

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500468

研究課題名(和文) BACトランスジェニックマウスにおける脊髄後角エンケファリンニューロンの性質

研究課題名(英文) Characterization of enkephalin-containing neurons in the spinal dorsal horn visualized by expression of green fluorescent protein in BAC transgenic mice

研究代表者

堀 雄一 (Hori, Yuuichi)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：60190229

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：EnkプロモータによりGFPが発現するBACトランスジェニックマウスを作製し、単一細胞Real Time RT-PCR法およびパッチクランプ記録法により検討した。脊髄後角内GFP抗原(+)細胞がEnk抗原(+)細胞と良く一致した。フォルスコリンによりGFP(+)細胞数が有意に増加した。座骨神経半結紮により、脊髄後角表層GFP蛍光(+)細胞数が有意に増加した。GFP(+)細胞にNR1、NR2A、NR2Bサブユニット、BKチャネルの発現が見られ、その発現パターンはGFP(-)細胞と差異はなかった。GFP蛍光を指標として痛覚情報の調節機序を検討することが可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Using a bacterial artificial chromosome, we have generated a transgenic mouse which expresses GFP under the control of the preproenkephalin promoter. We observed as follows: 1) double immunostaining analysis using anti-enkephalin and anti-GFP antibodies showed that all GFP (+) neurons contained enkephalin; 2) forskolin increased the number of GFP (+) neurons in the superficial dorsal horn; 3) the partial ligation of unilateral sciatic nerve induced allodynia and increased the number of GFP (+) neurons in the ipsilateral side; and (4) Single-cell Real-time RT-PCR analysis showed that several GFP (+) neurons in the superficial dorsal horn expressed NMDA receptor subunits NR1, NR2A and NR2B mRNA and BK channel mRNA. The expression patterns of these genes were not significantly different between GFP (+) and (-) neurons. The Enk-GFP mouse is a useful model to study the cellular mechanisms underlying the synaptic transmission of nociceptive information in the central nervous system.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経 筋肉生理学

キーワード：エンケファリン NMDA受容体 BKチャネル 脊髄痛覚神経回路 脊髄後角表層ニューロン 単一細胞遺伝子発現解析 パッチクランプ記録 興奮性シナプス後電流

## 1. 研究開始当初の背景

Jo YH らは、免疫組織化学的方法によって脊髄後角の Enk 作働性ニューロンを同定し、その性質を検討した (J Neurophysiol, 1998)。我々はパッチクランプ記録した後そのニューロンを採取し、単一細胞 RT-PCR 法により Enk 作働性ニューロンを同定した (Neuroreport, 1999)。さらに、我々は Preproenkephalin プロモータ領域を組み込んだ GFP 発現ベクターを、遺伝子銃を用いてマウス脊髄スライスに導入し、GFP 蛍光により Enk 作働性ニューロンを同定し、発現する NMDA 受容体サブユニットを Enk 非含有ニューロンと比較した (Neurosci Lett, 2005)。最近、Koshimizu らは BAC トランスジェニックマウス法によって、Enk 作働性ニューロンが GFP 蛍光によって同定されるマウスを作成している (Eur J Neurosci, 2008)。我々も Koshimizu らと同じ様に、BAC トランスジェニック法によって Enk プロモータ BAC クローン-GFP トランスジェニックマウス (Enk-GFP マウス) を作成した。免疫二重染色の結果、このマウスでは脊髄に分布する GFP 抗原(+)細胞が Enk 抗原(+)細胞と良く一致することが確認された (19th Neuropharmacol Conf, 2009)。

群馬大学 柳川博士らは、GABA 合成酵素である GAD67 のプロモータにより GFP が発現するノックインマウスを作成した (J Comp Neurol, 2003)。我々は柳川博士との共同研究を行い、脊髄後角表層 GABA 作働性ニューロンがセロトニン 3 型受容体を発現することを、パッチクランプ法と単一細胞 RT-PCR 法によって観察した (J Neurophysiol, 2009)。

中枢神経のスライス標本において、単一神経細胞に発現する遺伝子を Real Time RT-PCR 法によって同定する試みは多くの中枢神経系内の部位について報告されている。脊髄後角表層のニューロンは非常に小さく mRNA 発現量が少ないため、Real Time PCR に先立って、前増幅 (Pre-amplification) する方法が開発されている (BMC Mol Biol, 2008)。

