

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293137

研究課題名(和文) 蛍光タンパク発現マウスを用いた感覚系入出力における脊髄神経回路網の3次元機能解析

研究課題名(英文) 3D analysis of functional neural network of sensory input and output in the spinal cord by use of transgenic mice expressing fluorescent proteins

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) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、神経系に蛍光タンパクを発現させたマウスを用いて、in vivoで皮膚刺激による感覚入力を情報処理する脊髄後角の神経回路網の3次元機能解析系を多光子励起顕微鏡で確立し、解析を行った。1回の皮膚刺激により応答する細胞が数10個同時に観察され、脊髄後角の表層では熱や機械的的刺激に、深層では触刺激に応答するニューロンが多数存在することを示し、脊髄後角ニューロンの刺激-応答図を作成した。炎症性疼痛モデルを作製し、脊髄の神経線維上に新たなシナプスが形成され、その数が経時的に増加すること、グルタミン酸受容体拮抗薬で抑制されることを明らかにした。本研究は研究計画にそって順調に進んだと考える。

研究成果の概要(英文)：Peripheral sensory impulses produced by stimuli to the skin are transmitted to the spinal dorsal horn and recognized as touch and pain in the brain. In this study, we established a 3-dimensional system of neural network in the spinal cord by two-photon fluorescence microscope and functionally and morphologically analyzed the network in transgenic mice expressing fluorescent proteins. We could observe dozens of neurons in the spinal dorsal horn in response to a stimulus to the skin and made stimulus-response maps. While neurons in the superficial layer responded to heat and mechanical stimuli, ones in the deeper layer responded to touch.

We also revealed that synapses were newly formed on neurites in the dorsal horn in inflammatory animal model and that the increase in synapses was blocked by glutamate antagonists. Thus we think that the research plans proposed by this grant have been achieved sufficiently.

研究分野：医化学、神経科学、疼痛学

 キーワード：多光子励起顕微鏡 脊髄後角 神経回路網 子宮内遺伝子導入 トランスジェニックマウス 皮膚刺激
Ca²⁺応答 形態変化

1. 研究開始当初の背景

脊髄後角の神経ネットワーク (図1) は、(a)末梢組織からの一次求心性線維、(b)脊髄内で情報処理を調節する介在ニューロン、(c)上位中枢に軸索を投射するニューロン、(d)下行性抑制系ニューロンの線維 (示さず) で構成される。熱や機械的侵害刺激は皮下の自由神経終末の侵害受容器を活性化し、一次求心性線維を介して脊髄後角の二次ニューロンに伝達され、閾値を越えると大脳皮質で痛覚として認識される。反射などによる侵害刺激からの逃避や除去とともに、痛みは消失する。神経損傷に伴う神経障害性疼痛では、損傷部位からの持続的侵害入力により、一次求心性線維の細胞体が存在する後根神経節 (DRG) 細胞での遺伝子発現の変化やその中枢端 (図1右下挿入図) でのシナプス伝達の効率化など痛覚伝達経路に機能的、器質的変化が生じ、さらに、脊髄後角で産生されるプロスタグランジン E₂ (PGE₂) や一酸化窒素 (NO) などの細胞間情報伝達物質により、中枢性感作が生じると考えられている。

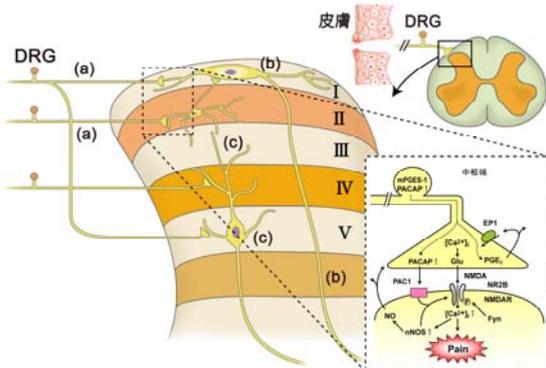


図1 脊髄後角の神経ネットワークと情報伝達

2. 研究の目的

本研究ではこれまでの研究成果をさらに発展させるため、形態観察用の蛍光タンパク (GFP) だけでなく機能解析用の Ca²⁺センサー蛍光タンパク (YCnano) を脊髄後角の神経細胞に発現させたマウスを用いて、末梢組織からの感覚入力に脊髄後角の神経細胞ネットワークでどのように情報処理され、上位中枢に出力されるかを多光子励起顕微鏡を用いて *in vivo* で明らかにすることを目的とした。

