

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 1 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860431

研究課題名(和文) In vivoパッチクランプ法を用いた痒覚中枢機構の解析

研究課題名(英文) In vivo patch-clamp analysis of itch transmission in central nerve system

研究代表者

歌 大介(Uta, Daisuke)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・助教

研究者番号：70598416

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：中枢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記録法を用いて皮膚への痒み刺激により誘起される興奮性応答を詳細に解析した。その結果、皮膚へのセロトニン(5-HT)投与によって、末梢で発生した活動電位が脊髄の表層及び大脳皮質の細胞にシナプス入力し興奮性応答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 central nervous system remains unclear. The present study was designed to analyze pruritic synaptic responses evoked in spinal dorsal horn and cortex neurons of rodents by using an in vivo whole-cell patch-clamp and extracellular recording technique. The present main finding is that subpopulation of spinal dorsal horn and cortex neurons are responsible for pruritic cutaneous 5-HT stimulation.

研究分野：神経生理学

キーワード：痒み 脊髄後角 in vivoパッチクランプ 5-HT 痛み 大脳皮質 シナプス伝達 中枢神経

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、痛みに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、脊髄や脳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、さらに上位中枢である脳領域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に対し痒みの情報伝達に關与すると報告されている受容体阻害薬を投与した際の効果を解析する。更に、脳への投射部位を明らかにするために皮膚への痒み刺激による c-Fos 発現部位を解析し、その領域から in vivo 記録を試みる。併せて、記録細胞の染色を行い形態組織学的な解析も行い痒みニューロンの特徴をより詳しく解析し、痒み中枢の基盤となる神経回路の同定と情報処理機構の全容を明らかにする事とした。

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、自然科学研究機構及び富山大学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機関及び富山大学動物実験委員会により承認を受けた後に開始した。又、実験動物に苦痛を与えないよう十分注意を払った。

(1) 皮膚への痒み刺激による中枢における応答部位の特定

成熟雄性 Sprague-Dawley 系ラットを使用し、皮膚への痒み物質 (セロトニン ; 5-HT) 投与による脊髄後角での c-Fos 発現部位の解析を行う。次いで、c-Fos 陽性ニューロンが脳のどの部位に局在しているか解析を行う。更に皮膚へのカプサイシン投与も行い、痒みと痛みの中核応答部位を比較する。

(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。更に、痒み特異的受容体として報告されている GRP 受容体の阻害薬や興奮性情報伝達物質であるグルタミン酸の受容体阻害薬を投与し痒み情報伝達に關与する神経伝達物質や受容体の解析を行う。

(3) 脳からの in vivo 記録法を用いた皮膚への痒み刺激誘起の応答解析

ラットをウレタンで麻酔し脳定位固定装置にセットし、皮膚への痒み物質投与により c-Fos 陽性ニューロンが見られた脳部位からの in vivo 記録を行う。

(4) 痒みニューロンの形態組織学的解析

In vivo パッチクランプ記録法により脊髄後角から記録した痒み応答ニューロンを染色し、その形態や軸索投射部位を解析する。

4. 研究成果

(1) 皮膚への痒み刺激による中枢における応答部位の特定

ラット下肢皮膚への痒み物質投与による脊髄後角及び脳での c-Fos 発現部位の解析を行った。その結果、L4-6 脊髄後角表層部において c-Fos 陽性ニューロンの局在が見られた。この結果は以前我々が行った電気生理学的解析から得られた結果やマウスでの報告とも位置していた。更に脳では、視床、大脳皮質において c-Fos 陽性ニューロンの局在が見られた。現在更に詳しい部位を解析中である。

(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

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、受容野に対し痒み物質を投与し、自発性 EPSC に対するこれらの影響を観察した。これまでの申請者の研究で約 3 割の脊髄後角細胞で皮膚への痒み物質投与により EPSC の長時間にわたる増強効果が見られ、痒み刺激応答細胞は非応答細胞に比べ有意に浅い層に局在していることを明らかにした。本研究では、痒み刺激応答細胞と非応答細胞の特徴を調べるために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。その結果、痒み刺激応答細胞では 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。次いで、痒み情報伝達にかかわる末梢神経を同定する実験を行ったところ、痒み刺激応答細胞にはある種の TRP チャネル発現線維が密に入力していること

が明らかとなった。更に、近年痒み特異的受容体として報告されている受容体の阻害薬を脊髄表層に灌流投与し、皮膚への痒み刺激により誘起される活動電位に対する影響を調べた。その結果、若干の抑制は見られたが有意な差は見られなかった。一方で AMPA 受容体阻害薬では活動電位の発生が完全に抑制された。

(3) 脳からの in vivo 録法を用いた皮膚への痒み刺激誘起の応答解析

脊髄から脳への痒み情報伝達回路同定の為、皮膚への痒み物質投与により c-Fos 陽性ニューロンが見られた脳部位からの in vivo 記録を試みた。本研究では c-Fos 陽性ニューロンが見られた大脳皮質で記録を試みたが皮膚への痒み刺激誘起の応答を十分な例数集めることが出来なかったが数例で皮膚への痒み刺激誘起の応答により活動電位が増加するものが見られた。今後より詳細なシナプス応答の解析を試みる予定である。

(4) 痒みニューロンの形態組織学的解析

In vivo パッチクランプ記録法を用いて脊髄後角から記録した痒みニューロンの形態染色を行った。その結果、痒みニューロンの細胞体は脊髄浅層に多く局在していた。この結果は c-Fos 陽性細胞の局在と一致していた。痒みニューロンの軸索投射などの解析を行っているが個々の差が大きくきれいに分類するには至らなかったため現在より詳細な解析を行っている。

(5) まとめ

本研究において、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。痒み情報を伝える線維にはある種の TRP チャンネルが発現し、神経伝達物質は主にグルタミン酸が担っていることが明らかとなった。更に痒み応答細胞は delayed firing, sustained repetitive firing を示す傾向が見られた。脳領域では視床や、大脳皮質などで痒み刺激による c-Fos 陽性細胞の局在が見られ、大脳皮質からの in vivo 記録も行い数例で痒み刺激による応答を取ること成功した。これら脊髄や脳領域におけるシナプス応答の詳細な報告は現在までになく、今後中枢における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)

Uta D, Yoshimura M, Imoto K and Furue H., Firing pattern of substantia

gelatinosa neurons receiving TRPA1-expressing afferents in rat spinal cord., The Journal of Functional Diagnosis of the Spinal Cord, 査読有, 35(1):3-9, 2014

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, 査読有, 9(8):e103321, 2014, DOI : 10.1371/journal.pone.0103321

Funai Y, Pickering AE, Uta D, Nishikawa K, Mori T, Asada A, Imoto K, Furue H., Systemic dexmedetomidine augments inhibitory synaptic transmission in the superficial dorsal horn through activation of descending noradrenergic control: An in vivo patch-clamp analysis of analgesic mechanisms., Pain, 査読有, 155(3):617-28, 2014, DOI : 10.1016/j.pain.2013.12.018

Akimoto N, Honda K, Uta D, Beppu K, Ushijima Y, Matsuzaki Y, Nakashima S, Kido MA, Imoto K, Takano Y, Noda M., CCL-1 in the spinal cord contributes to neuropathic pain induced by nerve injury., Cell Death Disease, 査読有, 4:e679, 2013, DOI : 10.1038/cddis.2013.198

[学会発表](計34件)

Uta D, Imoto K and Furue H., Selective excitatory effect of TRPA1 agonists on synaptic transmission in superficial spinal dorsal horn neurons of the adult rat., The 88th Annual Meeting of the Japan Pharmacological Society, 2015年3月20日, 名古屋国際会議場(愛知県)

歌 大介, 吉村 恵, 井本 敬二, 古江 秀昌., 成熟ラット脊髄後角膠様質ニューロンへの後根刺激誘起のシナプス伝達に対する TRPA1 作動薬の応答., 第36回脊髄機能診断研究会 2015年2月7日, イイノホール&カンファレンスセンター(東京都)

歌 大介., In vivo パッチクランプ法をもちいた成熟ラット脊髄後角における痒み情報伝達機構の解析. 脊髄運動・感覚統合研究会, 2015年1月9日, 熊本保健科学大学(熊本県)

Takayama Y, Uta D, Furue H and Tominaga M., A pain-enhancing mechanism through TRPV1-AN01 interaction, and its inhibition effect by drag., The 41th Annual Meeting of the Society for Neuroscience., 2014年11月16日,

