

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860391

研究課題名(和文)疼痛性サイトカインが及ぼす中枢性内臓機能異常の解明 - in vivoパッチ解析 -

研究課題名(英文) In vivo patch-clamp analysis of central cytokine action on visceral functions

## 研究代表者

秋元 望 (AKIMOTO, Nozomi)

生理学研究所・生体情報研究系・特別協力研究員

研究者番号：60723905

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、慢性疼痛の一つである神経障害性疼痛の発現時にみられる炎症性サイトカインが内臓、特に下部尿路の自律神経制御に与える影響について調べることを目的として行われた。炎症性サイトカインを脊髄に灌流投与を行ったところ、頻尿を誘発するサイトカインと、排尿間隔を広げるものがあることがわかった。また、下部尿路から脊髄への伝達では膀胱と尿道のそれぞれから別々の神経を介して情報が伝達されることがわかった。これらの結果から、下部尿路から脊髄へ入力された圧変化や知覚の情報は複数の種類の細胞に伝達され、これらの細胞にサイトカインが作用し、排尿に影響を与えることがこれまでの研究によって示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cytokines (TNF-alpha, IL-1 beta and CCL-1) are known to be involved in the development of neuropathic pain. However effects of the cytokines on spino-bulbospinal micturition reflex circuit remain unclear. Application of IL-1 beta and CCL-1 to the spinal cord decreased inter-contraction interval. On the contrary, application of TNF-alpha increased it. Furthermore, we showed that efferent signal to bladder and urethra was transmitted from the same autonomic nucleus. However, afferent information from these organs was transmitted to the spinal cord by different afferent neurons. These data indicated that sensory afferent information such as pressure and chemicals from the lower urinary tract was separately transmitted to distinct neuronal populations in the spinal dorsal horn, and cytokines in the spinal cord control micturition reflex.

研究分野：神経生理

キーワード：サイトカイン 排尿 神経障害性疼痛 下部尿路

## 1. 研究開始当初の背景

サイトカインが中枢神経系に及ぼす影響は最近国内外の多くの研究者に注目されており、広く情報伝達機構に変調を来すことが明らかにされている。申請者は、本来障害部位局所で免疫・炎症や細胞の増殖・分化に関与するサイトカインが、痛みの中枢への入り口である脊髄にも作用し、最終的に興奮性シナプス伝達に変調を来すこと、この可塑的变化がアロディニアなどの疼痛発現に極めて重要な役割を果たすことを報告した。一方で、内臓機能は自律神経系の制御を受け、特に膀胱などの下部尿路は自律神経中枢を介し最終的に腰仙部脊髄の節前ニューロンを介し排尿がコントロールされる。この自律神経による膀胱機能の制御には、膀胱からの圧情報が重要であり、その情報は膀胱壁に投射する一次求心性線維 Aδや C 線維を介して腰仙部脊髄後角に伝わるなど、投射部位や入力様式が体性感覚と極めて類似している。しかし、腰部脊髄後角の可塑的变化が与える膀胱機能への影響は不明である。

## 2. 研究の目的

サイトカインは痛覚だけでなく、広く中枢神経系にも作用し情報伝達に変調を来す。しかし、疼痛を誘発するサイトカインが中枢性に他の系に及ぼす影響は着目されていない。そこで、神経障害性疼痛に伴うサイトカインが、その他の機能、特に排尿の自律神経制御に与える影響を調べる。生理的条件下に下部尿路の制御機構を *in vivo* の状態で解析する方法を用い、疼痛と自律神経系変調の中枢性の関連を明確にすることを目的に本研究を遂行した。

## 3. 研究の方法

(1) イソフルランによる全身麻酔下に雌性 Sprague-Dawley ラットの膀胱内にカテーテルを留置し、圧トランスデューサーに接続し膀胱内圧を測定した。また、カテーテル留置後、背部皮膚を切開し脊椎を露呈させ、椎弓を切除し定位固定装置に固定した。膀胱内に生理食塩水を持続注入 (6 ml/hr) しながら排尿に伴う膀胱内圧変化を観察し、一方で Krebs 液 (mM: NaCl 112, KCl 3.6, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgCl<sub>2</sub> 1.2, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, glucose 11, NaHCO<sub>3</sub> 25) を脊髄に灌流させながら、記録電極を脊髄 (L6-S1) に刺入して排尿に関連した脊髄細胞の活動電位を記録した。