Aβ線維を介する触覚とAδとC線維を介する痛覚が伝達経路で明確に区別され、膠様質 (SG) の介在ニューロンを介して触覚刺激が痛覚を和らげるとされているが、神経障害性疼痛では触覚刺激が痛覚となるアロディニアを生じる。痒みは皮膚の痒み受容器を活性化し、脊髄後角に伝達され生じるが、痛覚と反対に、搔くことにより痒みは収まる。申請者らはこれまで検証する手段がなかった疼痛研究の長年の根源的概念を解決すべく、神経回路網を蛍光可視化できる Thy1-YFP マウスと多光子励起顕微鏡を駆使して脊髄後角の形態変化 (図2) を解析する系を *in vivo*

で確立している。

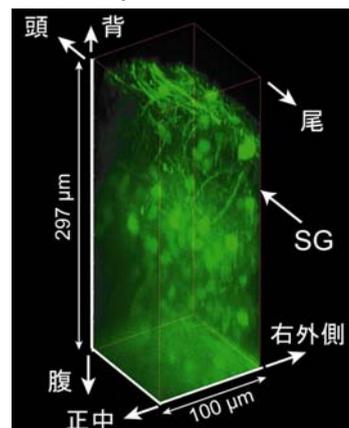


図2 多光子励起顕微鏡による脊髄後角像

本研究は感覚入力の第一中継地である脊髄後角でどのように情報処理され、上位中枢に伝達されるのかを明らかにするために、(1)Ca²⁺センサー蛍光タンパク (YCnano) を子宮内遺伝子導入法により脊髄後角に発現させるだけでなく、ニューロン特異的および興奮性あるいは抑制性ニューロン特異的 Cre マウスと交配して標的ニューロン特異的 YCnano 発現マウスを作製するために、そのレポーターマウスの作製すること (2)YCnano などの蛍光タンパクを発現するマウスを用いて、皮膚での熱、触、機械的刺激にCa²⁺応答する脊髄ニューロンとそのネットワークを機能的に解析して、刺激応答図を作成すること (3)PGE₂、グルタミン酸をはじめとする薬剤を脊髄スライス標本に添加して、直接応答反応を検討する一方、NMDA 受容体拮抗薬等薬剤の刺激入力 - 応答反応への影響を検討すること

さらに感覚系の入力応答反応に伴う可塑的变化を *in vitro*、*in vivo* で長期間解析できる疼痛研究の利点を利用して、(4)炎症による慢性疼痛モデル、痒みモデルマウスを作製し、多光子励起顕微鏡を駆使して機能と形態の両面から時空間的に解析し、末梢組織からの感覚系入力の情報処理機構と神経ネットワークの可塑性を脊髄で明らかにすることを計画した。

疼痛研究ではさまざまな疼痛動物モデル系が確立されている。疼痛に伴う可塑性変化は、分子レベルから動物個体の行動まで数時間から1ヶ月以上の長期にわたり観察実験が可能で、刺激入力 - 応答が *in vivo* で解析できる点に学術的特色がある。従来の電気生理学的手法では個々の細胞の性格付けはできない。多光子励起顕微鏡を用いた実験では1つの個体から数10から100個のニューロンの刺激 - 応答を同時に解析できる特色がある。

in vivo で脊髄後角でのニューロン活動を時空間的に多光子励起顕微鏡で解析する点、

痛みと痒みの類似点と相違点を明らかにすると同時に、その相互作用を神経ネットワークとして解明できる点が独創的である。

3. 研究の方法

脳と異なり、脊髄は呼吸や拍動により動くので、生きたマウス脊髄の形態変化、機能変化を顕微鏡下で追跡することはできなかった。本研究は麻酔下のマウスを、長時間、多光子顕微鏡下に脊髄の神経回路網を観察する系を世界ではじめて確立した(図3)。

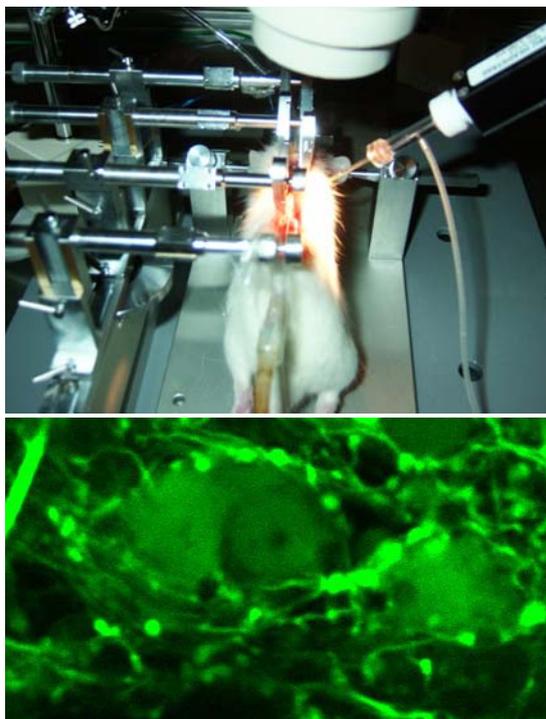


図3 多光子顕微鏡による *in vivo*での Thy1-YFP マウス解析と得られた脊髄後角ニューロンの拡大蛍光像

マウスは神経系に特異的に蛍光タンパクを発現する Thy1-YFP マウス、Ca²⁺センサー蛍光タンパク (YCnano) を子宮内遺伝子導入して脊髄後角に発現させたマウス、YCnano の細胞系譜特異的に発現できるレポーターマウスと脊髄ニューロン、抑制性介在ニューロン特異的 Cre マウスと交配して標的ニューロン特異的蛍光タンパク発現マウスを作製して用いた。

脊髄後角のニューロンの刺激応答は、皮膚に熱、触、機械的刺激を加えて Ca²⁺応答する脊髄ニューロンを多光子励起顕微鏡を用いて *in vivo*した。さらに、露出した脊髄後角に PGE₂ で直接刺激する一方、阻害薬・拮抗薬を添加して刺激応答反応への影響を解析した。さらに炎症性疼痛や痒みのモデルマウスを作製し、神経回路網の形態と機能の両面から感覚系入力の情報処理機構を解析した。

4. 研究成果

本研究では末梢組織からの感覚入力脊髄後角の神経細胞ネットワークでどのように情報処理され、上位中枢に出力されるかを明らかにするために、形態観察用の蛍光タンパク (GFP) だけでなく機能解析用の Ca²⁺セ

ンサー蛍光タンパクを脊髄後角神経細胞に発現させたマウスを用いて、研究実施計画にそって、多光子励起顕微鏡を用いた研究を実施した。

(1) 神経特異的に YFP を発現するトランスジェニックマウス (*thy1-YFP*) で炎症性疼痛モデルを作製し、神経ネットワークの変化を形態学的に解析し、炎症直後から樹状突起上に新たなスパイン様構造が形成されること、炎症性疼痛モデルで多光子励起画像でシナプス数が経時的に増加すること、AMPA 型、NMDA 型グルタミン酸受容体いずれの拮抗薬でもその経時変化が抑制されることを明らかにした。この成果は、Matsumura *et al.* Eur. J. Neurosci. **41**:987-995 (2015) に発表した。

(2) 子宮内遺伝子導入法を用いて 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を作製し、皮膚での熱、触、機械的刺激に Ca²⁺応答する脊髄ニューロンとそのネットワークを多光子励起顕微鏡を用いて *in vivo*で解明を行った。その結果、多光子励起顕微鏡下に1回の皮膚刺激により応答する細胞が数10個同時に観察され、脊髄後角の表層では侵害刺激の受容として熱や機械的刺激に応答するニューロン、深層では触刺激による非侵害刺激に応答するニューロンが多数存在することを認めた。さらに、異なる皮膚分節からの入力に応答する脊髄後角のニューロンが数多く観察されたので、体節を超えた情報伝達が行われることを明らかにし、脊髄後角での刺激-応答図を作成した。この成果は、Nishida *et al.* PLoS ONE **9**: e103321 (2014) に発表した。

(3) 露出した脊髄後角に生理活性物質 PGE₂ を添加して、皮膚刺激による応答や興奮性伝達物質の応答を修飾することを明らかにした。また、抑制性神経伝達物質の受容体拮抗薬を投与すると脊髄後角の神経細胞の応答が増大することから、皮膚刺激の上位中枢への伝達の第1中継地脊髄後角での痛覚伝達、大脳皮質での痛覚認識の解析の系が確立できた。

(4) Ca²⁺センサー蛍光タンパクを発現するトランスジェニックマウスを作製した。さらに、脊髄後角ニューロン選択性、抑制ニューロン選択性をもつドライバーマウスとレポーターマウスを交配して、それらのニューロンに選択的に Ca²⁺センサー蛍光タンパクを発現するトランスジェニックマウスを作製した。現在EP受容体サブタイプの作動薬、拮抗薬を用いて、単独あるいはグルタミン酸の反応が修飾されるニューロンの解析をすすめている。

以上のように本研究の所期の目的である、皮膚刺激の上位中枢への伝達の第1中継地脊髄後角での痛覚伝達の神経回路網の3次元機能解析系を多光子励起顕微鏡で確立し、その解析を推進した。

さらに、(5) 脊髄後角から大脳皮質への神経伝達経路を明らかにするために、投射ニューロンの解析も平行して行った。

(6) 痛みと痒みの伝達経路のネットワークの違い、あるいは同一であるのかを明らかにするために、痒みのモデル系を立ち上げて痒みの情報伝達機構の解析を行った。

以上のように研究計画に沿って、順調に進んだと考えている。

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 12 件)

①Nguyen H. T., Katano, T., Matsumura, S., Pham M. V., Muratani, T., Minami, T. and Ito, S. Role of c-Jun N-terminal kinase in late nerve regeneration monitored by *in vivo* imaging of thyl-yellow fluorescent protein transgenic mice. *European Journal of Neuroscience*, 査読有, **43**:548-560, 2016.

DOI: 10.1111/ejn.13139

②Matsumura, 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. *European Journal of Neuroscience*, 査読有, **41**:987-995, 2015. DOI:10.1111/ejn.12837

③Omoto, H., Matsumura, S., Kitano, M., Miyazaki, S., Minami, T. and Ito, S. Comparison of mechanisms of allodynia induced by acromelic acid A between early and late phases. *European Journal of Pharmacology*, 査読有, **760**:42-48, 2015. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.03.075.

④Shudo, Y., Shimojo, M., Fukunaga, M. and Ito, S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is regulated by alternative splicing of transcriptional repressor REST/NRSF in nerve injury. *Life Sciences*, 査読有, **143**:174-181, 2015. DOI: 10.1016/j.lfs.2015.10.033

⑤Uchida, H. and Ito, S. Differential regulation of RNA-ending enzymes, ADAR1 and ADAR2, expression by 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A in human neuronal SH-SY5Y cells. *Neuroreport*, 査読有, **26**:1089-1094, 2015. DOI: 10.1097/WNR.0000000000000474

⑥Okuda-Ashitaka, E., Ito, S. Nocistatin: milestone of one decade of research. *Current Pharmaceutical Design*, 査読無, **21**:868-884, 2015. DOI: 10.2174/1381612820666141027112451

⑦Nguyen H. T., Katano, T., Matsumura, S. and Ito, S. Involvement of endothelin B receptor in peripheral nerve regeneration

using sciatic nerve transection-regeneration model. *Pain Research*, 査読無, **30**:167-172, 2015.

