

令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16133

研究課題名(和文)細胞種特異的遺伝子編集法を用いたセロトニンによる脊髄痒み調節メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of serotonergic modulation of spinal dorsal horn neurons by cell-type specific genome editing.

研究代表者

古賀 啓祐 (Koga, Keisuke)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：50835189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Cre-loxPシステムとCRISPR-Cas9システムを用いた細胞種特異的な遺伝子編集技術により、脳から脊髄に下行するセロトニンシグナルの痒み調節における役割解明を目的に実験を行った。頸部脊髄後角抑制性神経からパッチクランプ記録を行った結果から、抑制性神経の調節にセロトニン受容体1aサブタイプ(HTR1A)が関与することを明らかにした。そこで、CRISPR-Cas9システムを利用することにより、抑制性神経特異的にHtr1a遺伝子を欠損させ急性の痒み行動及び慢性の痒み行動の試験を行い、脊髄後角抑制性神経に発現するHTR1Aの痒み行動調節における役割に関する知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

痒みは、搔破により外界の寄生虫等の有害物の付着を除去することで生体恒常性維持の役割を担う。一方で、慢性的な痒みは長期的な不快感によって肉体的・精神的ストレスを引き起こし、患者の生活の質を著しく低下させる。痒み感覚を調節する要因として下行性の抑制系が存在するが、その中でもセロトニンによる痒みの調節機構は依然として不明な点が多く残されていた。本研究では、脊髄後角でかゆみを抑制する抑制性神経の活動を、下行性のセロトニンがHTR1A受容体を介して抑制し、痒みの脊髄後角内での調節に関与することを明らかとした。本研究の成果が、新規の慢性搔痒の治療薬や治療戦略の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigate the role of descending serotonergic input to spinal dorsal horn inhibitory neurons in itch modulation. Using patch clamp technique, we revealed that serotonin inhibited inhibitory interneurons via Serotonin 1A receptors (HTR1A). Then, we produced Cre-dependent AAV vectors containing the gene encoding Cas9 nuclease and guide RNA targeting HTR1A and injected these viruses to Vgat-Cre mice, which express Cre recombinase in inhibitory neurons. Behavioral study using these mice revealed the itch modulating role of HTR1A in spinal inhibitory interneurons.

研究分野：体性感覚

キーワード：痒み 脊髄後角 セロトニン パッチクランプ 慢性搔痒

1. 研究開始当初の背景

痒みは、搔破により外界の寄生虫等の有害物の付着を除去することで生体恒常性維持の役割を担う。一方で、慢性的な痒みは長期的な不快感によって肉体的・精神的ストレスを引き起こし、患者の生活の質 (quality of life : QOL) を著しく低下させる。さらに既存の治療薬の抗ヒスタミン薬などにも抵抗性を示すことから、そのメカニズム解明及び新規治療薬の開発が急務の課題である。また、痒みの感受性は抑うつ状態や緊張などの精神状態によって影響を受けるなど、中枢神経による痒み感覚の調節機構が存在する。近年、感覚情報の修飾や伝達に重要な脊髄後角内での痒み伝達及び調節機構が徐々に明らかとされてきたが、脳から脊髄後角への下行性入力による痒み感覚の調節機構の詳細は未だ不明なことが多い。そこで本研究では、脊髄後角神経を下行性に調節するセロトニン (5-HT) 神経に着目し、その脊髄後角痒み伝達制御メカニズムの解明、さらには慢性搔痒における役割の全容解明を目指す。

脊髄に投射する下行性 5-HT 神経は、延髄の吻側腹内側髄質 (rostral ventromedial medulla; RVM) 内に存在する。先行研究において、下行性 5-HT シグナルが痒み伝達の促進に重要であることが報告されている (Zhao et al., Neuron, 2014) が、脊髄後角には抑制性及び興奮性の介在神経および投射神経が存在し、それぞれの細胞が異なる 5-HT 受容体 (5-HTR) サブタイプを発現していることから、各細胞における 5-HTR の痒み伝達における役割解明は困難であった。本研究では、電気生理学的手法とウイルスベクターを用いた細胞種特異的遺伝子編集法を用いることにより、脊髄後角神経活動の 5-HT 受容体による調節機構及び、その痒み調節への寄与を解明する。本研究の成果により、生理・病態における痒み感覚の下行性制御機構の理解が格段に進展し、内因性の痒み制御系を介した画期的な創薬に繋がることが期待される。

