

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：34417

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670291

研究課題名(和文)二光子顕微鏡を用いた痒みの脊髄後角in vivoイメージングと情報伝達機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of itch mechanism by in vivo imaging of spinal dorsal horn with two-photon microscopy

研究代表者

伊藤 誠二 (ITO, SEIJI)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：80201325

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：痒みは皮膚を掻きたくなる不快な感覚で、アトピー性皮膚炎や腎透析患者を悩ませる症状である。皮膚を軽く掻くと痒みが消えるが、痒みがない時に強く掻くと痛みを引き起こす。このように、痒みと痛みは密接に関係し、その伝達経路は共通しているが、そのメカニズムはよくわかっていない。本研究では、痒み物質を頬に投与して、痒み行動を起こさせ、その伝達経路と伝達に関与する物質の解析を行った。その結果、痛みと痒みを起こす物質は異なるが、痛みと痒みに共通する伝達経路があることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Itch or pruritus has been identified as an unpleasant cutaneous sensation that provokes the desire to scratch and is a tormenting symptom in patients with atopic dermatitis and hemodialysis. Itch disappears by scratching the skin and strong scratching provokes pain. Thus, itch and pain are intimately related and may share similar pathways, but their mechanism remains largely unknown. In the present study, we applied pruritic agents to the cheek of mice and provoked scratching behaviors. The present study demonstrates that itch transmission pathway considerably shares pain transmission pathway but that agents that induce pain and itch are different.

研究分野：生化学を基礎として、ホルモン受容体の情報伝達機構と痛覚や搔痒の感覚受容の行動神経科学を専門とする

キーワード：動物モデル 搔痒 痛覚 グルタミン酸受容体 ガストリン遊離ペプチド c-fos

1. 研究開始当初の背景

我々は、痒みが痛み刺激とどのように区別され、脊髄で処理されるのか長年疑問に思っていた。具体的に述べると、痛覚を誘発する侵害刺激は持続することにより、末梢性感作、脊髄での中枢性感作により慢性疼痛に移行することがよく知られている。一方、搔痒感にはヒスタミン、セロトニン、クロロキン、PAR2をはじめ 1,000 以上の起痒物質が報告され、引っ掻き行動により痒みがおさまる。しかしながら、これらの痒み刺激が限られた一次求心性線維を介してどのように脊髄後角に伝達され、また、痛覚刺激とどのように区別されるのか不明であった。

グルタミン酸は興奮性神経伝達物質で、AMPA 型と NMDA 型の 2 種類のグルタミン酸受容体を介して痛みを脊髄後角に伝える。我々は NMDA 型グルタミン酸受容体の GluN2B サブタイプの 1472 番目の Tyr 残基を Phe 残基に置換して Tyr 残基がリン酸化できないノックイン (Y1472F-KI) マウスを用いて、GluN2B サブユニットの 1472 番目の Tyr 残基のリン酸化が神経障害性疼痛の発症・維持に関与していることを明らかにし、報告した (Matsumura *et al.*, *Eur. J. Neurosci.* **32**: 798-810, 2010)。

申請時に痒みの神経伝達物質として、gastrin-releasing peptide (GRP; Sun *et al.*, *Nature* **448**: 700-703, 2007; *Science* **325**: 1531-1534, 2009) と Natriuretic polypeptide B (BNP; Mishra & Hoon, *Science* **340**: 968-971, 2013) が相次いで発見され、痒み行動が痛覚行動と明確に区別されることが報告された。BNP の受容体は cGMP、NMDA 受容体は Ca²⁺ をセカンドメッセンジャーとすることから、痒みは cGMP センサー蛍光タンパク、痛みは Ca²⁺ 指示蛍光タンパクを発現するマウスを作製し、申請者が確立している二光子励起顕微鏡下の脊髄後角の *in vivo* イメージングで、長年の疑問が解決できると考えた。