(2) 下部尿路から中枢への神経細胞の同定には、神経トレーサー (コレラトキシン B) を膀胱、尿道にそれぞれ投与し、7日後にパラホルムアルデヒドで灌流固定し、脊髄後根神経節 (DRG) および脊髄を取り出し、切片を作成し観察した。

(3) 排尿に関連した脊髄での神経細胞の同定には、膀胱にカプサイシンを2時間注入した後に灌流固定し、切片を抗 c-fos を用いて免疫染色を行った。

## 4. 研究成果

(1) 排尿に関連した脊髄神経細胞の解析手法の開発

*in vivo* の生理的条件下に、膀胱内圧測定により排尿を観察しながら脊髄の神経活動を同時に記録する方法を開発した。この手法によりこれまで誰も記録したことのない排尿に関連した神経活動を脊髄から記録した。また、これにより排尿に関連し神経活動する細胞が脊髄後角では2種類 (Type 1, Type 2)、副交感神経核で1種類 (Type 3) の細胞が記録された (図1)。また、この活動電位を Offline Sorter software で発火頻度を解析した (図2)。図2では、横軸は排尿時の膀胱内圧の傾きが最も大きい時間を0秒として示した。その結果、Type 2, Type 3は0秒以前から発火が開始されるのに対し、Type 1は0秒以降から発火が始まることが示唆された。

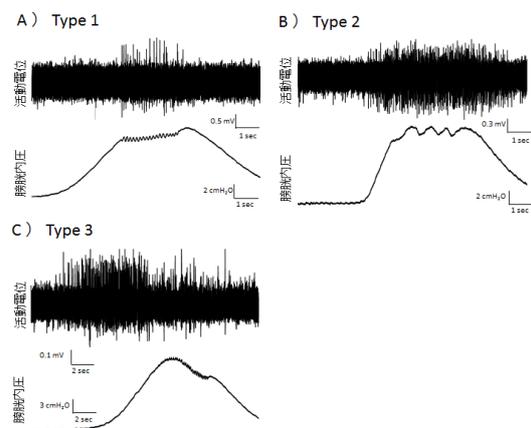


図1) 脊髄での神経活動を膀胱内圧と同時に細胞外記録によって解析した

Type 1 は脊髄後角における尿道の開口に同期して発火が開始する細胞。Type 2 は脊髄後角における排尿に伴う尿道内圧の上昇時から発火を始める細胞。Type 3 は脊髄副交感神経核から記録した神経活動。

(2) 脊髄へのサイトカイン投与による排尿への影響

脊髄にサイトカインを灌流投与した時の排尿間隔への影響について記録検討した。本研

究では、これまでに神経障害性疼痛とのかかわりが報告されているサイトカイン、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、CCL-1 を検討した。その結果、IL-1 $\beta$  と CCL-1 は頻尿になる傾向があることがわかり、TNF- $\alpha$  は排尿間隔が広がることを示された。

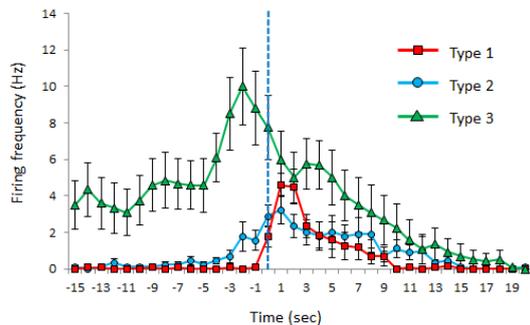


図 2) 脊髄における排尿に関連した細胞の発火頻度の比較

横軸は排尿時の膀胱内圧の傾きが最も大きい時間を 0 秒として示した。その結果、Type 2、Type 3 は 0 秒以前から発火が開始されるのに対し、Type 1 は 0 秒以降から発火が始まることを示唆された。

