

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590735

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛維持機構の構造的および機能的変化の同時イメージング

研究課題名(英文) In vivo imaging of structural dynamics in the spinal dorsal horn in a neuropathic pain model

研究代表者

松村 伸治 (Matsumura, Shinji)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：70276393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：神経障害性疼痛の発生機序に大きな役割を担うと考えられる脊髄後角内の神経可塑性を伴う感覚情報伝達系の機能異常に焦点を絞り、in vivo脊髄標本を用いたイメージング法により体性感覚情報伝達神経回路網の構造とその活動を経時的に同時に可視化した。In utero遺伝子導入法で蛍光カルシウムプローブタンパク質を脊髄後角ニューロン特異的に発現したマウスニューロンの痛み刺激、接触刺激、熱刺激に対する応答を記録し、脊髄後角内の分布を明らかにした。また、ニューロン特異的に蛍光タンパク質を発現するマウスを用いて、急性炎症性疼痛モデルでニューロンの神経突起の形態学的変化が起こることをリアルタイムに明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We established in vivo calcium imaging of multiple spinal dorsal horn neurons by using a two-photon microscope and extracted three-dimensional neuronal activity maps of these neurons in response to cutaneous sensory stimulation.

We demonstrated inflammation-induced structural changes in dendrites in the spinal dorsal horn of two transgenic mice, expressing yellow fluorescent protein specific to the nervous system over the course of several hours. Structural changes such as the formation of spine-like structures and swelling of dendrites were observed in the spinal dorsal horn within 30 min after the multiple-site injections of complete Freund's adjuvant, a chemical irritant, to a leg; and these changes continued for 5 h. The present study first demonstrates by in vivo two-photon microscopy imaging that structural synaptic plasticity occurred in the spinal dorsal horn immediately after the injection of complete Freund's adjuvant and may be involved in inflammatory pain.

研究分野：神経生物学

キーワード：疼痛 多光子励起顕微鏡 in vivo標本 脊髄 カルシウム イメージング in utero遺伝子導入法

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は神経を含む組織損傷後、傷そのものが治癒後にも長期にわたり持続する激痛とされ、多くの症例では一旦確立されてしまった疼痛は様々な治療に対し抵抗性である。この疼痛は非常に多くの生体因子が関与し、DNA マイクロアレイ等を用いた網羅的な研究が試みられているが、発生機序まで深く掘り下げることができていない。我々の研究グループは、末梢性神経障害性疼痛は末梢神経からの異常入力が脊髄後角のグルタミン酸遊離→NMDA 受容体の活性化→神経型 NO 合成酵素(nNOS)の活性化→神経障害性疼痛発症・維持という機能的かつ可逆的变化で生じるという以下の研究成果を得た。NO 産生が鎮痛薬により可逆的变化を示すという興味ある結果を始点とし、第5腰髄脊髄神経(L5)の単独切断による神経障害性疼痛モデル(L5-SNT モデル)をマウスで確立しており、数多くの遺伝子改変マウスに適用している。その結果、神経障害性疼痛出現に①nNOS の活性化が必要不可欠な重要条件で、その活性化に②NMDA 受容体 NR2B サブユニットのチロシン 1472 残基でのリン酸化、③PGE 受容体サブタイプの EP1, EP3, EP4、④pituitary adenylate cyclase activating-polypeptide (PACAP)、⑤myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARKS)の 159 残基でのリン酸化、⑥nociceptin が重要な役割を担っており、さらに⑦NO 自身が逆行性メッセンジャーとしてシナプス前終末に働き nNOS 活性にフィードバックをかけていること、⑧その NO はシナプス前終末から放出される PGE<sub>2</sub> とともにミクログリアの遊走を抑制すること、⑨脊髄損傷によって脊髄後角で引き起こされる器質的な変化の探索では、脊髄後角で radial astroglia が活性化することを明らかにしてきた。しかし、いままでこれらの結果を、自発呼吸下の個体の in vivo 標本におけるリアルタイムな直接的な観察で検証する方法がなかった。我々は新規に標本の深部を観察出来る多光子励起顕微鏡下での in vivo 標本における脊髄後角の観察法、in utero 遺伝子導入法による脊髄神経回路蛍光可視化可能なマウス作製法を確立しつつある。これらの新技術を用いれば、神経障害性疼痛に関わる感覚情報伝達神経回路網を構成するニューロンの形態学的変化とその活動変化を同時に高空間・高時間分解能で可視化することが可能となる。脊髄を摘出すること無く、これらを観察することは今まで不可能であったので、生体脊髄でのこの解析は神経障害性疼痛発症維持の可塑性形成機構解明の一助となると考え研究を開始するに至った。

