

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870496

研究課題名(和文) 痒みを特異的に伝達する脳 - 脊髄神経ネットワークの同定

研究課題名(英文) Analysis of the itch specific neural network from the spinal cord to the brain

研究代表者

高浪 景子 (Takanami, Keiko)

岡山大学・自然科学研究科・日本学術振興会特別研究員(RPD)

研究者番号：70578830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：知覚神経系に発現するgastrin-releasing peptide receptor (GRPR)が痒み特異的伝達分子として見出され、痒み独自の伝達機構の解明が急速に進んでいる。我々は、リガンドであるgastrin-releasing peptide (GRP)に着目し、光学顕微鏡と各種先端電子顕微鏡技法を駆使し、痒み伝達神経終末の階層的形態解析を実施した。その結果、超微形態レベルで三次元的な痒み伝達シナプス構造の可視化に成功した。

研究成果の概要(英文)：Elucidation of the itch specific transmission mechanism advances rapidly since gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) has been discovered as a first itch specific mediator recently. We focused on the GRPR ligand, gastrin-releasing peptide (GRP), as a functional molecule of itch transmission and analyzed the hierarchical morphological analysis of itch transmission nerve terminals using light microscopy and various advanced electron microscope technique. As a result, the visualization of three-dimensional itch transmission synaptic structure succeeded at an ultrastructural level.

研究分野：神経解剖学

キーワード：痒み 神経回路 GRP 超高压電子顕微鏡 三次元電子顕微鏡 連続ブロック表面走査型電子顕微鏡 SB
F-SEM 重金属ブロック染色法

1. 研究開始当初の背景

痒みは非常に不快な皮膚感覚であるが、これまで痛みとの多くの類似性により、痒み特異的分子基盤が不明であった。ここで、2007年に gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) が初めて痒み特異的伝達分子として見出され、痒みの研究領域のブレイクスルーを迎えた。以降、痒みの伝達に関わる様々な分子が多数報告されてきたが、痒み独自の伝達機構と神経回路について未だ不明な部分が多い。

2. 研究の目的

我々は痒み独自の伝達回路の解明を行う上で、末梢の皮膚と中枢を繋ぐ知覚の中継地のひとつである脊髄を研究対象領域とし、GRPR のリガンドであるペプチドホルモン gastrin-releasing peptide (GRP) を痒みの機能分子として着目し、研究を実施してきた。本研究では、光学顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡、超高圧電子顕微鏡、透過型電子顕微鏡、三次元電子顕微鏡などの各種顕微鏡を用いて、GRP の局在、投射先の解明およびシナプス構造の可視化による痒み伝達神経回路の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 光学顕微鏡解析

まず始めに、GRP の局在と投射先の解明を行うために、成熟雄ラットの知覚神経系組織（脊髄後根神経節、頸髄から仙髄までの脊髄、三叉神経節、脳幹）を採取し、GRP および GRPR 遺伝子および GRP タンパク発現解析を実施した。

(2) 超高圧電子顕微鏡解析

(1) で見出した GRP の投射先である脊髄に着目し、GRP を含有する神経終末における痒み伝達シナプス構造の可視化を行った。超高圧電子顕微鏡は 100 万ボルトの加速電圧を用いることにより、光学顕微鏡では観察不可能な超微形態レベルでの 3D 情報の取得を容易にする。その中で生理学研究所に現有する超高圧電子顕微鏡(H-1250M)は、世界でも希少な医学・生物学研究に特化したものであるため、本機を研究に用いた。しかしながら、従来の透過型電子顕微鏡で用いられているトモグラフィー法では、マイクロメーター・オーダー厚の薄切片を超高圧電子顕微鏡下、均一に高コントラストで観察することが難しく、3D 解析への大きな障害となっていた。一方、最近開発された三次元電子顕微鏡のひとつである連続ブロック表面走査型電子顕

微鏡(SBF-SEM)を用いた解析で使用される特殊な重金属ブロック染色法 (NCMIR 法) がある。今回、この NCMIR 法による厚切り切片を超高圧電子顕微鏡へ応用した。