DOI: 10.11154/pain.30.167

⑧片野泰代, 伊藤誠二. 脊髄に起因する痛み～脊髄の構造と慢性化をおこす中枢性感作～Chronic pain is induced by central sensitization in spinal dorsal horn. *Practice of Pain Management*, 査読無, **6**:22-25, 2015.

⑨Lee, B., Villarreal-Ponce, A., Fallahi, M., Ovadia, J., Sun, P., Yu, Q. C., Ito, S., Sinha, S., Nie, Q. and Dai, X. Transcriptional mechanisms link epithelial plasticity to adhesion and differentiation of epidermal progenitor cells. *Developmental Cell*, 査読有, **29**:47-58, 2014. DOI: 10.1016/j.devcel.2014.03.005.

⑩Nishida, 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. DOI: 10.1371/journal.pone.0103321

⑪Unezaki, S., Katano, T., Hiyama, T. Y., Nguyen, H. T., Yoshii, S., Noda, M. and Ito, S. Involvement of Na_x sodium channel in peripheral nerve regeneration via lactate signaling. *European Journal of Neuroscience*, 査読有, **39**:720-729, 2014. DOI:10.1111/ejn.12436

⑫Lu, J., Yao, I., Shimojo, M., Katano, T., Uchida, H., Setou, M. and Ito, S. Identification of nitrated tyrosine residues of protein kinase G-Iα spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 査読有, **406**:1387-1396, 2014. DOI: 10.1007/s00216-013-7535-4

[学会発表] (計 20 件)

①片野泰代, 福田正史, 山崎真耶, 阿部学, 渡辺雅彦, 古江秀昌, 矢尾育子, 西田和彦, 奥村宣明, 中澤敬信, 山本雅, 崎村健司, 高尾敏文, 伊藤誠二. 脊髄後角における新規慢性疼痛関連分子の同定, 2015年度包括型脳科学研究推進支援ネットワーク 冬のシンポジウム, 2015年12月17日～19日, 一橋大学 一橋講堂 (東京都・千代田区)

②Nguyen, H. T., Katano, T., Matsumura, S. and Ito, S. New mechanisms for pain control and clinical potential. International Conference on Pain -Anesthesiology and pain control- (国際学会), 2015年11月20日, ハノイ市 (ベトナム)

③Nguyen, H. T., Matsumura, S., Katano, T., and Ito, S. Involvement of c-Jun

N-terminal kinase in neurite extension of cultured DRG neurons. The 45th annual meeting of the Society for Neuroscience (国際学会), 2015年10月17日~21日, シカゴ (アメリカ)

④Katano, T., Watanabe, M., Yamazaki, M., Abe, M., Yao, I., Sakimura, K. and Ito, S. Localization of neuropathic pain-related protein, BEGAIN in the spinal dorsal horn. The 45th annual meeting of the Society for Neuroscience (国際学会), 2015年10月17日~21日, シカゴ (アメリカ)

⑤Matsumura, S., Taniguchi, W., Nishida, K., Nakatsuka, T. and Ito, S. Chasing morphological changes of neuronal processes in the spinal dorsal horn in an inflammatory pain model by using two-photon microscopy. The 45th annual meeting of the Society for Neuroscience (国際学会), 2015年10月17日~21日, シカゴ (アメリカ)

⑥ Shimojo, M., Shudo, Y. and Ito, S. Selective siRNA-mediated suppression of nSR100(SRRM4) induces the cell death of small cell lung cancer. The 45th annual meeting of the Society for Neuroscience (国際学会), 2015年10月17日~21日, シカゴ (アメリカ)

⑦Pham, M.V., Nguyen, H.T., Katano, T., Matsumura, S. and Ito, S. Two feasible mouse models for neuropathy. The 2nd Gene & Immunotherapy Conference in Vietnam 2015 (国際学会), 2015年9月25日~26日, ホーチミン (ベトナム)