2. 研究の目的

搔痒と痛覚の神経回路網と情報伝達機構の共通性と相違性を明らかにするために、(1) さまざまな起痒物質を頬に注入する急性搔痒モデルの確立と急性搔痒モデルを用いた刺激応答、神経回路網と情報伝達機構の解析、(2) 乾燥性慢性搔痒モデルの確立と慢性搔痒モデルを用いた刺激応答、神経回路網と情報伝達機構の解析、(3) 痒みの神経伝達物質が BNP と報告されたことから、痒み刺激に対する *in vivo* イメージングを確立するために、マウスで cGMP センサー蛍光タンパクの発現方法を確立し、二光子励起顕微鏡下に急性、慢性搔痒モデルを用いて、確立した痒み刺激に応答する細胞を *in vivo* イメージング、*in vitro* スライスの解析、(4) Y1472F-KI マウスを用いてグルタミン酸を介する神経伝達機構を搔痒モデルと疼痛モデルで比較検討をすることを当初の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 毛剃りしたマウスの頬にヒスタミン、セロトニン、クロロキン、エンドセリン等の起痒物質を投与し、テレビモニターで搔痒行動を録画し、搔痒行動を測定する。サブスタンス P (SP) を発痛物質として用いて疼痛行動を誘発し、テレビモニターで疼痛行動を録画し測定する。搔痒行動は薬物投与側の上肢で前頭部の引っ掻き動作、疼痛行動は前頭部を上肢でなでる行動で区別した。

(2) 剃毛した頬にアセトンとエーテルの混液を含ませたガーゼを当て、その直後に水を含ませたガーゼを当てる操作を毎日 2 回、5 日間繰り返して、乾皮症の慢性搔痒モデルを作製し、(1) と同じように、搔痒行動を観察する。慢性侵害受容性疼痛モデルは、足蹠のカラゲニン、ホルマリン等の起炎物質を注入、神経障害性疼痛モデルは第 5 腰部脊髄神経を切断・結紮して作製する。搔痒モデルと疼痛モデルを比較するために、頬の代わりに下肢に起痒物質を投与して搔痒モデルの作製を行う。

(3) 野生型マウスと Y1472F-KI マウスで急性及び慢性搔痒モデルを作製し、搔痒行動の変化、搔痒行動の変化を観察する。

(4) 起痒物質を投与後、延髄を摘出し、搔痒行動で活性化される神経細胞を gastrin-releasing peptide (GRP) とその受容体や c-fos の抗体を用い組織免疫染色を行い、発現するニューロンを同定する。

(5) GRP や NMDA などの神経伝達物質を大槽内に注入して搔痒行動の誘発を観察する。反対に AMPA 型あるいは NMDA 型グルタミン酸受容体や GRP 受容体 (GRPR) の拮抗薬を大槽内に注入して、搔痒行動が抑制されるかを観察する。(6) cGMP の受容タンパクとしてプロテインキナーゼ G (PKG) やホスホジエステラーゼのアイソフォーム 5 (PDE5) があり、FRET (Fluorescence resonance energy transfer) を利用する cGMP センサー用コンストラクトの報告 (*Nat. Method* **3**: 23-25, 2005) に従ってコンストラクトを数種類作製する。

作製したコンストラクトを神経系培養細胞に導入・発現させ、cGMP の応答を確認し、最善のコンストラクトを選択する。

選択したコンストラクトを子宮内遺伝子導入で脊髄での発現をチェックする。

子宮内遺伝子導入した脊髄スライスで cGMP に対する応答性、反応性をチェックする。BNP に応答する神経細胞の存在を確認する。そして、起痒物質による脊髄後角神経細胞の *in vivo* イメージングを二光子励起顕微鏡を用いて観察する。

同様に、Ca²⁺ センサー蛍光タンパクを子宮内遺伝子導入法で脊髄後角に発現させ、皮膚の触刺激、熱刺激、機械的刺激に応答する細胞の *in vivo* イメージングを二光子励起顕微鏡を用いて観察する。

