

脊髄後角抑制性介在神経の感覚伝達における役割及びその内因性制御メカニズムの解明

古賀, 啓祐

<https://hdl.handle.net/2324/1931856>

出版情報：九州大学, 2017, 博士（創薬科学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

脊髄後角抑制性介在神経の感覚伝達における役割及びその内因性制御メカニズムの解明

ライフイノベーション分野 3PS15018W 古賀 啓祐

【序論】

体性感覚は、末梢の一次求心性神経が受容した刺激情報が脊髄後角へ伝達され、さらにその情報が脳へ伝達されることで知覚される。脊髄後角には抑制性と興奮性の介在神経が数多く存在し、末梢から脊髄を介する脳への正常な感覚伝達には、脊髄後角内での抑制と興奮のバランスが重要であることが知られている。近年、脊髄後角神経の多様性やその回路が徐々に明らかとなっているが、一方で、実際に抑制性介在神経の活動性変化が個体レベルに及ぼす影響はほとんどわかっていない。

本研究では、内因性 VGAT (vesicular GABA transporter) プロモーター下流に IRES 配列と Cre 酵素をノックインして抑制性介在神経特異的に Cre を発現する *Vgat-Cre* マウスと、FLEX switch システムを利用することで、脊髄後角抑制性介在神経特異的な遺伝子発現制御法の確立を試みた。さらに細胞機能を急性に制御する目的で、designer receptors exclusively activated by designer drugs (DREADD) に着目した。この受容体は、内因性のリガンドが作用せず、合成リガンド選択的に活性化される人工受容体である。特に、hM4Di は Gi 共役型の G タンパク共役型受容体 (GPCR) であり、神経細胞においてこの受容体を活性化させると、下流シグナルによりカリウムチャネルを開口させることで膜電位の過分極を引き起こし、細胞活動を抑制することが可能となる。このような手法を組み合わせることで、脊髄後角抑制性介在神経の活動性変化に伴ったシナプス伝達への影響及び感覚制御における役割を検討した。

さらに、抑制性介在神経活動を調節し得る内因性の伝達物質としてノルアドレナリンに焦点をあて、ノルアドレナリンによる抑制性介在神経の制御とその役割について検討を行った。脳幹から下行性に脊髄後角に投射するノルアドレナリン神経は、感覚伝達において重要な役割を持つことが古くから知られている。ノルアドレナリンは、抑制性介在神経に発現する Gq 共役型の GPCR である α_1 -アドレナリン受容体 (α_1 -AR) を介して同神経を活性化。しかしながら、この抑制性神経の活性化に関与する α_1 -AR のサブタイプや、その行動学的な役割は明らかにされていない。そこで本研究では、薬理的な手法から抑制性介在神経の活動を制御する α_1 -AR サブタイプを同定し、shRNAmir システムと FLEX switch システムを組み合わせることにより細胞種特異的な α_1 -AR サブタイプのノックダウンを行い、行動学的な解析から感覚伝達における役割解明を試みた。

【方法】

脊髄後角抑制性神経特異的遺伝子発現

抑制性神経特異的に Cre 酵素を発現する *Vgat-Cre* マウスに、Cre 依存的なアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを脊髄実質内に処置した。AAV ベクター処置後 4-5 週後に実験に使用した。

免疫組織染色法

4% パラホルムアルデヒド溶液で固定したマウスの腰部脊髄を摘出し、スクロース置換後 O.T.C. compound に包埋した。クライオスタットにより組織切片を作成し、一次及び二次抗体処置後、共焦点顕微鏡で画像を取得した。

自発的侵害防御行動の測定

hM4Di のリガンドである clozapin-N-oxide (CNO) 又は溶媒投与後、マウスの自発的侵害防御反応を撮影し、ウイルスベクターを処置した側の後肢について、舐める行動 (licking) と噛む行動 (biting) の時間を計測した。

電気生理学的記録法

マウスを用いて脊髄の急性スライスを作製し、ホールセルパッチクランプ法により神経細胞の膜電位応答及び、興奮性と抑制性シナプス応答の記録を行った。

カプサイシン試験及びカプサイシン誘発痛覚過敏の測定

足底部にカプサイシン溶液を 10 μ L 投与した。投与から 5 分間、マウスが足を舐めるもしくは噛むといった痛み行動時間を測定した。さらに投与から 30, 60, 90, 120, 180 分後に、投与側と非投与側において von Frey ファイラメントを用いてマウス後肢疼痛閾値を測定した。

