

令和元年6月18日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05233

研究課題名(和文) 痒みと神経障害性搔痒の中枢性感作機構と脊髄後角の神経ネットワークに関する研究

研究課題名(英文) Studies on central mechanisms of acute and chronic itch and its network in the spinal cord

研究代表者

伊藤 誠二 (Ito, Seiji)

大阪医科大学・その他部局等・客員教授

研究者番号：80201325

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：痒みは掻きたくする衝動を起こさせる不快な感覚であり、アトピー性皮膚炎や透析患者を苦しめる。皮膚が正常な場合には掻く、噛むという機械的な刺激は痒みを抑制し、強力な鎮痛薬モルヒネは痒みを誘発するというように、痒みと痛みで正反対の感覚が生じる。痛みと痒みは密接に相互に関係し、伝達経路を共有しているように見えるが、痒みの情報伝達機構は不明な点が多い。本研究では急性と慢性の痒みモデルマウスを用いて、痒みの情報伝達機構と伝達経路に痛みと共通するものがあることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、我々はNMDA型グルタミン酸受容体の1つGluN2Bサブユニットの活性化が慢性疼痛の維持に関与することを明らかにしてきた。最近、ガストリン放出ペプチド(GRP)が痒みの神経伝達物質であることがわかり、痒みの研究が脚光を浴びている。

本研究で痒みの情報伝達にもGluN2Bサブユニットの活性化が重要であること、その活性化はGRP経路より上流で働くことを初めて明らかにした。さらに、痒みが知覚される脳への伝達経路は痛みと共通する部位があることを明らかにした。本研究成果は学術的な意義だけでなく、痒みの発生、維持機構を理解し、痒みをコントロールし、治療するための重要な知見となる。

研究成果の概要(英文)：Itch is defined as unpleasant sensation that evokes the desire to scratch, but chronic itch is a tormenting symptom in patients with atopic dermatitis and hemodialysis. In normal skin, mechanical stimuli such as scratch and bite relieve itch and morphine, a strong analgesic, induces itch. Thus itch and pain are intimately related and may share transduction pathways in the peripheral and central nervous systems. However, transduction mechanisms of itch remain to be known.

In the present study, to address this, we prepared mouse models of acute and chronic itch and demonstrated the mechanisms and pathways common to itch and pain in the central nervous system.

研究分野：病態医化学(中でもホルモンの情報伝達機構) 神経科学(中でも神経障害性疼痛の発生・維持機構)

キーワード：痒みの動物モデル クロロキン セロトニン ガストリン放出ペプチド NMDA受容体 c-fosの発現 脊髄と延髄 遺伝子改変マウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

痒みは掻きたくなる衝動を起こさせる不快な感覚、非常にありふれた感覚で、アトピー性皮膚炎や透析患者をはじめとする慢性的な痒みは慢性疼痛と同様にひどい精神的な苦痛や生活の質の低下を引き起こす。しかし、通常、痒みは掻けば治まるので、慢性疼痛のように重篤と捉えられなかった。そのため、慢性疼痛に比べて、痒みに関係する研究者や研究費が少なく、痒みに関する研究は皮下にヒスタミン等の起痒物質を注入する行動実験が中心でその発生・持続機構の解明が行われてこなかった。

痛みと痒みを引き起こす刺激は、皮膚から無髄の一次求心性線維であるC線維を介して一次中継地である脊髄後角に伝達される。皮膚が正常な場合には掻く、噛むという機械的な刺激は痒みを抑制し、強力な鎮痛薬モルヒネは痒みを誘発するという正反対の感覚を生む。最近、ガストリン放出ペプチド (GRP)、B型ナトリウム利尿ペプチド (Nppb) が脊髄後角での痒みの神経伝達物質である可能性が報告されたことから、痒みの研究が脚光を浴びるようになり、研究費が投入されるようになった。現在、生化学的研究は端緒についたところで、痒みの中枢性感作に関わる情報伝達機構の解明ははまだ未熟な段階にある。