4. 研究成果

(1)クロロキンを剃毛部の頬に注入して、投与後5分から15分で搔痒行動が見られたが、Y1472F-KI マウスではクロロキンによる搔痒行動が全く見られなかった。また、クロロキンを背部に注入した場合でも搔痒行動が見られたが、Y1472F-KI マウスではクロロキンによる搔痒行動の回数が減少した。同様に、ヒスタミン、セロトニン、エンドセリン、Compound48/80 などのさまざまな起痒物質でも搔痒行動がみられた。そして、セロトニン以外の起痒物質で誘発された搔痒行動はY1472F-KI マウスで減弱した。SPで誘発された疼痛行動の回数はY1472F-KI マウスで変化しなかった。以上の結果、神経障害性疼痛の発症・維持にGluN2Bサブユニットの1472番目のTyr残基のリン酸化が関与するだけでなく、急性搔痒行動にもGluN2Bサブユニットの1472番目のTyr残基のリン酸化が関与することを初めて明らかにした。クロロキンやヒスタミンとセロトニンの搔痒行動を誘発する情報伝達経路・機構が異なることが示唆された。SPによる急性疼痛行動がY1472F-KI マウスで変化しなかったことは、炎症性疼痛の発症・維持にGluN2Bサブユニットの1472番目のTyr残基のリン酸化が関与しない以前の報告と合致する。

(2)延髄や上位中枢の脳でのc-fosの発現は痒みの神経伝達経路を解析するのに有用な手段である。図1に示すように、延髄脊髓路核のVcとC1領域の部分に発現すること、Y1472F-KI マウスではc-fos発現がみられないことから、頬部での搔痒行動は延髄脊髓路核に入力し、NMDA受容体GluN2Bのリン酸化が重要な役割をすることが確かめられた。

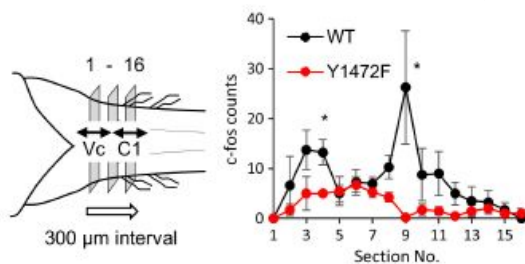


図1. 延髄脊髓路核でのc-fosの発現

(3)一部のc-fos発現細胞はGRPRの発現と一致したが、GRP発現とは一致しなかった。

(4)搔痒行動の延髄脊髓路核での神経伝達機構を解明するために、NMDA型グルタミン酸受容体作動薬NMDAを大槽内に注入した。NMDAは5-20nmolの範囲で濃度依存的に搔痒行動を誘発した。NMDAで誘発された搔痒行動は、非特異的NMDA受容体拮抗薬D-AP5、GluN2Bサブユニット特異的拮抗薬CP101,606で約50%抑制された。NMDA受容体により活性化され、c-fosが発現するニューロン数は、頬部にクロロキンを注入してc-fosが発現するニューロン数よりも顕著に多かった。その発現したニューロンの一部はGRPRを発現してい

た。以上の結果から、搔痒行動においてGluN2Bサブユニットが関与することが明らかにされた。

(4)一方、GRPを大槽内投与すると、搔痒行動が誘発されたが、Y1472F-KI マウスでも野生型マウスと同様に搔痒行動が誘発された。NMDAの投与では多数のニューロンでc-fosの発現がみられたが、GRPの投与ではc-fos発現はみられなかった。

(5)NMDAあるいはGRPによる搔痒行動の誘発は部分的にGRPR拮抗薬で抑制された。以上の結果をまとめると、クロロキンにより延髄脊髓路核のニューロンの中でグルタミン酸がGRPRを発現するニューロンに直接作用して搔痒行動を誘発する経路と、GRP発現ニューロンを介して間接的にGRPRを活性化する少なくとも2経路あることが示唆された(図2)。NMDA受容体のシグナルはc-fos発現を惹起するのに十分な強さがあるのに対し、GRPのシグナルは弱く惹起できないと考えられた。