【結果】

脊髄後角抑制性神経の急性の抑制によるモルヒネ抵抗性の侵害防御行動の誘発

抑制性神経特異的に Cre リコンビナーゼを発現する *Vgat-Cre* マウスに、FLEX switch システムを利用した AAV2/9-FLEX-EF1 α -hM4Di-P2A-mCherry ウイルスベクターを後肢の感覚入力を受ける L4 脊髄後角実質内へ微量注入した (*Vgat-Cre*;AAV-hM4Di^{FLEX} マウス) (Fig. 1a)。免疫組織染色法により mCherry の発現様式について検討を行ったところ、mCherry の蛍光はウイルス処置側の脊髄後角表層 (主に lamina I-III) で観察され、抑制性神経のマーカーである PAX2 と共局在を示した (Fig. 1b)。電気生理学的手法により mCherry 陽性細胞からホールセルパッチクランプ記録を行い、hM4Di のアゴニストである CNO (10 μ M) を灌流処置すると、急速な過分局応答を示した (Fig. 1c, d)。これらのことから、脊髄後角抑制性介在神経特異的な活動抑制が可能であることが示された。

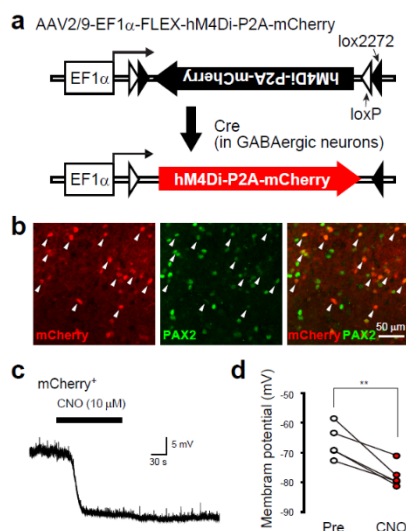


Fig. 1 脊髄後角抑制性神経特異的 hM4Di の遺伝子導入 (a) ウイルスベクターの配列の模式図。(b) 抑制性神経特異的な遺伝子導入。(c, d) hM4Di アゴニストである CNO 処置による過分極応答 (c) 及びその定量 (d)。

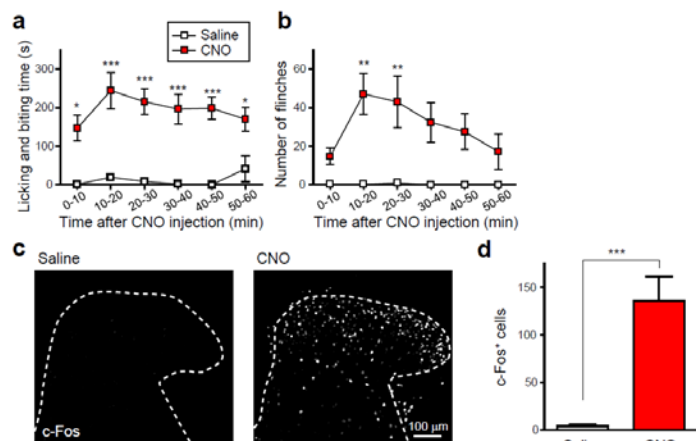


Fig. 2 脊髄後角抑制性神経特異的抑制による侵害防御行動の誘発

(a, b) CNO により誘発される侵害防御行動。後肢を舐めるもしくは噛む行動 (a) とバタバタさせる行動 (b)。(c, d) 神経細胞活動性マーカーの c-Fos の脊髄における発現変化 (c) 及びその定量 (d)。

次に個体レベルで脊髄後角抑制性神経特異的な活動抑制を行う目的で、*Vgat-Cre;AAV-hM4Di^{FLEX}* マウスに CNO を投与したところ、自発的な侵害防御行動が引き起こされた (Fig. 2)。さらに、電気生理学的な検討から hM4Di による脱抑制は NMDA 受容体を介した A 線維性の多シナプス性入力の増強を引き起こし、この増強が自発的な侵害防御行動の誘発に関与することを明らかにした。また非常に興味深いことに、鎮痛薬を用いた検討において、CNO 誘発の侵害防御反応は全身性のモルヒネ投与に対して抵抗性を示した。