本研究では、我々の20年以上の疼痛研究で用いた実験手技と培った経験を土台に、痛覚と痒みの脊髄・延髄での情報伝達機構、脳の高次中枢への伝達経路が同じなのかという興味ある課題を明らかにするために、さまざまな遺伝子改変マウスを用いて搔痒動物モデルを作製し、痒みの中枢性感作機構を明らかにする着想に至った。

2. 研究の目的

痛覚伝達における脊髄後角での中枢性感作、神経可塑的变化は、一次求心性線維から遊離される神経伝達物質グルタミン酸が脊髄二次ニューロンのNMDA型グルタミン酸受容体のチャンネル活性を変化させることにより生じる。NMDA受容体はGluN1とGluN2A~2Dのサブユニットが2つずつ合わさって、4つのサブユニットでイオンチャンネルを形成するが、我々はGluN2Bの1472番目のTyr残基のリン酸化が神経障害性による慢性疼痛の維持に関与することを明らかにした。

本研究は、(1)急性搔痒の中枢性感作におけるグルタミン酸NMDA受容体の役割、情報伝達機構の解明、(2)搔痒伝達と痛覚伝達に関与する分子、経路の類似点と相違点の解析、(3)多光子励起顕微鏡を用いた蛍光タンパク遺伝子導入マウスの*in vivo*イメージングにより神経ネットワークを明らかにすることを申請時の当初の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 急性搔痒モデル、慢性搔痒モデルの作製と痒み行動の評価

急性搔痒モデルではヒスタミン、クロロキン、セロトニンなど様々な痒み物質注射を頬に注入し、投与直後から自発的な搔破行動をビデオに録画して測定した。慢性搔痒モデルとして、乾燥性皮膚搔痒モデルでは毛剃りした左頬にアセトンとエーテルの混液を1日2回、ビタミンD塗布モデルではビタミンD3のアナログ体MC903を1日1回、1週間頬に添付した後に自発的な搔破行動をビデオに録画して測定した。

(2) 痒みの伝達経路の解析

外部刺激の入力に応答した神経細胞では、約30分後に最初期遺伝子*c-fos*のmRNA、1~2時間後には*c-Fos*タンパク質レベルの発現上昇が一過性にみられ、神経細胞活動性の指標として用いられている。本研究では、免疫染色による*c-Fos*の発現上昇を用いて、痒みの伝達経路の解析を行った。さらに、*c-fos*遺伝子のプロモーター下で神経活動を抑制する遺伝子改変マウスFos-tTA、Fos-EGFP、TRE-hM4Diマウスを作製し、痒みの行動解析を行った。

(3) 遺伝子改変マウス

NMDA受容体GluN2Bサブユニットの1472番目のTyr残基がリン酸化できないノックインマウス(Y1472F-KI)は、東大医科研山本雅名誉教授より供与された。Fos-tTA、Fos-EGFPダブルトランスジェニックマウスとTRE-hM4Diマウスは米国ジャクソン研究所から購入した。

4. 研究成果

(1) 急性搔痒、慢性搔痒の中枢性感作におけるNMDA受容体の役割

クロロキン誘発性搔痒のグルタミン酸NMDA受容体GluN2Bのリン酸化の関与

野生型マウスにクロロキンを投与すると投与直後から搔破行動がみられ、三叉神経脊髄路核の後角内側の浅い層のニューロンにクロロキン刺激に応答する*c-Fos*の発現が見られた。これらのニューロンの多くは痒み伝達に重要なGRP受容体を発現していた。Y1472F-KIマウスでクロロキンに対する痒み行動の低下、*c-Fos*の発現細胞数の低下がみられた。これらの結果は、急性搔痒にも三叉神経脊髄路核にあるニューロンのGluN2Bの1472番目のTyr残基のリン酸化が関与することが初めて示された。

慢性搔痒モデルにおけるグルタミン酸 NMDA 受容体 GluN2B のリン酸化の関与
慢性搔痒モデルとして作製した乾燥性皮膚搔痒モデルでも Y1472F-KI マウスにおける痒み行動の低下がみられたことから、神経障害性疼痛を引き起こす慢性疼痛モデルと同様に、慢性搔痒においても GluN2B のリン酸化の関与が明らかになった。