## 2. 研究の目的

脊髄後角表層に分布して情報伝達に関与している様々の伝達物質、受容体、イオンチャンネルについて、その遺伝子発現が Enk 作働性ニューロンおよびそれ以外のニューロンで差異があるか、それぞれのニューロンに特徴があるか、単一細胞 Real Time RT-PCR 法によって明らかにする。特に、NMDA 型グルタミン酸受容体サブユニット NR1、NR2A-D、セ

ロトニン 1 型~7 型受容体および  $Ca^{2+}$  依存性 K<sup>+</sup> チャンネルの遺伝子について検討する。

さらに、Enk 含有ニューロンからパッチクランプ・ホールセル記録を行い、発現しているイオンチャンネル、受容体について生理学的・薬理的な検討を加え、Enk 非含有ニューロンと比較する。そして、Enk 作働性ニューロンに見いだされた特徴が、末梢神経損傷あるいは脊髄損傷によって惹起される神経損傷後疼痛の発症に伴ってどのように変化するか明らかにする。

脊髄後角表層は感覚情報の伝達調節に重要な役割を果たしている。この部位には、Enk 作働性ニューロンのほか、GABA 作働性 (一部は Enk と共存する) glycine 作働性などの抑制性介在ニューロン、興奮性介在ニューロンや長経路ニューロンが分布し、それぞれユニークな役割を果たしている。本研究では、脊髄後角表層に分布するニューロンの多様性に留意し、Enk 作働性ニューロンを同定し、その生理学的・薬理学的特徴を明らかにし、発現している遺伝子と対応づけて検討する。

本研究をとおして、脊髄後角表層における感覚情報の伝達機構とその制御機構を解明する手掛かりを得る。さらに、Enk プロモータ領域の活性化により Enk 含有量を増加させる方法、あるいは、Enk 含有ニューロンを選択的に刺激して Enk 放出を促す方法の開発にむつび付き、慢性疼痛の合理的な治療法の開発の手掛かりを得ることが本研究の究極の目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) 単一細胞 Real Time RT-PCR 法による遺伝子の検出

BAC トランスジェニック法により作製した Enk-GFP マウスを用い実験を行う。ハロセン麻酔下に脊髄を摘出し、厚さ 350 $\mu$ m のスライスを作成する。近赤外線微分干渉蛍光顕微鏡 (Axioskop FS, Zeiss) のもとに、脊髄後角表層に分布する GFP 蛍光(+)および(-)の細胞を採取する。我々が従来から行っている単一細胞 RT-PCR 法 (Neuroreport 1999) によって逆転写反応を行い cDNA を合成する。次に、Real Time PCR に先だって、目的とする遺伝子を増幅するためのプライマー複数組を同時に用いて、Multiplex PCR 反応を行い、目的とする複数の遺伝子を同時に前増幅 (Pre-amplification) する。この前増幅については、multiplex PCR 用に市販されている酵素を用いて、Noutsias M ら (BMC Mol Biol 2008) の方法を改良して行う。

NMDA 受容体サブユニット NR1 および

NR2A-D、セロトニン 1-7 型受容体、Ca<sup>2+</sup>依存性 K<sup>+</sup>チャネル (BK、IK、SK) の mRNA について検討する。また、Preproenkephalin mRNA (GFP 蛍光の発現と Enk の発現が一致するか) GABA 合成酵素 GAD65 mRNA および GAD67 mRNA (Enk と GABA が共存しているか) についても検討する。また、採取した細胞がニューロンであることを確認する目的として Neuron Specific Enolase (NSE) mRNA について、すべての細胞において検討する。GAPDH をハウスキーピング遺伝子として用いる。

Pre-amplification を行った後、それぞれの遺伝子ごとに別の反応チューブ内で Real Time PCR を、Mastercycler ep-realplex (Eppendorf 社製) を用いて行なう。遺伝子の発現レベルの定量には $\Delta\Delta CT$  法によって、GAPDH をコントロールとして比較定量を行う。以上の実験から、脊髄後角に分布することが知られている受容体およびイオンチャネルの、Enk 作動性ニューロン、GABA 作動性ニューロンおよびそれ以外のニューロンにおける発現パターンを比較・検討する。

### (2) 末梢神経損傷モデルマウスの作製

我々が従来から行なっている Seltzer 法を改変した座骨神経部分結紮 (Eur J Neurosci, 2007) によって行なう。Sham 手術をしたコントロールマウスと比較・検討する。さらに、Chung 法による脊髄神経結紮の影響についての検討を考える。