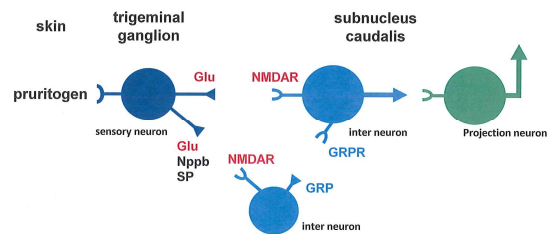


図2. 延髄脊髓路核における搔痒行動に関わる2経路の想定図

(6)cGMPセンサー蛍光タンパクによるin vivoイメージングを申請時の計画をしていたが、BNPが痒みを神経伝達物質であるという論文(*Science* 340:968-971, 2013)はGRPが痒みの神経伝達物質であるというグループにより否定され、当初の計画の中止を余儀なくされた。そのため、痛みと痒みの伝達経路を明らかにするために、神経活動に伴い誘導されるc-fosやArcのプロモーターの下流で蛍光タンパクが発現するトランスジェニックマウスを入手して、解析を行い、痒み行動に伴い蛍光タンパクが上昇することを確認した。現在、延髄だけでなく脳全体のc-fosやArcの発現の3次元像の構築をすすめており、痛みと痒みの発現パターンと比較することにより、痒みと痛みの神経回路網、伝達経路の共通性と相違性の解析を進めている。

(7)乾皮症による慢性搔痒モデルを用いて、慢性搔痒にもGluN2Bサブユニットの1472番目のTyr残基のリン酸化が関与することを明らかにした。

(8)セロトニンの頬部に注入により誘発される搔痒行動はY1472F-KI マウスで変化がないことから、クロロキンとセロトニンのc-fos発現をin situハイブリダイゼーションによるmRNAとタンパクの免疫染色で解析を行い、クロロキンとセロトニンの神経伝達経路の共通部分と相違する部分を明らかにした。

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13件)

Inoue, A., Uchida, H., Nakazawa, T., Yamamoto, T. and Ito, S. Phosphorylation of NMDA receptor GluN2B subunit as its Tyr1472 is important for trigeminal processing of itch. *Eur. J. Neurosci.* **44**, 2474-2482, 2016. 査読有
DOI:10.1111/ejn.13337.

Nguyen H. T., Katano, T., Matsumura, S. and Ito, S. Involvement of endothelin B receptor in peripheral nerve regeneration using sciatic nerve transection-regeneration model. *Pain Res.* **30**, 167-172, 2015. 査読有
DOI:10.11154/pain.30.167

Okuda-Ashitaka, E., Ito, S. Nocistatin: milestone of one decade of research. *Current pharmaceutical design* **21**, 868-884, 2015. 査読有
DOI:10.2174/1381612820666141027112451#sthash.aTk8DvaL.dpuf

Uchida, H. and Ito, S. Differential regulation of RNA-ending enzymes, ADAR1 and ADAR2, expression by 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A in human neuronal SH-SY5Y cells. *Neuroreport* **6**, 1089-1094, 2015. 査読有
DOI:10.1097/WNR.0000000000000474

Nguyen H. T., Katano, T., Matsumura, S., Pham M. V., Muratani, T., Minami, T. and Ito, S. Role of c-Jun N-terminal kinase in late nerve regeneration monitored by *in vivo* imaging of thy1-yellow fluorescent protein transgenic mice. *Eur. J. Neurosci.* **43**, 548-560, 2016. 査読有
DOI:10.1111/ejn.13139.

Shudo, Y., Shimojo, M., Fukunaga, M. and Ito, S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is regulated by alternative splicing of transcriptional repressor REST/NRSF in nerve injury. *Life Sci.* **143**, 174-181, 2015. 査読有
DOI:10.1016/j.lfs.2015.10.033

Omoto, H., Matsumura, S., Kitano, M., Miyazaki, S., Minami, T. and Ito, S. Comparison of mechanisms of allodynia induced by acromelic acid A between early and late phases. *Eur. J. Pharmacol.* **760**, 42-48, 2015. 査読有
DOI:10.1016/j.ejphar.2015.03.075

Matsumura, S., Taniguchi, W., Nishida, K., Nakatsuka, T. and Ito, S. *In vivo* two-photon imaging of structural dynamics in the spinal dorsal horn in an inflammatory pain model. *Eur. J. Neurosci.* **41**, 989-997, 2015. 査読有
DOI:10.1111/ejn.12837