(2) 搔痒伝達に関する分子と情報伝達機構の解明

次に NMDA 受容体の活性化と GRP-GRP 受容体経路の痒み伝達における相互関係を解析した。野生型、Y1472F-KI マウスの大槽内に GRP を投与したところ、いずれのマウスも全身への激しい搔破行動を引き起こし、その数に差は見られなかった。さらに、NMDA の大槽内投与は野生型において激しい搔破行動を引き起こすが、GRP 受容体の拮抗剤 RC-3095 により抑制された。これらのことから痒み伝達において GRP-GRP 受容体経路は NMDA 受容体の活性化の下流で働くことが示された (図 1)。

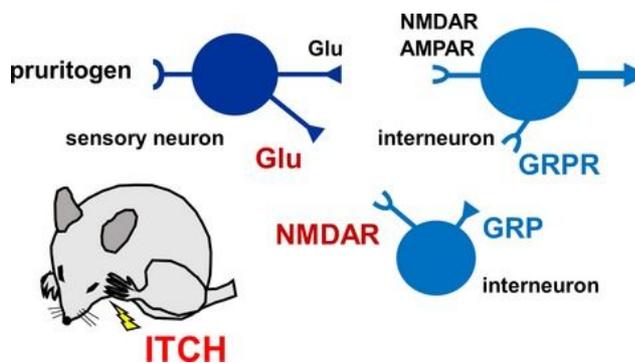


図 1 脊髄・延髄における痒みの情報伝達機

(3) クロロキン誘発搔痒とセロトニン誘発搔痒は異なる伝達経路

セロトニンや 5-HT₂ セロトニンレセプター作動薬 -メチルセロトニン刺激による搔破行動と測定したところ野生型と Y1472F-KI マウスで有意な差が見られなかった。-メチルセロトニンに対する c-Fos の発現に対しても野生型と Y1472F マウスでは有意な差が見られなかった。さらに、GluN2B の選択的な阻害薬 CP101,606 や Tyr 残基のリン酸化阻害薬 PP2 の大槽内投与は、セロトニンに対する搔破行動に変化をあたえなかった。これらのことから、三叉神経脊髄路核において急性搔痒には NMDA 受容体を介するものと介さない少なくとも2つの伝達経路があることが示された。

(4) 痒みと痛覚に関する伝達経路の類似点と相違点の解析

急性搔痒モデルでは、脊髄や三叉神経脊髄路核において痒み刺激だけでなく、痛み刺激に対する c-Fos の発現位置は非常によく似ており、これらが異なる神経回路により伝達されているのか、さらにストレスによる非特異的的刺激により c-Fos の発現が上昇しているのか区別するのは困難であった。慢性搔痒モデルは、急性搔痒モデルと異なり、恐怖などのストレスに伴う非特異的な c-Fos 発現は減り、自発的な搔破行動による脳の神経活動を反映すると考えた。

ビタミン D アナログ塗布による慢性搔痒モデルでは、1 週間処置後の皮膚で表皮の肥大化や炎症メディエーターの TSLP mRNA の発現増大がみられた。実際、特異的な c-Fos 発現細胞群が parasubthalamic nucleus (PSTh)、central amygdala (CeA)、parabrachial nuclei (PB) やその他領域で見られた。これらの c-Fos 発現部位は痛覚伝達の経路でもあり、現在、ジニトロフルオロベンゼン塗布による慢性搔痒モデルにおいても c-Fos 発現解析を行っている。ビタミン D 塗布モデルとの発現を比較しながら、慢性搔痒に共通する脳部位の同定、痛覚伝達との類似点と相違点の解析を進めている。

(5) 遺伝子改変マウスによる痒みに関係するニューロンと伝達経路の同定

外部刺激の入力に反応し、c-Fos の発現上昇させるニューロンは 1 切片 (2 次元) あたり数 10 個ある。脊髄後角や三叉神経脊髄路核の神経ネットワーク (3 次元) を研究計画書に記載した多光子励起顕微鏡を用いた *in vivo* イメージングで解析するには、実験手技だけでなく、検出感度、検出部位など技術的に困難であった。そこで、当初の計画を変更し、痒みの刺激により活性化されるニューロン特異的に、c-fos 遺伝子のプロモーター下で神経活動が抑制される Fos-tTA, Fos-EGFP, TRE-hM4Di マウスを作製し、搔破行動への影響を検討した。

実験 3 日前に DOX を抜いたマウスを用いて左頬に生理食塩水、カプサイシン、クロロキンを注射し c-fos 発現下で hM4Di の発現を誘導した。12 時間後に大槽内に CNO を注射し hM4Di を活性化させ、30 分後に左頬に再度クロロキンを注射した。生理食塩水注射群と比較してカプサイシン、クロロキン注射群は共に 2 度目のクロロキン注射に対する搔破行動を低下させたが、カプサイシンとクロロキンで有意な差は見られなかった。カプサイシン注射後のクロロキン応答の低下はカプサイシン注射に伴う炎症による痒み応答の低下が原因である可能性が考えられた。

今後、本研究で明らかになった脳の部位に対して、Tet 発現誘導システムを用いて、痒み刺激や痛覚刺激に応答して活性化したニューロン特異的な細胞破壊や人為的活性化を行い、搔痒伝達と痛覚伝達の経路の相違点と類似点を解析する予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

Pham VM, Matsumura S, Katano T, Funatsu N, Ito S. Diabetic neuropathy research: from mouse models to targets for treatment. *Neural Regen Res*. 2019;印刷中 査読あり

Katano T, Takao K, Abe M, Yamazaki M, Watanabe M, Miyakawa T, Sakimura K, Ito S. Distribution of Caskin1 protein and phenotypic characterization of its knockout mice using a comprehensive behavioral test battery. *Mol Brain*. 2018;11: 63. 査読あり
DOI: 10.1186/s13041-018-0407-2

Harada M, Minami T, Ito S, Okuda-Ashitaka E. Development of a novel photoaffinity probe for labeling nocistatin receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;501:514-519. 査読あり
DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.05.028

Uchida H, Matsumura S, Katano T, Watanabe M, Schlossmann J, Ito S. Two isoforms of cyclic GMP-dependent kinase-I exhibit distinct expression patterns in the adult mouse dorsal root ganglion. *Mol Pain*. 2018;14. 査読あり
DOI: 10.1177/1744806918796409

Pham VM, Tu NH, Katano T, Matsumura S, Saito A, Yamada A, Furue H, Ito S. Impaired peripheral nerve regeneration in type-2 diabetic mouse model. *Eur J Neurosci*. 2018; 47(2):126-139. 査読あり
DOI: 10.1111/ejn.13771

Nishida K, Ito S. Developmental origin of long-range neurons in the superficial dorsal spinal cord. *Eur J Neurosci*. 2017;46(10):2608-2619. 査読あり
DOI: 10.1111/ejn.13736

Tu NH, Katano T, Matsumura S, Funatsu N, Pham VM, Fujisawa JI, Ito S. Na⁺/K⁺-ATPase coupled to endothelin receptor type B stimulates peripheral nerve regeneration via lactate signalling. *Eur J Neurosci*. 2017;46(5):2096-2107. 査読あり
DOI: 10.1111/ejn.13647

Uchida H, Matsumura S, Okada S, Suzuki T, Minami T, Ito S. RNA editing enzyme ADAR2 is a mediator of neuropathic pain after peripheral nerve injury. *FASEB J*. 2017;31(5):1847-1855. 査読あり
DOI: 10.1096/fj.201600950R

Hayashi M, Shinozuka Y, Shigenobu S, Sato M, Sugimoto M, Ito S, Abe K, Kobayashi S. Conserved role of *Ovo* in germline development in mouse and *Drosophila*. *Sci Rep*. 2017;7:40056. 査読あり
DOI: 10.1038/srep40056

Katano T, Fukuda M, Furue H, Yamazaki M, Abe M, Watanabe M, Nishida K, Yao I, Yamada A, Hata Y, Okumura N, Nakazawa T, Yamamoto T, Sakimura K, Takao T, Ito S. Involvement of Brain-Enriched Guanylate Kinase-Associated Protein (BEGAIN) in Chronic Pain after Peripheral Nerve Injury. *eNeuro*. 2016;3(5). 査読あり
DOI: 10.1523/ENEURO.0110-16.2016

Okamoto K, Ohashi M, Ohno K, Takeuchi A, Matsuoka E, Fujisato K, Minami T, Ito S, Okuda-Ashitaka E. Involvement of NIPSNAP1, a neuropeptide nocistatin-interacting protein, in inflammatory pain. *Mol Pain*. 2016;12. 査読あり
DOI: 10.1177/1744806916637699

Kawabata K, Nishimura I, Fujiwara T, Terauchi S, Minami T, Ito S, Okuda-Ashitaka E. Intrathecal administration of low-dose nociceptin/orphanin FQ induces allodynia via c-Jun N-terminal kinase and monocyte chemoattractant protein-1. *Eur J Neurosci*. 2016;43(11):1499-1508. 査読あり
DOI: 10.1111/ejn.13247

Inoue A, Uchida H, Nakazawa T, Yamamoto T, Ito S. Phosphorylation of NMDA receptor GluN2B subunit at Tyr1472 is important for trigeminal processing of itch. *Eur J Neurosci*. 2016;44(7):2474-2482. 査読あり
DOI: 10.1111/ejn.13337

〔学会発表〕(計 18 件)

Katano T, Takao K, Abe M, Yamazaki M, Watanabe M, Miyakawa T, Sakimura K, Ito S. Protein distribution and functional characterization of CASK-interacting protein 1 (Caskin1) in mice. The 48th annual meeting of the Society for Neuroscience (国際学会), 2018 年

Ito S, Nguyen HT, Katano T, Matsumura S, Funatsu N, Pham VM. Na⁺/K⁺-ATPase coupled to ETBR promotes peripheral nerve regeneration via lactate signaling. The 47th annual meeting of the Society for Neuroscience (国際学会), 2017 年

Pham VM, Nguyen HT, 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

(国際学会), 2017年

伊藤 誠二、痛みの研究の最新の知見、学術講演会 医学の進歩シリーズ 平成 29 年度第 1 回 (招待講演) 2017 年

伊藤 誠二、Nguyen Huu Tu、片野 泰代、松村 伸治、Pham Minh Vuong、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、日本麻酔科学会第 64 回学術集会 (招待講演) 2017 年

西田 和彦、伊藤 誠二、脊髄後角長距離投射ニューロンの発生、第 40 回日本神経科学大会 2017 年

井上 明俊、中澤 敬信、伊藤 誠二、痒みの神経伝達において NMDA 受容体 GluN2B サブユニットの Tyr1472 のリン酸化は重要である、第 110 回近畿生理学談話会、2017 年

Pham VM, Nguyen HT, Katano T, Matsumura S, Ito S. Study on the effect of diabetic neuropathy on peripheral nerve regeneration in mouse model. 16th World Congress on Pain (国際学会), 2016 年

〔図書〕(計 1 件)

伊藤 誠二、講談社、痛覚のふしぎ 脳で感知する痛みのメカニズム、224、2017 年

〔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

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：松村 伸治

ローマ字氏名：MATSUMURA, Shinji

所属研究機関名：関西医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号 (8 桁)：70276393

研究分担者氏名：西田 和彦

ローマ字氏名：NISHIDA, Kazuhiko

所属研究機関名：関西医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号 (8 桁)：80448026

研究分担者氏名：井上 明俊

ローマ字氏名：INOUE, Akitoshi

所属研究機関名：関西医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号 (8 桁)：50709152

研究分担者氏名：ファム ミン・ヴン

ローマ字氏名：PHAM Minh Vuong

所属研究機関名：関西医科大学

部局名：医学部

職名：研究員

研究者番号 (8 桁)：50828853

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：内田 仁司

ローマ字氏名：UCHIDA, Hitoshi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。