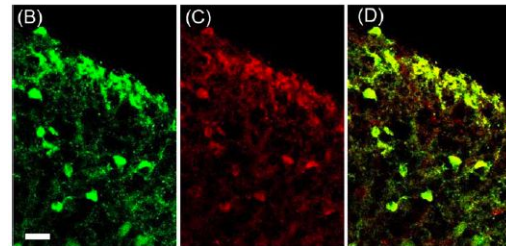
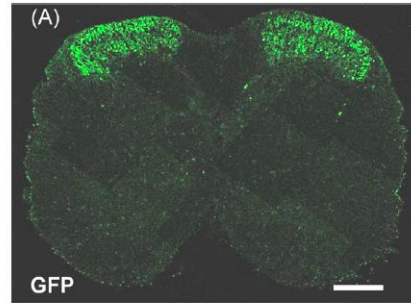
### (3) パッチクランプ・ホールセル記録

ハロセン麻酔下に脊髄を摘出し、厚さ 350 $\mu$ m のスライスを作成する。近赤外線微分干渉蛍光顕微鏡 (Axioskop FS, Zeiss) のもとに、脊髄後角表層に分布する GFP 蛍光(+) および(-)の細胞からパッチクランプホールセル記録を行なう。

単一細胞 Real Time RT-PCR の遺伝子発現の結果に基づいて実験を進める。電気生理学的・薬理的性質と遺伝子発現とを対応づける。さらに、末梢神経損傷の影響について、パッチクランプ・ホールセル記録による検討と単一細胞 Real Time RT-PCR による検討を組み合わせる。

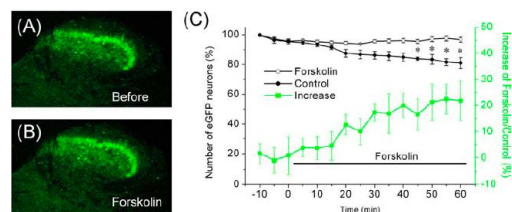
## 4. 研究成果

(1) Enk-GFP マウスにおいて、Enk 発現と GFP 発現が一致するか否かについて二重免疫染色により検討した。その結果、脊髄後角第 II 層に分布する GFP(+)ニューロン 1550 個のうち 1544 (97%)が Enk(+)であった。また、Enk(+)ニューロン 1552 個のうち 1544(99.5%)が GFP(+)であった (下図参照)。



(A) GFP(+)ニューロンの分布 (Scale bar = 200  $\mu$ m)  
 (B) - (D) 二重免疫染色 (B: GFP 抗体 C: Enk 抗体 D: Merge 像 Scale bar = 20  $\mu$ m)  
 (BMC Neuroscience 2011, 12:36 より)

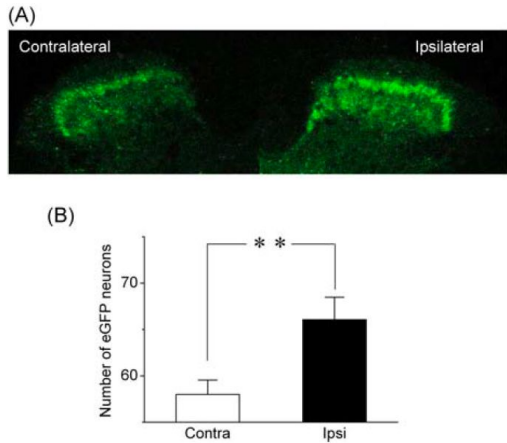
(2) Enk 発現は、cAMP Responsive Element を含む Preproenkephalin プロモータによって調節されている。GFP 発現がこのプロモータによって調節されているか否かについて、cAMP 濃度を増加させる作用を持つフォスコリンを用いて検討した。脊髄スライス標本を作製し、フォスコリン (5  $\mu$ M) 存在下に 60 分間インキュベートすると、GFP(+)ニューロンの数が  $21.8 \pm 7.5\%$  の増加を示した (下図参照)。



(A) - (B) フォスコリンの GFP 蛍光に対する作用 (A: 投与前 B: 投与後)  
 (C) フォスコリンの GFP(+)ニューロン数に対する作用の時間経過 (n = 7, \* P < 0.05)  
 (BMC Neuroscience 2011, 12: 36 より)