片野泰代, 伊藤誠二. 脊髄に起因する痛み～脊髄の構造と慢性化をおこす中枢性感作～ Chronic pain is induced by central sensitization in spinal dorsal horn. *Practice of Pain Management*, **6**, 22-25頁, 2015. 査読無
http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=ai1popmd/2015/000601/003&name=0022-0025j&UserID=202.209.6.52&base=jamas_pdf

Tsuda, M., Kaneko, S., Ando, A., Nishimura, T., Okuda-Ashitaka, E., Ito, S., Taomoto, M., Matsumura, M. and Takahashi, K. Controllable urokinase gene expression in trabecular meshwork cells. *J. Clin. Exp. Ophthalmol.* **5**, 329(1-4), 2014. 査読有
DOI:10.4172/2155-9570.1000329.

Nishida, K., Matsumura, S., Taniguchi, W., Uta, D., Furue, H. and Ito, S. Three-dimensional distribution of sensory stimulation-evoked neuronal activity of spinal dorsal horn neurons analyzed by *in vivo* calcium imaging. *PLOS ONE* **9**, e103321, 2014. 査読有
DOI:10.1371/journal.pone.0103321.

Lee, B., Villarreal-Ponce, A., Fallahi, M., Ovadia, J., Sun, P., Yu, Q.C., Ito, S., Sinha, S., Nie, Q. and Dai, X. Transcriptional mechanisms link epithelial plasticity to adhesion and differentiation of epidermal progenitor cells. *Dev. Cell* **29**, 47-58, 2014. 査読有
DOI:10.1016/j.devcel.2014.03.005.

Lu, J., Yao, I., Shimojo, M., Katano, T., Uchida, H., Setou, M. and Ito, S. Identification of nitrated tyrosine residues of protein kinase G-1 α by mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 1387-1396, 2014. 査読有
DOI:10.1007/s00216-013-7535-4.

[学会発表](計16件)

Nguyen H.T., Katano, T., Matsumura, S., Pham, M.V. and Ito, S. Involvement of Na⁺/K⁺-ATPase in peripheral nerve regeneration via lactate signaling in sciatic nerve transection-regeneration

model. The 46th annual meeting of the Society for Neuroscience, 2016 年 11 月 12-16 日, San Diego(U.S.A.)

Pham, M.V., Nguyen H.T., Katano, T., Matsumura, S. and Ito, S. Study on the effect of diabetic neuropathy on peripheral nerve regeneration in mouse model. 16th World Congress on Pain, 2016 年 9 月 26-30 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

Nguyen, H. T., Katano, T., Matsumura, S. and Ito, S. New mechanisms for pain control and clinical potential. International Conference on Pain-Anesthesiology and pain control-, 2015 年 11 月 20 日, Hanoi (Vietnam)

Shimojo, M., Shudo, Y. and Ito, S. Selective siRNA-mediated suppression of nSR100(SRRM4) induces the cell death of small cell lung cancer. The 45th annual meeting of the Society for Neuroscience, 2015 年 10 月 17-21 日, Chicago(U.S.A.)

Matsumura, S., Taniguchi, W., Nishida, K., Nakatsuka, T. and Ito, S. Chasing morphological changes of neuronal processes in the spinal dorsal horn in an inflammatory pain model by using two-photon microscopy. The 45th annual meeting of the Society for Neuroscience, 2015 年 10 月 17-21 日, Chicago(U.S.A.)

Katano, T., Watanabe, M., Yamazaki, M., Abe, M., Yao, I., Sakimura, K. and Ito, S. Localization of neuropathic pain-related protein, BEGAIN in the spinal dorsal horn. The 45th annual meeting of the Society for Neuroscience, 2015 年 10 月 17-21 日, Chicago(U.S.A.)

Nguyen, H. T., Matsumura, S., Katano, T. and Ito, S. Involvement of c-Jun N-terminal kinase in neurite extension of cultured DRG neurons. The 45th annual meeting of the Society for Neuroscience, 2015 年 10 月 17-21 日, Chicago(U.S.A.)