2. 研究の目的

神経障害性疼痛の発生機序に大きな役割を担うと考えられる脊髄後角内の神経可塑性を伴う感覚情報伝達系の機能異常に焦点を絞り、新規に確立を試みている in vivo 脊髄標

本を用いたバイオイメージング法により体性感覚情報伝達神経回路網の構造とその活動を経時的に同時に可視化する。興奮性と抑制性介在ニューロンを選択的にイメージングして刺激-応答地図を作成する。その地図で触覚・圧・温・冷と痛覚がどう違うかを解析する。疼痛モデルにおいて疼痛維持の可塑性形成に関与するニューロンの形態学的変化と機能的変化の連関を解明する。これは触覚のような非侵害刺激を痛覚と誤認してしまうアロディニアがなぜ生じるかの理解の糸口となる。

3. 研究の方法

(1) 標的ニューロン特異的に蛍光タンパク質を発現するマウスの作製 ニューロン特異的なプロモーター遺伝子を用いて細胞特異的に発現する蛍光カルシウムプローブの Cameleon ファミリータンパク質を脊髄に in utero 遺伝子導入法により導入し、脊髄腰膨大部後角ニューロン特異的に蛍光タンパク質発現に成功した (図1)。

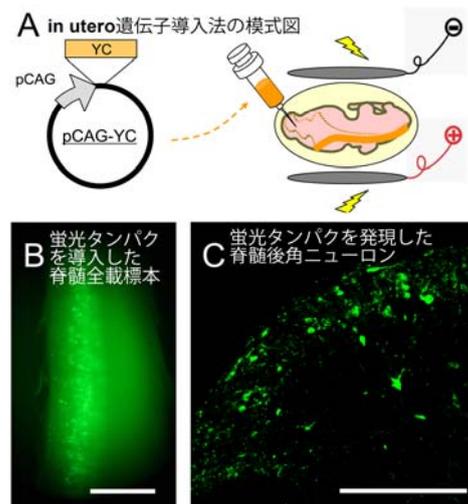


図1

(2) in vivo 標本作製法の確立 呼吸・心拍振動ノイズをイメージングに耐えられる程度に抑えるために、動物麻酔法、椎弓削除法、脊椎固定法の条件検討を行い、脊髄ニューロン観察法を確立した (図2)。

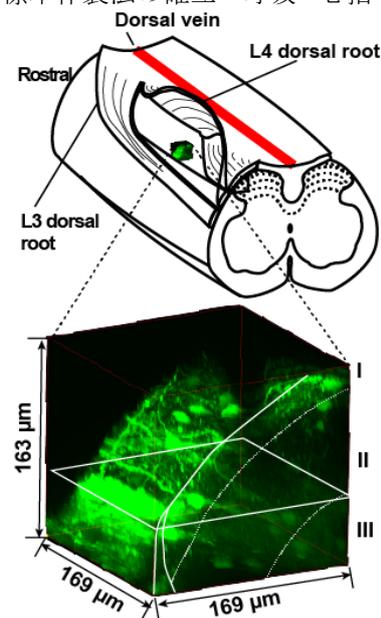


図2

#### 4. 研究成果

(1) 脊髄後角ニューロンの同定と感覚刺激-応答地図の作成 刺激-応答地図を作成するためにコレラトキシンBに蛍光プローブを重合させたもので末梢からのトレースによる支配領域の可視化に成功した。また、脊髄ニューロンの刺激応答反応を記録するために、in vivo 標本に対する多光子励起顕微鏡を用いたカルシウムイメージング法を確立した(図3)。

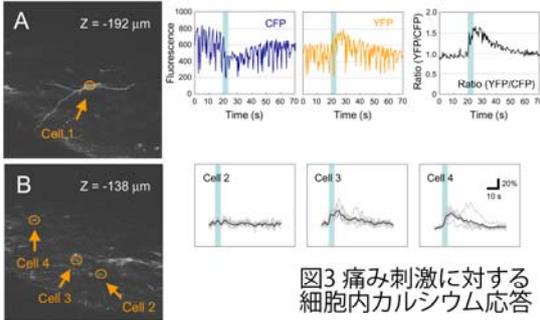


図3 痛み刺激に対する細胞内カルシウム応答

皮膚に対して、痛み (Pinch)、接触 (Brush)、熱 (Heat) 刺激を行い、それぞれの刺激に反応する脊髄後角ニューロンの同定とその脊髄後角の位置と反応の種類の割合を明らかにした (図4)。

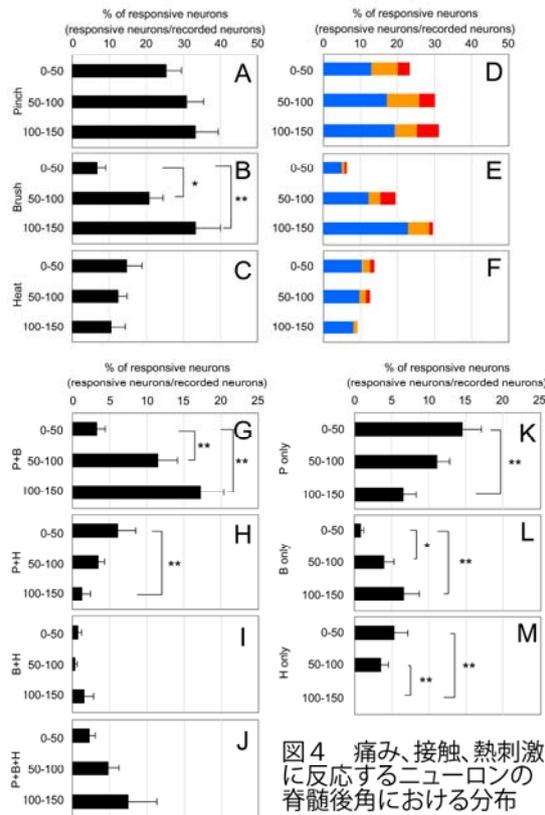


図4 痛み、接触、熱刺激に反応するニューロンの脊髄後角における分布

(2) 炎症性疼痛モデル動物脊髄のニューロンの形態的および機能的変化の経時的追跡 Thy1-YFP トランスジェニックマウスを用いた in vivo 標本脊髄後角ニューロンの多光子励起顕微鏡による形態観察により、CFA 投与による L5 脊髄ニューロンの経時的形態変化の追跡に成功した。ニューロンからの神経突

起に spine 様構造の増加が投与後 60 分から現れる事が明らかとなった (図5)。また、神経線維上に観られる swelling が経時的に膨大した。細胞体からのびる線維上に観られる構造のほかに、斑点状のシナプスマーカーと共局在する構造が増大した。個々の個体における斑点の数はばらつきがあり、リアルタイムに同一個体で追跡する事によりその変化を初めてとらえる事が出来た。