⑧熊田アンリオバディア, 谷口久哲, 矢尾育子, 古田享史, 松田公志, 伊藤誠二. 質量顕微鏡によるテストステロンのマウス精巣における可視化 Visualization of testosterone on mouse testis with imaging mass spectrometry. 第40回日本医用マススペクトル学会年会, 2015年9月17日~18日, アクトシティ浜松コンgresセンター (静岡県・浜松市)

⑨Ito, 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, 2014年11月15日~19日, ワシントンD.C. (アメリカ)

⑩Nguyen, 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, 2014年11月15日~19日, ワシントンD.C. (アメリカ)

⑪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, 2014年9月11日~13日, パ

シフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

⑫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, 2014年9月11日~13日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

⑬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(招待講演), 2014年7月25日, 京王プラザホテル (東京都・新宿区)

⑭Nguyen 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, 2014年6月20日~21日, KKR ホテルオーサカ (大阪府・大阪市)

⑮Ito, S. Bifurcate roles of nitric oxide (NO) in neuropathic pain. The 44th NIPS International Symposium and The 5th Asian Pain Symposium (招待講演), 2013年12月18日~20日, 岡崎コンファレンスセンター (愛知県・岡崎市)

⑯首藤由江, 下條正仁, 福永幹彦, 伊藤誠二. 神経因性疼痛における Pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide (PACAP) 発現に関与する神経特異的転写抑制因子 RE1-silencing transcription factor (REST/NRSF) アイソフォームに関する研究, 第36回日本分子生物学会, 2013年12月3日~6日, 神戸国際展示場 (兵庫県・神戸市)

⑰Katano, T., Yao, I., Yamazaki, M., Abe, M., Fukuda, M., Okumura, N., Takao, T., Sakimura, K. and Ito, S. Involvement of neuropathic pain-related protein-B (NPRP-B), a novel functional molecule, in inflammatory and neuropathic pain in vivo. The 43rd annual meeting of the Society for Neuroscience, 2013年11月9日~13日, サンディエゴ (アメリカ)

⑱Ito, S., Lu, J., Shimojo, M., Katano, T., Uchida, H. and Yao, I. Proteomic approach of nitrated tyrosine residues of protein kinase G-I α . The 43rd annual meeting of the Society for Neuroscience, 2013年11月9日~13日, サンディエゴ (アメリカ)

⑲内田仁司, 伊藤誠二. Epigenetic gene regulation of RNA editing enzyme in neuron. 神経細胞におけるRNA編集酵素のエピゲノム制御, 第15回日本RNA学会年会, 2013年7月24日~26日, ひめぎんホール (愛媛県・松山市)

⑳ 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, 2013 年 6 月 20 日～23 日, 国立京都国際会館 (京都府・京都市)

[図書] (計 4 件)

①西田和彦, 伊藤誠二. 「分子脳科学」DOJIN BIOSCIENCE SERIES, 8 章: 体性感覚の受容と伝達の分子機構, 化学同人, 全 312 頁 (89-98), 2015.

②伊藤誠二. PACAP と神経障害性痛 「痛みの Science & Practice 第 8 巻 臨床に役立つ神経障害性痛の理解」, 文光堂, 全 285 頁 (29-30), 2015.

③Katano, T. Ito, S. Studies on Pediatric Disorders (Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice), Chapter 5: Multifunctional Roles of Nitric Oxide (NO) in Neurons, Human Press, 全 494 頁 (71-84), 2014.

④ Okuda-Ashitaka, E., Ito, S. Pain regulation induced by nocistatin-targeting molecules: G protein-coupled-receptor and nocistatin-interacting protein. NOCICEPTIN OPIOID, *Vitamins and Hormones*, **97**:147-165, 2014.

DOI: 10.1016/bs.vh.2014.12.001.

[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

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

(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: 7 0 2 7 6 3 9 3

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

矢尾 育子 (YAO, Ikuko)

関西医科大学・医学部・准教授 (平成 25 年 6 月 30 日まで)

浜松医科大学・メディカルフォトニクス研究センター・准教授 (平成 25 年 7 月 1 日より)

研究者番号: 6 0 3 9 9 6 8 1

(平成 25 年 7 月 1 日より連携研究者)