ノルアドレナリンによる脊髄後角抑制性介在神経の機能調節とその役割解明

過去の報告で、脊髄後角においてノルアドレナリンは抑制性シナプス伝達物質の GABA やグリシンを介する抑制性シナプス伝達である自発的抑制性シナプス後電流 (sIPSC) の頻度を増強することが報告されている。そこで、ノルアドレナリンによる IPSC 増強に関与する受容体サブタイプの同定を目的として、薬理的な検討を行った。ノルアドレナリンによる IPSC 頻度の増強は、 α_{1A} -AR 選択的拮抗薬である silodosin の前処置で有意に抑制された (Fig. 3)。一方で、 α_{1B} -AR 及び α_{1D} -AR に選択性の高い拮抗薬である L-765,314 及び A-315456 ではそのような抑制作用は認められなかった (Fig. 3b)。次に、この作用が脊髄後角抑制性介在神経に発現する α_{1A} -AR を介しているか否かを検証する目的で、shRNAmir システムと FLEX switch システムを組み合わせることで脊髄後角抑制性介在神経特異的な α_{1A} -AR のノックダウンを試みた。 α_{1A} -AR をターゲットとした shRNAmir を Cre 依存的に発現させるベクターを *Vgat-Cre* マウスの L4 脊髄後角両側に微量注入した (*Vgat-Cre;AAV-shAdra1a^{FLEX}* マウス 及び、コントロールとして *Vgat-Cre;AAV-shscramble^{FLEX}* マウス)。このようなマウスでは、コントロールマウスと比較して α_1 -AR アゴニストであるフェニレフリンによる抑制性シナプス伝達の増強が有意に低下した (Fig. 4a-c)。

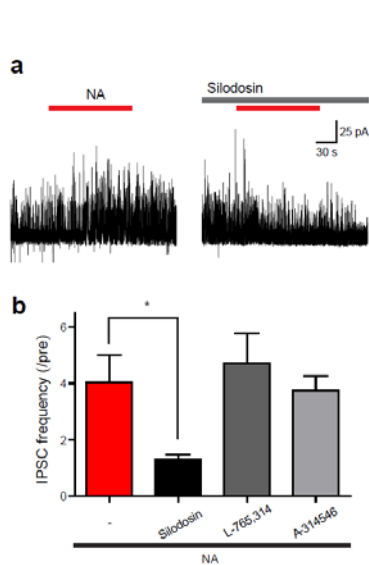


Fig. 3 ノルアドレナリン (NA) による sIPSC の増強は α_{1A} -AR を介する

(a) NA による sIPSC 増強の代表的なトレース (left)。 α_{1A} -AR 選択的アンタゴニスト silodosin 存在下での NA の効果 (right)。 (b) 各種アンタゴニストの効果の定量。L-765,314; α_{1B} -AR 選択的アンタゴニスト。A-315456; α_{1D} -AR 選択的アンタゴニスト

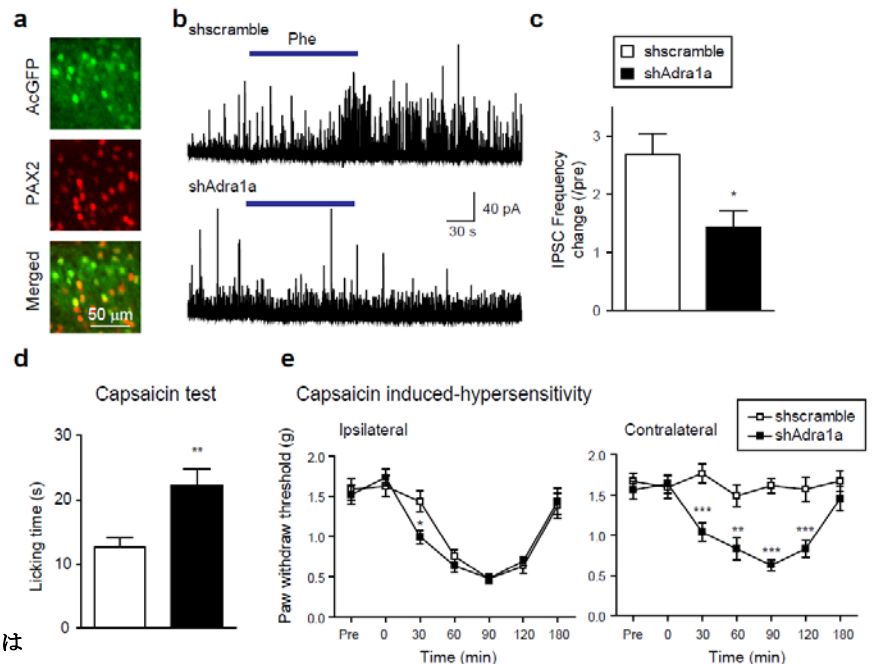


Fig. 4 脊髄後角抑制性神経特異的 α_{1A} -AR ノックダウンの効果

(a) 抑制性介在神経特異的遺伝子導入。 (b, c) shウイルス及びコントロールウイルス導入動物でのフェニレフリン効果の代表的なトレース (b) 及び定量 (c)。 (d, e) 脊髄後角抑制性神経特異的 α_{1A} -AR ノックダウン動物における痛み行動の解析。カプサイシン試験 (d) 及び、カプサイシン誘発の遅発性過敏応答。 (e, 投与側; left, 非投与側; right)

