

令和元年12月4日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18885

研究課題名(和文) 感覚情報伝達に対する脊髄後角アストロサイトの役割解明

研究課題名(英文) The role of spinal dorsal horn astrocytes in sensory information processing

研究代表者

高露 雄太 (Kohro, Yuta)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：30723861

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄後角アストロサイトは、末梢神経損傷後における神経障害性疼痛の維持期への関与が報告されているが、正常時においてアストロサイトの機能変化自体が感覚情報伝達にどの程度影響を及ぼすかについては未だ不明な点が多い。本研究では、脊髄後角アストロサイト特異的に機能制御可能な方法を確認することで、機械刺激に対する応答性を変調し得ることを明らかにした。さらに、脊髄アストロサイトの活動性変化が末梢における侵害刺激受容後の機械刺激に対する過敏応答に重要であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、これまで未解明であった脊髄後角アストロサイトの感覚情報伝達における役割の解明に成功した。さらに成体脊髄後角アストロサイトの亜集団を世界で初めて同定し、同集団が感覚情報伝達の変調に中心的役割を果たすことを見出した。今後、慢性疼痛を含む病態時における役割について検討を行うことで、同集団をターゲットとした治療薬の開発へと繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Astrocytes in the spinal dorsal horn (SDH) have an important role in the maintenance of neuropathic pain after peripheral nerve injury. However, under normal condition, little is known about how much SDH astrocytes actively influence sensory information processing in vivo. In this study, we established the selective activation of SDH astrocytes in vivo and clarified their role of modulating innocuous mechanical information processing. Furthermore, we found that SDH astrocytes sensitized light mechanical information after peripheral noxious stimuli.

研究分野：神経薬理学

キーワード：脊髄後角 アストロサイト 感覚情報伝達 亜集団

1. 研究開始当初の背景

脊髄後角は機能的・構造的に異なる6層の Lamina (I-VI) からなり、通常は末梢から感覚情報を受容すると各 Lamina に存在する神経細胞が適切に処理し、上位中枢へと情報が伝達されることで我々は感覚を認知している。脊髄後角には神経細胞以外にグリア細胞が存在しており、中でもアストロサイトは脊髄全体に存在し、神経細胞のシナプスと非常に密に接触しており、神経伝達の調節に関与すると考えられている。これまで我々は、既存の鎮痛薬が奏功し難く、触刺激でさえも劇的な痛みとして感じる病態（アロディニア）を主症状とする神経障害性疼痛の維持期（引用文献、 ）に脊髄アストロサイトが非常に重要な役割を果たすことを明らかにしており、新規治療薬の有望なターゲットとして考えられる。

病態時への関与の解明が進展する一方で、通常感覚情報伝達に対する脊髄アストロサイトの役割には未だ不明な点が多い。さらに近年、グリア細胞の亜集団の存在およびその機能解明が注目を集めているが、脊髄後角アストロサイトに関する報告は皆無であり、特定のアストロサイト亜集団が特徴的な機能を有しているか否かについては未だ不明な点が多いのが現状である。これら課題は、グリア細胞を標的とした治療薬の開発のためにも非常に重要な問題であると考えられる。

2. 研究の目的

脊髄アストロサイトをターゲットとした研究は、従来汎用されている研究手法としてノックアウトマウスや脊髄腔内への各種阻害剤投与などが挙げられるが、脊髄後角アストロサイト特異的な機能制御を実現することが不可能であり、真の意味で脊髄後角アストロサイトの役割を解析できる方法が確立されていないことが、課題解決の障壁であると考え、申請者はアデノ随伴ウイルスベクターを利用し低侵襲的な脊髄後角内微量注入技術を開発し、領域・細胞種特異的な遺伝子導入を可能とした（引用文献、 ）。そこで本研究課題では、申請者が開発した技術を用いて脊髄後角アストロサイトを特異的に機能制御する系を確立し、感覚情報伝達に対する脊髄アストロサイトの役割解明を目指す。さらに、脊髄後角 Lamina 特異的なアストロサイトの機能制御法を確立し、感覚情報伝達に重要な役割を担うアストロサイト亜集団の同定を最終目標とする。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

本研究では、雌雄の *GFAP-Cre* マウス（Jackson Lab）*Ip3r2* ノックアウトマウス、*Hes5-CreERT2* マウスおよび雄性 C57BL/6J マウス（日本クレア）を使用した。

(2) アデノ随伴ウイルスの脊髄実質内投与 マウスをケタミン（100 mg/kg）およびキシ

ラジン（10 mg/kg）を用いて麻酔し、胸髄湾曲部を中心に正中に沿って3 cm 程皮膚を切開した。椎骨の第13胸髄および第1/2腰髄の棘突起側先端から1 mm 側方の筋組織を2 mm 程度で切開し、第12-第13胸髄、第13胸髄-第1腰髄、及び第1-第2腰髄椎骨間の膜を露出した。マイクロキャピラリー（エッペンドルフ社製）に満たしたアデノ随伴ウイルスを、脊髄実質内（脊髄表面から200-300 μm）に挿入し、ウイルスを微量注入した（500-600 nL）。ウイルス注入後、キャピラリーを慎重に脊髄から取り除き、皮膚を5-0 絹糸で縫合した。アストロサイト特異的に *hM3Dq* を遺伝子導入したマウスは *CNO*（10 mg/kg）投与により刺激を行った。

(3) 急性単離脊髄スライスを用いたアストロサイト細胞内 Ca^{2+} イメージング

マウス麻酔下で、L2-L5 付近の腰髄を単離し、酸素化した氷冷人工脳脊髄液中で、ピプラーームを用いて L4 脊髄の横断スライス（400 μm）を作製した。*hM3Dq* 刺激は *CNO*（100 μM）を用い、*GCaMP6m* の蛍光観察は共焦点レーザー顕微鏡を使用した。

(4) 各種行動測定

機械刺激に対する後肢逃避閾値測定は von Frey filament を用いた up and down 法に従って行った。熱刺激はマウス後肢に tail flick unit を用いた赤外線ランプ照射を、冷刺激はアセトンにマウス後肢に接触させることで行い、反応までの潜時を計測した。化学刺激に対する応答性は、マウス後肢にカプサイシン（1.6 μg/5 μL）および5%ホルマリン溶液（20 μL）を投与した後、それぞれ5分間および60分間の足を舂める、噛むなどの行動をビデオ撮影し、合計時間を計測した。

(5) 免疫組織染色法

氷冷した4%パラホルムアルデヒド溶液を灌流することにより組織を固定し、腰部脊髄およびDRG（後根神経節）を摘出し、浸漬固定、スクロース置換を行い包埋した。包埋組織から切片を作製し、ブロッキング1次抗体反応を行った。その後、洗浄し、2次抗体反応を行い、洗浄、乾燥後封入し、共焦点レーザー顕微鏡で蛍光を観察した。

(6) 脊髄くも膜下腔内への薬物投与

30G の注射針を付けた Hamilton マイクロシリンジを用いて脊髄くも膜下腔内へ定法に従って投与（5 μL）を行った。

(7) マウス足裏への電気刺激

2-3%イソフルラン吸入麻酔下、マウスの後肢に電極を装着し、電気刺激装置（Multi Channel Systems）を用いて2000 Hz, 1000 μA の刺激を10分間行った。

(8) 遺伝子発現解析

マウス麻酔下、氷冷 PBS 溶液 20 mL を灌流して脱血し、腰部（L3-L4）脊髄後角および脊髄前角を摘出し、定法に従って全 RNA を抽出後、定量的リアルタイム PCR 法により解析した。

