

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 30 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670289

研究課題名(和文) 脊髄後角局所回路の光遺伝学的操作による痛み・痒み行動の制御

研究課題名(英文) Optogenetic manipulation of spinal local circuit which modulate pain/itch transmission

研究代表者

八坂 敏一 (Yasaka, Toshiharu)

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号：20568365

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)：難治性疼痛のメカニズムの解明は急務である。痛み情報は脊髄後角に入力すると、そこでインターニューロンからなる局所回路によって修飾を受ける。この局所回路の役割を明らかにするため、光遺伝学的手法の導入を試みる一方、パッチクランプ法と免疫染色を用いて解析を行った。本研究ではパルプアルブミン(PV)を発現する抑制性細胞と興奮性のvertical cellの役割について調べた。その結果、PVニューロンは触覚を伝える神経線維の終末をシナプス前抑制しvertical cellへの入力を抑制することが明らかとなった。従って、PV細胞の機能がアロディニアの発症に深く関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate a mechanism of intractable pain is urgent. The spinal dorsal horn is a target of primary afferents which convey sensory information (include pain). These inputs are processed and modified by local circuits which consist of interneurons. These interneurons are heterogeneous and little is known about connectivity among them. To clarify roles of each type of interneurons, we planned to employ an optogenetic approach. We chose a parvalbumin (PV) expressing population as one of interneurons. Among setting-up an experimental environment for optogenetics, a combined electrophysiological and anatomical approach was used to investigate role of PV interneurons. We found that tactile inputs to the vertical cell were likely suppressed by PV interneurons. The vertical cell is a class of excitatory interneuron possessing axons which innervate lamina I projection neurons. Thus, these result suggested that PV cells were important to suppress the pathway involving tactile allodynia.

研究分野：神経科学

キーワード：疼痛学 痒み オプトジェネティクス 脊髄後角 局所回路

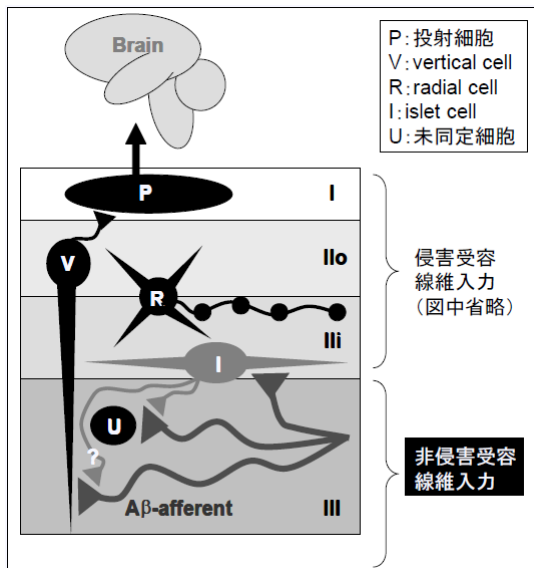
1. 研究開始当初の背景

(1) 痛みの研究と脊髄内神経回路

QOLの著しい低下を起こす難治性の疼痛は、未だ治療法が確立しておらず、その解決が急がれる。痛みを伝える一次求心性線維が投射する脊髄後角は、中枢神経の痛みの入り口に相当し、研究のターゲットとされてきた。脊髄後角は脳への中継地点とされるが、その機能を持つ投射細胞は、わずか約1%にすぎない。それ以外の細胞は脊髄内で局所回路を構築するインターニューロンであり、投射細胞から脳への出力を修飾していると考えられている。この事実、実に約99%の細胞が、脊髄からの出力修飾に使われていることは、衝撃すら覚え、局所回路による情報処理が、現在考えられているより遥かに重要であることをうかがわせる。しかし、未だ不明な点が多く研究を難しくしている。その原因として、これらインターニューロンが多様であり、分類が難しいことがあげられる。驚くべきことに、1965年に提唱された「ゲートコントロール説」の神経回路は未同定で、疼痛メカニズムの理解には、神経回路の解明が急務である。

(2) インターニューロンの分類と局所神経回路

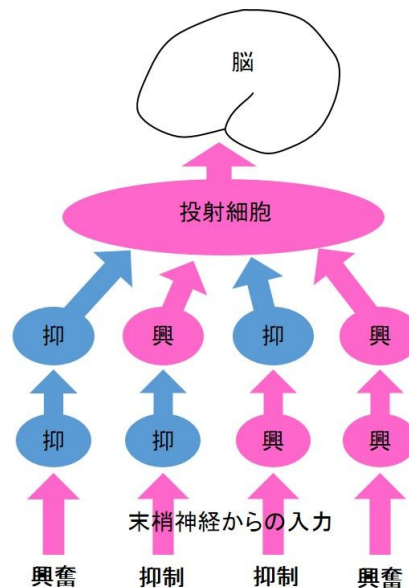
脊髄後角II層のインターニューロンは、形態学的に vertical cell, radial cell, islet cell 等に分類される(下図)。また、vertical cell



と radial cell は多くの場合グルタミン酸を神経伝達物質とする興奮性のインターニューロンである。Islet cell は GABA やグリシンを神経伝達物質とする抑制性インターニューロンである。これらの細胞に対する末梢神経の入力は伝導速度を基にした分類ではある程度調べられているが、どのような他のインターニューロンとシナプスを形成し、最終的に投射細胞に対してどのような修飾作用を及ぼすのかについては、ほとんど知られていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、痛みの伝導路のうち、脊髄後角の局所回路に焦点をあて、その役割を明らかにすることである。例えば、脊髄後角のインターニューロンから記録し、薬の作用を調べた研究はこれまでに多く報告されているが、記録細胞の特徴づけがなされていない場合が多い。そのような研究においては脊髄からの出力(痛みの伝達)に対して、その薬がどのような作用を持つのかを同定するためには困難を伴う。その理由は下図に示すように、投射細胞への修飾作用は記録細胞の特徴や局所神経回路内の役割で様々に解釈されるからである。



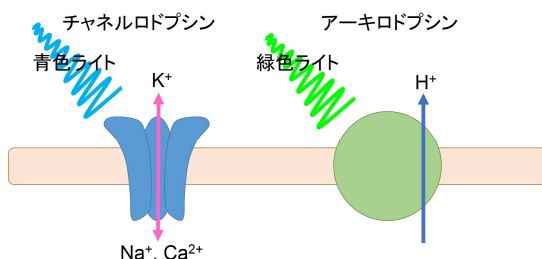
末梢神経入力が、それぞれの局所神経回路を刺激した際の投射細胞への修飾作用

このような問題を解決するため、我々はこれまで細胞の分類を行ってきた。本研究では、その分類のノウハウを生かし、個々のニューロンが他のニューロンとどのような連絡を持っているかを明らかにし、局所神経回路内の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 上述の目的へのアプローチとして、光遺伝学を用いた方法を用いる。光遺伝学的方法とは、特定の波長の光がトリガーとなり開くイオンチャネルや稼動するポンプを神経細胞等に発現させ、光を当てることにより細胞の興奮性をコントロールする方法である。近年実用化されるようになり、この手法を採用した研究が劇的に増えている。今回、青色光で開く非選択性陽イオンチャネルであるチャンネルロドプシン2と、緑色光で水素イオンを細胞外へ排出するポンプであるアーキロドプシンを用いた(次頁図)。神経細胞にチャンネルロドプシンを発現させた場合、青色光を当てることによりチャネルが開き、静止膜電位から脱分極を生じさせ、活動電位の発生を誘発することができる。また同様にあき口

ドプシンを発現させたニューロンに緑色光を当てた場合、陽イオンである水素イオンが細胞外へと排出されるため、静止膜電位は過分極し、細胞の興奮性は抑制される。



これらの分子を脊髄後角内の特定のニューロンに発現させ、光操作した時の神経回路の入力/出力変化を解析し、各インターニューロンの局所回路内の役割を明らかにする。今回は特にパルブアルブミン (PV) を発現する抑制性インターニューロンに注目し、その役割を調べる。この実験を行うために PV 発現細胞においてのみチャンネルロドプシンあるいはアーキロドプシンを発現するマウスを作製する。