2. 研究の目的

本研究ではまず、Cre-loxP システムと CRISPR-Cas9 システムを組み合わせることにより、特定遺伝子を細胞種特異的に欠損させる手法を開発する。もう一つの下行性シグナルであるノルアドレナリンに着目して、上記手法を用いた遺伝子欠損マウスと、floxed マウスと Vgat-Cre マウスの掛け合わせで作成した conditional knockout マウスを用いた行動解析結果を比較し、本研究手法の妥当性を評価する。

さらに、脊髄後角抑制性神経の活動を調節する受容体サブタイプをパッチクランプ法により特定して、上記の細胞種特異的な遺伝子編集技術を駆使することで、痒み感覚における抑制性神経に発現するセロトニン受容体サブタイプの痒み伝達調節における役割を解析する。

3. 研究の方法

- (1) Cre 依存的に Cas9 酵素及び標的遺伝子特異的なガイド RNA を発現させる AAV を作製した。抑制性神経特異的に Cre 酵素が発現する Vgat-Cre マウスの脊髄に、上記 AAV をマイクロインジェクションし、行動学的な解析を行った。
- (2) 抑制性神経特異的に蛍光たんぱく質が発現する Vgat-Cre; Rosa-tdTomato マウスから脊髄スライスを作製し、パッチクランプ法により、抑制性神経のセロトニン還流応答を記録した。
- (3) 抑制性神経特異的に、(2) で特定した受容体を (1) と同様の方法で欠損させるマウスのかゆみ行動を評価した。

4. 研究成果

- (1) Cre-loxP システムと CRISPR-Cas9 システムを組み合わせることにより、特定遺伝子を細胞種特異的に欠損させる手法を開発する目的で、抑制性神経に発現するノルアドレナリン受容体の $\alpha 1$ -AR に着目した。 $\alpha 1$ -AR 受容体遺伝子の *Adra1a* に対するガイド RNA を作製して、遺伝子編集の評価を行った。さらに、Cre 依存的に Cas9 酵素を発現させる AAV ベクターと *Adra1a* 特異的なガイド RNA を発現させる AAV ベクターを Vgat-Cre マウスに処置して抑制性神経特異的な *Adra1a* 遺伝子の欠損を行った。このように作製したマウスでは、クロロキン処置に対する急性の痒み行動の増強が認められた。同様に、*Adra1a* floxed マウスと Vgat-Cre マウスの掛け合わせにより作成した *Adra1a* conditional knockout マウスでも同様の行動学的な表現型が得られた (引用文献)。さらに、この手法の応用により、神経回路特異的かつ細胞種特異的な遺伝子編集手法を開発し、その成果を国際科学誌に発表した (引用文献)。
- (2) 蛍光標識された抑制性神経からパッチクランプ記録を行い、セロトニンの還流処置を行ったところ、多くの抑制性神経で過分極応答が認められた。また、セロトニン受容体の HTR1A の特異的なアンタゴニストによりこの応答は有意に抑制された。
- (3) *Htr1a* 遺伝子を標的とするガイド RNA を組み込んだ AAV ベクターを作製した。このベクターにより抑制性神経特異的な *Htr1a* 欠損マウスを用いて急性と慢性搔痒の評価を行い、抑制性神経に発現する HTR1A の行動学的な役割に関する知見を得た (未発表データ)。

引用文献

α 1A-adrenaline receptors in dorsal horn inhibitory neurons have an inhibitory role in the regulation of chloroquine-induced itch in mice.

Yuto Shiraishi, Keisuke Koga, Ryo Yamagata, Izuho Hatada, Miho Shiratori-Hayashi, Makoto Tsuda, *Molecular brain* 14(1) 55-55, 2021、共同筆頭著者

Intrinsic braking role of descending locus coeruleus noradrenergic neurons in acute and chronic itch in mice.