(3) 下部尿路からの脊髄への一次求心性神経細胞の同定

膀胱と尿道にそれぞれに違う神経トレーサーを投与し 7 日後に固定し、DRG と脊髄切片を作成し観察を行った。その結果、DRG では膀胱、尿道からのトレーサーが全く共発現を示さなかった (図 3)。しかし、脊髄切片では副交感神経核ではそれぞれのトレーサーが共発現を示した。これらの結果より、膀胱、尿道からの求心性神経は別々の神経細胞によって伝達され、また脊髄から膀胱、尿道には同じ自律神経による支配をうけていることが示唆された。

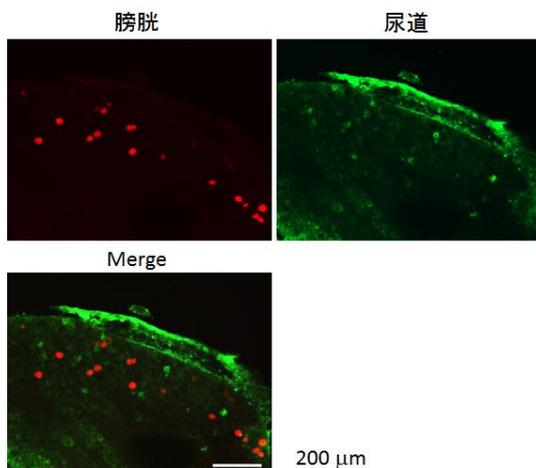


図 3) 膀胱、尿道に神経トレーサーを投与した時の脊髄後根神経節 (DRG) の観察

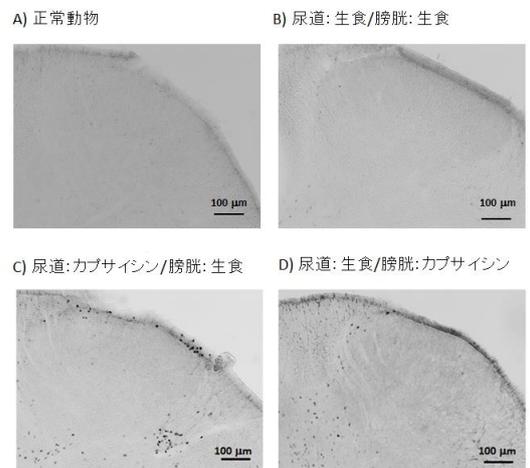
DRG において膀胱壁に投与したトレーサー (赤) の陽性細胞と尿道壁に投与したトレーサー (緑) の陽性細胞が一致しないことが示された。

(4) 下部尿路からの脊髄での神経伝達について

研究結果 (1) から、脊髄後角には排尿に関連し、神経活動が引き起こされる細胞が 2 種類いることが示唆された。そこでその 2 種類について特徴を検討した。尿道の開口に同期して発火が開始され、また下部尿路に 15  $\mu$ M カプサイシンを投与すると、カプサイシンに反応して神経発火が増加するもの (Type 1) と、排尿に伴う尿道内圧の緩やかな上昇時から発火を始め、カプサイシンを投与しても神経発火にあまり影響がないもの (Type 2) があることが明らかになった。また、Type 1 は尿道に局所麻酔薬であるキシロカインを投与したところ神経発火が減少することから尿道からの情報を受け取った神経細胞であると考えられることが明らかとなった。

(5) 膀胱、尿道にそれぞれカプサイシンを投与した時の脊髄における c-fos の発現

膀胱、尿道別々に生理食塩水もしくはカプサイシンを注入し 2 時間後に灌流固定し脊髄の c-fos の発現を観察したところ、尿道にカプサイシンを投与した時の方が膀胱に入れた時よりも脊髄のより表層で c-fos 陽性の細胞が観察された (図 4)。これらの結果により膀胱、尿道からの情報は脊髄で別々の細胞に入力され、より上位中枢に伝達されることが示唆された。