(3) Enk はニューロモジュレータとして痛覚情報伝達を調節し、慢性疼痛の発症に伴ってその発現レベルが変化することが報告されている。Enk-GFP マウスの一側の座骨神経

を半結紮し (Seltzer model) 疼痛症状を発生させると、座骨神経結紮側の脊髄後角第 II 層内の GFP 蛍光(+)ニューロンの数が、反対側に比べて有意に増加した (下図参照)。



(A) 座骨神経半結紮の脊髄後角内GFP蛍光に対する作用  
 (B) 座骨神経半結紮側のGFP(+)ニューロン数が反対側に比べ有意に増加している (n = 18, \*\* P < 0.01)。  
 (BMC Neuroscience 2011, 12: 36 より)

以上の結果から、我々の作製した Enk-GFP マウスにおいては、GFP 発現は Preproenkephalin プロモータによって調節されており、GFP 蛍光は Enk 発現を良く反映していると考えられた。

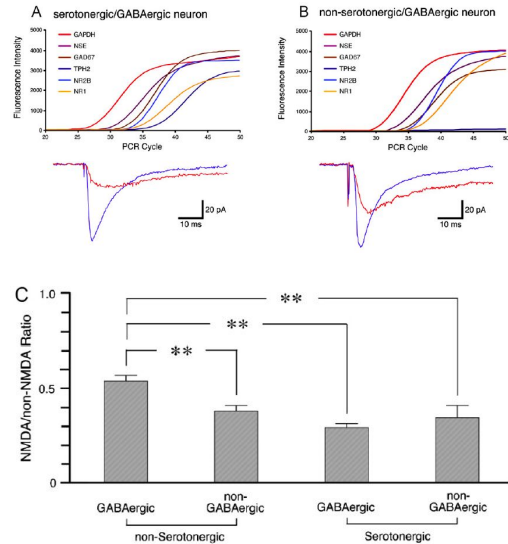
(4) 単一細胞 Real Time RT-PCR 法による遺伝子検出システムの確立を試みた。RT 反応によって得られた cDNA を前増幅した後、Real Time PCR 反応によって遺伝子の発現を調べた。この解析方法は false positive の危険性が高いことが危惧された。そこで、false positive の可能性をどの程度に見込む必要があるかにつき、以下のように検討した。

細胞を含まない結合組織、細胞残屑、灌流液をそれぞれ採取し、RT 反応、前増幅、Real Time PCR 反応を行った。PCR 反応のサイクル数を 70 まで増やしても遺伝子の増幅は観察されなかった。Enk-GFP マウス (Preproenkephalin プロモータによって GFP 蛍光が発現する) において PCR 反応により Preproenkephalin の増幅が見られた細胞のほぼ全てにおいて GFP 蛍光が観察された (19th Neuropharmacology Conference, 2009)。

TPH2-GFP マウス (TPH2 プロモータによって GFP 蛍光が発現する) において TPH2 の増幅が見られた細胞の約 95% に GFP 蛍光が観察された (SFN Meeting Abstract 2012)。

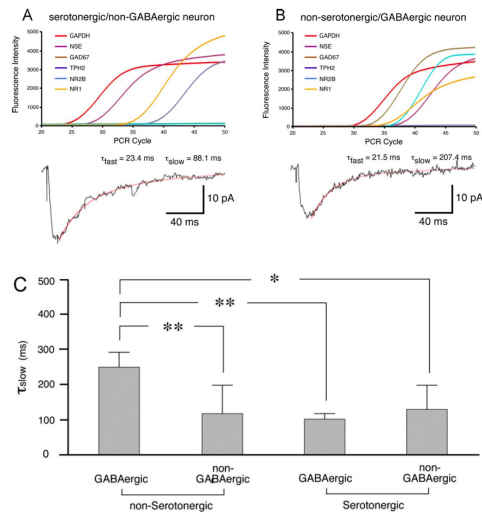
(5) 単一細胞 Real Time RT-PCR 法を、脊髄後角ニューロンおよび中脳水道周辺灰白質ニューロンに適用した。その結果、

GABA 作動性ニューロンとセロトニン作動性ニューロンでは、興奮性シナプス後電流 (EPSCs) の NMDA 成分と non-NMDA 成分の振幅比 (NMDA/non-NMDA 比) が異なる値を示した (下図参照)。