Keisuke Koga, Yuto Shiraishi, Ryo Yamagata, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, Miho Shiratori-Hayashi, Makoto Tsuda, *Molecular Brain* 13(1), 2020、筆頭著者

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Shiraishi Yuto, Koga Keisuke, Yamagata Ryo, Hatada Izuhō, Shiratori-Hayashi Miho, Tsuda Makoto | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 1A-adrenaline receptors in dorsal horn inhibitory neurons have an inhibitory role in the regulation of chloroquine-induced itch in mice | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Molecular Brain | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-021-00768-9 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Tashima Ryoichi, Koga Keisuke, Yoshikawa Yu, Sekine Misuzu, Watanabe Moeka, Tozaki-Saitoh Hidetoshi, Furue Hidemasa, Yasaka Toshiharu, Tsuda Makoto | 4. 巻 118 |
| 2. 論文標題 A subset of spinal dorsal horn interneurons crucial for gating touch-evoked pain-like behavior | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences | 6. 最初と最後の頁 e2021220118 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2021220118 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Uchida Shuntaro, Soya Shingo, Saito Yuki C., Hirano Arisa, Koga Keisuke, Tsuda Makoto, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Sakurai Takeshi | 4. 巻 41 |
| 2. 論文標題 A Discrete Glycinergic Neuronal Population in the Ventromedial Medulla That Induces Muscle Atonia during REM Sleep and Cataplexy in Mice | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience | 6. 最初と最後の頁 1582 ~ 1596 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/jneurosci.0688-20.2020 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Koga Keisuke, Shiraishi Yuto, Yamagata Ryo, Tozaki-Saitoh Hidetoshi, Shiratori-Hayashi Miho, Tsuda Makoto | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Intrinsic braking role of descending locus coeruleus noradrenergic neurons in acute and chronic itch in mice | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Molecular Brain | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-020-00688-0 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Kohro Yuta, Matsuda Tsuyoshi, Yoshihara Kohei, Kohno Keita, Koga Keisuke, Katsuragi Ryuichi, Oka Takaaki, Tashima Ryoichi, Muneta Sho, Yamane Takuya, Okada Shota, Momokino Kazuya, Furusho Aogu, Hamase Kenji, Oti Takumi, et al. | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 Spinal astrocytes in superficial laminae gate brainstem descending control of mechanosensory hypersensitivity | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Nature Neuroscience | 6. 最初と最後の頁 1376 ~ 1387 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41593-020-00713-4 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Uchiyama Sawako, Yoshihara Kohei, Kawanabe Riku, Hatada Izuho, Koga Keisuke, Tsuda Makoto | 4. 巻 15 |
| 2. 論文標題 Stress-induced antinociception to noxious heat requires 1A-adrenaline receptors of spinal inhibitory neurons in mice | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Molecular Brain | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-021-00895-3 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Kawai Momotaro, Imaizumi Kent, Ishikawa Mitsuru, Shibata Shinsuke, Shinozaki Munehisa, Shibata Takahiro, Hashimoto Shogo, Kitagawa Takahiro, Ago Kentaro, Kajikawa Keita, Shibata Reo, Kamata Yasuhiro, Ushiba Junichi, Koga Keisuke, Furue Hidemasa, Matsumoto Morio, Nakamura Masaya, Nagoshi Narihito, Okano Hideyuki | 4. 巻 37 |
| 2. 論文標題 Long-term selective stimulation of transplanted neural stem/progenitor cells for spinal cord injury improves locomotor function | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cell Reports | 6. 最初と最後の頁 110019 ~ 110019 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.110019 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 藤原 優香、古賀 啓祐、橋 俊哉、古江 秀昌 |
| 2. 発表標題 光遺伝学による抑制性ニューロンの活動操作と脊髄後角神経応答の変調 |
| 3. 学会等名 第43回日本疼痛学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 中野 康佑、古賀 啓祐、角谷 学、小山 英則、古江 秀昌 |
| 2. 発表標題 Effects of sleep deprivations on nociception threshold and neural activity in the anterior cingulate cortex of mice |
| 3. 学会等名 第99回日本生理学会大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |