追跡できる系を確立した。

(2) *Thy1-YFP* マウス line16 は脊髄後角膠様層で YFP を発現するニューロンの割合が少ないことから、3 次元構築した脊髄後角で神経線維の構造変化の解析に適していることがわかった。

(3) Ca²⁺ センサー蛍光タンパクを脊髄後角で発現させるために、妊娠マウスの胎児の中心管に子宮内遺伝子導入する予備実験を行い、胎生期 12.5 日が最適であり、脊髄後角で興奮性脊髄ニューロン、抑制性脊髄ニューロンともに発現することを確認した。

(4) ホルマリンを下肢の複数箇所注入し作製した炎症性疼痛モデルで、疼痛閾値の低下が 30 分後から 4 時間まで観察されること、*in vivo* patch-clamp recording でホルマリン投与直後から、興奮性後シナプス電流の増加がみられること、その増加は発火頻度と発火強度によることを明らかにした。このような炎症性疼痛モデルにおいて、脊髄後角で経時的な神経線維の蛍光強度とブクダ数の増加がみられることを *in vivo* イメージングで示した。炎症性疼痛モデルで機能的可塑的变化だけでなく、形態学的な可塑的变化が生じることをはじめて明らかにした。

(5) これらの変化は、AMPA 型、NMDA 型グルタミン酸受容体拮抗薬で抑制されることから、形態学的な変化にグルタミン酸が関与することを示した。

(6) Ca²⁺ センサー蛍光タンパクを発現させたトランスジェニックマウスで侵害性機械刺激、熱刺激、非侵害性触覚刺激に応答する脊髄後角ニューロンの解析を行った。侵害性機械的刺激、熱刺激では浅層のニューロン、非侵害性触覚刺激では深層のニューロンが反応する傾向がみられた。末梢からの一次求心性線維の入力は、一次求心性線維が支配する dermatome、脊髄に局在しているが、脊髄後角でのニューロンの応答は椎体を越えて観察された。

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9件)

Miyazaki, S., Minami, T., Mizuma, H., Kanazawa, M., Doi, H., Matsumura, S., Lu, J., Onoe, H., Furuta, K., Suzuki, M. and Ito, S. The action site of the synthetic kainoid (2S,3R,4R)-3-carboxymethyl-4-(4-methylphenylthio) pyrrolidine-2-carboxylic acid (PSPA-4), an analogue of Japanese mushroom poison acromelic acid, for allodynia (tactile pain). *Eur. J. Pharmacol.*, **710**, 120-127, 2013. 査読有
DOI:10.1016/j.ejphar.2012.10.023

Unezaki, S., Sasaki, A., Mabuchi, T., Matsumura, S., Katano, T., Nishio, N., Andoh, T., Nakazawa, T., Yamamoto, T., Nakatsuka, T., Kuraishi, Y. and Ito, S. Involvement of Tyr1472 phosphorylation of NMDA receptor NR2B subunit in postherpetic neuralgia in model mice. *Mol. Pain* **8**, 59(1-13), 2012. 査読有
DOI:10.1111/ejn.12436

Sugiura, Y., Zaima, N., Setou, M., Ito, S. and Yao, I. Visualization of acetylcholine distribution in central nervous system tissue sections by tandem imaging mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **403**, 1851-1861, 2012. 査読有
DOI:10.1007/s00216-012-5988-5

Okuda-Ashitaka, E., Minami, T., Tsubouchi, S., Kiyonari, H., Iwamatsu, A., Noda, T., Handa, H. and Ito, S. Identification of NIPSNAP1 as a nocistatin-interacting protein involving pain transmission. *J. Biol. Chem.* **287**, 10403-10413, 2012. 査読有
DOI:10.1074/jbc.M111.271866

芦高恵美子, 伊藤誠二, ニューロペプチド update 痛み ノシセプチンとノシスタチン, *Clinical Neuroscience*, **30**, 148-151, 2012. 査読無

伊藤誠二, 下條正仁, 松村伸治, 痛みの可塑性と慢性化 特集痛みとしびれのサイエンス 基礎と臨床, *脊椎脊髄ジャーナル*, **24**, 341-347, 2011. 査読無

Nishida, K., Nakayama, K., Yoshimura, S. and Murakami, F. Role of Neph2 in pontine nuclei formation in the developing hindbrain. *Mol. Cell Neurosci.* **46**, 662-670, 2011. 査読有
DOI:10.1016/j.mcn.2011.01.007

Lu, J., Katano, T., Uta, D., Furue, H. and Ito, S. Rapid S-nitrosylation of actin by NO-generating donors and in inflammatory pain model mice. *Mol. Pain*, **7**, 101(1-13), 2011. 査読有
DOI:10.1186/1744-8069-7-101

Kanazawa, M., Furuta, K., Doi, H., Mori,

T., Minami, T. and Ito, S. Synthesis of an acromelic acid A analog-based ¹¹C-labeled PET tracer for exploration of the site of action of acromelic acid A in allodynia induction. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21**, 2017-2020, 2011. 査読有
DOI:10.1016/j.bmcl.2011.02.018

〔学会発表〕(計5件)

Ito, S. Bifurcate roles of nitric oxide (NO) in neuropathic pain. The 44th NIPS International Symposium and The 5th Asian Pain Symposium, Okazaki, December 18-20, 2013. (招待講演)

西田和彦, 松村伸治, 伊藤誠二, Three-dimensional distribution of sensory stimulation-evoked neuronal activity of spinal dorsal horn neurons analyzed by in vivo calcium imaging. In vivo カルシウムイメージングによる脊髄後角ニューロンの神経活動の三次元分布の解析, 第36回日本神経科学大会・第56回日本神経化学学会大会・第23回日本神経回路学会大会合同大会, 京都(国立京都国際会館), 6月20-23日, 2013.

Ito, S., Sasaki, A., Unezaki, S., Andoh, T., Matsumura, S., Katano, T., Nishio, N., Nakatsuka, T., Kuraishi, Y. and Minami, T. Characterization of postherpetic neuralgia in mice with knock-in mutation of NMDA receptor. 14th World Congress on Pain, Milano, August 27-31, 2012.

Ito, S. Mechanism of maintenance of neuropathic pain in the spinal cord, as a model of neural plasticity. The 6th International Conference of Neurons and Brain Diseases in Toyama, Toyama, August 3, 2011. (招待講演)

Ito, S. Blockade by prostaglandin E2 of microglial migration in the spinal cord after nerve injury. The 4th Asian Pain, Shanghai, May 16, 2011. (招待講演)

〔図書〕(計3件)

Katano T., Ito, S. Chapter 5: Multifunctional Roles of Nitric Oxide (NO) in Neurons. Studies on Pediatric Disorders (Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice), Human Press(Springer), 2014. (in press)

西田和彦, 伊藤誠二. DOJIN BIOSCIENCE SERIES 分子脳科学, 化学同人, 2014. (in press)

Okuda-Ashitaka, E., Ito, S. Nociceptin Opioid, Academic Press, 2014. (in press)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www3.kmu.ac.jp/medchem/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 誠二 (ITO, Seiji)
関西医科大学・医学部・教授
研究者番号：80201325

(2) 研究分担者

松村 伸治 (MATSUMURA, Shinji)
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号：70276393

西田 和彦 (NISHIDA, Kazuhiko)
関西医科大学・医学部・助教
研究者番号：80448026

(2) 連携研究者

中塚映政 (NAKATSUKA, Terumasa)
関西医療大学・保健医療学部・教授
研究者番号：30380752