#### 図 4) 膀胱、尿道にそれぞれカプサイシンを投与した時の脊髄における c-fos の発現

A)正常動物, B)膀胱, 尿道内に生理食塩水(生食)を注入投与した時の脊髄, C)尿道にカプサイシン,膀胱に生食を注入投与した時の脊髄, D)尿道に生食, 膀胱にカプサイシンを投与した時の脊髄. 尿道にカプサイシンを投与した時の方が膀胱への投与よりも、より脊髄の後角表層に c-fos が多く発現することが示された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Kiyotada Naitou, Hiroyuki Nakamori, Takahiko Shiina, Azusa Ikeda, Yuuta Nozue, Yuuki Sano, Takuya Yokoyama, Yoshio Yamamoto, Akihiro Yamada, Nozomi Akimoto, Hidemasa Furue, and Yasutake Shimizu. Stimulation of dopamine D2-like receptors in the lumbosacral defecation centre causes propulsive colorectal contractions in rats. *The Journal of physiology*, 査読有, 594 巻, 2016, 印刷中. doi: 10.1113/JP272073
- ② Mori Y, Tomonaga D, Kalashnikova A, Furuya F, Akimoto N, Ifuku M, Okuno Y, Beppu K, Fujita K, Katafuchi T, Shimura H, Churilov LP, Noda M. Effects of 3,3',5-triiodothyronine on microglial functions. *Glia*, 査読有, 63 巻, 2015, 906-920. doi: 10.1002/glia.22792.

[学会発表] (計 8 件)

- ① Akimoto N, Hakozaiki A, Kawatani M, Imoto K, Furue H. In vivo nociceptive responses in the marginal layer of the spinal cord induced by intravesical capsaicin administration during micturition. 第 93 回日本生理学会大会、2016.3.23、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)
- ② 秋元 望. 自律神経系を介した内の中枢性制御機構. 新潟脳研-生理研合同シンポ、2016.3.1-2、岡崎カンファレンスセンター (愛知県岡崎市)

- ③ 秋元 望, 箱崎 敦志, 井本 敬二, 古江 秀昌. 下部尿路からの脊髄感覚伝達および自律神経調節機構の解明. 第 5 回名古屋大学・生理学研究所合同シンポジウム、2015.9.19. 生理学研究所 1 階大会議室 (愛知県岡崎市)
- ④ 秋元 望, 箱崎 敦志, 河谷 正仁, 井本 敬二, 古江 秀昌. 下部尿路から脊髄に入力する痛覚伝達機構の in vivo 解析. 第 37 回日本疼痛学会、2015.7.4、市民会館崇城大学ホール (熊本県熊本市)
- ⑤ Akimoto N, Hakozaiki A, Imoto K, Furue H. In vivo analysis of afferent pathways to the spinal cord from the bladder and urethra. 第 92 回日本生理学会大会、2015.3.23、神戸国際会議場・展示場 (兵庫県神戸市)
- ⑥ 秋元 望, 歌 大介, 本多 健治, 高野 行夫, 井本 敬二, 野田 百美, 古江 秀昌. 脊髄後角シナプス伝達に対する CCL-1 の作用と疼痛発現機構. 第 4 回名古屋大学・生理学研究所合同シンポジウム、2014.11.22. 名古屋大学医学部附属病院・中央診療棟 3 階講堂 (愛知県名古屋市)
- ⑦ Nozomi Akimoto. Action of Chemokine (C-C motif) ligand 1 on synaptic transmission in the spinal superficial dorsal horn. 2014NIPS-KU/YU Symposium、2014.7.1、岡崎カンファレンスセンター (愛知県岡崎市)
- ⑧ 秋元 望, 歌 大介, 本多 健治, 高野 行夫, 井本 敬二, 野田 百美, 古江 秀昌. 脊髄後角シナプス伝達に対する CCL-1 の作用と疼痛発現機構. 第 36 回日本疼痛学会、2014.6.20、KKR ホテル大阪 (大阪府大阪市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

秋元 望 (AKIMOTO, Nozomi)  
生理学研究所・生体情報研究系・特別協力  
研究員  
研究者番号: 60723905

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

古江 秀昌 (FURUE, Hidemasa)

生理学研究所・生体情報研究系・准教授

研究者番号：20304884

(4) 研究協力者

なし