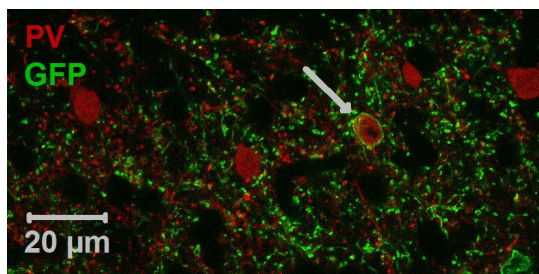
(2) 上述のようなマウスの作製には時間を要するため、その間従来のパッチクランプ法と免疫染色法を用い、記録した細胞に対してどのような 1 次感覚神経の入力があるか、また他のインターニューロンとどのような相互作用があるのかを調べる実験を行う。

4. 研究成果

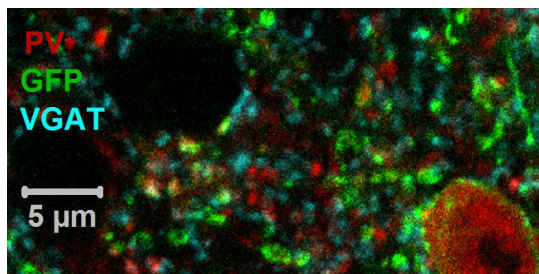
(1) 上述したマウスを作製するため理研バイオリソースセンターより、PV ニューロンに tTA という発現コントロール分子を発現するマウス (PV-tTA) tTA が tetO 配列に結合することによりチャンネルロドプシンを発現するマウス (tetO-ChR2) 及び同様にアーキロドプシンを発現するマウス (tetO-ArchT) を凍結精子の状態で購入し、佐賀大学動物実験施設において個体復元を行い、PV-tTA と tetO-ChR2 及び、PV-tTA と tetO-ArchT の交配を行い、その両方の遺伝子をもったマウス (ダブルトランスジェニックマウス)、PV-ChR2 マウス及び PV-ArchT マウスを得た。これらのマウスが目的のマウスとなる。

まず、目的の遺伝子の発現を組織学的に検討した。これらのマウスではチャンネルロドプシンの発現やアーキロドプシンの発現を緑色蛍光タンパク (GFP) で見ることができるようデザインされている。そこで PV の免疫染色と GFP の発現を比較した。その結果、PV-ChR2 マウスでは残念ながら脊髄内ではほとんど GFP の発現を確認することは出来なかった。従って、このマウスの組合せでは本研究を行うのに十分なチャンネルロドプシンの発現が得られないことが分かった。チャンネルロドプシンのマウス系統に関しては今後変更が必要である。一方、アーキロドプシンの発

現に関しては脊髄においてチャンネルロドプシンよりもはっきりと GFP の発現を確認することができた (下図)。しかし、明らかな GFP の発現を確認することができたのは PV ニューロンの中の一部に限られていた (下図矢印)。また、PV ニューロンには一部興奮性の

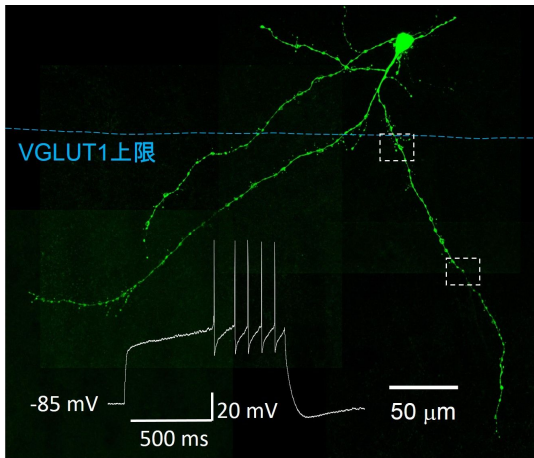


ニューロンも含まれており、GFP を発現しているニューロンが興奮性か抑制性かを確認するため、抑制性神経終末を染色することが出来る小胞型 GABA トランスポーター (VGAT) による染色を行った。その結果少なくとも一部の PV 陽性 GFP 陽性終末は抑制性であることが確認された (下図)。今後これらのマウスを用いて電気生理学的実験を行う予定である。

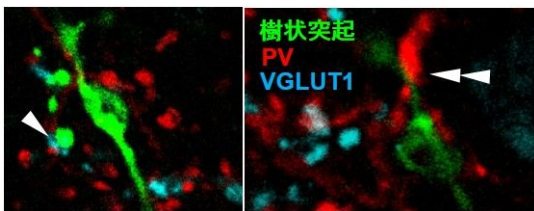


(2) パッチクランプ法と免疫染色を組み合わせた実験により、抑制性 PV 陽性細胞は形態学的分類では islet cell が多く、触圧覚を伝える 1 次感覚神経の終末 (低閾値機械受容性 (LTM) 終末、小胞型グルタミン酸トランスポーター1 (VGLUT1) 陽性) から入力を受け、また、その同じ種類の終末へ軸索 軸索シナプスを形成しシナプス前抑制に関与することを明らかにした。

我々は近年 vertical cell に対する LTM 終末からの入力を同様の手法で明らかにした。Vertical cell は投射細胞へ軸索を送っているため、正常な状態ではこの入力が抑制されているはずである。このことから、vertical cell への LTM 入力が PV ニューロンによりシナプス前抑制されていると仮説を立て、その検証を行った。次頁の細胞の写真は vertical cell の一例である。この細胞は細胞内への脱分極性通電により脱分極するが活動電位の発射は遅れて生じる。このパターンは興奮性の vertical cell に見られることが知られており、この細胞は興奮性の vertical cell と同定できる。この細胞について LTM 終末とその終末に抑制をかけると考えられる PV 陽性終末を観察するため、免疫染色により解析を



行った。上図の点線で囲まれた樹状突起の部分について、免疫染色した結果を下図に示す。



以前我々が報告したように、Vertical cell の樹状突起上のスパインには VGLUT1 陽性の LTM と考えられる終末が接していた。仮説のように、そのような LTM 終末に対して PV 終末が接触している像が得られた(左図、矢頭)。また、それだけではなく vertical cell と PV 細胞が直接接している像(右図、二重矢頭)も得られたことから、PV 細胞は vertical cell に対してシナプス前抑制だけでなく直接の抑制も行っており、少なくとも 2 段階に抑制していることが示唆された。

LTM 終末からの vertical cell への入力に触ただけで痛みを生じるというアロディニアを起こす神経回路と解釈することができる。本研究の結果から PV ニューロンは恒常的にこの LTM 終末から vertical cell への入力を抑制していると考えられ、PV ニューロンの機能不全がアロディニアを引き起こす可能性があることを示唆している。実際アメリカのグループが薬理遺伝学的手法を用いた実験により、このアイデアを指示する報告を行っている。ただ、この報告の中では LTM 終末から vertical cell への直接入力に関する観察はされておらず、他のインターニューロンを介していることが論じられている。

本研究の結果から、脊髄後角の局所神経回路を明らかにすることで難治性疼痛発症のメカニズムが明らかになる可能性が示唆された。また、脊髄後角局所神経回路内の特定のインターニューロンの興奮性を特異的にマニピュレートすることが可能となれば新たな治療戦略として創薬のターゲットとなるかもしれない。

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 2 件)

Yuzo Murata, Toshiharu Yasaka, Makoto Takano, Keiko Ishihara; Neuronal and glial expression of inward rectifier potassium channel subunits Kir2.x in rat dorsal root ganglion and spinal cord. Neuroscience Letters 査読有 Vol. 617, pp. 59-65. DOI: 10.1016/j.neulet.2016.02.007

八坂敏一、痛いの痛いの飛んでいけ：ゲートコントロール説の神経回路に重要である脊髄後角神経細胞の解析、日本病態生理学会雑誌、査読無、Vol. 23、2014、pp. 50-54

(学会発表)(計 20 件)

八坂敏一、脊髄後角インターニューロンの多様性と局所神経回路における役割、平成 28 年度生理学研究所研究会「痛みの理解を目指した先端的アプローチ」、2017 年 1 月 30-31 日、自然科学機構岡崎コンファレンスセンター(愛知県・岡崎市)