Washington D.C. (USA)
Uta D, Andoh T, Kuraishi Y, Imoto K and Furue H., In vivo spinal excitatory synaptic responses and scratching behaviors evoked by cutaneous 5-HT application., The 24th International Symposium of Itch., 2014 年 10 月 18 日, Belle Salle Jimbocho (Tokyo)
Uta D, Andoh T, Kuraishi Y, Imoto K and Furue H., Electrophysiological analysis of spinal dorsal horn neurons receiving pruriceptive afferents in the adult rat spinal cord., The 37th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2014 年 9 月 12 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
Akimoto N, Uta D, Honda K, Takano Y, Imoto K, Noda M and Furue H., Action of Chemokine (C-C motif) ligand 1 on synaptic transmission in the spinal superficial dorsal horn., 2014 NIPS-KU/YU Symposium, 2014 年 7 月 2 日, Okazaki Conference center (Aichi)
Uta D, Imoto K and Furue H., Effect of TRPA1 and TRPV1 agonists on synaptic transmission evoked in morphologically distinct cell types in the substantia gelatinosa of the adult rat spinal cord., 第 36 回日本疼痛学会, 2014 年 6 月 20 日,
Uta D, Andoh T, Kuraishi Y, Imoto K and Furue H., Firing pattern of spinal dorsal horn neurons receiving pruriceptive afferents in the adult rat spinal cord., The 91th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2014 年 3 月 18 日, 鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島県)
歌 大介, In vivo パッチクランプ法による感覚シナプス伝達機構の解析., 第 3 回新潟脳研 生理研合同シンポジウム, 2014 年 2 月 25 日, 岡崎カンファレンスセンター (愛知県)
歌 大介, 吉村 恵, 井本 敬二, 古江 秀昌., TRPA1 発現線維が入力するラット脊髄後角膠様質細胞の発火パターン解析., 第 35 回脊髄機能診断研究会, 2014 年 2 月 1 日, 東京商工会議所ビル国際会議場 (東京都)
Uta D, Imoto K and Furue H., Firing pattern and morphological analysis of substantia gelatinosa neurons receiving TRPA1-expressing afferent fibers in adult rat spinal dorsal horn., The 5th Asian Pain Symposium, 2013 年 12 月 18 日, Okazaki Conference center (Aichi)
Akimoto N, Uta D, Honda K, Takano Y, Imoto K, Noda M and Furue H., Effect of Chemokine (C-C motif) Ligand 1 on

Synaptic Transmission in the Spinal Dorsal Horn., The 5th Asian Pain Symposium, 2013 年 12 月 18 日, Okazaki Conference center (Aichi)

歌 大介, In vivo パッチクランプ法を用いた脊髄後角における痒み情報伝達機構の解析., 日本薬学会北陸支部特別講演会, 2013 年 12 月 11 日, 富山大学薬学部 (富山県)

Uta D, Andoh T, Kuraishi Y, Imoto K and Furue H., In vivo patch-clamp recording analysis of excitatory synaptic transmission in the adult rat spinal dorsal horn evoked by cutaneous application of a pruritogen., The 23th International Symposium of Itch, 2013 年 10 月 26 日, Senri Life Science center (Tokyo)

Noda M, Akimoto N, Honda K, Uta D, Furue H, Kido M, Imoto K, Takano Y., A new target in the treatment for neuropathic pain induced by nerve injury., The 11th Korea-Japan Joint Symposium of Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscle Sciences, 2013 年 8 月 5 日, Act City Hamamatsu Congress center (Shizuoka)

Uta D, Imoto K and Furue H., In vivo patch-clamp analysis of local anesthetic actions on synaptic transmission to the adult rat spinal dorsal horn., 第 35 回日本疼痛学会, 2013 年 7 月 12 日, 大宮ソニックシティ (埼玉県)

Uta D, Andoh T, Kuraishi Y, Imoto K and Furue H., Firing pattern of spinal dorsal horn neurons receiving prurigen serotonin-responsive afferents in the rat spinal cord., The 36rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2013 年 6 月 21 日, 国立京都国際会議場 (京都府)

歌 大介, 秋元 望, 井本 敬二, 古江 秀昌., In vivo パッチクランプ記録法を用いた脊髄後角における痒み情報伝達の解析., 第 15 回ブレインサイエンス研究会, 2013 年 6 月 2 日, 休暇村志賀島 (福岡県)

〔図書〕(計 1 件)

古江 秀昌, 歌 大介, 秋元 望., 脊髄における侵害受容機構 (Neuronal mechanisms of spinal nociception)., 月刊ファインケミカル 43(1):17-21, 2014

〔その他〕

ホームページ等

生理学研究所生体情報研究系神経シグナル研究部門ホームページ:

<http://www.nips.ac.jp/huinfo/>
富山大学大学院医学薬学研究部(薬学)
応用薬理学教室ホームページ：
<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/phapha2/Japanese/frame.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

歌 大介 (UTA DAISUKE)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・
助教

研究者番号：70598416