

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月1日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659317

研究課題名（和文）

ニューロン・グリアの信号伝播同時イメージングによる神経可塑性の解析

研究課題名（英文）

Neuroplasticity analyzed by simultaneous imaging of neuron and glial activities

研究代表者

村瀬 一之 (MURASE KAZUYUKI)

福井大学大学院工学研究科・教授

研究者番号：40174289

研究成果の概要（和文）：

炎症によって生じる痛みと（炎症性疼痛）、痛みを伝える神経の損傷によって生じる痛み（神経損傷性疼痛）ではその発生メカニズムに違いがあると考えられてきた。我々はそれを明確に示すために、神経細胞の活動を記録するための膜電位イメージングとグリア細胞の活動を記録するためのカルシウムイメージングを行った。その結果、炎症性疼痛にはアストロサイトが、神経損傷性疼痛にはミクログリアが関与していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Signaling pathway for inflammatory pain has been thought to be different from that of neuropathic pain. In order to reveal the pathways, we developed a simultaneous imaging method of membrane potentials and intracellular calcium ions. We dissociated neuronal activities, activities of astrocytes, and activities of micro glia. We revealed that astrocytes contribute to the generation of inflammatory pain and microglia of neuropathic pain

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野:神経科学

科研費の分科・細目：境界医学・疼痛学

キーワード：痛覚過敏、グリア細胞、脊髄後角、膜電位イメージング、カルシウムイメージング、ATP、慢性疼痛、中枢性感作

## 1. 研究開始当初の背景

米国議会で21世紀初頭の医学振興策として「Decade of Pain Control and Research」が取り上げられて以来、世界中で痛み研究の重要性が注目されている。特に、関節炎や癌性疼痛時に起こる持続的な痛みの過敏化（痛覚過敏）は、時には“死んだ方がましだ”と思わせるぐらい我々を苦しめるものであり、その有効な緩和方法の解明が急務とされている。痛覚過敏は、痛覚刺激を受け取る末梢の病巣が原因ではなく、その信号を脳へと伝える中継点である脊髄の神経結合あるいは、信号伝達の効率が変化する（シナプス可塑

性）ことによって起こると考えられており、最近それを示す報告が多くされている。また、痛覚過敏には、グリア細胞の働きが重要な役割を担っていることが最近、報告されているが、その詳細な機序については明らかではない。

我々の研究室では現在までに、痛覚過敏には、末梢から脳への痛覚信号を中継する脊髄後角領域でのシナプス可塑性が関与していることを示した（J. Neurosci 2004, Eur. J. Neurosci 2006, Science 2006）。さらに最近、このシナプス可塑性にグリア細胞が関与している可能性を示唆する研究成果を報告

した (Eur. J. Neurosci 2007)。そこで、グリア細胞がシナプス可塑性や痛覚過敏に関与していることをより直接的に示すための計測システムを計画した。

## 2. 研究の目的

関節炎や癌性疼痛時に起こる持続的な痛みの過敏化 (痛覚過敏) は、我々を苦しめるものであり、その有効な緩和方法の解明が急務とされている。痛覚過敏は、痛覚刺激を受け取る末梢の病巣が原因ではなく、その信号を脳へと伝える中継点である脊髄の神経結合あるいは、信号伝達の効率が変化することによって起こると考えられており、最近それを示す報告が多くされている。また、痛覚過敏には、グリア細胞の働きが重要な役割を担っていることが最近、報告されているが、その詳細な機序については明らかではない。本研究では、痛覚過敏がどのような機序で起こるのか、脊髄内の神経伝達の異常、特にグリア細胞の役割について、ニューロンの活動およびグリア細胞の活動をイメージングし、明らかにすることを目的とする。

具体的には、ニューロンの活動およびグリア細胞の活動をイメージングし、脊髄でのシナプス可塑性にグリア細胞が、どのような機序で関与しているのか、また、シナプス可塑性が痛覚過敏の要因であるのかを、これまでの研究を踏まえて、より詳細かつ明確に示すことである。

近年、多くの研究者によって、痛覚過敏には脊髄内のグリア細胞が関与していることを示唆する研究結果が報告されている。しかし、それらの研究の多くは、行動実験においてグリア細胞抑制剤が痛覚過敏の惹起を抑制することを示すものや、痛覚過敏時のグリア細胞の形態的な変化や、受容体の数の変化などを示すものであり、グリア細胞が実際に、脊髄内の神経活動にどのように影響を与えているのか、そのメカニズムの詳細を、直接計測する研究は行われていない。

これを明確にするには、神経活動とグリア細胞の活動を同時に計測する必要があるが、そのような実験方法、および計測システムを構築するのは困難である。本研究は、電位感受性色素、カルシウム感受性色素で生きた脊髄スライス標本を染色し、スライス上の神経活動とグリア細胞の活動を共焦点顕微鏡と高速、高感度、高解像度 CCD カメラを用いて計測する。ここから得たデータは、さまざまな痛覚過敏状態で、神経細胞とグリア細胞の活動がどのように変化しているのか、また、これらは相互にどのような影響を与えてい

るのかを明確に示すものである。

従って、痛覚過敏時にはグリア細胞とニューロンのインターアクションが、どのように働いているのかを同時に計測することができ、その機能的な役割が明確になると考えられる。本研究は、慢性痛や痛覚過敏などの我々に激しい苦痛を与える痛みを緩和するための有効な方法を発見するブレークスルーになると考える。

すなわち、従来の研究の多くは、行動実験においてグリア細胞抑制剤が痛覚過敏の惹起を抑制することを示すものであり、詳細なメカニズムを理解するには不十分な手法である。また、痛覚過敏時のグリア細胞の形態的な変化や、受容体の数の変化などを示すものも多く報告されているが、これらの手法では、生きている状態での観測は不可能であるため、これらの変化が原因なのか結果なのか等の不明な点が存在する。また、培養したグリア細胞のカルシウムシグナルを計測した報告もあるが、ニューロンとの相互作用がわからないため、グリア細胞が実際に、脊髄内の神経活動にどのような影響を与えているのか理解するのは困難である。

本研究では、共焦点顕微鏡と高解像度の CCD カメラを組み合わせることで、これらの細胞が作るネットワークを伝播するシグナルを、高速で、かつ個々の細胞が識別でき、ニューロンの活動とグリア細胞の活動を生きた状態で同じスライス標本上でイメージング可能なシステムを構築する。つまり、ニューロンとグリア細胞のインターアクションを解明する新しい手法を確立しようとするものである (図 1)。

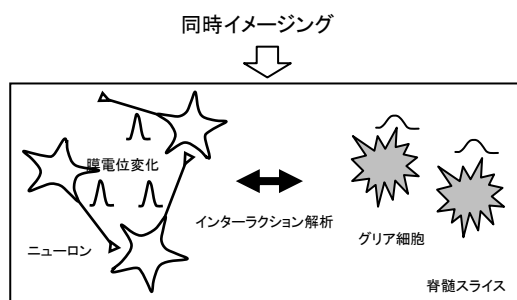


図 1: ニューロンの活動とグリア細胞の活動の同時イメージング: 脊髄スライス上でニューロンの膜電位変化とグリア細胞のカルシウム変化を同時にイメージングし、そのインターアクションを解析する

### 3. 研究の方法

神経損傷を起こしたラットの脊髄後角では、ミクログリアの P2X4 受容体の数が増えることが報告されている。我々は、脊髄スライスを用いたカルシウムイメージングによって、ATP 刺激によって生じる P2X4 受容体を介したカルシウムシグナルが、このようなラットでは、増強していることを最近示した。本研究では、ニューロンの電位変化をイメージングするシステムを、このカルシウムイメージングシステムに組み込むことで、ニューロンの活動とグリア細胞の活動を同時にイメージングすることを実現し、神経損傷や組織の炎症によって生じるグリア細胞の様々な変化がニューロンの活動にどのような変化をもたらすのか、そのインターアクションを明らかにすることを目指す。

#### (1) イメージングシステム

神経活動は、時間の速い現象であるため、非常に高速でイメージングが可能なカメラが必要となる。このカメラについては既に本研究室で稼動している。一方のカルシウムシグナルは、数秒以上持続する比較的ゆっくりとした現象であるため、計測用のカメラには速度はあまり要求されないが、個々の細胞の形をより明確に捉えるために高解像度のカメラを使用する。このカメラについても既に共焦点顕微鏡と組み合わせたシステムとして稼動しており、個々の細胞が識別できる解像度でカルシウムシグナルがイメージングできている。本研究では、共焦点顕微鏡に、上述した電位イメージング用のカメラを結合させ、波長切り替え装置、高速シャッター等を組み合わせることで、ニューロンの電位変化と、グリア細胞のカルシウムシグナルを同時にイメージングするシステムを構築する (図 2)。

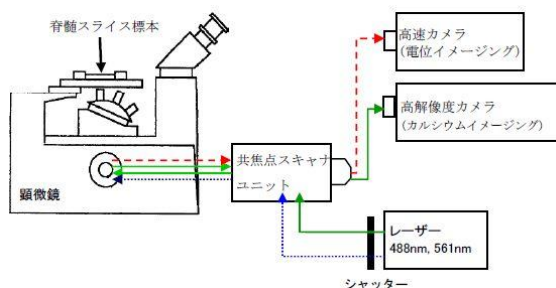


図 2: 本研究で構築するイメージングシステム: 488nm と 561nm の 2 つの波長のレーザーを顕微鏡のチャンバーに乗せた脊髄スライス標本に照射し、2 つの異なる蛍光をそれぞれ別のカメラで計測する

実験には脊髄スライス標本を用い、膜電位感受性色素、カルシウム感受性色素、およびグリア細胞を選択的に染色する染料で染色する。膜電位感受性色素は、細胞膜内の電位差の変化に反応する。神経細胞の活動は、電位変化によって他の細胞へと伝えられることが知られており、一方、グリア細胞の電位変化は神経細胞の電位変化に比べて非常に僅かであることが知られており、この染色液によって神経細胞の活動が計測できる。カルシウム感受性色素は、細胞内のカルシウムイオンの濃度上昇をイメージングするために用いる。カルシウムイオンの濃度上昇は、神経細胞、グリア細胞のいずれの細胞にも起きると考えられるが、その細胞がグリア細胞を選択的に染色する色素で染まっているか否かで神経細胞とグリア細胞を識別することが可能となる。海馬のスライスでは、短時間のカルシウム染料による染色でグリア細胞のみを特異的に染色することに成功している (Araque A et al., J. Neurosci. 2002)。そこで、本研究でも同様の染色方法を試してみる。また、sulforhodamine 101 は、細胞が生きた状態でグリア細胞のみを染めることが可能であることが報告されているため、本研究でも試してみる予定である。さらに、グリア細胞のみがカルシウム感受性色素 Fluo-4 および sulforhodamine 101 で染まっているかを、ミクログリアのマーカーである OX-42 およびアストロサイトのマーカーである GFAP で免疫染色し、重なって染まっているかを確認しながら、最適なカルシウム染料の濃度、染色時間を決定する。もし、グリア細胞のみがカルシウム染料で染まる条件が見つからなければ、ガラス電極にカルシウム染料を満たし、グリア細胞からパッチクランプを行うことで染色を行う。このような方法によって、神経細胞活動とグリア細胞活動のイメージングシステムを構築する。

#### (2) モデル動物

完全フロイトアジュバンドを、ラットの後肢の足裏に注入し、炎症ラットを作成する。また、坐骨神経を露出し、糸で結紮することによって神経損傷ラットを作成する。これら 2 つのグループのラットの痛覚閾値を von frey フィラメントを用いて計測し、痛覚過敏が起きているかを調べる。

#### (3) ATP の効果

上述したニューロンの電位変化とグリア細胞カルシウム応答を同時にイメージングするシステムを用いて、ATP によってミクロ

グリア、およびアストロサイト内のカルシウム濃度が上昇（活性化）するのかをノーマルラット、炎症ラット、神経損傷ラットで調べ、カルシウムシグナルの大きさ、シグナルを示す細胞の数を比較する。また、ATP で活性化されたグリア細胞は、ニューロンの活動にどのような変化を起こすのかを隣接するニューロンの活動を同時にイメージングすることによって調べる。なお、ニューロンの活動を起こす刺激としては、脊髄への入力線維である後根への電気刺激を用いる。また、何らかの変化が見られた場合、それがグリア細胞の抑制剤で変化するのか、どのタイプの ATP の受容体によって起きているのかを拮抗薬によって調べ、また、どのような伝達物質を介してニューロンの活動に変化を起こしているのかを調べる。また、そのような変化がミクログリアで起きているのか、アストロサイトで起きているのかを、それぞれの特異的な抑制剤を用いた後、免疫染色によって識別する。また、ATP ではなく、電気刺激によっても、同様のカルシウムシグナルがグリア細胞で起きるのかを計測し、神経線維が刺激されることで ATP が放出されているか、実際の刺激に対してはニューロンとグリア細胞の機能が痛覚過敏ラットでどのように変化しているのか、2つの細胞間のインターアクションはどのように変化しているのかを調べる。

#### 4. 研究成果

炎症性痛覚過敏と損傷性痛覚過敏のモデル動物を作成し、それらの脊髄後角神経興奮の増強へのグリア細胞の関与を、膜電位イメージングとカルシウムイメージングによって調べた。実験の結果、脊髄後角での神経興奮は、コントロールに比べて炎症、損傷のどちらのラットでも増大していたが、神経損傷ラットには、ミクログリアが深く関与しており、炎症ラットにはアストロサイトが深く関与していた。また、神経損傷ラットでは、ATP の還流によってカルシウムシグナルを示す細胞の数が増大しており、これはミクログリアの抑制および P2X4 受容体の拮抗によって抑制された。

さらに、Sulforhodamine101(SR101) と Fluo-4/AM を同時に投与してアストロサイトの同定とその細胞でのカルシウムイオンの定量を行った。プリン P2 受容体の作動薬である ATP および代謝型グルタミン酸受容体の作動薬である DHPG を投与して脊髄後角でのカルシウムイオン動態を解析した結果、コン

トロールマウスに比べ、末梢組織に炎症を起こし、痛覚過敏となっているマウスでは、ATP に対してカルシウム応答を示す細胞が SR101 陽性細胞で有意に増加していた。また、カルシウム応答を示した細胞の数は、ATP の受容体のうちの P2X 受容体の阻害薬である Brilliant Blue G によって有意に減少した。

本研究では、痛覚過敏がどのような機序で起こるのか、脊髄内の神経伝達の異常、特にグリア細胞の役割について、ニューロンの活動およびグリア細胞の活動をイメージングし、明らかにした。このことは、さまざまな痛覚過敏状態で、神経細胞とグリア細胞の活動がどのように変化しているのか、また、これらは相互にどのような影響を与えているのかを示すものであり、慢性痛や痛覚過敏などの我々に激しい苦痛を与える痛みを緩和するための有効な方法を発見するブレークスルーになると考えられる。

#### 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 1 件)

(1) Ikeda H, Kiritoshi T, Murase K, Contribution of microglia and astrocytes to the central sensitization, inflammatory and neuropathic pain in the juvenile rat, *Molecular Pain*, 査読有, 8 (2012) 43. Doi: 10.1186/1744-8069-8-43

[学会発表] (計 3 件)

(1) 高須 俊太郎, 池田 弘, 村瀬 一之, 竹内 翔汰, Contribution of the descending pain inhibitory system to the analgesic effect by smelling the aroma oil, 第 35 回日本神経科学学会, 2012 年 9 月 19 日, 愛知県名古屋市

(2) 池田 弘, 林 努, 村瀬 一之, 前帯状回における神経興奮の長期増強へのアストロサイトの関与, 第 35 回日本神経科学学会, 2012 年 9 月 19 日, 愛知県名古屋市

(3) H. Ikeda, K. Mochizuki, K. Murase, Astrocyte involves in the long-term facilitation of neuronal excitation in the anterior cingulate cortex of mice with inflammatory pain, NIPS-WS 2012 Central Neuroplasticity in Sensory Emotional Link, 2012 年 9 月 13 日, 愛知県岡崎市

[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://www.synapse.his.u-fukui.ac.jp/en/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村瀬 一之 (MURASE KAZUYUKI)  
福井大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号：40174289

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

池田 弘 (IKEDA HIROSHI)  
福井大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号：80377473