(3) 三次元電子顕微鏡解析

さらに痒み伝達シナプス構造の三次元可視化を行うために、近年開発された三次元電子顕微鏡のひとつである連続ブロック表面走査型電子顕微鏡(SBF-SEM)を用いた。連続ブロック表面電子顕微鏡法は、樹脂包埋された試料を数十から数百ナノメートル厚で連続的に削りながら、その表面に現れる構造を走査型電子顕微鏡により記録し、網羅的に試料の三次元再構築する方法である。本研究ではこれまで、免疫組織化学法と電子顕微鏡解析を組み合わせてきた実績を基に、連続ブロック表面走査型電子顕微鏡(SBF-SEM)を用いて、感覚神経系における痒み特異的伝達分子 GRP の三次元微細構造再構築に取り組み、目的分子を標識する免疫組織化学法と Mark H. Ellisman らの考案した NCMIR 法を組み合わせた技術を開発した。

(4) 痒み関連分子をターゲットとした遺伝子改変動物のキャラクタライゼーション

本研究室で作出された GRPR 遺伝子改変ラットのキャラクタライゼーションを実施した。

4. 研究成果

(1) 光学顕微鏡解析

GRPR のリガンドである GRP を痒みの分子マーカーとして着目し、形態学解析を行った結果、脊髄後根神経節のみでなく、三叉神経節の無髄の神経細胞にも GRP の発現を認められた。GRP 発現細胞の投射先を調べた結果、脊髄知覚神経系では脊髄後角最表層に入力し、三叉神経知覚系では脳幹三叉神経知覚核のうち、脊髄路核尾側亜核最表層に特異的に入力することが明らかとなった。また、GRP の投射先と GRPR 遺伝子局在は領域の一致を示した。これらから、GRP は身体領域の痒みのみでなく、顔面・口腔領域の痒みの伝達にも関与し、脳-脊髄領域において痒み感覚の伝達に普遍的に関与することが示唆された。

(2) 超高圧電子顕微鏡解析

超高圧電子顕微鏡と包埋前免疫電子顕微鏡法を組み合わせ、感覚神経終末における痒み伝達分子の局在の三次元微細構造解析を実施した。これまでの染色法ではシグナル以

外の構造物が不明瞭であったが、今回、高いコントラストが得られる NCMIR 法を超高圧電子顕微鏡に適用し、1 ミクロン程度の準超薄切片においても、明瞭な神経ネットワークおよびシナプス構造の可視化に成功した。脊髄後角において、GRP 免疫陽性終末は連続した数珠状構造を呈し、従来想定されてきたよりも多くのポストシナプス構成要素と複雑な痒み神経ネットワークを形成していることをより効率的に明らかにすることが可能となった。

(3)三次元電子顕微鏡解析

連続ブロック表面走査型電子顕微鏡(SBF-SEM)に、これまで確立してきた免疫電子顕微鏡法を応用し、痒み伝達神経終末の三次元超微形態解析を実施した。その結果、免疫組織化学法、重金属染色法、試料作製法の改良を試み、脊髄後角における痒み伝達神経終末の三次元観察が可能となり、セグメンテーションを実施し、三次元再構築を行った。GRP で標識される神経終末はいくつもの膨らみが連続する数珠状構造を示し、膨らみの部分に GRP 免疫陽性およびミトコンドリアの集積が見られた。また、痒み伝達神経終末に対するポストシナプスの構成要素の解析を行い、樹状突起・細胞体・有芯性小胞を含む神経終末・グリア細胞などの多数の構成要素によるシナプスの被覆がみられた。従来の電子顕微鏡法による脊髄後角神経ネットワーク解析から得られる情報は二次元的であったため、今回の三次元構造解析の結果から、多数の構成要素によるシナプス構造が見出された。このうち、想定していたよりもグリア細胞による痒み伝達シナプスの被覆の割合が多かったため、このグリア細胞の由来を同定するために、各グリア細胞の特異的マーカーを用いて、新たな構造解析を実施している。

(4) 痒み関連分子をターゲットとした遺伝子改変動物のキャラクタライゼーション

GRPR 遺伝子改変ラットの脳と脊髄における GRPR 発現ニューロンの局在について赤色蛍光シグナルを指標に解析した。その結果、GRPR 発現が報告されている脳・脊髄の各領域において RFP 陽性ニューロンを多数観察した。また、脊髄後角 GRP 受容体発現細胞は脊髄後角最表層から中枢に投射する Neurokinin 1 受容体と局在が異なることが示唆された。これを受け、現在 GRP 受容体発現細胞の投射部位の解析を実施している。

