

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：17201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659320

研究課題名(和文) 痛覚伝達に関わる脊髄後角局所回路における高解像度トレーシング

研究課題名(英文) Investigation of the spinal local circuit involved in pain signal transmission in the superficial dorsal horn.

研究代表者

八坂 敏一 (YASAKA, Toshiharu)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：20568365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：今回我々は痛みの情報処理に重要な役割を担っている脊髄後角細胞の神経回路について研究を行った。興奮性介在ニューロン(vertical cell)と抑制性介在ニューロン(islet cell)について、これまであまり研究されていなかった、触感覚を伝える一次感覚神経入力があることを見出した。これらの結果により、様々な種類の興奮性及び抑制性介在ニューロンが局所回路を形成して痛みに関わる情報伝達を調節していることが示唆され、その異常がアロディニアのような病態へとつながる可能性があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study we investigated excitatory and inhibitory lamina II interneurons which have contact with myelinated low-threshold mechanoreceptive (LTM) afferents in the superficial dorsal horn of the spinal cord. We found contacts between dendritic spines of vertical cells, major excitatory interneurons and axonal boutons containing the vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1), which is expressed by LTM afferents. Vertical cells in lamina II are therefore a potential route through which tactile afferents can activate lamina I projection neurons, and this pathway could play a role in tactile allodynia. We also found axo-axonic contacts between axonal terminals of parvalbumin (PV)-expressing islet cells, major inhibitory interneurons and terminals of LTM. Therefore PV neurons in laminae II and III are a source of inhibitory presynaptic input onto LTM afferents. PV cells might play an important role in the development of central sensitization and tactile allodynia.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・疼痛学

キーワード：神経科学 解剖学 生理学 疼痛 局所神経回路

1. 研究開始当初の背景

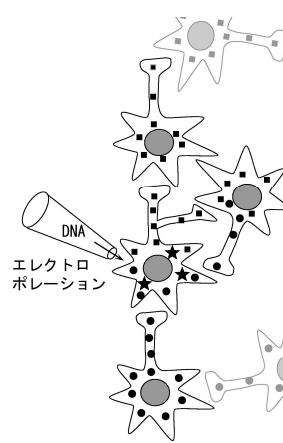
侵害受容性一次求心性線維が最初にシナプスを形成するのは脊髄後角浅層部である。そこには脳へ情報を中継する投射細胞が存在し、痛みの伝達に非常に重要な部位と考えられている。ところが投射細胞は実は1%に過ぎず、99%の細胞は介在ニューロンである。そのことから脊髄後角内局所回路による痛覚情報修飾が大きな役割を持っていることが明確である。しかし、現在この神経回路は全くと言ってよいほど解明されていない。驚くべきことに、1965年に提唱された「ゲートコントロール説」の具体的な神経回路は未だ同定されておらず、疼痛メカニズムの理解には、神経回路の解明が急務である。

2. 研究の目的

上述のような背景を受け、本研究では脊髄後角浅層部の神経回路を明らかにすることを目的とした。近年、我々のグループを含め、脊髄後角浅層細胞を形態学的・電気生理学的に分類し神経回路を明らかにしようとする研究が行われている。これらの細胞がどのような神経回路を構築するのかが非常に興味のあるところである。これまで行われている方法は、パッチクランプ法を基本とする手法である。パッチクランプ法は単一神経細胞を記録する方法であるが、同時に記録細胞に色素などを注入し染色することができる。この作業を同時に2つの細胞について行い、それらの細胞がシナプス結合していれば、それらの細胞同士の結合様式を知ることができる。この作業を繰り返すことで徐々に神経回路を明らかにすることができる。しかし、この方法は、技術的にも非常に困難であり、非常に時間を要する。そこで、効率的な方法を開発する必要がある。本研究では、脊髄後角の神経回路を標識する方法として単一細胞にトレーサーを発現させる方法の開発に挑戦した。また、これと並行して、近年明らかになってきた一次感覚神経終末の種類を区別することができるマーカータンパク質の免疫細胞化学染色法とパッチクランプ法による単一細胞標識法を組み合わせた手法も行った。

3. 研究の方法

今回開発に挑戦した手法は in vivo 単一細胞エレクトロポレーション法である。この方法は脳皮質でその有用性が明らかとなっている。この方法に着目した理由として、従来我々が行ってきた脊髄 in vivo パッチクランプ法と in vivo 単一細胞エレクトロポレーション法が酷似していることがあげられる。そのため我々の実験系にも比較的スムーズに取り入れられると考えた。これらの背景から、本実験の着想に至った。研究期間内に何をどこまで明らかにしようとしているのか本実験では、経シナプス性トレーサーとして小麦胚芽レクチン (WGA、順行性) やテタ



- WGA=順行性トレーサー
- TTC=逆行性トレーサー
- ★ 輸送されない蛍光蛋白質

ヌストキシンCフラグメント (TTC、逆行性) を用い、両方向性に回路を標識する。脊髄後角浅層の膠様質 (第II層) の細胞は形態学的に主に4種類に分類される。それらについてどのようなシナプス結合を有しているかを明らかにする。介在ニューロンだけでな

く一次感覚神経 (後根神経節細胞) から投射細胞まで、すなわち脊髄への入力から脊髄からの出力まで一連の回路を解析する。

また、上述の新規な神経回路可視化法の開発を行うと同時に従来のパッチクランプ法と免疫細胞化学方を組み合わせた方法による神経回路の解明も引き続き行った。

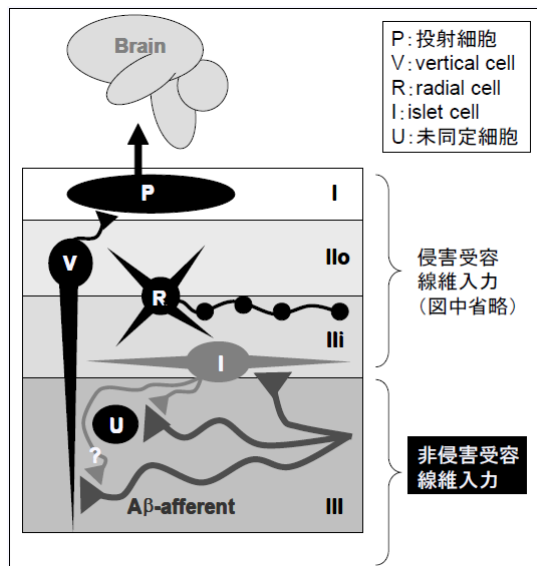
4. 研究成果

(1) 脊髄後角の興奮性介在ニューロンの一種、vertical cell について、これまであまり研究されていなかった、触覚を伝える一次感覚神経入力について解析を行った。脊髄後角の役割には、抹梢からの感覚情報を脳へと中継することと同時にその情報を修飾することがある。侵害受容線維の投射を受ける膠様質には多様な形態を持つ興奮性や抑制性の細胞が存在する。これらは全て介在ニューロンで感覚情報の修飾に重要であり、形態学的に4つのグループに分類される。興奮性細胞の一種 vertical cell は、細胞体が膠様質浅層部に位置し、樹状突起を深層へ、軸索を 層の投射細胞へ伸ばしている。一方、侵害受容性のA線維は 層に、非侵害受容性のA線維は 層周辺から深層へと投射している。また、前者の終末には小胞型グルタミン酸トランスポーター2 (vGlut2)、後者の終末には vGlut1 が特異的に発現している。Vertical cell はA線維の入力を受けるが、どちらの入力を受けているのかは明らかでなかった。そこで、今回 vertical cell が脊髄後角 層に置いて vGlut1 陽性神経終末とコンタクトしているかを調べた。その結果、調べた複数の細胞で、そのスパインと vGlut1 陽性の終末がコンタクトしていることを観察した。また、vGlut1 陽性の終末が末梢神経由来であるかどうかを確認するために、神経トレーサーの一種で、末梢神経に注入することにより、A線維に選択的に取り込まれ、脊髄内の神経終末を標識することができるコレラトキシンB (CTB) による実験を行った。坐骨神経にCTB注入して3日後の動物を用いて同様の実験を行った結果、ほとんどの

vGlut1 陽性の終末はCTBによって標識されており、末梢神経由来であることが確認された。これらの結果により、vertical cell が、侵害受容性 層投射細胞への非侵害受容性ポリシナプス入力のソースとなっている可能性が示唆された。言い換えれば、触感覚情報が痛覚情報を伝えている神経回路へと伝わってしまうことを示唆している。痛覚異常のメカニズムにこの ' 非侵害受容性 A 線維 Vertical cell 層投射細胞 ' の神経回路が関わっている可能性が示唆された (図中 V の細胞と A -Afferent の関係) 。
この成果はオンラインジャーナルの Molecular Pain 誌に掲載され、Highly Accessed (頻繁にアクセスされている) となっている。

(2) 脊髄後角の抑制性介在ニューロンの一種、islet cell について、これまであまり研究されていなかった、触感覚を伝える一次感覚神経入力について解析を行った。上述のように、脊髄後角は末梢からの感覚情報を脳へと中継すると同時にその情報を修飾している。この部位で見られる一次求心性線維の終末には、シナプス系球体を形成しているものもあり、これらはシナプス前抑制による入力修飾の標的と考えられる。A 線維終末のシナプス系球体はパルプアルブミン (PV) 陽性の前終末により抑制されていることが報告されているが、これらの前終末がどのような細胞に由来するのかは未だ明らかでない。膠様質細胞は全て介在ニューロンであり、多様な形態を持つ興奮性あるいは抑制性ニューロンであることから、感覚情報の修飾に重要な役割を持つと考えられている。抑制性細胞の一種 islet cell には、いくつかのサブグループがあり、PV を発現するグループもある。今回、パッチクランプ法による細胞内染色と免疫組織化学法を用いた解析により、この islet cell が A 線維終末のシナプス系球体に対してシナプス前抑制していることを明らかにした。パッチクランプによる細胞内染色を行い、その細胞が PV を持っているかを免疫細胞化学法で調べた。100 個以上の細胞を染色したが、PV 陽性の細胞は3つしか得られなかった。しかし、この細胞のアクソンを追跡した結果また、vGlut1 陽性神経終末と contacts していることを見出した。A 線維終末を抑制している PV 陽性細胞の由来を明らかにすることができた。また、この細胞はそれ自身が A 線維からの入力を受けることも見出した。A 線維終末の中には膠様質の興奮性介在ニューロンに入力しているものもある。“ゲートコントロール説”には低閾値機械受容線維による痛覚抑制回路が示されている。従って、今回の結果により、この痛覚抑制回路と機能的類似性を持つ多シナプス性局所回路に、この PV 陽性 islet cell が関与している可能性が示唆された((図中 I の細胞と A -Afferent の関係))。

今回、興奮性及び抑制性の2種類の介在ニューロンと A 線維終末の神経回路を明らかにした。それぞれの介在ニューロン間には相互作用する可能性がある。Vertical cell に入力している A 線維が PV 陽性 islet cell のシナプス前抑制を受ける可能性である。今後、それらについても明らかにしていきたい(図中 V と I の細胞と A -Afferent の関係、? マークの部分) 。これまで、侵害受容線維についての研究は盛んに行われてきたが、今回のような触感覚を伝える線維の2層細胞への入力についてはほとんど分かっていなかった。今回の成果はアロディニア (触刺激で痛みが起こる病態) の基礎として重要な示唆を与えるものであると考えられる。



5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Toshiharu Yasaka, Sheena YX Tiong, Erika Polgár, Masahiko Watanabe, Eiichi Kumamoto, John S Riddell, Andrew J Todd. A putative relay circuit providing low-threshold mechanoreceptive input to lamina I projection neurons via vertical cells in lamina II of the rat dorsal horn. Molecular Pain 査読有、vol. 10、2014、3、doi: 10.1186/1744-8069-10-3.

[学会発表] (計 1 4 件)

Yasaka T 他、Excitatory and inhibitory spinal lamina II interneurons that receive inputs from putative low-threshold mechanoreceptors in adults rats. The 5th Asian Pain Symposium. 2013、12、18-20、岡崎
Yasaka T 他、A subset of lamina II excitatory interneuron relaying low-threshold mechanoreceptive input

to lamina I projection neurons in the rat spinal cord. Neuroscience 2013 - Society for Neuroscience the 43rd Annual Meeting. 2013, 11, 9-13、サンディエゴ
Hughes DI 他、Parvalbumin-expressing cells provide presynaptic (axo-axonic) inputs on to myelinated afferents in the rat spinal dorsal horn. Neuroscience 2013 - Society for Neuroscience the 43rd Annual Meeting. 2013, 11, 9-13、サンディエゴ
八坂敏一 他、脊髄後角において低閾値機械受容線維終末をシナプス前抑制する膠様質ニューロンの同定、第 64 回西日本生理学会、2013, 10, 18-19、北九州
八坂敏一 他、脊髄後角膠様質介在ニューロンの構造と機能および侵害受容情報処理回路における役割、第 90 回日本生理学会大会、2013, 3, 27-29、東京
八坂敏一 他、ラット脊髄後角で低閾値機械受容線維とコンタクトしている興奮性及び抑制性 II 層インターニューロン群、第 36 回日本神経科学大会、2013, 6, 20-23、京都
八坂敏一 他、ラット脊髄膠様質細胞の分類と痛覚伝達に関わる後角内局所神経回路における役割、第 35 回日本疼痛学会、2013, 7, 12-13、大宮
Yasaka T 他、A possible neuronal circuit for relaying low-threshold mechanoreceptive input to lamina I projection neurons in the rat spinal cord. The 14th World Congress on Pain. 2012, 8, 27-31、ミラノ
八坂敏一 他、ラット脊髄後角内で VGLUT1 免疫陽性神経終末とコンタクトを持つ II 層興奮性介在ニューロンの解析、第 89 回日本生理学会大会、2012, 3, 29-31、松本
八坂敏一 他、ラット脊髄において低閾値機械受容入力を第 1 層投射細胞に中継している第 1 層興奮性介在ニューロン、第 35 回日本神経科学大会、2012, 9, 18-21、名古屋
八坂敏一 他、脊髄介在ニューロンの構造と機能および侵害受容情報処理回路における役割、第 88 回日本生理学会大会、2011, 3, 28-30、横浜(震災のため紙面のみ)
八坂敏一 他、新生仔期カプサイシン処置ラットにおいて観察された C 線維の入力を受ける脊髄後角第 II 層介在神経群、第 34 回日本神経科学大会、2011, 9, 14-17、横浜
八坂敏一 他、脊髄後角膠様質興奮性介在ニューロンと非侵害受容神経終末間コンタクトの解析、第 62 回西日本生理学会、2011, 10, 14-15、佐賀
八坂敏一 他、脊髄後角における非侵害

受容性神経終末 - II 層興奮性介在細胞コンタクトの解析、平成 23 年度生理研研究会「痛みの病態生理と神経・分子機構」2011, 12, 21-22、岡崎

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八坂 敏一 (YASAKA Toshiharu)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：20568365

研究協力者 (海外共同研究者)

Andrew J Todd

グラスゴー大学・教授

David I Hughes

グラスゴー大学・講師