八坂敏一、David I Hughes、園畑素樹、Andrew J Todd、原博満、脊髄後角局所神経回路の抑制性調節に関する研究、第 9 回日本運動器疼痛学会、2016 年 11 月 26-27 日、御茶ノ水ソラシティカンファレンスセンター(東京都・千代田区)

Yasaka T、Boyle K、Graham B、Hughes D、Parvalbumin-Expressing Interneurons In The Mouse Spinal Dorsal Horn Gate Low Threshold Mechanoreceptive Input To Lamina I、The 16th World Congress on Pain(国際疼痛学会)、2016 年 9 月 26-30 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

八坂敏一、マウス脊髄後角 II 層 vertical cell への抑制性入力の解析、第 93 回日本生理学会大会、2016 年 3 月 22-24 日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

八坂敏一、Hughes DI、藤田亜美、熊本栄一、Todd AJ、脊髄後角 II 層 vertical cell への抑制性入力に関する研究、平成 27 年度生理学研究所研究会「痛みの理解を目指した先端的アプローチ」、2015 年 12 月 17-18、自然科学機構岡崎コンファレンスセンター(愛知県・岡崎市)

八坂敏一、Boyle AK、Shehab AS、Scott TD、Riddell SJ、藤田亜美、熊本栄一、Callister JR、Graham AB、Hughes ID、脊髄後角への有髄一次求心性線維入力はパルプアルブミン発現インターニューロンによるシナプス前抑制を受ける、第 38 回日本神経科学大会、

2015年7月28-31日、神戸国際会議場・展示場（兵庫県・神戸市）

八坂敏一、Boyle K、Shehab S、Scott D、Riddell J、藤田亜美、熊本栄一、Callister R、Graham B、Hughes D、ラット脊髄後角において有髄線維終末をシナプス前抑制する細胞の同定、第37回日本疼痛学会、2015年7月3-4日、市民会館崇城大学ホール（熊本市市民会館）（熊本県・熊本市）

八坂敏一、Boyle KA、Shehab SA、Scott DT、Riddell JS、藤田亜美、熊本栄一、Callister RJ、Graham BA、Hughes DI、げっ歯類パルプアルブミン発現脊髄後角 II 層介在ニューロンは有髄低閾値機械受容器終末への抑制性シナプス前入力のアリジンである、第92回日本生理学会大会、2015年3月21-23日、神戸国際会議場・展示場（兵庫県・神戸市）

八坂敏一、Boyle K、Shehab SA、Scott DT、Riddell JS、藤田亜美、熊本栄一、Callister RJ、Graham BA、Hughes DI、パルプアルブミンニューロンによる低閾値機械受容線維終末の制御、平成24年度生理学研究所研究会「痛みと痛覚情動連関の神経機構」、2014年12月10-11日、自然科学機構岡崎コンファレンスセンター（愛知県・岡崎市）

八坂敏一、Tiong SYX、Polgár E、Boyle K、園畑素樹、藤田亜美、熊本栄一、Hughes DI、Todd AJ、脊髄後角において触覚入力を受け痛覚伝達経路へ出力する興奮性インターニューロンと触覚終末をシナプス前抑制するインターニューロンの同定、第7回日本運動器疼痛学会、2014年10月25-26日、ANAクラウンプラザホテル宇部（山口県・宇部市）

八坂敏一、痛いの痛いの飛んでいけ：ゲートコントロール説の神経回路に重要である脊髄後角神経細胞の解析、第24回日本病態生理学会大会、2014年8月8-10日、北九州国際会議場（福岡県北九州市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八坂 敏一（YASAKA, Toshiharu）
鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授
研究者番号：20568365

(2) 研究分担者

園畑 素樹（SONOHATA, Motoki）
佐賀大学・医学部・准教授
研究者番号：50304895

(3) 研究協力者

Andrew J Todd
グラスゴー大学・教授

David I Hughes
グラスゴー大学・講師

Callister J Robert
ニューカッスル大学・教授

Brett A Graham
ニューカッスル大学・准教授