以上から今回行った一連の先端的電子顕微鏡技法は分子を標識するのみでなく、痒みの情報伝達という機能を関連づける「機能形態解析」の発展に繋がるイメージング技術だと考えられる。

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 9 件)

T Oti, K Takanami, N Katayama, T Edey, K Satoh, T Sakamoto, H Sakamoto. Perinatal testosterone exposure is critical for the development of the male-specific sexually dimorphic gastrin-releasing peptide system in the lumbosacral spinal cord that mediates erection and ejaculation. *Biology of Sex Differences*, 2016; 7: 4. doi: 10.1186/s13293-016-0058-x. 査読有

N Katayama, T Oti, K Takanami, T Sakamoto, H Sakamoto, Postnatal development of the gastrin-releasing peptide system in the lumbosacral spinal cord controlling male reproductive function in rats. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 2016; 92: 69-75. doi: 10.2183/pjab.92.69. 査読有

S Mukudai, KI Matsuda, H Bando, K Takanami, T Nishio, Y Sugiyama, Y Hisa, M Kawata. Expression of Sex Steroid Hormone Receptors in Vagal Motor Neurons Innervating the Trachea and Esophagus in Mouse. *Acta Histochem. Cytochem.* 2016; 49: 37-46. doi: 10.1267/ahc.15037. 査読有

K Satoh, K Takanami, K Murata, M Kawata, T Sakamoto, H Sakamoto, Effective *synaptome* analysis of itch-mediating neurons in the spinal cord: a novel immunohistochemical methodology using high-voltage electron microscopy., *Neuroscience Letters*, 2015; 599: 86-91. doi: 10.1016/j.neulet.2015.05.031. 査読有

K Satoh, K Takanami, K Murata, M Kawata, T Sakamoto, H Sakamoto, Three-dimensional visualization of multiple

synapses in thick sections using high-voltage electron microscopy in the rat spinal cord., *Data in Brief*, 2015; 4 566-570. doi: 10.1016/j.dib.2015.07.005. 査読有

Y Takayanagi, M Yoshida, A Takashima, **K Takanami**, S Yoshida, K Nishimori, I Nishijima, H Sakamoto, T Yamagata, T Onaka., Activation of supraoptic oxytocin neurons by secretin facilitates social recognition. *Biological Psychiatry*, 2015; in press. doi: 10.1016/j.biopsych.2015.11.021. 査読有

S Yamada, M Ooya, **K Takanami**, KI Matsuda, M Kawata, Critical role of androgen receptor in the postnatal period in male sexual behavior in rats., *Neuroscience Letters*, 2015; 609 189-193. doi: 10.1016/j.neulet.2015.10.040. 査読有

K Takanami and H Sakamoto. The Gastrin-Releasing Peptide Receptor (GRPR) in the Spinal Cord as a Novel Pharmacological Target. *Current Neuropharmacology* 2014; 12: 434-443. doi:10.2174/1570159X12666140923201432. 査読有

K Takanami, H Sakamoto, KI Matsuda, K Satoh, T Tanida, S Yamada, K Inoue, T Oti, T Sakamoto, M Kawata. Distribution of gastrin-releasing peptide in the rat trigeminal and spinal somatosensory systems. *Journal of Comparative Neurology* 2014; 522: 1858-73. doi: 10.1002/cne.23506. 査読有

[学会発表](計 14 件)

高浪景子、松田賢一、河田光博、坂本竜哉、坂本浩隆 . 公募シンポジウム「かたちの意味」、形態学解析から考える痒みの伝達機構、第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会、ビッグパレット福島(福島県郡山市) 2016 年 3 月 28 日-30 日【招待講演】

高浪景子、坂本浩隆 . スクスにおける神経ペプチド・ホルモン分子の進化と機能、第 10 回スクス研究会、ビッグパレット福島(福島県郡山市) 2016 年 3 月 27 日【招待講演】

高浪景子、佐藤慧太、村田和義、河田光博、坂本竜哉、坂本浩隆 . Tomography visualization of multiple synapses in thick sections using high-voltage electron microscopy in the rat sensory neurons、SSSEM 研究部会 / 生理研研究会、岡崎コンフェレンスセンター(愛知県岡崎市) 2015 年 11 月 18 日-19 日