(A)-(B) 上: serotonergic/GABAergicニューロン(A)および non-serotonergic/GABAergicニューロン(B)のReal Time PCR 増幅曲線。GAPDH(赤)、NSE(紫)、GAD67(茶)、TPH2(紺)、NR2B(青)、NR1(黄)の増幅を表す。下: 興奮性シナプス後電流 (EPSC) の non-NMDA 成分(青)と NMDA 成分(赤)  
 (C) 四つの genotype 間の、NMDA/non-NMDA 振幅比の比較 (\*\* P < 0.01)  
 (Neuroscience Letters 2012, 528: 55-60 より)

NMDA 成分の減衰過程が GABA 作動性ニューロンで遅い時間経過を示した (下図参照)。



(A)-(B) 上:serotonergic/GABAergicニューロン(A)および non-serotonergic/GABAergicニューロン(B)のReal Time PCRの増幅曲線。GAPDH(赤)、NSE(紫)、GAD67(茶)、TPH2(紺)、NR2B(青)、NR1(黄)

下:EPSC-NMDA 成分の減衰過程の指数関数当てはめによる解析

(C) 四つの genotype 間の、 $\tau_{slow}$  の比較 (\* P < 0.05、\*\* P < 0.01)

(Neuroscience Letters 2012, 528: 55-60 より)

これらの観察から、今回の研究課題において開発した単一細胞 Real Time RT-PCR 法は、

実際の遺伝子発現を十分に反映しており、

パッチクランプ記録法によって見いだされた薬理的・生理学的性質に対応する遺伝子発現の情報をよく反映していると考えられる。

(6) 我々は脊髄後角内において、大コンダクタンスカルシウム活性化カリウムチャンネル(BK チャンネル)が疼痛情報のシナプス伝達に対して調節作用を行っていることを報告した(Neurosci Lett, 2008)。Enk-GFP(+)ニューロンにおいて BK チャンネルの発現の有無を検討した結果、GFP(+)ニューロン 41 個のうち 27 個(66%)に BK チャンネルの発現が確認された。また、GFP(-)ニューロン 29 個のうち 14 個(48%)に BK チャンネルが発現していた。BK チャンネルの発現パターンに GFP(+)および GFP(-)で差異はなかった。NMDA 受容体の活性化により BK チャンネルが開口し Enkephalin 含有ニューロンが過分極し Enkephalin の放出を抑制的に調節すると推測される。

## 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 7 件)

Matsuzawa R, Fujiwara T, Nemoto K, Fukushima T, Yamaguchi S, Akagawa K, Hori Y. Presynaptic inhibitory actions of pregabalin on excitatory transmission in superficial dorsal horn of mouse spinal cord: further characterization of presynaptic mechanisms. Neuroscience Letters 査読有 2014, 558: 186-191

doi: 10.1016/j.neulet.2013.11.017.

Matsuzawa R, Takasusuki T, Maekawa M, Yamaguchi S, Hori Y. Effects of pregabalin on D-serine content and NMDA receptor-mediated synaptic transmission in the mouse spinal cord. FASEB J 査読有 2014 28:1129.9 [http://www.fasebj.org/content/28/1\\_Suppleme](http://www.fasebj.org/content/28/1_Suppleme)

[nt/1129.9.abstract?sid=4050e95d-dfa4-488c-9600-cfb6a2587ba6](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3411299/abstract?sid=4050e95d-dfa4-488c-9600-cfb6a2587ba6)

Tsuzuki H, Maekawa M, Konno R, Hori Y. Functional roles of endogenous D-serine in pain-induced ultrasonic vocalization Neuroreport 査読有 2012, 23: 937-941 doi: 10.1097/WNR.0b013e3283595726.

Terashima T, Shirakawa K, Maekawa M, Furukawa N, Yamaguchi S, Hori Y. Differential expression of NMDA receptor in serotonergic and/or GABAergic neurons in the midbrain periaqueductal gray of the mouse. Neuroscience Letters 査読有 2012, 528:55-60. doi: 10.1016/j.neulet.2012.08.061.

Miura Y, Hori Y, Kimura S, Hachiya H, Sakurai Y, Inoue K, Sawada T, Kubota K. Triphenyltin impairs insulin secretion by decreasing glucose-induced NADP(H) and ATP production in hamster pancreatic beta-cells. Toxicology 査読有 2012, 299: 165-171. doi: 10.1016/j.tox.2012.05.021.

