

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460705

研究課題名(和文) 痒み神経機構の生後発達におけるドーパミン神経系の役割解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of dopaminergic neural systems in the development of neural mechanisms of itch

研究代表者

緒形 雅則 (OGATA, MASANORI)

北里大学・医療衛生学部・講師

研究者番号：20194425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：幼若期ドーパミン(DA)神経系傷害が痒み神経機構の発達に及ぼす影響について行動学的、組織学的、電気生理学的手法を用いて検討した。その結果、幼若期DA神経系傷害が成熟後のセロトニン(5-HT)投与による痒み関連行動の減少をもたらすことが確認された。一方、5-HTの痒み関連行動誘発閾値には差はなかった。組織学的解析では、5-HT投与に反応する脊髄細胞は後角の表層に多く認められ、その反応細胞数は2群間で有意な差はなかった。電気生理学的解析でも、脊髄後角細胞の5-HT反応性に2群間で顕著な差は見られなかった。

以上の結果より、幼若期DA神経系傷害は痒み関連行動の発達に影響を与えることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to clarify the effects of neonatal dopamine (DA) depletion on itch-related responses during the adulthood using behavioral, histological and electrophysiological methods. Serotonin (5-HT) was injected into middle plantar region of the hind paw, as an itch-inducing substance. The results indicated that neonatal DA depletion caused significant decrease in number of itch-related behavior during the adulthood, but no change in threshold of 5-HT for the inducing itch-related behavior. In the histological and electrophysiological analyses, the spinal neurons that responded to the 5-HT injected into the hind paw were located in the superficial layer (laminae I-II), and the neonatal DA depletion did not affect the responsibility to the 5-HT in the spinal neurons. These results indicated that dopaminergic neural system play a crucial part in development of mechanism for itch sensation.

研究分野：神経科学

キーワード：幼若期ドーパミン神経系傷害 痒み感覚 体性感覚系の発達

1. 研究開始当初の背景

痒みは、掻きたいという強い願望や引っ掻き反射をとまなう不快な皮膚感覚である。痒覚は痛覚の弱いものでなく、現在は、両感覚は明らかに独立した感覚とされている。痒みを伝える脊髄後根神経節ニューロンが、ガストリン放出ペプチドを持ち、その受容体を欠損した動物が痛覚関連行動に変化はなく、痒み関連行動のみが抑制されることや¹⁾、fMRIを用いた研究により、痛み刺激と痒み刺激では大脳皮質での刺激-反応様式が異なることが報告されている²⁾。DA神経系の痒覚への関与として、Meraliらは、ドーパミンD1受容体(D1R)の阻害やドーパミンD2受容体(D2R)の活性化が痒み関連行動を抑制することを示している³⁾。また最近、Akimoto等は、誘痒物質投与による視床下部の異常興奮がD1R阻害剤により抑制されることを組織学的解析により示している⁴⁾。また他の神経系の関与として、脊髄後角でのノルアドレナリン(NA)神経系の下行性抑制やオピオイド系による痒み関連行動の亢進が報告されている^{5,6)}。

一方ドーパミン(DA)神経系は、幼若期の低酸素や母子分離などの各種ストレスの影響を受けやすい。またDA神経系傷害は、この傷害を受ける時期により個体行動に及ぼす影響が異なる。成熟後のDA神経系傷害は運動量低下や不安関連行動の増加を引き起こすことや、機械刺激、熱刺激、化学的刺激に対する痛覚過敏反応を誘発することが既に報告されている。最近私達は、幼若期のDA神経系傷害は反対に自発運動量増加と抗不安関連行動の増加(不安行動の減少)を示すこと、さらに痛覚過敏は化学的刺激による炎症性疼痛に対してのみ観察されることを初めて報告した⁷⁾。そしてこれらの背景には、幼若期DA神経系傷害にともなう線条体でのセロトニン(5-HT)量の増加⁸⁾や、線条体でのGABA輸送体の発現減少等の報告⁹⁾があるように、DA神経系傷害に対する他の神経系による機能的補償や他の神経系の発達異常の可能性が示唆される。このような背景の下、私は幼若期DA神経系傷害が、持続性の強い刺激(閾上刺激)に対して過剰な反応を誘発する可能性があると考え本研究の立案に至った。

2. 研究の目的

本研究では、幼若期DA神経系傷害の成熟後の痒覚機構への影響を解明するために、行動学的解析により、痒み誘発刺激の強度(5-HT投与量)と誘発される痒み関連行動との関係を明確にする。免疫組織学的解析により、誘痒物質投与による初期応答遺伝子蛋白(c-Fos)の中樞神経系内の発現を調べ、痒覚関連領域を明確にし、痛覚関連領域との相違を示す。また幼若期DA神経系傷害にともなう脳内のグリアの活性化の有無を明らかにする。電気生理学的解析では、幼若期DA

神経系傷害動物の脊髄における体性感覚入力に対する反応性並びに痒覚入力機構の変調について明確にする。本研究では以上3つの内容を解明し、幼若期DA神経系傷害の痒覚神経機構発達に対する影響を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 幼若期DA神経系傷害動物の作製

冷却麻酔下にて、小型頭部定位固定装置を用い生後4日目の雄ラットの両側の側脳室に6-hydroxydopamine (6-OHDA)を一側に対し50 μ g/5 μ l注入し、ドーパミン神経系を傷害した。また6-OHDAの毒性からNA神経系を保護する目的で、腹腔内に塩酸デジプラミン(25mg/kg)を6-OHDA注入30分前に投与した。全処置終了後、麻酔回復までの時間は体温維持システム下で動物を管理した後に、母ラットケージ内に処置仔ラットを戻した。また同腹の仔ラットを用いて対照群(vehicle:0.1%アスコルビン酸含有生理食塩水処置群)も作製した。

(2) 5-HT投与による痒み関連行動の解析

実験者の動物への接触による行動試験結果への影響を減ずるために、生後8週目より動物に対しハンドリングを行った。動物は行動試験開始30分以上前に飼育部屋から行動解析室へ移動し、環境に適應させた後に行動試験は行った。

動物が実験環境に適應したのを確認後、右後肢足底に生理食塩水に溶かした5-HTを皮内投与した。5-HT濃度は0.01%、0.05%、0.1%、1.0%の4種類を用いた。生理食塩水のみを注入した対照群も作製した。5-HT投与後、75分間、痒み関連行動の観察を行うとともに、動物の行動をビデオカメラで撮影・記録し、Off-Lineでの行動解析を可能にした。5-HT注入により誘発される行動の指標として、5-HT注入付近の皮膚を素早くかむ行動(Biting)と5-HT注入側の後肢を素早く動かす行動(Flinch)を解析した。Bitingは行っている時間を、Flinchはその回数を数値化して結果に用いた。また、グラフ化して比較する際は、75分間のBiting総時間とFlinch総数を、さらに経時的な変化として5分毎のBiting時間とFlinch数を両群間で比較した。

また比較として成熟後に片側DA神経系を破壊した動物を作製し、1.0%5-HT投与による痒み関連行動への影響を検討した。

(3) 組織学的解析

灌流固定および凍結切片の作製

行動実験終了後、ウレタン(25%、1.4g/kg)をラットの腹腔内に投与し、深麻酔下にて灌流固定を行った。初めにヘパリン入り生理食塩水200ml、続いて4%パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝液(pH7.4)400mlを経口的に灌流し、組織の固定を行った。断頭後、脳と脊髄を摘出し、前記と同様の固定液を用

いて4で一晚、後固定を行った。その後30%スクロース液に置き換え、脳が沈むまで浸した。c-Fos 免疫陽性細胞数の解析実験では、5-HT 注入 2 時間後に前記の灌流操作を行った。

また幼若期 DA 神経系傷害にともなうミクログリアの活性化確認の際は、6-OHDA 処置後 2 週間、3 週間、4 週間目に上記灌流処置を行った。

灌流固定後の脳並びに脊髄を用いマイクロトームにより厚さ 40 μ m の凍結切片を作製し免疫組織化学染色に用いた。

免疫組織化学染色

チロシン水酸化酵素(TH)に対する抗体を用いて、DA 神経系並びに NA 神経系の傷害を確認した。0.1M リン酸緩衝液ナトリウム溶液(PBS)を用い、切片を洗浄後、0.3% H₂O₂ 溶液により内因性ペルオキシダーゼ活性の阻害を行った。4% 正常ウマ血清と 0.25% Triton-X を含む 0.1M PBS を用い室温で 1 時間反応させ、非特異的な反応を阻害した。2% 正常ウマ血清、0.1% Triton-X、モノクローナル TH 抗体(MILLIPORE, 1:2000)を含む 0.1M PBS を用い、4 で 24 時間、一次抗体反応を行った。ビオチン標識された Anti-mouse IgG (Vector, 1:400)、2% 正常ウマ血清、0.1% Triton-X を含む 0.1M PBS を用い、室温で 1 時間、二次抗体反応を行った。その後、アビジン ビオチンコンプレックス複合体溶液 (Vector)を用い、室温で 1 時間反応させ増感反応を行った。0.1M PBS で洗浄後、0.05% ジアミノベンチジンと H₂O₂ の混合溶液で発色反応させ、TH 陽性細胞を可視化させた。

また細胞の興奮性の指標として初期応答遺伝子のタンパク質である c-Fos を用い、その抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。一次抗体にはポリクローナル c-Fos 抗体 (Calbiochem 1:20000)を用い、正常血清として正常ヤギ血清を使用した。二次抗体には Anti-Rabbit IgG (Vector, 1:200)を用い、その他の操作は TH 抗体による染色法と同様に行った。

ミクログリアの活性化確認に際しては、一次抗体にはポリクローナル抗体の IBa1(和光, 1:4000)とモノクローナル抗体の CD68(AbD Serotec, 1:400)の両方を用いて確認をした。IBa1 はミクログリアの特異抗体として用い、形態変化を確認した。CD68 はミクログリアの活性化マーカーとして用いた。二次抗体以降の操作は、IBa1 は c-Fos 染色と、CD68 は TH 染色と同様な操作にて染色を行った。

c-Fos 免疫反応陽性細胞数の計測

脊髄後角における c-Fos 陽性細胞数の算出は、各個体の脊髄からの 120 μ m 間隔の連続切片を用い行った。最初に 40 倍の光学顕微鏡下にて第 5 腰髄(L5)分節を選び、さらに染色性の良いものを 10 切片選出した。その後、

選出した 10 切片の c-Fos 陽性細胞数の算出を 100 倍の光学顕微鏡下にて画像解析ソフト (Olympus, cellsense Dimension)を用いて行った。得られた 10 切片の c-Fos 陽性細胞数の多いもの 4 切片を用い、平均を求め各個体の c-Fos 陽性細胞数とした。

(4) 電気生理学的解析

ウレタン麻醉下の動物を脊髄・脳固定装置に固定した。動物の腰膨大部を露出し、硬膜・くも膜・軟膜を処理した後に、タングステン電極を用いて脊髄後角からニューロン活動の細胞外導出を行った。また脊髄表面を 37 に加温し酸素負荷した Krebs 液により灌流した。

ニューロン活動を導出後、末梢受容野を確認した。機械刺激に対する反応性を調べるために von-Frey Filaments(vFF, 1.4g, 4.0g, 8.0g, 15.0g, 60.0g)を用い末梢受容野に刺激を与え反応を記録した。自発発火を 30 分以上記録した後、生理食塩水 (50 μ l) を末梢受容野に投与して 90 分間反応を確認した。その後、0.1% 5-HT (50 μ l) を投与し 90 分間反応を記録した。得られたニューロン活動は、データ解析ソフト (Molecular Devices, pClamp 10.2)にて記録および解析を行った。

(5) 統計学的解析

得られた全ての結果は、平均 \pm 標準誤差で表した。統計解析は GraphPad Prism6.07 windows 版(GraphPad, USA)を用い、棄却率を 5%未満として行った。また 2 群間の比較には *t* 検定を、3 群間以上の比較には、一元又は二元配置の分散分析法を用い、必要に応じてその後、多重比較 (Tukey's test or Bonferroni's test) を行った。

4. 研究成果

(1)本研究により得られた主な実験結果

TH 抗体を用いた免疫組織化学染色による DA 神経系傷害の確認

図 1 に TH 免疫染色の典型例を示す。幼若期の 6-OHDA と塩酸デジプラミンの両処置により、中脳の黒質と腹側被蓋野の TH 陽性細胞はほぼ完全に消失していた。一方、橋の青斑核では Vehicle 群、6-OHDA 群で、TH 免疫陽性反応に違いはみられなかった。このことは、本研究で作製した 6-OHDA 処置動物は DA 神経系が特異的に傷害されており、

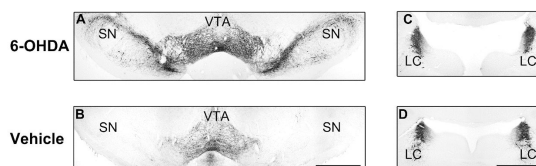


図 1 TH 免疫染色の典型例

A と C は 6-OHDA 群を、B と D は Vehicle 群を示す。A と B は黒質(SN)と腹側被蓋野(VTA)を、C と D は青斑核(LC)を示す。スケールバーは 1000 μ m である。

NA神経系は6-OHDA処置の影響を受けていないことを示している。

痒み関連行動の解析

図2に0.05%、0.1%、1.0%の5-HTを後肢足底に投与した際のBiting時間に関する解析結果を示す。Vehicle群では、5-HT投与後10分にBiting数は最大となり、その後、経時的に減少し、5-HT投与後約60分でBitingはほぼ消失している(図2-A)。一方、6-OHDA群では75分間の全観察期間においてBitingが顕著に出現する時間帯はなく、全期間を通してわずかに出現するだけである(図2-A)。75分間の全Biting出現時間を2群間で比較すると、全ての5-HT濃度において6-OHDA群でBiting出現時間の有意な減少が観察された(図2-B、C、D、全て $p < 0.01$)。また、Vehicle群では、1.0% 5-HT投与によるBiting時間が0.05%並びに0.1% 5-HT投与によるBiting時間より有意に増加していたが($p < 0.05$)、6-OHDA群では、5-HT濃度の増加にともなうBiting時間の変化は認められなかった。

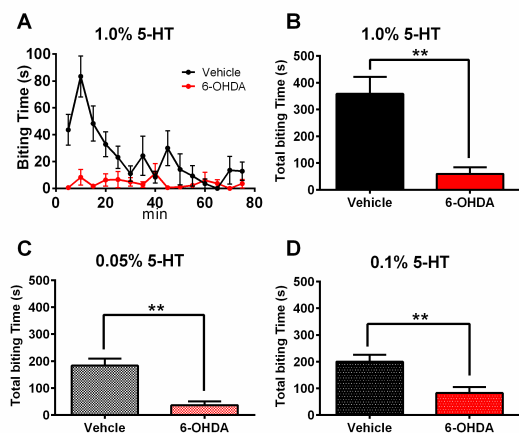


図2 5-HT投与によるBiting時間の比較

AとBは1.0% 5-HT投与の結果を、CとDはそれぞれ0.05%と0.1%の5-HT投与の結果を示す。またAは5分毎の経時変化を、B、C、Dは75分間の全Biting時間を比較したものである。

** $p < 0.01$ 。

図3に0.05%、0.1%、1.0%の5-HTを後肢足底に投与した際のFlinch数に関する解析結果を示す。Vehicle群、6-OHDA群共に5-HT投与直後に最大値を示し、その後経時的に減少し、投与後約70分で両群ともFlinchは消失している(図3-A)。また75分間の全Flinch数を2群間で比較すると、0.05%、0.1%の5-HT投与では2群間に有意な差は認められなかった(図3-C、D)。しかし1.0% 5-HT投与では、6-OHDA群でFlinch数の有意な増加が観察されている(図3-B、 $p < 0.05$)。さらに両群とも1.0% 5-HT投与によるFlinch数は、0.05%、0.1% 5-HT投与によるFlinchよりも有意に増加していた($p < 0.01$)。

0.01% 5-HT投与による痒み関連行動はBiting、Flinchともに両群で観察されなかった。

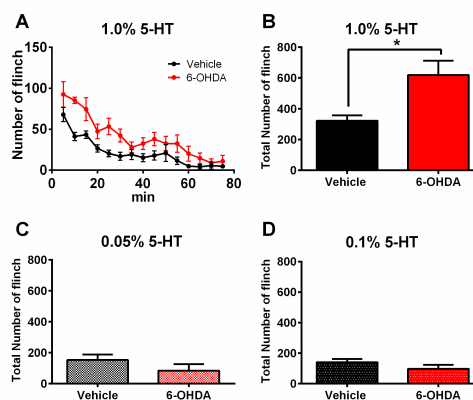


図3 5-HT投与によるFlinch数の比較

AとBは1.0% 5-HT投与の結果を、CとDはそれぞれ0.05%と0.1%の5-HT投与の結果を示す。またAは5分毎の経時変化を、B、C、Dは75分間の全Flinch数を比較したものである。* $p < 0.05$ 。

また成熟後にDA神経系を破壊した動物に対して1.0% 5-HT投与を行い誘発行動の出現頻度を幼若期破壊動物と比較した。その結果、全Biting時間はVehicle群で 358.4 ± 63.6 秒、幼若期6-OHDAでは 59.7 ± 24.1 秒、成熟後6-OHDA群では 216.5 ± 42.3 秒であり、成熟後6-OHDA群において顕著なBiting時間の減少は認められなかった。Flinch数は、Vehicle群で 322.7 ± 35.4 回、幼若期6-OHDAでは 619.3 ± 92.7 回、成熟後6-OHDA群では 367.8 ± 76.3 回であり、成熟後6-OHDA群において顕著なFlinch数の増加は認められなかった。

組織学的解析

ニューロンの興奮マーカーとしてc-Fosの発現を指標とし、後肢足底への5-HT投与にともなう脊髄後角ニューロンの興奮性を検討した。図4にc-Fos発現の典型例とc-Fos

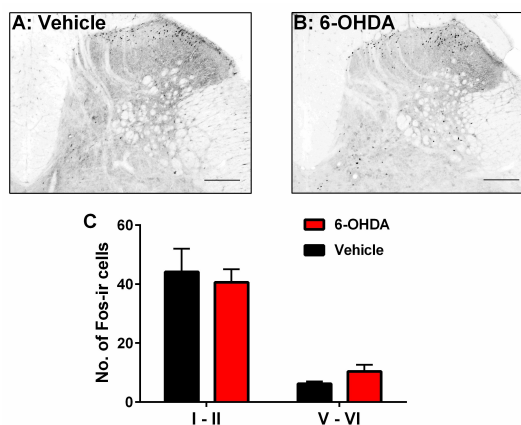


図4 1.0% 5-HT投与による脊髄後角におけるc-Fos発現

AはVehicle群の、Bは6-OHDA群の典型例を示す。Cは脊髄後角におけるc-Fos発現数の比較を示す。スケールバーは200 μ mである。

発現数の定量的解析結果を示す。その結果、Vehicle 群、6-OHDA 群共に c-Fos 陽性細胞は脊髄表層の 1 層に多く認められた。また深層の 2 層には両群ともわずかな c-Fos 陽性細胞しか認められず、一般的な痛み刺激(ホルマリンなど)による c-Fos 陽性細胞の発現様式とは明らかに異なっていた(図 4-A, B)。また c-Fos 陽性細胞の発現数は脊髄表層、深層ともに両群間に有意な差は認められなかった(図 4-C)。

幼若期の 6-OHDA 処置にともなうミクログリアの脳内における活性化を Iba1 抗体と CD68 抗体を用いて検討した。その結果、6-OHDA 処置 3 週間後にミクログリアの活性化が中脳の黒質と腹側被蓋野で観察されたが、Vehicle 群ではミクログリアの活性化は確認されなかった。

電気生理学的解析

初めに、幼若期 DA 神経系傷害が脊髄後角ニューロンの機械刺激に対する反応性に及ぼす影響を検討した。図 5 は vFF に対する反応の典型例と両群の発火頻度の定量的解析結果を示す。両群ともに刺激強度の増強により発火頻度が増加したが、2 群間に有意な差は認められなかった。

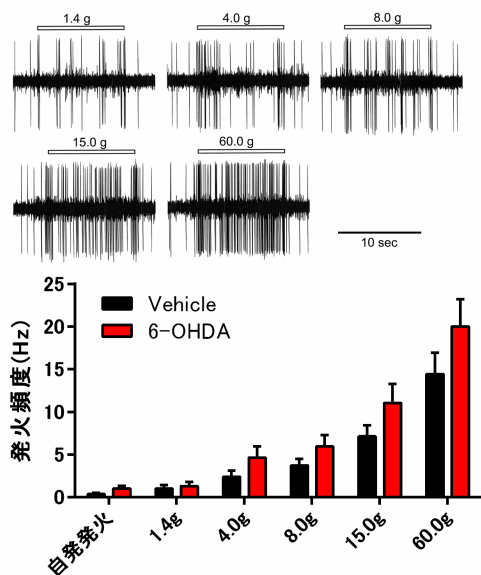


図 5 受容野への機械刺激に対する反応性の比較

上段は vFF による刺激に対する反応の典型例を、下段は 2 群間の反応性を定量的に解析したグラフである。

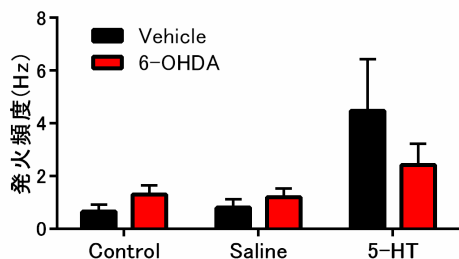


図 6 0.1% 5-HT 投与に対する反応性

次に 0.1% 5-HT 投与に対する脊髄後角ニューロンの反応性を調べた結果、Vehicle 群では 14 個のニューロン中 4 個のニューロンが、6-OHDA 群では 11 個のニューロン中 2 個のニューロンが 0.1% 5-HT に応答し、6-OHDA 群で少ない傾向が見られた。さらにその発火頻度を比較すると、Vehicle 群では 0.1% 5-HT 投与により顕著な発火数の増加がみられたが、6-OHDA 群で発火の増加が不明確であった(図 6)。

(2) 本研究成果の国内外における位置づけ

今回の研究成果より、幼若期 DA 神経系傷害が成熟後の痒み関連行動の減少を引き起こすことが明らかとなった。さらにその痒み関連行動の減少は、閾値の上昇によるものではなく、閾上刺激における反応性の変化であることが明らかとなった。そして組織学的、電気生理学的解析から、脊髄後角における痒覚誘発反応に顕著な影響が観察されていないことから、痒み関連行動の減少には脊髄上位の中枢神経系の関与が強いと考えられる。また本研究開始時には、幼若期 DA 神経系傷害が痒み過敏を引き起こすのではないかと予想していたが、反対に行動反応の減少という結果を得た。国内外においても、幼若期の DA 神経系傷害が痒覚神経機構の発達に影響を及ぼすことを示した報告はなく、本研究が最初の研究である。またその幼若期 DA 神経系傷害の影響が痛覚系と異なり行動反応の低下であることは、とても興味深いことである。また脊髄上位での変調が示唆されたが、近年、視床下部での DA 神経系の痒覚への関与が報告されている⁴⁾ことは、本研究を進めていく上で重要な報告である。

(3) 今後の展望

本研究成果により、幼若期 DA 神経系傷害が痒覚神経機構の発達に影響を与えることが明らかとなった。しかしその機序解明には更なる研究が必須である。脊髄レベルでは例数を増やし確実な変化をとらえるとともに、より詳細な細胞・分子レベルでの解析が要求される。また上記のごとく、脊髄上位での DA 神経系の痒覚神経機構への関与も知られていることより、脳幹、視床、大脳皮質に対する解析へと進む必要がある。本研究成果により、痒覚と痛覚の神経機構が異なることが明確となったが、その詳細をとらえることは両感覚異常に対する新薬の開発の一助となりうる。

< 引用文献 >

Sun YG, Chen ZF, A gastrin-releasing peptide receptor mediates the itch sensation in the spinal cord, *Nature*, 488, 2007, 700-703

Mochizuki H, et al, Imaging of central itch modulation in the human brain using positron emission tomography, *Pain*, 105,

2003, 339-346

Merali Z, Piggins H, Effects of dopamine D1 and D2 receptor agonists and antagonists on bombesin-induced behaviors, *Eur J Pharmacol*, 191, 1990, 281-293

Akimoto Y, Furuse M, SCH23390, a dopamine D1 receptor antagonist, suppressed scratching behavior induced by compound 48/80 in mice, *Eur J Pharmacol*, 670, 2011, 162-167

Gotoh Y, et al, Noradrenergic regulation of itch transmission in the spinal cord mediated by α -adrenoceptors, *Neuropharmacol*, 61, 2011, 825-831

Kuraishi Y et al, Intracisternal, but not intrathecal, injection of naloxone inhibits cutaneous itch-related response in mice, *Biol Pharm Bull*, 31, 2008, 2143-2145

Ogata M, et al, Nociceptive behavioral responses to mechanical, thermal and chemical stimulation in the adulthood of rats with neonatal dopamine depletion, *J Physiol Sci*, 63, Supplement 1, 2013, S205

Avale ME, et al, Elevated serotonin is involved in hyperactivity but not in the paradoxical effect of amphetamine in mice neonatally lesioned with 6-hydroxydopamine, *J Neurosci Res*, 78 2004, 289-296

Masuo Y, et al, Motor activity and gene expression in rats with neonatal 6-hydroxydopamine lesions, *J Neurochem*, 91, 2004, 9-19

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計4件)

緒形雅則、幼若期ドーパミン欠損ラットの発育並びに運動制御に関する特性、第95回日本生理学会大会、2018/03/29、サンポート高松・かがわ国際会議場(香川県高松市)

Ogata Masanori、Itch-related behavior and spinal c-Fos expression induced by 5-hydroxytryptamine in adolescent rats with neonatal dopamine depletion. 16th World Congress on Pain(第16回国際疼痛学会)、2016/9/27、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Ogata Masanori、Effects of neonatal dopamine depletion on anxiety-related behaviors and c-Fos expression in the dorsal raphe nucleus in adult rats. 北米神経科学会、2015/10/18、McCormick Place(米国、シカゴ)

緒形雅則、幼若期ドーパミン神経系傷害が成熟後の痒み並びに痛み関連反応におよぼす影響、第92回日本生理学会大会、2015/3/23、神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

緒形 雅則 (Ogata Masanori)
北里大学・医療衛生学部・講師
研究者番号：20194425

(2)研究分担者

石橋 仁 (Ishibashi Hitoshi)
北里大学・医療衛生学部・教授
研究者番号：50311874

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

(3)連携研究者

野田 和子 (Noda Kazuko)
北里大学・医療衛生学部・講師
研究者番号：60050704