4. 研究成果

脊髄後角アストロサイトを特異的に機能制御することが可能な系の確立を目的とし、脊髄においてアストロサイト特異的に Cre リコンビナーゼ活性が観察される *GFAP-Cre* マウスの脊髄実質内に Cre-ON システム (Cre 陽性細胞でのみ目的遺伝子を発現するシステム) を搭載したリコンビナントアデノ随伴ウイルスベクターを微量注入し、Designer Receptor Exclusively Activated by a Designer Drug (DREADD) の 1 種である hM3Dq (Gq 共役型) の遺伝子導入を試みた。hM3Dq の発現を免疫組織染色で観察したところ、脊髄後角アストロサイト特異的に hM3Dq の発現が確認された。また、Ca²⁺感受性蛍光タンパク質である GCaMP6m を同時に遺伝子導入したマウスから急性単離脊髄スライスを作製し、hM3Dq の選択的アゴニストである clozapine-N-oxide (CNO) を灌流処置したところ、脊髄後角アストロサイトにおいて細胞内 Ca²⁺濃度増加が観察された。

次に上述したマウスを用いて、脊髄後角アストロサイト特異的に機能制御した際の各種感覚情報伝達における影響について検討を行った。CNO 投与による脊髄後角アストロサイト特異的な活性化は熱、冷、化学刺激(カプサイシンおよびホルマリン)に対する応答性に影響を及ぼさなかったのに対し、von Frey ファイラメントを用いた機械刺激に対して一過性に過敏応答を示した。さらに脊髄アストロサイト刺激条件下において、マウス後肢に電極を用いて触刺激を伝達する A 線維を電気刺激した際の脊髄神経細胞の活動性の変化について活性化の指標となる c-Fos の発現変化について免疫組織染色で確認したところ、脊髄後角 1/II 層において c-Fos 陽性ニューロン数の増加が観察された。従って、脊髄後角アストロサイトの活動性変化は特に機械刺激に対する応答性を変調しうる可能性が示唆された。

そこで、アストロサイトの活動性変化に基づいた感覚情報伝達の変調メカニズムを解明するため、アストロサイトの細胞内 Ca²⁺濃度変化に伴い放出されることが示唆されているアデノシン三リン酸 (ATP)、グルタミン酸の各種受容体の阻害剤を脊髄くも膜下腔内へ投与することにより検討を行った。脊髄アストロサイト刺激による機械刺激に対する過敏応答は NMDA 受容体阻害剤により抑制されたのに対し、AMPA 受容体および P2 受容体阻害剤では大きな影響が観察されなかった。また、*Ip3r2* ノックアウトマウスおよびアストロサイト由来の伝達物質の開口放出を抑制する目的でドミナントネガティブ SNARE タンパク質を強制発現させたマウスにおいて、機械刺激に対する過敏応答が顕著に抑制された。

上述した結果より、NMDA 受容体の機能を変調させる因子として D-セリンに着目し、NMDA 受容体のグリシン結合部位の阻害剤 (5,7-dichlorokynurein acid: DCK) を前処置したところ、同様に過敏応答が抑制された。さらに D-セリンを脊髄くも膜下腔内に処置するこ

とにより、機械刺激に対する一過性の過敏応答および A 線維選択的な電気刺激により脊髄後角 1/II 層での c-Fos 陽性ニューロン数が増加した。以上の結果より、脊髄アストロサイトの活動性変化は D-serine/NMDA 受容体シグナルを介して、機械刺激に対する応答性を変調させることが示唆された。

様式特異的な感覚情報伝達の変調を担う脊髄後角アストロサイト亜集団を同定するため、realtime PCR 法を用いて脊髄前角と比較して脊髄後角で優位に発現が高いアストロサイト関連分子の同定を行ったところ、転写因子の hairy and enhancer of split 5 (*Hes5*) が顕著に脊髄後角で発現が高いことが示された。そこで *Hes5* 陽性細胞の細胞種および分布を同定することを目的として、*Hes5-CreERT2* マウスと *Rosa-tdTomato* マウスを交配したマウスの脊髄における tdTomato 陽性細胞について各細胞種マーカー分子と共染色を行った。その結果、非常に興味深いことに、*Hes5* 陽性細胞は脊髄後角の中でも特に脊髄後角 1/II 層にその局在が限局しており、その大部分がアストロサイトであることが明らかとなった。

