

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07855

研究課題名(和文) 内臓痛の伝達に関与する脊髄内神経回路とその構築を制御する分子基盤の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular basis governing the construction of spinal neural circuits involved in visceral pain transmission

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：内臓痛伝達に関わる脊髄後角神経回路の存在を明らかにするために、潰瘍性大腸炎モデルマウス(DSSマウス)を用いた解析を行った。DSSマウスの脊髄での神経活動をc-fos免疫染色により調べた結果、c-fos陽性ニューロンは第6腰椎から第1仙髄にかけての脊髄後角浅層に多く認められた。脊髄後角ニューロンの複数の分子マーカーを調べた解析より、内臓痛応答ニューロンの30%ほどはBrn3a陽性であることが分かった。興味深いことに皮膚への体性痛に応答するニューロン中のBrn3a陽性率はその割合よりも有意に小さかった。以上より、Brn3a陽性ニューロンは内臓痛の伝達に大きく関与することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の国内外の研究より、機械、温度、痒み等の体性感覚の伝達に関与する脊髄後角の神経サブタイプが徐々に明らかになりつつある。しかしながら、我々に身近である内臓痛を伝達する神経回路については、体性感覚に比べて理解が進んでいない。本研究の成果は、内臓痛を特異的に伝達する脊髄後角神経回路の存在を示唆するものであり、感覚情報伝達全般の包括的な理解につながる点において学術的意義がある。また、内臓痛特異的な神経回路の解明はそれを標的とした内臓痛特異的鎮痛薬の開発にもつながり、社会的意義も極めて大きい。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the spinal circuitry involved in the transmission of visceral pain information, we utilized a mouse model of inflammatory bowel disease (DSS model). Analysis of visceral pain-responsive spinal neurons in the mouse through immunostaining with c-fos revealed that c-fos-positive neurons were predominantly localized in the superficial spinal dorsal horn at the lumbosacral (L6-S1) level. Co-immunostaining of several molecular markers for spinal dorsal horn neurons demonstrated that approximately 30% of visceral pain-responsive neurons expressed Brn3a. Interestingly, the proportion of Brn3a-positive neurons among somatic pain-responsive neurons was significantly lower than that among visceral pain-responsive neurons. These findings suggest the involvement of Brn3a-positive spinal dorsal horn neurons in the transmission of visceral pain.

研究分野：疼痛学、神経科学

キーワード：内臓痛 脊髄後角

1. 研究開始当初の背景

内臓痛、体性痛等の感覚情報は一次求心性繊維によって末梢で受容されたのちに、脊髄後角へと伝達される。これらの情報は脊髄後角に存在する各種ニューロンにより構成される神経回路により情報処理がなされ、高次脳中枢へと伝達される。近年の国内外の研究より、異なる種類の体性感覚(機械、熱、痒み)の伝達には異なるサブタイプの脊髄後角ニューロンが関わるということが明らかになりつつあり、これが我々の感じる感覚の違いのもととなると考えられている。内臓痛は体性痛とは異なり、痛みの局在が不明確であること、関連痛を伴うことなどの特徴を有する。しかしながら、内臓痛を特異的に伝達する脊髄後角神経回路の存在については、これまでの研究では必ずしもコンセンサスが得られていない。内臓痛応答ニューロンのほとんどは体性痛にも応答するという報告、内臓痛刺激にのみ応答するニューロンが存在するという報告がそれぞれなされている。この疑問を解決する糸口の一つは、内臓痛に応答するニューロンの神経サブタイプを調べて、内臓痛刺激に特異的に応答するサブタイプを探索することであると思われる。

2. 研究の目的

内臓痛に特異的な脊髄後角神経回路の存在が明らかとなれば、感覚伝達経路全般の包括的な理解につながる。そこで、本研究では内臓痛特異的な脊髄後角神経回路の探索を目指した研究を行う。第一に、潰瘍性大腸炎モデルマウスを構築して、疼痛応答行動を調べるとともに、内臓痛刺激に応答する脊髄後角ニューロンの有無を解析する。第二に、各種マーカー分子を用いた免疫染色により、内臓痛に応答するニューロンの同定を目指す。体性痛刺激を加えたマウスも準備して同様な解析をすることにより、内臓痛に応答するニューロンが内臓痛に特異的なのか、体性痛刺激にも応答するのかを評価する。第三に、これらのニューロンの神経活動を DREADD により阻害した際の内臓痛応答を調べて、これらのニューロンの内臓痛伝達における機能を調べる。

3. 研究の方法

(1) 潰瘍性大腸炎モデルマウスの作成

DSS(デキストラン硫酸ナトリウム)の飲水投与による潰瘍性大腸炎モデルマウス(以下 DSS マウス)を作成して、これが内臓痛のモデルとして使用できるかどうかを評価する。モデルマウスは、生後 8 週令の C57BL6J オスマウスに 2 %DSS を飲水投与することにより得る。投与後 1 週間のマウスの疼痛応答行動をビデオ撮影により調べる。さらに、そのマウスの脊髄サンプルを c-fos (神経活動の指標)の免疫染色により解析し、内臓痛の脊髄後角への入力の有無を調べる。

(2) 内臓痛に応答する脊髄後角ニューロンの同定

DSS マウスの脊髄後角における内臓痛応答ニューロンの神経サブタイプを調べるために、脊髄後角ニューロンの各種マーカー分子を用いた染色を行う。マーカー分子としては、ソマトスタチン(浅層の興奮性ニューロンのマーカー)、Brn3a(浅層最表層のマーカーの一つ)、Pax2(浅層抑制性ニューロンのマーカー)を用いる。これらの発現を c-fos の免疫染色との二重染色により解析し、c-fos 陽性ニューロン中の各マーカーの陽性率を評価する。

(3) 内臓痛伝達における脊髄後角ニューロンの機能解析

内臓痛伝達における脊髄後角ニューロンの各神経サブタイプの機能を調べるために、神経機能の阻害実験を行う。Brn3a 陽性ニューロンに着目して、このニューロン特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Brn3a-Cre マウスおよび抑制性 DREADD を用いて機能阻害実験を行う。Brn3a-Cre マウスの脊髄後角に抑制性 DREADD 遺伝子をコードするアデノ随伴ウイルスを導入し、Brn3a 陽性ニューロン特異的に DREADD を発現させる。リガンドの腹腔内投与により、Brn3a 陽性ニューロンの神経機能を阻害した際に内臓痛に対する疼痛応答行動にどのような変化が認められるかを調べる。疼痛応答は、肛門付近を舐める行動を指標にして行う。

4. 研究成果

(1) 潰瘍性大腸炎モデルマウスの作成

生後 8 週令の C57BL6J マウスに 2 %DSS の飲水投与を 1 週間行

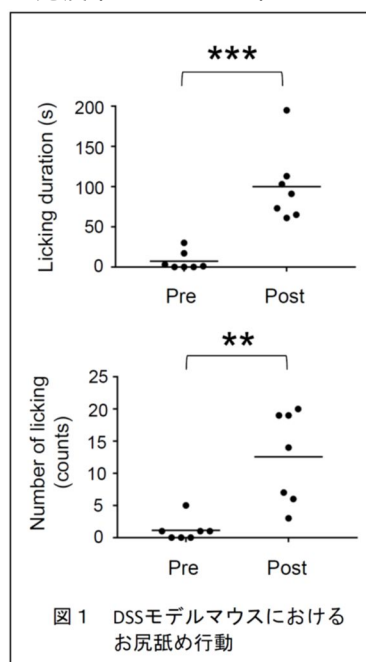


図1 DSSモデルマウスにおけるお尻舐め行動

った結果、これまでの知見と同様に下痢、血便、体重減少の進行が認められ、さらに遠位大腸での顕著な炎症が観察された。DSS マウスの行動をビデオ撮影により解析したところ、肛門を舐める行動の時間、回数が投与前に比べて有意に上昇していた（図1）。DSS マウスでは肛門に近い遠位結腸に炎症が強く引き起こされることから、この行動は内臓痛をかばう行動であることが予想された。次に DSS マウス脊椎の冠状断切片を用いて c-fos の免疫染色を行い、内臓痛の脊椎内伝達を調べた。その結果、DSS マウスでは第6 腰椎から第1 仙髄にかけての脊椎後角の両側に顕著に c-fos 陽性細胞が分布していた（図2）。遠位結腸の粘膜の感覚伝達に関わる一次求心性ニューロンは第6 腰椎から第1 仙髄の脊椎後角に投射することが過去の知見で明らかとなっている。以上の結果より、DSS マウスにおける内臓痛刺激は脊椎後角へと伝達され、その感覚受容によりお尻舐め行動という疼痛応答行動を引き起こしていることが示唆された。

（2）内臓痛に应答する脊椎後角ニューロンの同定

上記 DSS マウスの脊椎切片を用いて、c-fos と各種マーカー分子の共発現を免疫二重染色により調べた。その結果、c-fos 陽性ニューロン（内臓痛応答ニューロン）中のソマトスタチン、Brn3a、Pax2 陽性ニューロンの割合はそれぞれ $17.6 \pm 1.7\%$ 、 $30.1 \pm 2.2\%$ 、 $32.6 \pm 1.3\%$ であった。

次に内臓痛、体性痛に应答するニューロンのサブタイプを比較するために、体性痛に应答するニューロンの解析を行った。体性痛刺激は下肢皮膚へのホルマリン注入により行った。ホルマリン刺激マウスの脊椎後角において c-fos と各種マーカー分子の二重染色を内臓痛モデルの場合と同様に行った結果、c-fos 陽性ニューロン（体性痛応答ニューロン）中のソマトスタチン、Brn3a、Pax2 陽性ニューロンの割合はそれぞれ $17.5 \pm 1.5\%$ 、 $18.9 \pm 1.4\%$ 、 $32.4 \pm 3.5\%$ であった。

内臓痛、体性痛応答ニューロンにおけるこれらのマーカー陽性の割合を比較すると、ソマトスタチン、Pax2 はどちらのモデルでも同じレベルであった。しかしながら、Brn3a 陽性の割合は内臓痛モデルの方が体性痛モデルよりも優位に高かった（図3）。

Brn3a 陽性ニューロンは脊椎後角の最表層、深層に分布するが、内臓痛に应答するニューロンは最表層に多く認められた。脊椎後角の最表層には感覚情報を高次脳中枢へと伝達する投射ニューロンが多い。そこで、投射ニューロンの主要なグループの一つである、結合腕傍核（LPb）、孤束核（NTS）投射ニューロンに着目し、それぞれのニューロン中の Brn3a 陽性の割合を解析した。その結果、それぞれの割合は $16.0 \pm 1.5\%$ 、 $51.8 \pm 4.6\%$ であり、孤束核投射ニューロン中の Brn3a 陽性率が優位に高かった。以上の結果より、内臓痛の伝達には Brn3a 陽性脊椎後角ニューロンが大きく寄与しており、これらのニューロンの一部は孤束核への伝達に関与することが明らかとなった。

（3）内臓痛伝達における脊椎後角ニューロンの機能解析

次に内臓痛の伝達における Brn3a 陽性ニューロンの機能を調べるために、Brn3a 陽性ニューロンの機能を阻害させた際の内臓痛応答行動を調べた。Brn3a-Cre マウスの脊椎後角（第6 腰椎から第1 仙髄）に抑制性 DREADD 遺伝子をコードするアデノ随伴ウイルス（AAV8-Syn-DIO-M4Di-Cherry）をインジェクションした。インジェクション3 週間後に DREADD と同時に発現する蛍光タンパク質 mCherry の蛍光を観察し、DREADD の発現を間接的に確かめた。次に、DREADD インジェクションマウスに DSS を飲水投与して内臓痛を誘導し、さらに DREADD リガンド（CNO）を投与した前後の内臓痛行動（お尻舐め行動）をビデオ撮影により解析した。しかしながら、予想に反して CNO 投与後に内臓痛行動の顕著な現象は認められなかった。CNO 投与後にマウスの行動自体が鈍くなる傾向が認められたが、CNO 自体が行動に影響する可能性が考えられる。

以上の結果より、Brn3a 陽性脊椎後角ニューロンは体性痛よりも内臓痛の伝達に深く関わる可能性が示唆された。この結果は Brn3a 陽性ニューロンが内臓痛特異的な神経回路の一部を構成している可能性を示唆しており意義深い。今後は、これらのニューロンが実際に内臓痛伝達に機能するかどうかを直接的に評価する機能アッセイを行い、その関与を証明するとともに、内臓痛に関与する他の神経サブタイプの探索をすることが必要となる。

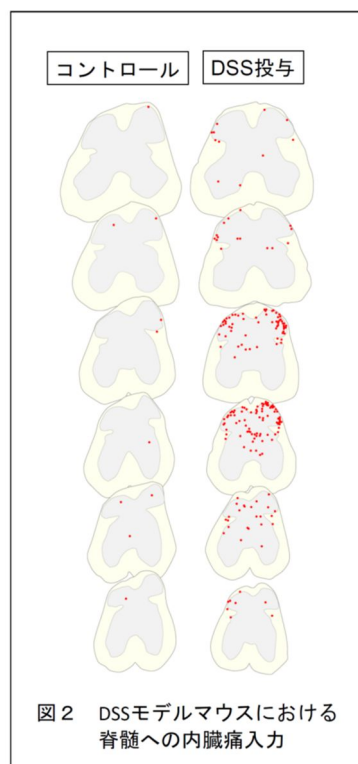


図2 DSSモデルマウスにおける脊椎への内臓痛入力

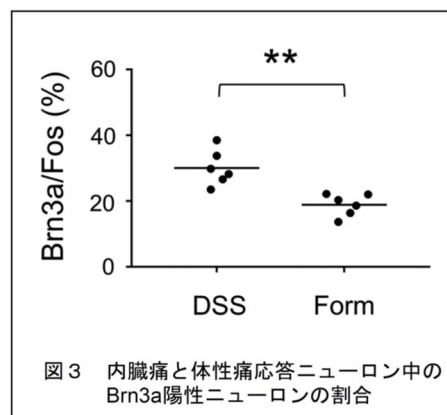


図3 内臓痛と体性痛応答ニューロン中のBrn3a陽性ニューロンの割合

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nishida K, Matsumura S, Kobayashi T	4. 巻 3
2. 論文標題 Involvement of Brn3a-positive spinal dorsal horn neurons in the transmission of visceral pain in inflammatory bowel disease model mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front. Pain Res.	6. 最初と最後の頁 979038
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpain.2022.979038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nishida K, Matsumura S, Uchida H, Abe M, Sakimura K, Badea T, Kobayashi T	4. 巻 537625
2. 論文標題 Brn3a controls the soma localization and axonal extension patterns of developing spinal dorsal horn neurons	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 biorxiv	6. 最初と最後の頁 537625
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2023.04.20.537625	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西田和彦、松村伸治、小林拓也
2. 発表標題 デキストラン硫酸ナトリウム誘導性大腸炎モデルを用いた脊髄後角における内臓痛伝達の解析
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西田和彦、伊藤誠二
2. 発表標題 脊髄後角長距離ニューロンの分子マーカーの同定
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	寿野 良二 (SUNO Ryoji) (60447521)	関西医科大学・医学部・准教授 (34417)	
研究 分担者	片野 泰代 (KATANO Tayo) (60469244)	関西医科大学・医学部・准教授 (34417)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------