

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08683

研究課題名(和文) 投射ニューロン特異的カルシウムイメージングを用いた疼痛評価系の確立

研究課題名(英文) Establishment of pain evaluation system by using projection neuron-specific calcium imaging in the spinal dorsal horn

研究代表者

西田 和彦 (NISHIDA, Kazuhiko)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：80448026

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄後角投射ニューロン特異的カルシウムイメージングを行うための第一歩として、これらニューロンの発生時期と発生ドメインを明らかにし、その分子マーカーの同定を目指すことにした。EdUを用いた神経細胞の誕生時期の解析より、投射ニューロンのほとんどは胎生9.5日目から10.5日目までに最終分裂を終えることが明らかとなった。この時期に生まれる前駆細胞はd11からd16の6種類存在する。d14からd16由来のLbx1系譜細胞を標識する遺伝子改変マウスを用いた解析、およびマーカー分子を用いた組織化学的解析より、投射ニューロンのほとんどはd15由来であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In order to establish projection neuron-specific calcium imaging in the spinal dorsal horn, I performed birthdate and lineage analyses of these neurons and aimed at the identification of their specific markers. Birthdate analysis using EdU revealed that most projection neurons are born between E9.5 and E10.5 in the mouse. In the developing dorsal neural tube, six classes of neuronal populations (d11-d16) are born from distinct progenitor domains around E10. Further analysis using reporter mice labeling Lbx1 lineage neurons (d14-d16) and histochemistry demonstrated that most projection neurons are derived from the d15 progenitor domain.

研究分野：神経科学、分子生物学

キーワード：脊髄後角 疼痛 投射ニューロン カルシウムイメージング

### 1. 研究開始当初の背景

我々が日常感じる疼痛は極めて主観的なものであり、その質と程度を評価するのは極めて困難である。この質と程度を決めているのは、疼痛の伝達に關与する多くの神経細胞の発火パターンであると考えられる。したがって、そのパターンを測定することができれば、主観的な痛みを記述し、痛みの違いを客観的に理解することが可能になると思われる。

脊髄後角は一次求心性線維により伝達された体性感覚刺激を中継する部位であるが、脊髄後角に存在する様々なニューロンのうち高次脳中枢への伝達を直接担うのは投射ニューロンである。私はこれまで *in vivo* カルシウムイメージングを用いて脊髄後角ニューロンの神経活動パターンを網羅的に解析し、神経活動の三次元分布を明らかにしてきた。もし脊髄後角投射ニューロン特異的なカルシウムイメージングが可能になり、その発火パターンの網羅的解析が実現されれば、痛みの客観的評価の道が大きく開かれると期待される。

### 2. 研究の目的

投射ニューロン特異的カルシウムイメージングを行うためには、このニューロンを特異的に標識する分子マーカーの同定、およびそのマーカー陽性細胞特異的にカルシウムインディケーターを発現する遺伝子改変マウスの樹立が有用であると思われる。しかしながら投射ニューロン特異的分子マーカーは未だ同定されていない。

そこで本研究ではこれらニューロンの分子マーカーの同定を目的として、その発生時期と発生ドメインに着目することにした。脊髄後角に存在する多種多様なニューロンは、発生初期の脊髄原基において転写因子の発現パターンを異にする複数の前駆細胞ドメインを由来として発生することが過去の知見から明らかとなっている。したがって、投射ニューロンもこれらのドメインのうちのいずれかより生じ、特異的な転写因子によりその発生運命が制御されていると考えられる。そこで申請者は脊髄後角投射ニューロンの発生時期と発生ドメインの詳細を明らかにすることで、その発生運命を決定する候補分子の同定を行う道筋をつけることができると考え、以下の解析を行った。

### 3. 研究の方法

(1) まず逆行性トレーサー、コレラトキシン B (CTB) を用いてマウス脊髄後角投射ニューロンを特異的に標識する系を確立した。比較対象として、脊髄内長距離ニューロン、局所介在ニューロンの標識も併せて行った。

(2) 次に投射ニューロンの発生時期と発生ドメインを決定する以下の解析を行った。発生時期(最終分裂時期)の特定は、時期特異的な EdU の導入を用いてこれを行った。また、脊髄後角ニューロンの前駆細胞の一部のドメインに発現する転写因子 Lbx1 の系譜細胞を特異的に LacZ ( $\beta$ -Gal) で標識する遺伝子改変マウス (Lbx1-Cre; ROSA26-LSL-LacZ) を用いて、投射ニューロンの系譜解析を行い、発生ドメインの解析を行った。さらに、それぞれの発生ドメイン由来のニューロンを標識するマーカーによる組織化学的解析により、投射ニューロンの発生ドメインの同定を行った。

### 4. 研究成果

(1) マウス脊髄後角投射ニューロンを標識するために、これらニューロンの 9 割以上が軸索投射する脳幹の外側結合腕傍核 (LPb) に CTB を注入した。さらに、逆行性標識された頸髄の投射ニューロンを抗 CTB 抗体により免疫染色し、これらを可視化した。その結果、同側、対側の I 層、背側索に局在する投射ニューロンの標識が可能になった (図 1 上)。脊髄内長距離ニューロン、局所介在ニューロンを標識する系も同様に確立した。

(2) マウス脊髄後角ニューロンの発生時期である胎生 9.5 日目から 12.5 日目の各時期の分裂細胞を EdU で標識したマウスを用いて、投射ニューロンの最終分裂時期の特定を行った。その結果、同側、対側投射する I 層、背側索のすべての投射ニューロンは胎生 9.5 日目から 10.5 日目に最終分裂を終える早生まれ集団であることが明らかとなった (図 1)。一方、脊髄内長距離ニューロンと局所介在ニューロンの発生時期はこれより遅い時期であり、神経発生の観点からも投射ニューロンとこれらは別の集団であることが示唆された。

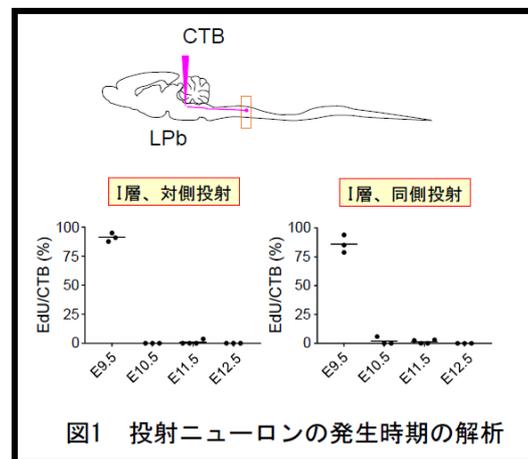


図1 投射ニューロンの発生時期の解析

(3) 胎生 10 日目頃に最終分裂を終える脊髄後角ニューロンは 6 つの前駆細胞ドメイン

(d11-d16) から発生することが過去の知見から明らかとなっている。これらのドメインのうち d14-d16 の3つのドメインに局在する前駆細胞は転写因子 Lbx1 陽性である。そこで Lbx1 系譜細胞を  $\beta$ -Gal で標識する遺伝子改変マウスを用いて投射ニューロンの系譜解析を行った。その結果、投射ニューロンのほとんどは Lbx1 の系譜であることが明らかとなった(図2)。

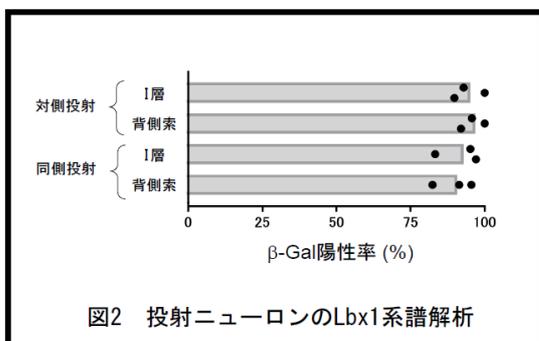


図2 投射ニューロンのLbx1系譜解析

(4) 上記の結果より、投射ニューロンは前駆細胞ドメインの d14-d16 より発生することが分かった。d14-d16 ドメインのうち、d14, d15 由来のニューロンはそれぞれ脊髄後角に存在する抑制性、興奮性ニューロンになることが過去の知見から明らかとなっている。そこで、投射ニューロンの発生ドメインをさらに絞り込むために興奮性、抑制性ニューロンのマーカーである VGLUT2、GAD67 の in situ ハイブリダイゼーションを行った。その結果、投射ニューロンのほとんどは VGLUT2 陽性であることが明らかになり、これらは d15 ドメイン由来であることが示唆された(図3)。

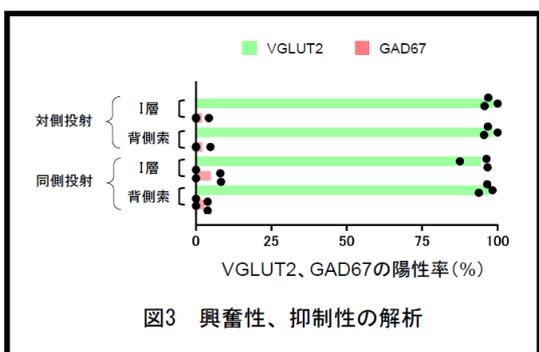


図3 興奮性、抑制性の解析

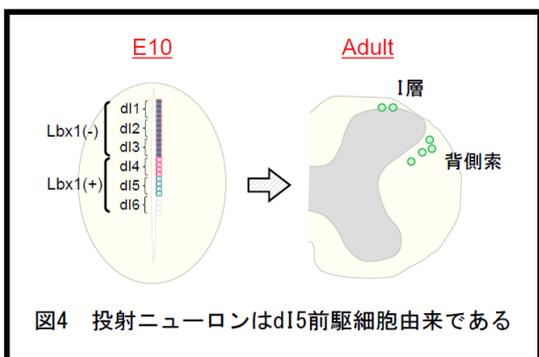


図4 投射ニューロンはd15前駆細胞由来である

以上の結果より、マウス脊髄後角投射ニューロンは胎生 10 日目頃に最終分裂を終える早生まれ集団であり、そのほとんどは d15 前駆細胞由来であることが明らかとなった(図4)。研究期間内に投射ニューロン特異的マーカー分子の同定、および投射ニューロン特異的カルシウムイメージングの構築までには至らなかったが、今後はこの結果得られた知見をもとに d15 特異的に発現する分子のスクリーニングを目指し、当初の目的に向けて前進できればと考えている。

## 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3件)

- (1) Nishida K and Ito S. Developmental origin of long-range neurons in the superficial dorsal spinal cord. **Eur. J Neurosci** 46, 2608-2619 (2017) doi: 10.1111/ejn.13736 (査読有)
- (2) Katano T, Fukuda M, Furue H, Yamazaki M, Abe M, Watanabe M, Nishida K, Yao I, Yamada A, Hata Y, Okumura N, Nakawawa T, Yamamoto T, Sakimura K, Takao T, and Ito S. Involvement of brain-enriched guanylate kinase-associated protein (BEGAIN) in chronic pain after peripheral nerve injury. **eNeuro** 3(5) ENEURO.0110-16 (2016) doi: 10.1523/ENEURO.0110-16.2016 (査読有)
- (3) Nishida K. Neuronal circuitry for sensory processing in the spinal dorsal horn. **Seikagaku**. 88(2),229-232 (2016) doi:10.14952/SEIKAGAKU.2016.880229 (査読無)

[学会発表](計2件)

- (1) 西田和彦、伊藤誠二. Developmental origin of long-range projection neurons in the spinal dorsal horn. 第40回日本神経科学大会、2017年7月21日、幕張メッセ(千葉県千葉市)
- (2) Matsumura S, Taniguchi W, Nishida K, Nakatsuka T, and Ito S. Chasing morphological changes of neuronal processes in the spinal dorsal horn in an inflammatory pain model by using two-photon microscopy. The 45<sup>th</sup> annual meeting of Society for Neurosciences. 2015年10月、シカゴ(アメリカ)

[図書](計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www3.kmu.ac.jp/medchem/>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

西田 和彦（NISHIDA, Kazuhiko）

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：80448026

### (2)研究分担者

伊藤 誠二（ITO, Seiji）

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：80201325

松村 伸治（MATSUMURA, Shinji）

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70276393