Maekawa M, Wakamatsu S, Huse N, Konno R, Hori Y. Functional roles of endogenous D-serine in the chronic pain-induced plasticity of NMDAR-mediated synaptic transmission in the central amygdala of mice. Neuroscience Letters 査読有 2012, 520: 57-61 doi: 10.1016/j.neulet.2012.05.030.

Fukushima T, Tsuda M, Kofuji T, Hori Y. Physiological properties of enkephalin-containing neurons in the spinal dorsal horn visualized by expression of green fluorescent protein in BAC transgenic mice. BMC Neuroscience 査読有 2011, 12:36 doi: 10.1186/1471-2202-12-36.

[学会発表](計 12 件)

金子賢太郎、加藤永子、福島央之、前川正夫、堀 雄一. 実験的熱性けいれん後のマウス海馬 CA1 における Syntaxin 1A 発現の減少. 日本生理学会, 2014/03/16 - 2014/03/18. 鹿児島

前川正夫、堀 雄一. シンタキシン 1A ノックアウトマウスのセロトニン神経支配と慢性疼痛による情動行動の変化. 日本生理学会, 2014/03/16 - 2014/03/18. 鹿児島

福島央之、弓削和哉、津田雅之、堀 雄一. BAC トランスジェニックマウスにおいて可視化された大縫線核のセロトニン作動性神経の生理学的機能解析. 第 35 回日本神経科学大会, 2012/09/18-2012/09/21. 名古屋

弓削和哉、福島央之、田中志歩、金野柳一、堀 雄一. 神経因性疼痛行動とセリンラセマーゼの脊髄における分布. 第 35 回日本神経科学大会, 2012/09/18-2012/09/21. 名古屋

Matsuzawa R, Yamaguchi S, Takasusuki T, Ohtsubo T, Hori Y. Inhibitory effect of

pregabalin on excitatory synaptic transmission in the spinal dorsal horn after nerve injury. Society for Neuroscience Meeting, 2013/11/09 – 2013/11/13. San Diego, USA

Nemoto K, Matsuzawa R, Fukushima T, Takasusuki T, Yamaguchi S, **Hori Y.** Intrathecal administration of botulinum toxin A presynaptically inhibits excitatory synaptic transmission in the spinal dorsal horn. Society for Neuroscience Meeting, 2013/11/09 – 2013/11/13. San Diego, USA

Fukushima T, Yuge K, **Hori Y.** Visualization of serotonergic neurons in the Nucleus Raphe Magnus using BAC transgenic mice. Society for Neuroscience Meeting, 2012/10/13–2012/10/17. New Orleans, USA

Kobayashi S, Yuge K, Fukushima T, Tanaka S, Nozaki M, **Hori Y.** Expression patterns of glial marker proteins in the spinal cord in mouse models of cancer pain. Society for Neuroscience Meeting, 2012/10/13–2012/10/17. New Orleans, USA

Nemoto K, Yamaguchi S, Matsuzawa T, Takasusuki T, Terashima T, Fukushima T, Ohtsubo T, **Hori Y.** Intrathecal administration of botulinum toxin A: Antiallodynic action and inhibition of excitatory synaptic transmission in the spinal dorsal horn. Society for Neuroscience Meeting, 2012/10/13–2012/10/17. New Orleans, USA

Kokubu S, Matsuzawa R, Nemoto K, Fukushima T, Yamaguchi S, Maekawa M, Fujiwara T, Akagawa K, **Hori Y.** The effects of HPC1/Syntaxin 1A gene knockout on the general anesthetic actions of sevoflurane. Society for Neuroscience Meeting, 2012/10/13–2012/10/17. New Orleans, USA

Shirakawa K, Yamaguchi S, Kokubu S, Takasusuki M, Maekawa M, Kitajima T, **Hori Y.** Differential effects of peripheral nerve injury on serotonergic and non-serotonergic neurons in mouse periaqueductal gray matter. Society for Neuroscience Meeting, 2011/11/12–2011/11/16. Washington DC, USA

福島央之、堀 雄一. Sciatic nerve ligation induces up-regulation of functional 5-HT3 receptor on glutamatergic excitatory neurons in the mouse spinal superficial dorsal horn. 日本神経科学大会, 2011/09/17. 横浜

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

堀 雄一 (HORI, Yuuichi)

獨協医科大学・医学部・

生理学 (生体情報) 教室・教授

研究者番号 : 60190229

### (2)研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3)連携研究者

( )

研究者番号 :