

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：24590736

研究課題名(和文)新規遺伝子改変マウスを用いた疼痛神経回路網の蛍光可視化システムの開発

研究課題名(英文) Visualization of neural circuits for pain processing using genetically engineered mice

研究代表者

西田 和彦 (Kazuhiko, Nishida)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：80448026

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々が皮膚で感じ取る体性感覚はどのような情報処理を経て脳中枢に伝達されるのかを明らかにすることを目的として、体性感覚情報の中継点である脊髄後角の多数の神経細胞の活動を生きたマウスで同時計測する系を構築した。その結果、マウス皮膚への疼痛、接触、熱刺激、および異なる部位の皮膚への刺激に応答して特異的な位置の脊髄後角ニューロンの神経活動が活性化することが明らかとなった。本研究の結果より、異なる体性感覚刺激は脊髄後角レベルで異なる神経細胞群により情報処理される可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To gain insight of how cutaneous sensory stimulation is processed and transmitted to the brain, the present study focused on the establishment of in vivo calcium imaging of a large ensemble of neurons in the spinal dorsal horn critical for transmission of sensory information. This study revealed that cutaneous pinch, brush, and heat stimulation, and stimulation to different skin points triggered neuronal activities of different subsets of neurons. This result suggests that each subset of spinal dorsal horn neurons is involved in neuronal processing of different types of sensory stimulation.

研究分野：神経科学

キーワード：カルシウムイメージング 脊髄後角 体性感覚

1. 研究開始当初の背景

脊髄後角は体性感覚情報を高次脳中枢へと伝達する極めて重要な部位である。脊髄後角には、高次脳中枢へ感覚情報を直接伝達する投射ニューロンだけでなく、様々な興奮性、抑制性介在ニューロンが存在し、これらが形作る神経回路が脊髄後角レベルで体性感覚情報の処理に重要な役割を果たしていると考えられている。したがって、脊髄後角における神経回路の構築パターンの解明は体性感覚の情報処理の理解につながると考えられる。

これまでの国内外の解剖学的、電気生理学的な解析により、脊髄後角ニューロン同士の回路パターンが徐々に明らかとされつつある。しかしながら、脊髄後角における情報処理は多くのニューロンによって共同して行われているのであり、これら複数のニューロンが全体としてどのようなパターンで活動しているかの包括的な理解が脊髄後角の情報処理の解明に必要である。

2. 研究の目的

本研究では体性感覚情報の処理に関わる複数の脊髄後角ニューロンがどのようなパターンで活動しているかを明らかにすることを目的として、脊髄後角の多数のニューロンを一個体で測定する系を構築した。さらに測定する脊髄後角ニューロンの正確な位置情報を求めることにより、一次求心性線維により脊髄後角に入力した体性感覚情報が脊髄後角内をどのように伝播するかを明らかにした。

3. 研究の方法

(1) 多数のニューロンの神経活動を同時に測定する方法としてカルシウムイメージングは極めて有用な手法である。そこでまず、子宮内電気穿孔法による脊髄後角へのカルシウムインディケーター遺伝子の導入系を確立した。またそれと平行してカルシウムインディケーター蛋白質を Cre/loxP システムにより誘導発現しうるマウスの開発も行った。

(2) 次に脊髄後角にカルシウムインディケーターを発現させたマウスを用いて、皮膚へ様々な体性感覚刺激をした際の脊髄後角ニューロンの応答を二光子励起顕微鏡下で観察した。この際、測定するニューロンの位置情報を詳細に調べて、背側表層からの距離と刺激に対する応答性の関連性についてを解析した。

4. 研究成果

(1) まず子宮内電気穿孔法(図1)を用いて

マウス脊髄後角に遺伝子導入する系を構築した。マウス胎生12日目にGF P発現ベクターを導入したマウスの脊髄を生後三週で解析したところ、GF P陽性細胞は脊髄後角の浅層で多く認められ、各種マーカー分子による免疫染色の結果、導入細胞のほとんどは神経細胞であり、興奮性、抑制性ニューロンどちらも含むことがわかった。

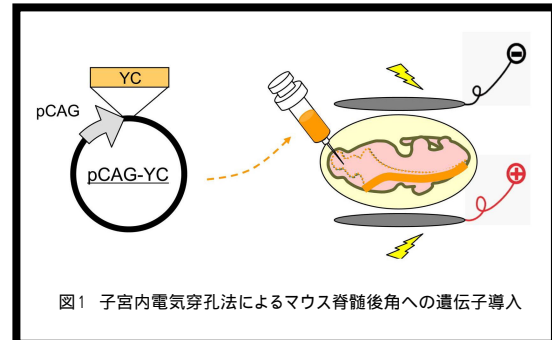


図1 子宮内電気穿孔法によるマウス脊髄後角への遺伝子導入

(2)(1)で確立した脊髄後角ニューロンへの遺伝子導入系によりカルシウムインディケーター遺伝子を脊髄後角ニューロンに導入し、in vivo カルシウムイメージングの系を構築した。二光子励起顕微鏡を用いた解析から、第一腰髄(L1)の脊髄後角における吻尾軸1.4mm、内側軸500 μ m、深さ150 μ mの範囲内の約200個のニューロンの神経活動を解析することに成功した(図2)。

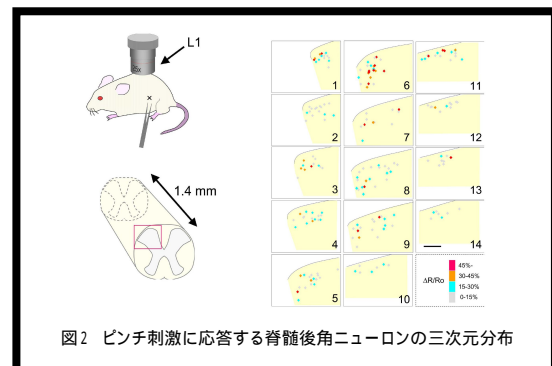


図2 ピンチ刺激に応答する脊髄後角ニューロンの三次元分布

(3)(2)で確立したカルシウムイメージングの系を用いて、接触、ピンチ、熱刺激依存性の脊髄後角ニューロンの神経活動パターンを解析した。測定する神経細胞の表層からの深さを解析した結果、刺激の種類と応答するニューロンの割合には相関が認められた。接触刺激に反応する細胞は深い層では多いが、浅い層ではほとんど認められなかった(図3)。これは接触刺激の受容に関与する一次求心性線維が深い層に投射することに対応している。カルシウムイメージングにより解析される神経細胞の活動は一次求心性線維の入力を直接受け取る二次ニューロンだけでなく、三次、四次ニューロンも含まれることを考えると、一次求心性線維により脊髄後角に入力した体性感覚情報は異なる層の間を自由に伝播しない可能性が示唆された。

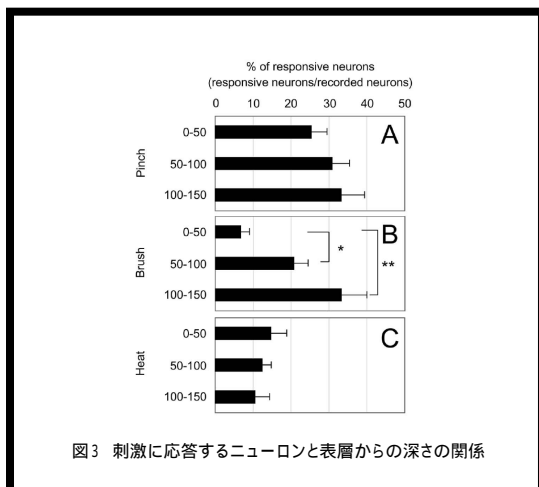


図3 刺激に反応するニューロンと表層からの深さの関係

(4) 次に皮膚の異なる点にピンチ刺激を加えた際の第一腰椎の脊髄後角ニューロンの神経活動を調べた。第一腰椎の一次求心性ニューロンが支配するわき腹の皮膚の点 (P1) とそこから吻尾軸方向にそれぞれ 1 cm 離れた 2 点 (P2, P3) を刺激する箇所とし、これら 3 点を順次ピンチ刺激した際のニューロンの応答をカルシウムイメージングで解析した。その結果、P1 への刺激によっては半分弱のニューロンで応答が見られたが、P2, P3 への刺激によっても 20% 程度のニューロンで応答が認められた (図 4)。P1, P2, P3 の皮膚感覚を伝達する一次求心性線維の中樞投射パターンを調べるために、逆行性トレーサのインジェクションによる標識を行ったところ、これらの一次求心性線維の中樞投射は脊髄後角において約 2 mm の間隔をもって離れて局在していた。これらの結果より脊髄後角により受容された体性感覚情報は脊髄後角介在ニューロンにより吻尾軸方向に広く拡散する可能性が示唆された。

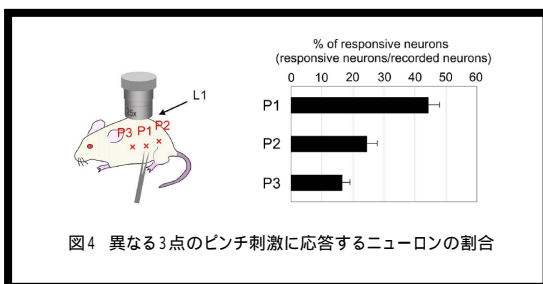


図4 異なる3点のピンチ刺激に反応するニューロンの割合

(5) 上記の研究と平行して Cre リコンビナーゼの組換えにより Yellow Cameleon を誘導発現するトランスジェニックマウスを構築した。このマウスと脊髄後角ニューロン特異的に Cre を発現するドライバーマウスを交配させたマウスの脊髄を解析した結果、脊髄後角特異的な Yellow Cameleon の発現を確認した。このトランスジェニックマウスの構築により、脊髄後角ニューロンのサブタイプ特異的に in vivo カルシウムイメージングを行う道が開けた。

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 2 件)

- (1) Matsumura S, Taniguchi W, Nishida K, Nakatsuka T, Ito S. In vivo two-photon imaging of structural dynamics in the spinal dorsal horn in an inflammatory pain model. **Eur. J Neurosci.** 41, 987-995 (2015) (査読有)
- (2) Nishida K, Matsumura S, Taniguchi W, Uta D, Furue H, Ito S. Three-dimensional distribution of sensory stimulation-evoked neuronal activity of spinal dorsal horn neurons analyzed by in vivo calcium imaging. **PLoS ONE** 9(8): e103321 (2014) (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

- (1) 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.
第 36 回日本神経科学大会
2013年6月20日、京都国際会館(京都府京都市)
- (2) 西田,和彦, 松村伸治, 伊藤誠二
In vivo calcium imaging of spinal dorsal horn neurons in response to cutaneous sensory stimulation toward different skin points.
第 37 日本神経科学大会
2014年9月11日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

[図書] (計 1 件)

- (1) 西田和彦, 伊藤誠二他, 三品昌美編, 化学同人, 「分子脳科学」8 章: 体性感覚の受容と伝達の分子機構、2015 年 4 月刊行、89-98

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

西田 和彦 (NISHIDA, Kazuhiko)
関西医科大学・医学部・助教
研究者番号：8 0 4 4 8 0 2 6

(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：8 0 2 0 1 3 2 5

松村 伸治 (MATSUMURA, Shinji)
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号：7 0 2 7 6 3 9 3