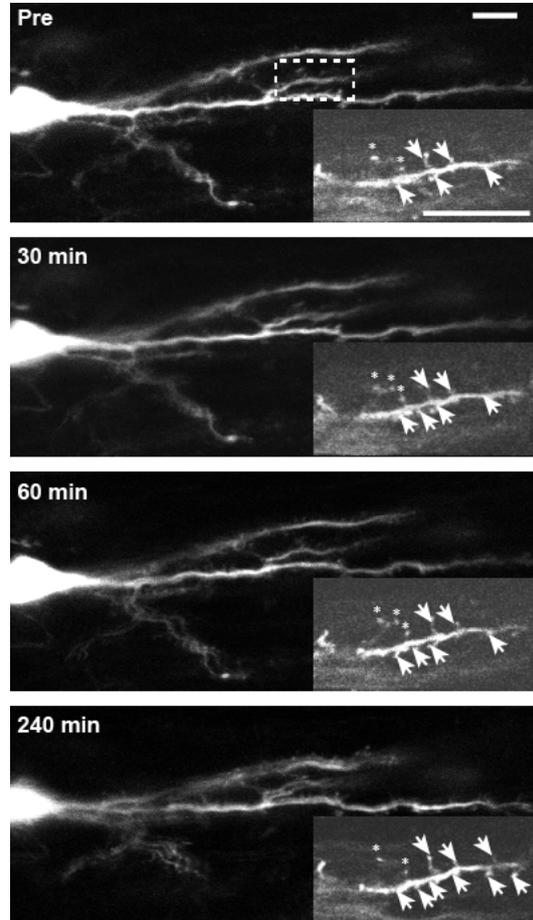


図5 炎症性疼痛モデルの脊髄後角ニューロンの神経突起の経時的増加

CFA により誘導されたスパイン様構造と swelling の出現に対するグルタミン酸受容体拮抗薬の効果調べた。Thy1-YFP で斑点状に観察される puncta のほとんどは抗 PSD95 抗体免疫陽性反応と共局在した。したがって、puncta の増加はシナプスの増加に比例すると考えられる。図6にCFA投与による puncta 数の経時変化を示す。各グラフのグレー線は各個体の経時変化を示している。A (赤線) は 0.5 ml CFA 0.5 を後肢に投与した時の変化。B (黒線) は刺激を与えずに経時変化を追跡した。C (青線) は AMPA 受容体の阻害薬である 10 μM DNQX を含む krebs 液で in vivo 標本の脊髄表層を浸して 15 分後に 0.5 ml CFA を後肢に投与した時の経時変化、D (緑) は NMDA 受容体阻害薬の 10 μM MK801 を含む krebs 液で in vivo 標本の脊髄表層を浸して 15 分後に 0.5 ml CFA を後肢に投与した時の経時変化をそれぞれ示す。AMPA/kainate 受容体および NMDA 受容体を阻

害すると spine 様構造物や swelling に変化が無かった。また、シナプス前終末のカルシウムチャンネルのブロッカーの 100 $\mu$ M gabapentin でもシナプスの数は増大しなかった (図 6 E)。

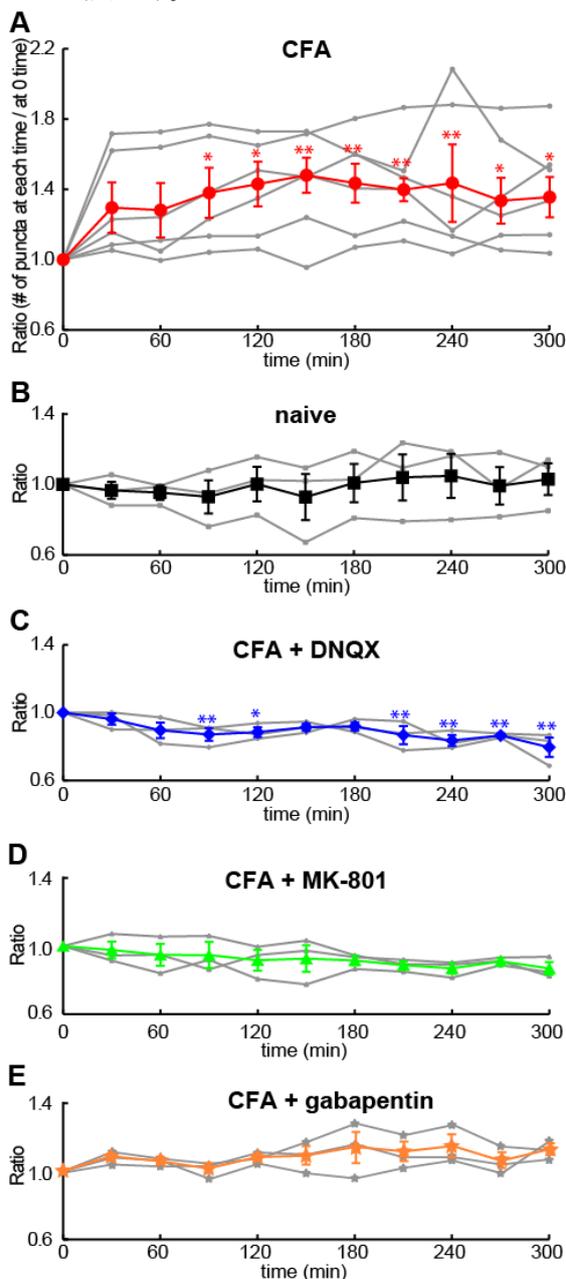


図 6 炎症性疼痛による脊髄後角におけるシナプス数の経時的変化と、興奮性神経伝達物質阻害薬やカルシウムチャンネルブロッカーの効果

##### 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)

1. Matsumura, S., Taniguchi, W., Nishida, K., Nakatsuka, T. and Ito, S.  
*In vivo* two-photon imaging of structural dynamics in the spinal dorsal horn in an inflammatory pain model.  
*Eur. J. Neurosci.* 査読有, 41, 987-995,

2015.

2. Nishida, K., Matsumura, S., Taniguchi, W., Uta, D., Furue, H. and Ito, S.  
Three-dimensional distribution of sensory stimulation-evoked neuronal activity of spinal dorsal horn neurons analyzed by *in vivo* calcium imaging.  
*PLOS ONE*, 査読有, 9, e103321, 2014.
3. 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.* 査読有, 710, 120-127, 2013.
4. 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*, 査読有, 8, 59(1-13), 2012.
5. Araki, Y., Kaibori, M., Matsumura, S., Kwon, A-H. and Ito, S.  
Novel strategy for the control of postoperative pain: long-lasting effect of an implanted analgesic hydrogel in a rat model of postoperative pain.  
*Anesth, Analg.* 査読有, 114, 1338-1345, 2012.

[学会発表] (計 10 件)

1. Ito, S., Nguyen, H. T., Matsumura, S. and Katano, T.  
Involvement of endothelin in peripheral nerve regeneration.  
The 44th annual meeting of the Society for Neuroscience, Washington D.C. (U.S.A), November 15-19, 2014.
2. Nguyen, H. T., Katano, T., Matsumura, S. and Ito, S.  
Involvement of c-Jun N-terminal kinase in peripheral nerve regeneration.  
The 44th annual meeting of the Society for Neuroscience, Washington D.C. (U.S.A), November 15-19, 2014.
3. 西田和彦、松村伸治、伊藤誠二

- In vivo カルシウムイメージングを用いた皮膚の異なる点への感覚刺激に応答する脊髄後角ニューロンの解析  
第 37 回日本神経科学大会、ポスター発表、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）、2014、9 月 11-13 日
4. 矢尾育子、松村伸治、片野泰代、山肩葉子、井本敬二、伊藤誠二  
CaMKII キナーゼ不活型 KI マウスにおける慢性疼痛モデル脊髄後角の CaMKII のシナプス局在  
第 37 回日本神経科学大会、ポスター発表、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）、2014、9 月 11-13 日
5. 伊藤誠二、片野泰代、松村伸治、西田和彦  
成熟した疼痛研究の新しい展開 New departure of mature pain research.  
日本ペインクリニック学会第 48 回大会、教育講演、京王プラザホテル（東京都新宿区）、2014、7 月 25 日
6. Nguyen Huu Tu、片野泰代、松村伸治、伊藤誠二  
末梢神経再生モデルを用いた神経再生におけるエンドセリンの関与  
Involvement of endothelin in peripheral nerve regeneration using tubing and osmotic pump model.  
第 36 回日本疼痛学会、口演、KKR ホテルオーサカ（大阪府大阪市）、2014、6 月 20-21 日
7. 矢尾育子、松村伸治、伊藤誠二  
Synaptic localization of CaMKII with mice model of chronic pain.  
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、ポスター発表、国立京都国際会館（京都府京都市）、2013、6 月 20-23 日
8. 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、ポスター発表、国立京都国際会館（京都府京都市）、2013、6 月 20-23 日

9. Uchida, H., Matsumura, S. and Ito, S.  
Developmental regulation of RNA editing in mouse dorsal root ganglion.  
The 42nd annual meeting of the Society for Neuroscience, New Orleans (U.S.A), October 13-17, 2012.
10. 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 (Italy), August 27-31, 2012.

〔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 0 件）

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

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

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

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：