さらに、 α_{1A} -AR は Gq 共役型 GPCR であることから、脊髄後角抑制性介在神経の Gq シグナルが sIPSC の増強に対して十分であるかを検討した。脊髄後角抑制性介在神経特異的に Gq 共役型の DREADD である hM3Dq を導入して同神経の特異的な活性化を引き起こすと、抑制性シナプス伝達の増強が観察された。一方で、hM3Dq を用いたアストロサイト特異的な活性化による検討から、ノルアドレナリンによる抑制性神経の活性化と並行して引き起こされるアストロサイトの活性化は、抑制性シナプス伝達に対してむしろ抑制的に作用することが示唆された。

最後に、抑制性介在神経特異的 α_{1A} -AR のノックダウンを両側性に行った *Vgat-Cre;AAV-shAdra1a^{FLEX}* マウスを用いて、抑制性介在神経に発現する α_{1A} -AR の各種感覚情報伝達における役割を明らかにするために行動学的な検討を行った。von Frey 試験及び hot-plate 試験により、軽度機械刺激及び侵害性熱刺激に対する反応性を調べたところ有意な変化は認められなかった。次に、侵害刺激に対する応答性を調べる目的でカプサイシン試験を行ったところ、コントロールマウスと比較して *Vgat-Cre;AAV-shAdra1a^{FLEX}* マウスではカプサイシン投与後の licking 行動が有意に増加した (Fig. 4d)。また、足裏へのカプサイシン投与は軽度機械刺激に対して遅発性の過敏化を引き起こすが、その過敏応答がコントロール群と比較して *Vgat-Cre;AAV-shAdra1a^{FLEX}* マウスではより早期に観察された (Fig. 4e, left)。また非常に興味深いことに、コントロール群ではカプサイシン非投与側 (contralateral) の後肢では軽度機械刺激への応答性に変化が見られないのに対し、*Vgat-Cre;AAV-shAdra1a^{FLEX}* マウスでは投与側と同様に非投与側でも機械刺激の過敏化が引き起こされた (Fig. 4e, right)。このことから、脊髄後角抑制性介在神経の α_{1A} -AR は、カプサイシンによる侵害刺激に対する即時的な疼痛行動に対して抑制的な役割を有していることと、遅発的な軽度機械刺激過敏応答に対しては両側性で抑制していることが示唆された。

【考察】

本研究では、FLEX switch システムと *Vgat-Cre* マウスを用いて脊髄後角抑制性介在神経特異的な遺伝子発現法を確立した。さらに、hM4Di を用いて抑制性介在神経の活動を急性に抑制すると、A 線維性の興奮性シナプス伝達が NMDA 受容体を介して脊髄後角第 II 層神経において増強し、モルヒネ抵抗性を示す自発的な侵害防御行動が引き起こされることが明らかとなった。本研究結果が、慢性疼痛においてオピオイドに抵抗性を示すメカニズムの解明や新規治療薬の開発に繋がることが期待される。

さらに本研究では、これまで明らかにされていなかった抑制性介在神経を賦活するノルアドレナリン受容体のサブタイプを同定し、その痛覚制御における役割を明らかにした。また、急性痛から慢性痛への遷移化は臨床でも問題となっており、同神経の α_{1A} -AR が侵害刺激後の過敏応答に抑制的に働くことを明らかにした本研究結果が、この遷移化の予防戦略の構築に繋がることを期待される。また、ノルアドレナリン作用を調節するプレガバリンやガバペンチン及び抗うつ薬などの薬物は、神経障害性疼痛における第一線の鎮痛薬であるが、急性の痛みには効きにくいことも報告されており、ノルアドレナリンによる神経やグリア細胞の調節メカニズムを明らかにすることで、その鎮痛効果をより有効なものにすることが期待される。

【発表論文】

Chemogenetic silencing of GABAergic dorsal horn interneurons induces morphine-resistant spontaneous nocifensive behaviours.

Koga K, Kanehisa K, Kohro Y, Shiratori-Hayashi M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, Furue H, Tsuda M.

Sci Rep 7: 4739 (2017)