脊髄後角アストロサイト亜集団の感覚情報伝達における役割解明のため、Cre-ON システムを搭載したアデノ随伴ウイルスベクターを *Hes5-CreERT2* マウスの脊髄実質内に投与し、*Hes5* 陽性 (脊髄後角表層) アストロサイト特異的な遺伝子導入法を確立した (図 1)。

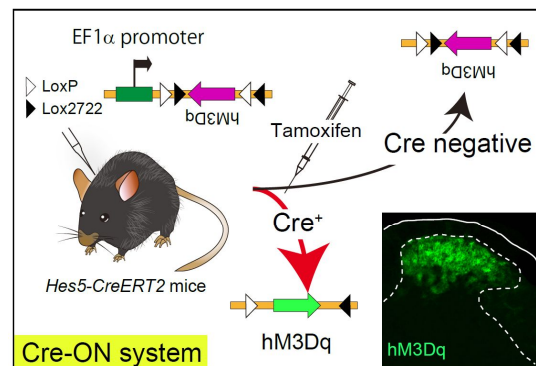


図 1. 領域特異的な脊髄後角アストロサイトの機能制御

同技術を用いて、脊髄後角表層アストロサイト特異的に hM3Dq 遺伝子を導入し、機械刺激に対する応答性変化について検討したところ、機械刺激に対する過敏応答が観察された。また脊髄後角表層アストロサイト刺激時には、A 線維選択的な電気刺激により脊髄後角 1/II 層での c-Fos 陽性ニューロン数の増加が観察された。

脊髄後角アストロサイト亜集団の生理的役割について検討するため、カプサイシンモデルを利用した。同モデルは、即時的な侵害防御行動および遅延して生じる機械刺激に対する過敏応答を惹起することが知られている。*Ip3r2* ノックアウトマウスおよび DCK を前処置することにより、侵害防御行動に影響を及

ばすことなく、機械刺激に対する過敏応答が有意に減弱した。

感覚情報伝達に対する脊髄アストロサイトの役割に関する研究は、これまで遺伝子組換え動物や脊髄くも膜下腔内への薬物処置を中心としてその役割を検討されてきたが、今回、脊髄後角 Lamina 特異的なアストロサイトの機能制御法を確立したことにより、脊髄後角表層アストロサイトの機能変化が、末梢への侵害刺激後の機械刺激に対する過敏応答に重要な役割を果たすことを明らかにした。本研究成果に端を発し、病態生理的条件下における脊髄アストロサイト亜集団の役割を解明していくことで、アストロサイト多様性の意義を解明することに繋がり、さらに病態への関与が強く示唆される場合にはアストロサイト亜集団をターゲットとした治療薬開発への可能性が期待できる。

<引用文献>

Tsuda M, Kohro Y, Yano T, Tsujikawa T, Kitano J, Tozaki-Saitoh H, Koyanagi S, Ohdo S, Ji RR, Salter MW, Inoue K. *Brain* 134(Pt 4): 1127-39 (2011)
Kohro Y, Sakaguchi E, Tashima R, Tozaki-Saitoh H, Okano H, Inoue K, Tsuda M. *Sci Rep.*, 5: 14306 (2015)

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6件)

全て査読有

Tashima R, Koga K, Sekine M, Kanehisa K, Kohro Y, Tominaga K, Matsushita K, Tozaki-Saitoh H, Fukazawa Y, Inoue K, Yawo H, Furue H, Tsuda M. Optogenetic activation of non-nociceptive A Fibers induces neuropathic pain-like sensory and emotional behaviors after nerve injury in rats. *eNeuro*, 5(1) (2018) DOI:10.1523/ENEURO.0450-17.2018

Koga K, Kanehisa K, Kohro Y, Shiratori-Hayashi M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, Furue H, Tsuda M. Chemogenetic silencing of GABAergic dorsal horn interneurons induces morphine-resistant spontaneous nocifensive behaviours. *Sci Rep.*, 7 (1): 4739 (2017) DOI:10.1038/s41598-017-04972-3

Kanehisa K, Shiratori-Hayashi M, Koga K, Tozaki-Saitoh H, Kohro Y, Takamori K, Tsuda M. Specific activation of inhibitory interneurons in the spinal

dorsal horn suppresses repetitive scratching in mouse models of chronic itch. *J Dermatol Sci.*, 88(2):251-254 (2017)

DOI:10.1016/j.jdermsci.2017.05.017

Masuda T, Kohro Y, Inoue K, Tsuda M. Peripheral Nerve Injury: a Mouse Model of Neuropathic Pain. *Bio-protocol*, 7(9): e2252 (2017) DOI: 10.21769/BioProtoc.2252

Koyanagi S, Kusunose N, Taniguchi M, Akamine T, Kanado Y, Ozono Y, Masuda T, Kohro Y, Matsunaga N, Tsuda M, Salter MW, Inoue K, Ohdo S. Glucocorticoid regulation of ATP release from spinal astrocytes underlies diurnal exacerbation of neuropathic mechanical allodynia. *Nat Commun.*, 7:13102 (2016) DOI:10.1038/ncomms13102

Masuda T, Ozono Y, Mikuriya S, Kohro Y, Tozaki-Saitoh H, Iwatsuki K, Uneyama H, Ichikawa R, Salter MW, Tsuda M, Inoue K. Dorsal horn neurons release extracellular ATP in a VNUT-dependent manner that underlies neuropathic pain. *Nat Commun.*, 7:12529 (2016) DOI:10.1038/ncomms12529

[学会発表](計14件)

高露雄太, 桂木龍一, 岡嵩晃, 棟田翔, 田島諒一, 齊藤秀俊, 井上和秀, 津田誠, The role of region-specific spinal dorsal horn astrocytes in sensory information processing, 第60回日本神経化学会大会, 2017年9月9日, 仙台国際センター(宮城県・仙台市)

高露雄太, 桂木龍一, 岡嵩晃, 棟田翔, 田島諒一, 齊藤秀俊, 御子柴克彦, 井上和秀, 津田誠, D-セリンシグナルを介した脊髄後角アストロサイトによる触覚情報の変調作用, 第39回日本疼痛学会, 2017年6月17日, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

高露雄太, 桂木龍一, 岡嵩晃, 棟田翔, 田島諒一, 齊藤秀俊, 御子柴克彦, 井上和秀, 津田誠, 脊髄アストロサイトの活動性変化は感覚情報を様式特異的に変調させる, 第89回薬理学会年会, 2017年3月11日, パシフィコ横浜会議センター(神奈川県・横浜市)

Kohro Y, Katsuragi R, Oka T, Muneta S, Tashima R, Tozaki-Saitoh H, Inoue K,

Tsuda M、 Activation of spinal dorsal horn astrocytes modulates the processing of tactile sensation、 2016年11月13日、 Society for Neuroscience 2016、 サンディエゴ (アメリカ)

Kohro Y, Katsuragi R, Oka T, Muneta S, Tashima R, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, Tsuda M、 Modality-specific sensory information processing by spinal dorsal horn astrocytes、 2016年9月30日、 16th world congress of pain、 パシフィコ横浜会議センター(神奈川県・横浜市)

高露雄太, 桂木龍一, 岡嵩晃, 棟田翔, 田島諒一, 齊藤秀俊, 井上和秀, 津田誠、 脊髄後角アストロサイトの活動変化は触覚情報を変調させる、 第38回日本生物学的精神医学会・第59回日本神経化学会大会合同年会、 平成28年9月9日、 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

高露雄太, 桂木龍一, 岡嵩晃, 田島諒一, 齊藤秀俊, 井上和秀, 津田誠、 DREADDを用いた脊髄アストロサイトの感覚情報伝達における機能解析、 第38回日本疼痛学会、 平成28年6月24日、 北海道立道民活動センター かでる2.7(北海道・札幌市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：鎮痛剤及びその使用
発明者：津田誠、高露雄太
権利者：九州大学
種類：特許
番号：特願 2018-018653
出願年月日：平成30年2月5日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等
<http://life-innov.phar.kyushu-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高露 雄太 (KOHRO, Yuta)
九州大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号：30723861