高浪景子、向井啓起、井上海平、田村圭、越智拓海、上田康雅、河田光博、坂本竜哉、坂本浩隆 . ほ乳類三叉神経知覚系の比較組織学解析、第 56 回日本組織細胞化学会 総会・学術集会、関西医科大学(大阪府枚方市) 2015 年 10 月 3 日-4 日

K Takanami, K Satoh, N Miyazaki, K Murata, M Kawata, T Sakamoto, and H Sakamoto. Effective ultrastructure neuroimaging of itch. The 8th World Congress on Itch, Nara Kasugano International Forum IRAKA, Nara, Japan. Sep. 27-29 2015

高浪景子 . 若手シンポジウム「行動を規定する神経内分泌機構」、神経内分泌機構による痒み感覚調節、第 42 回日本神経内分泌学会・第 23 回日本行動神経内分泌学会合同学術集会、仙台市戦災復興記念館(宮城県仙台市) 2015 年 9 月 18 日-19 日【招待講演】

高浪景子、坂本浩隆、宮崎直幸、村田和義、佐藤慧太、坂本竜哉、河田光博 . SBF-SEM 解析への免疫電顕法の応用 - 痒み伝達シナプスの構造解析-、SEM 連続断面観察による生物組織三次元再構築法研究会、勝沼ぶどうの丘(山梨県甲州市) 2015 年 3 月 24 日-25 日【招待講演】

高浪景子、坂本浩隆、宮崎直幸、村田和義、佐藤慧太、坂本竜哉、河田光博 . 脊髄における痒み伝達神経ネットワークの微細構造解析、第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会合同大会、神戸国際会議場(兵庫県神戸市) 2015 年 3 月 21 日-23 日

高浪景子、坂本浩隆、宮崎直幸、村田和義、佐藤慧太、坂本竜哉、河田光博．連続ブロック表面走査型電子顕微鏡による痒み伝達感覚ニューロンの形態解析、生理学研究所研究会 電子顕微鏡機能イメージングの医学・生物学への応用「次世代の生物電顕を考える」、岡崎コンフェレンスセンター（愛知県岡崎市）2014年11月12日-13日

高浪景子、坂本浩隆、宮崎直幸、村田和義、佐藤慧太、坂本竜哉、谷田任司、山田俊児、松田賢一、河田光博．かゆみを伝える神経ネットワーク、第41回日本神経内分泌学会学術集会、都道府県会館（東京都千代田区）2014年10月31日-11月2日

K Takanami, H Sakamoto, N Miyazaki, K Murata, K Satoh, T Sakamoto, and M Kawata. “3D electron microscopic analysis of neural network in the spinal dorsal horn” The 24rd International Symposium of Itch. Belle Salle Jimbocho, Tokyo, Japan. Oct. 18 2014

高浪景子、坂本浩隆、宮崎直幸、村田和義、佐藤慧太、坂本竜哉、河田光博．免疫組織化学法を用いた体性感覚ニューロン系の3次元微細構造解析、第55回日本組織細胞化学会、Bioimaging histochemistry、松本市中央公民館（長野県松本市）2014年9月27日-28日【招待講演】

K Takanami, H Sakamoto, N Miyazaki, K Murata, K Satoh, T Sakamoto, and M Kawata. “Visualization of a three-dimensional ultrastructure of neuropeptide in the axon terminals by 3view-scanning electron microscopy” The International Congress of Neuroendocrinology 2014 including the 18th Annual Meeting of the Society for Behavioral Neuroendocrinology. Hilton Sydney, Sydney, Australia, Aug. 17-20 2014

K Takanami, H Sakamoto, KI Matsuda, K Satoh, T Tanida, S Yamada, K Inoue, T Oti, T Sakamoto, and M Kawata. “Neural Circuit of the Itch to Consider From the

Expression of Gastrin-Releasing Peptide in the Rat Somatosensory Systems.”The 18th Congress of the International Federation of Associations of Anatomists. Beijin International Cnvention Center, Beijing, China. Aug. 8-10 2014

〔その他〕

岡山大学大学院自然科学研究科 理学部附属臨海実験所 / 文部科学省共同利用拠点(UMI) ホームページ

<http://www.science.okayama-u.ac.jp/~rinkai/index.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

高浪 景子 (TAKANAMI, Keiko)
岡山大学・大学院自然科学研究科
日本学術振興会特別研究員(RPD)
研究者番号：70578830