Pham, M.V., Nguyen, H.T., Katano, T., Matsumura, S. and Ito, S. Two feasible mouse models for neuropathy. The 2nd Gene & Immunotherapy Conference in Vietnam 2015, 2015 年 9 月 25-28 日, Ho Chi Minh(Vietnam)

Nguyen, H. T., Katano, T., Matsumura, S. and Ito, S. Involvement of endothelin B receptor in peripheral nerve regeneration using sciatic nerve transection-

regeneration model. VSEM Conference on Emergency Medicine, 2015 年 3 月 9-13 日, Saigon(Vietnam)

Nguyen, H. T., Katano, T., Matsumura, S. and Ito, S. Involvement of c-Jun N-terminal kinase in peripheral nerve regeneration. The 44th annual meeting of the Society for Neuroscience, 2014 年 11 月 15-19 日, Washington D.C.(U.S.A.)

Ito, S., Nguyen, H. T., Matsumura, S. and Katano, T. Involvement of endothelin in peripheral nerve regeneration. The 44th annual meeting of the Society for Neuroscience, 2014 年 11 月 15-19 日, Washington D.C.(U.S.A.)

Shimojo, M., Shudo, Y., Ito, S. Identification of small cell lung cancer (SCLC)-specific miRNAs in blood as a tumor marker for the detection of SCLC. The 44th annual meeting of the Society for Neuroscience, 2014 年 11 月 15-19 日, Washington D.C.(U.S.A.)

矢尾育子, 松村伸治, 片野泰代, 山肩葉子, 井本敬二, 伊藤誠二. CaMKII キナーゼ不活型 KI マウスにおける慢性疼痛モデル脊髄後角の CaMKII のシナプス局在. 第 37 回日本神経科学大会, 2014 年 9 月 11-13 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

西田和彦, 松村伸治, 伊藤誠二. In vivo カルシウムイメージングを用いた皮膚の異なる点への感覚刺激に応答する脊髄後角ニューロンの解析. 第 37 回日本神経科学大会, 2014 年 9 月 11-13 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

伊藤誠二, 片野泰代, 松村伸治, 西田和彦. 成熟した疼痛研究の新しい展開. New departure of mature pain research. 日本ペインクリニック学会第 48 回大会, 2014 年 7 月 25 日, 京王プラザホテル (東京都・新宿区)

Nguyen Huu Tu, 片野泰代, 松村伸治, 伊藤誠二. 末梢神経再生モデルを用いた神経再生におけるエンドセリンの関与 Involvement of endothelin B receptor in peripheral nerve regeneration using tubing and osmotic pump model. 第 36 回日本疼痛学会, 2014 年 6 月 20-21 日, KKR ホテルオーサカ (大阪府・大阪市)

〔図書〕(計 4 件)

伊藤誠二. 痛覚のふしぎ 脳で感知する痛みのみカニズム, 全 224 頁, 講談社, 2017

西田和彦, 伊藤誠二. 8章: 体性感覚の受容と伝達の分子機構「分子脳科学」, 89-98頁(全312頁), 化学同人, 2015

伊藤誠二. PACAP と神経障害性痛「痛みのScience & Practice 第8巻 臨床に役立つ神経障害性痛の理解」, 29-30頁(全285頁), 文光堂, 2015

Okuda-Ashitaka, E., Ito, S. Pain regulation induced by nocistatin-targeting molecules: G protein-coupled-receptor and nocistatin-interacting protein. *NOCICEPTIN OPIOID Vitam. Horm.*, 97, 147-165(全357頁), 2014

〔その他〕

ホームページ等

<http://www3.kmu.ac.jp/medchem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 誠二 (ITO, Seiji)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号: 80201325

(2) 研究分担者

松村 伸治 (MATSUMURA, Shinji)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号: 70276393

西田 和彦 (NISHIDA, Kazuhiko)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号: 80448026

井上 明俊 (INOUE, Akitoshi)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号: 50709152

(4) 研究協力者

グウェン ヒュー トゥ (NGUYEN, Huu Tu)

ファン ミン ヴン (PHAM, Minh Vuong)