

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790652

研究課題名（和文） In vivo パッチクランプ法を用いた脊髄搔痒シナプス伝達機構の解析

研究課題名（英文） In vivo patch-clamp recording analysis of a pruritogen-induced itching on synaptic transmission in spinal dorsal horn

研究代表者

歌 大介（UTA DAISUKE）

生理学研究所・生体情報研究系・特任助教

研究者番号：70598416

研究成果の概要（和文）：

脊髄後角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 パッチクランプ法を用いて皮膚への痒み刺激により誘起される興奮性のシナプス応答を詳細に解析した。その結果、皮膚へのセロトニン投与によって、末梢で発生した活動電位が脊髄の表層の細胞にシナプス入力し振幅の大きな EPSC の発生頻度を著明に増加させることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

The mechanism for the itch transmission in the spinal dorsal horn remains unclear. The present study was designed to analyze pruritic synaptic responses evoked in spinal dorsal horn neurons of rodents by using an in vivo whole-cell patch-clamp recording technique. The present main finding is that subpopulation of spinal dorsal horn neurons are responsible for pruritic cutaneous serotonin stimulation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：疼痛学

キーワード：痒み、in vivo パッチクランプ、シナプス、脊髄後角、セロトニン、EPSC、膠様質細胞、c-fos

### 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、痛みと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ニューロン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、脊髄における活動電位閾値下の痒みのシナプス伝達機構やその調節機構の詳細は不明であっ

た。そこで、本研究では、in vivo パッチクランプ法を用いて脊髄における痒みシナプス伝達機構の詳細な解析を行った。

### 2. 研究の目的

本研究では、脊髄後角からの in vivo パッチクランプ記録法を用い、皮膚への痒み刺激により誘起される興奮性のシナプス応答を詳細に解析する。痒みに応答した単一ニューロンの発火パターンなどの電気生理学的特性やシナプス終末に発現する受容体の機能解析を行い入力する末梢神経を同定する。行動薬理学的実験も併せて行い、脊髄痒みシナプス伝達機構の全容を明らかにすることを目的とした。

### 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、自然科学研究機構の定める規則に則り動物実験計画書を作成・提出し、岡崎3機関動物実験委員会により承認を受けた後に開始した。また、実験動物に苦痛を与えないよう十分は注意を払った。

#### (1) 行動薬理実験

成熟雄性 Sprague-Dawley 系ラットを使用し、行動実験観察前にラットを行動観察用ケージに入れ測定環境に慣れさせた。その後、ラット下肢に薬物を投与し直ちに行動観察用ケージに戻した。行動は無人環境下にビデオ撮影し、撮影後行動解析を行った。

(2) *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

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。

### 4. 研究成果

(1) ラット下肢皮膚へのセロトニン投与による影響

ラット下肢皮膚へのセロトニン投与によって長時間持続する痒み行動 (biting) が見られた。しかし、痛み行動 (licking) はほとんど見られなかった。これらの結果は、以前マウスで報告されている結果と同様であり、ラット皮膚へのセロトニンによって痒み行動が誘発されることが明らかとなった。

(2) *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変化

*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) など生理的刺激を行い記録細胞の受容野を特定し、受容野に対し vehicle (エタノール) またはセロトニンを投与し、自発性 EPSC に対するこれらの影響を観察した。その結果、vehicle 投与では自発性の EPSC 発生頻度及び振幅にほとんど変化は見られなかったが、セロトニンを投与すると約 30% の細胞で振幅の大きな自発性 EPSC の発生頻度が著明に増加した。この応答は数十分にわたって持続し、行動薬理の実験で得られた結果と一致した。更に、電流固定下に膜電位の変化を記録すると、-70mV 付近に静止膜電位を

有し、自発性のシナプス後電位 (EPSP) が誘起され、セロトニン投与により自発性 EPSP の発生頻度が著明に増加し、一部の細胞は EPSP の加重による活動電位の発生が観察された。セロトニン応答細胞で、電位依存性 Na チャネルの阻害薬であるテトロドトキシンを脊髄表面に灌流投与するとセロトニンにより誘起された振幅の大きな自発性 EPSC の増加は完全に抑制された。続いてグルタミン酸 AMPA 受容体の拮抗薬である CNQX を同様に投与すると自発性 EPSC は完全に抑制された。以上のことから、皮膚へのセロトニン投与によって痒み行動が誘発されること、末梢で発生した活動電位が膠様質細胞にシナプス入力し振幅の大きな EPSC の頻度を著明に増加させることが示唆された。

次いで、セロトニン応答細胞と非応答細胞の特徴を調べるために細胞の位置、発火パターンなどの電気生理学的特性の解析などを行った。まず、セロトニン応答細胞と非応答細胞の脊髄表面からの距離を測定したところセロトニン応答細胞は有意に浅い層に局在していた。更に、神経興奮のマーカーである c-fos を用いた実験からセロトニン塗布により脊髄浅層に c-fos 陽性細胞が局在しており、電気生理学的結果と一致していた。次いで、セロトニン応答細胞と非応答細胞の電気生理学的特性を解析した。膠様質細胞では、delayed、tonic、phasic、initial の 4 つの発火パターンが記録できた。セロトニン応答細胞では delayed firing、tonic firing の割合が多い傾向にあった。一方、静止膜電位などでは有意な差は認められなかった。

以上のことから、皮膚へのセロトニン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 EPSC の頻度を著明に増加させることが明らかとなった。更にセロトニン応答細胞は delayed firing、sustained repetitive firing を示す傾向が見られた。これら脊髄におけるシナプス応答の詳細な報告は現在までになく、今後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。

### 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5件)

Xie DJ, Uta D, Feng PY, Wakita M, Shin MC, Furue H and Yoshimura M., Identification of 5-HT receptor subtypes enhancing inhibitory transmission in the rat spinal dorsal horn in vitro., Molecular Pain, 査読有, 8:58, 2012, DOI: 10.1186/1744-8069-8-58

Uta D, Furue H, Mizuguchi-Takase H, Imoto K and Yoshimura M., Morphological analyses of excitatory effect of TRPA1 agonists on synaptic transmission in spinal dorsal neurons., The Journal of Functional Diagnosis of the Spinal Cord, 査読有, 34(1):58-64, 2012

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

Uta D, Furue H, Imoto K and Yoshimura M., Activation of TRPA1 on excitatory synaptic transmission in substantia gelatinosa of the adult rat spinal cord., The Journal of Functional Diagnosis of the Spinal Cord, 査読有, 33(1):24-29, 2011

Yanagisawa Y, Uta D, Kawamata T, Furue H, Imoto K and Yoshimura M., Plastic changes in spinal excitatory synaptic transmission in cancer-bearing mice., The Journal of Functional Diagnosis of the Spinal Cord, 査読有, 33(1):8-17, 2011

[学会発表](計 29 件)

Uta D, Imoto K and Furue H., Firing pattern and morphological analysis of substantia gelatinosa neurons receiving TRPA1-expressing afferents in rat spinal dorsal horn., The 90th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2013年3月29日, タワーホール船堀(東京都)

Uta D., In vivo patch clamp analysis of itch transmission in the rat spinal dorsal horn., Symposium on Behavioral Molecular Neuroscience 2013, 2013年3月26日, 東京国際フォーラム(東京都)

Uta D, Furue H and Imoto K., In vivo spinal synaptic responses and scratching behaviors evoked by cutaneous 5-HT application., 2nd Joint conference of BRI and NIPS, 2013年2月18日, 新潟大学脳研究所附属統合脳機能研究センター(新潟県)

歌 大介, 安東嗣修, 倉石 泰, 井本敬二, 古江秀昌., 痒み物質の皮膚投与により誘起される行動学的解析と in vivo パッチクランプ記録法を用いた脊髄後角におけるシナプス応答の解析., 第59回中部日本生理学会, 2012年11月16

日, 自然科学研究機構岡崎コンファレンスセンター(愛知県)

Akimoto N, Honda K, Uta D, Furue H, Imoto K, Takano Y and Noda M., The relationship between CCL-1 and neuron/glia in the neuropathic pain model., The 42th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2012年10月17日, New Orleans, USA

Uta D, Gotoh Y, Andoh T, Kuraishi Y, Imoto K and Furue H., In vivo puritic synaptic responses elicited by cutaneous 5-HT application in the superficial spinal dorsal horn of adult rats., The 42th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2012年10月15日, New Orleans, USA

歌 大介, 古江秀昌, 井本敬二., 局所麻酔薬光学異性体の分離遮断能と TRP チャネルをターゲットにした新たな鎮痛薬の可能性について., 第3回名古屋大学医学研究科・生理学研究所合同シンポジウム, 2012年9月29日, 自然科学研究機構岡崎コンファレンスセンター(愛知県)

Uta D, Andoh T, Kuraishi Y, Imoto K and Furue H., In vivo spinal synaptic responses and scratching behaviors evoked by cutaneous serotonin application., The 35rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2012年9月19日, 名古屋国際会議場(愛知県)

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., NIPS International Workshop 2012 Central Neuroplasticity in Sensory-Emotional Link, 2012年9月14日, 自然科学研究機構岡崎コンファレンスセンター(愛知県)

Uta D, Imoto K and Furue H., In vivo patch-clamp analysis of local anesthetic actions on rat spinal nociceptive synaptic transmission., 第34回日本疼痛学会, 2012年7月21日, 熊本市国際交流会館(熊本県)

Uta D, Gotoh Y, Andoh T, Kuraishi Y, Imoto K and Furue H., Excitatory effect of a pruritogen serotonin on synaptic transmission in adult rat spinal dorsal horn neurons in vivo., The 89th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2012年3月29日, 長野県松本文化会館, 熊本市総合体育館, 信州大学松本キャンパ

ス(長野県)

Uta D, Yanagisawa Y, Furue H and Imoto K., Plastic changes in nociceptive excitatory synaptic transmission induced in bone cancer model mice, and selective antinociceptive actions of local anesthetics and TRPA1 channel agonist., 42nd NIPS International Symposium - NIPS and BRI Niigata University Joint Symposium - "Advanced Research Areas for the Future Breakthrough in Neuroscience", 2012年3月6日, 自然科学研究機構生理学研究所(愛知県)

Uta D., Plastic changes in nociceptive excitatory synaptic transmission induced of bone cancer model mice, and selective antinociceptive actions of TRPA1 channel agonists and local anesthetics., 第4回NAGOYAグローバルリトリート, 2012年2月24日, あいち健康プラザ(愛知県)

歌 大介, 古江秀昌, 吉村 恵, 井本敬二., TRPA1 発現線維が入力する脊髄後角細胞の形態学的解析., 第34回脊髄機能診断研究会, 2012年2月4日, 東京商工会議所(東京都)

歌 大介, 井本敬二, 古江秀昌., 光学異性体の痛覚伝達に対する選択的抑制効果., 「痛み」の病態生理と神経・分子機構」平成23年度生理研研究会, 2011年12月21日, 自然科学研究機構岡崎コンファレンスセンター(愛知県)

Uta D, Gotoh Y, Andoh T, Kuraishi Y, Imoto K and Furue H., In vivo patch-clamp analysis of pruriceptive and nociceptive synaptic transmission in the adult rat spinal dorsal horn., The 41th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2011年11月16日, Washington D.C. (USA)

Yoshimura M, Xie D, Uta D, Hachisuka J and Furue H., Sensitization of TRPV1 receptors expressed at the central end of C afferents following inflammation., The 41th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2011年11月14日, Washington D.C. (USA)

謝 篤傑, 歌 大介, 服部 剛, 笠原憲一, 吉村 恵., Naftoidil の脊髄膠様質細胞に対する作用の電気生理学的解析., 第62回西日本生理学会, 2011年10月15日, 佐賀大学医学部臨床大講堂(佐賀県)

歌 大介., In vivo パッチクランプ法を用いた痛覚シナプス伝達の解析., 第7

回若手の会 セルセンサー研究の未来予想図, 2011年9月24日, 自然科学研究機構岡崎コンファレンスセンター(愛知県)

Uta D, Gotoh Y, Andoh T, Kuraishi Y, Imoto K and Furue H., In vivo patch-clamp recording analysis of a pruritogen serotonin-induced itching on synaptic transmission in substantia gelatinosa neurons., The 34rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2011年9月17日, パシフィコ横浜(神奈川県)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

歌 大介 (UTA DAISUKE)

生理学研究所・生体情報研究系・特任助教  
研究者番号: 70598416

### (2)研究分担者

( )

研究者番号:

### (3)連携研究者

( )

研究者番号: