

平成 30 年 6 月 15 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：15K08684

研究課題名(和文) In vivoイメージングによる疼痛維持機構におけるプロスタノイドの役割の可視化

研究課題名(英文) Investigation of the role of prostanoids in pain maintenance using in vivo imaging

研究代表者

松村 伸治 (MATSUMURA, Shinji)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70276393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：神経障害性疼痛の特徴の一つは、触覚刺激が痛覚として知覚されることである。この変調を来す可塑性機構を脊髄ニューロンの刺激-応答地図の中で形態学的、機能的変化として可視化を行った。長時間にわたり、連続的に形態変化を追跡すると共に、それに伴うカルシウム動態変化を記録し、形態と機能の連関の解析を試みた。自発呼吸下の個体のin vivo標本において2光子顕微鏡を用いて複数の脊髄後角ニューロンの細胞内カルシウムイメージングを行った。皮膚への機械的な刺激に反応して細胞内カルシウム濃度増加するニューロンの中にPGE2によってその反応が記録した。そのニューロンは脊髄後角表層に存在した。

研究成果の概要(英文)：One of the features of neuropathic pain is that tactile stimulation is perceived as pain sensation. We attempted to visualize the plasticity mechanism that causes this modulation as a morphological and functional change in the spinal cord neuronal network. We continuously tracked morphological changes of neuronal structures and recorded calcium ion dynamics in neuronal somata associated with them. Intracellular calcium imaging of multiple spinal dorsal horn neurons was performed in two-photon microscopy on in vivo preparations of spontaneous-respiratory individuals. The response was recorded by PGE2 in neurons that increase intracellular calcium ion concentration in response to mechanical stimulation to the skin. The neuron was present on the dorsal horn surface of the spinal cord.

研究分野：神経生物学

キーワード：疼痛 神経障害性疼痛 多光子励起顕微鏡 プロスタグランジンE2

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は神経を含む組織損傷後、損傷の治癒後も長期にわたり持続する激痛とされ、多くの症例では一旦確立されてしまった疼痛は様々な治療に対し抵抗性である。この疼痛は非常に多くの生体因子が関与し、DNA マイクロアレイ等を用いた網羅的な研究が試みられているが、発生機序まで深く掘り下げることができていない。我々の研究グループは、第5腰髄脊髄神経(L5)の単独切断による神経障害性疼痛モデル(L5-SNTモデル)をマウスで確立し、末梢性神経障害性疼痛は末梢神経からの異常入力から脊髄後角のグルタミン酸遊離→NMDA受容体の活性化→神経型NO合成酵素(nNOS)の活性化→神経障害性疼痛発症・維持という機能的かつ可逆的变化で生じるという研究成果を得た。我々はPGE合成酵素のKOマウスでは神経障害性疼痛が消失すること、プロスタグランジン(PG)_{E2}がEP1~EP4の4つの受容体サブタイプがそれぞれ異なる作用機序で神経障害性疼痛発症・維持に関与する中枢感作を引き起こすことを脊髄後角組織レベルで明らかにした。シナプス終末に存在するEP1活性化によりグルタミン酸放出を増大させシナプス後ニューロンのNR2Bのリン酸化を促進する。ミクログリアのEP2を活性化してNOとともにその遊走を抑制する。EP3を介してアクチン動態に作用し細胞骨格の再構築に関与する。EP4を介してノシセプチンを遊離しシナプス前主末からのグルタミン酸放出を増大させNMDA受容体-NO系を活性化する。EP2はまたシナプス後ニューロンでグリシン受容体を阻害し痛みの感作に寄与することをHarveyらが報告している。

2. 研究の目的

我々が新規確立した*in vivo*脊髄標本を用いたバイオイメージング法により体性感覚情報伝達神経回路網の構造とその活動を経時的に同時に可視化することが可能となった。神経障害性疼痛の発生機序に大きな役割を担うと考えられる脊髄後角内の神経可塑性を伴う感覚情報伝達系の機能異常に焦点を絞り、興奮性と抑制性介在ニューロンを選択的にイメージングして刺激-応答地図を作成し、同定したニューロンでPGE₂の作用機序を受容体サブタイプレベルで詳細に解析する。疼痛モデルにおいて疼痛維持の可塑性形成に関与するニューロンの形態学的変化と機能的変化にPGE₂がどのように関わるかを解明することを目的とした。これらは、神経障害性疼痛に対して選択的PGE₂受容体サブタイプ拮抗薬の臨床応用につながる糸口につながると予想した。

3. 研究の方法

標的ニューロン特異的に蛍光タンパク質を発現するマウスの作製

ニューロン特異的なプロモーター遺伝子

を用いて細胞特異的に発現する蛍光タンパク遺伝子を脊髄に*in utero*遺伝子導入法により導入し、脊髄腰膨大部後角ニューロン特異的にCa²⁺イメージングを行った。YCnano50よりもS/N比の高いGCaMP5を発現するマウスも用いた。

急性スライス標本を用いたニューロンへのPGE₂の効果の解析

Fura2などのCa²⁺プローブ試薬の複数のニューロンへの選択的な負荷は困難だったので、ニューロン特異的に発現する遺伝的プローブによってPGE₂受容体サブタイプの脊髄後角ニューロンにおける役割を検討した。

*in vivo*標本における動物脊髄のニューロンのEP受容体の役割 *in vivo*標本に多光子励起顕微鏡を用い脊髄後角ニューロンのCa²⁺イメージングを行い脊髄後角ニューロンのEP受容体の役割の解析を試みた。グルタミン酸投与による反応に対するPGE₂の修飾作用、皮膚への機械刺激にตอบสนองするニューロンに対するPGE₂の修飾作用を記録した。

4. 研究成果

標的ニューロン特異的に蛍光タンパク質を発現するマウスの作製

ニューロン特異的なプロモーター遺伝子を用いて細胞特異的に発現する蛍光タンパク遺伝子を脊髄に*in utero*遺伝子導入法により導入し、脊髄腰膨大部後角ニューロン特異的に蛍光タンパク発現に成功した。*in vivo*標本作製に際して呼吸・心拍振動ノイズをイメージングに耐えられる程度に抑えるために、動物麻酔法、椎弓削除法、脊椎固定法の条件検討を行い(図1)皮膚つまみ刺激でカルシウム濃度増大が惹起されるニューロン

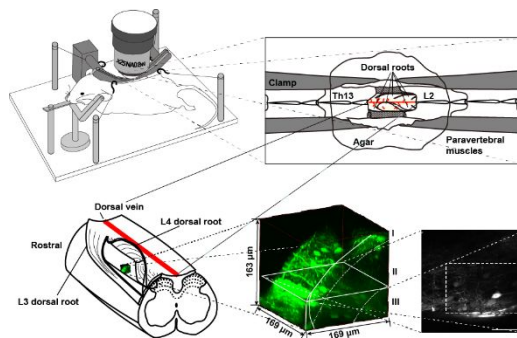


図1. *in vivo*標本 自発呼吸している麻酔下のマウスの脊髄腰膨大部を露出し後根神経束を除去して脊髄後角を露出し顕微鏡で経時的に観察

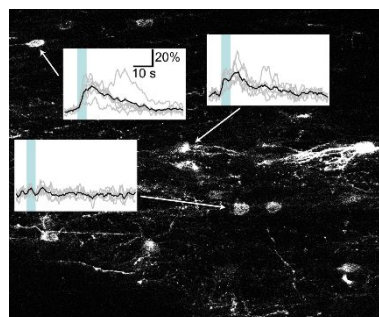


図2. ニューロン特異的に蛍光タンパク質を導入した脊髄に皮膚刺激を施すことにより惹起された細胞内カルシウム濃度の経時的変化

観察法を確立した(図2)

急性スライス標本を用いたニューロンへの PGE₂ の効果の解析

我々は脊髄後角における PGE₂ の作用には 4 つの受容体サブタイプが関与することを明らかにしてきたが、その中の EP2 に関しては、マイクログリアの EP2 を活性化して NO とともにその遊走を抑制することを示した。ニューロンにおける EP2 の役割を検討するために、GCaMP5 がニューロン特異的に発現したマウス脊髄から作製した急性スライス標本を用いて EP2 受容体の役割を検討した。脊髄後角ニューロンすべてに GCaMP5 が発現する標本で惹起されたグルタミン酸誘導カルシウム増大効果は PGE₂ あるいは EP2 阻害薬により 68%のニューロンで修飾されたのに対し、抑制性のニューロンでは 43%だった(図3)。このことは、興奮性ニューロンに EP2 受容体を介した修飾作用があることを示

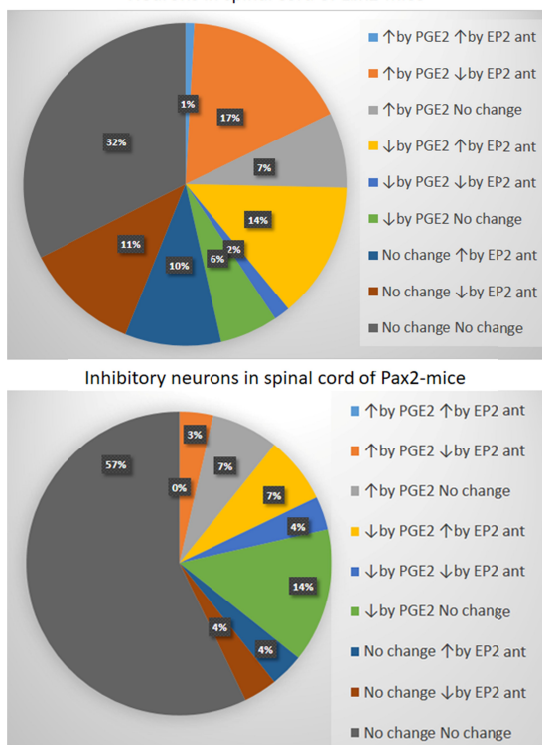


図3. 脊髄後角の興奮性・抑制性ニューロンの両方に GCaMP5 が発現したマウス(Lbx-1 mice)と抑制性ニューロンのみに発現したマウス(Pax2-mice)のグルタミン酸に反応するニューロンへの PGE₂ と EP2 阻害剤(PF-04418948)の効果

唆している。

in vivo 標本における動物脊髄のニューロンの EP 受容体の役割

体性感覚刺激により引き起こされた神経活動への PGE₂ の修飾効果を直接観察した報告は今までなかった。そこで、我々が確立した *in vivo* 標本を多光子顕微鏡下に観察する系を用いて、皮膚つまみ刺激に应答する神経活動への効果を記録した。グルタミン酸投与によりカルシウム濃度が増大するニューロ

ンの中で、PGE₂ によりその効果が増強され

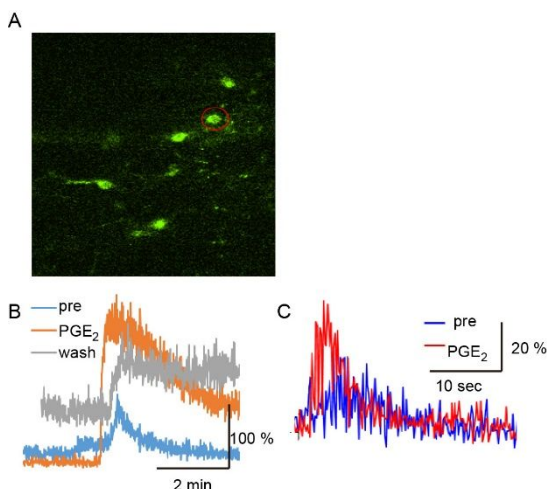


図4. A)子宮内電気穿孔法によりYCnano50を発現した脊髄後角ニューロン B)赤丸のニューロン(A)の1mM グルタミン酸による細胞内カルシウム濃度の増大に対する10μM PGE₂の修飾効果 C)皮膚つまみ刺激応答の10μM PGE₂の増強効果

る細胞体で皮膚つまみ刺激も増強された(図4)

これは、今までの我々の行動やスライス標本を用いた結果(図5)を補強した。

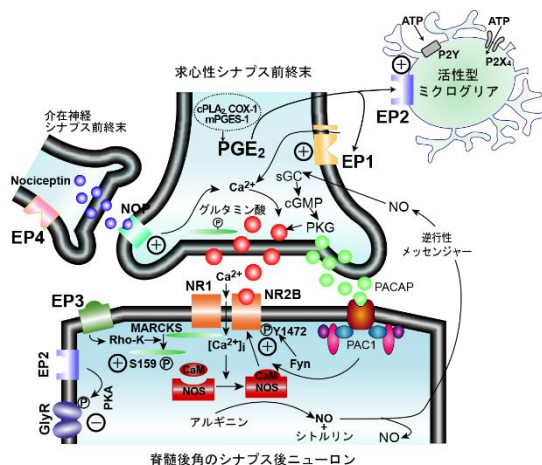


図5. 脊髄後角のシナプスにおいて想定される PGE₂ の役割

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)

Impaired peripheral nerve regeneration in type-2 diabetic mouse model.

Vuong PM, Nguyen HT, Katano T, Matsumura S, Saito A, Yamada A, Furue H, Ito S.

Eur J Neurosci, 47(2):126-139, 2018.1 (査読有)

Na⁺/K⁺-ATPase coupled to endothelin receptor type B stimulates peripheral nerve regeneration via lactate signaling.

Tu NH, Katano T, Matsumura S, Funatsu N,

Pham VM, Fujisawa JI, Ito S.

Eur J Neurosci, 46(5):2096-2107, 2017.9 (査読有)

RNA editing enzyme ADAR2 is a mediator of neuropathic pain after peripheral nerve injury.

Uchida H, Matsumura S, Okada S, Suzuki T, Minami T, Ito S.

FASEB J, 31(5):1847-1855, 2017.5 (査読有)

神経細胞特異的に蛍光タンパクを発現するマウスを用いた坐骨神経切断-再生モデルの確立と神経再生メカニズムの解析 伊藤 誠二、Tu Nguyen H、Pham Vuong H、片野 泰代、松村 伸治 麻酔 66 巻増刊 Page S148-S156 2017.11 (依頼原稿総説)(査読無)

Role of c-Jun N-terminal kinase in late nerve regeneration monitored by in vivo imaging of thyl-yellow fluorescent protein transgenic mice.

Tu NH, Katano T, Matsumura S, Vuong PM, Muratani T, Minami T, Ito S

Eur J Neurosci, 43(4):548-560, 2016.2 (査読有)

In vivo two-photon imaging of structural dynamics in the spinal dorsal horn in an inflammatory pain model.

Matsumura S, Taniguchi W, Nishida K, Nakatsuka T, Ito S.

Eur J Neurosci, 41(7):989-997, 2015.4 (査読有)

Comparison of mechanisms of allodynia induced by acromelic acid A between early and late phases.

Omoto H, Matsumura S, Kitano M, Miyazaki S, Minami T, Ito S

Eur J Pharmacol, 760:42-48, 2015.4 (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

Ito S, Nguyen TH, Katano T, Matsumura S, Nomuo F, Pham VM. Na⁺/K⁺-ATPase coupled to ETBRpromotes peripheral nerve regeneration via lactate signaling. The 47th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Washington, U.S.A.) (国際学会) 2017 年

Pham VM, Nguyen TH, Katano T, Matsumura S, Ito S. Impaired peripheral nerve regeneration in type 2 diabetic mouse model. The 47th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Washington, U.S.A.) (国際学会) 2017 年

Tu NH, Ito S, Matsumura S, Katano T, Pham VM Involvement of Na⁺/K⁺-ATPase in peripheral nerve regeneration via lactate signaling in sciatic nerve transection-regeneration model. The 46th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (San Diego, U.S.A.)(国際学会) 2016 年

Matsumura S, Taniguchi W, Nishida K, Nakatsuka T, Ito S. Chasing morphological changes of neuronal processes in the spinal dorsal horn in an inflammatory pain model by using two-photon microscopy. The 45th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Chicago, U.S.A.)(国際学会) 2015 年

Nguyen HT, Matsumura S, Katano T, Ito S. Involvement of c-jun N-terminal kinase in neurite extension of cultured DRG neurons. The 45th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Chicago, U.S.A.) (国際学会) 2015 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔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

松村 伸治 (MATSUMURA, Shinji)
関西医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70276393

(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

西田 和彦 (NISHIDA, Kazuhiko)
関西医科大学・医学部・助教
研究者番号：80448026