

脊髄後角アストロサイトを介した下行性ノルアドレナリン経路による感覚変調機構の解明

松田, 烈士

<https://hdl.handle.net/2324/1931857>

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（2）

脊髄後角アストロサイトを介した下行性ノルアドレナリン経路による感覚変調機構の解明

九州大学大学院薬学府ライフイノベーション分野 3PS15019P 松田 烈士

【序論】

グリア細胞の一種であるアストロサイトは脳や脊髄内においてシナプス近傍に存在し、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇をもたらす神経伝達物質の受容体を発現している。アストロサイトの Ca^{2+} シグナルは神経回路機能の調節や行動の変化に関与する可能性が提唱されているが、*in vivo* での報告はごく僅かである。これまで我々のグループは脊髄後角アストロサイトが神経障害性疼痛の維持 (Tsuda et al., 2011) や慢性掻痒の増悪 (Shiratori-Hayashi et al., 2015) に重要な役割を果たしていることを報告しており、脊髄後角アストロサイトを標的とした感覚異常の治療戦略に早くから着目してきた。病態時における脊髄アストロサイトの役割が解明される一方で、正常時における脊髄後角アストロサイトの機能はいまだ不明な点が多い。末梢組織と脳からの情報を処理・修飾・統合する脊髄後角の体性感覚制御機構を理解することは、その破綻によって生じる感覚異常の発症メカニズムの解明へと繋がり、病態の理解や新規治療法の開発に貢献することが期待できる。そのような中、私は2光子励起顕微鏡を用いた生体イメージング解析により、一次求心性神経刺激に応じて脊髄後角アストロサイトが細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させ、活性化することを見出した。本研究では、未だ明らかにされていない、脊髄後角アストロサイトの活性化機構ならびにその役割を生体イメージング技術と行動薬理学的手法により検討した。

【方法】

In vivo Ca^{2+} イメージング

AAV2/9-gfaABC₁D-GCaMP6m-WPRE を左側脊髄実質内に注入することで脊髄アストロサイト選択的に GCaMP6m を発現させた。マウスに脊髄固定具を装着し、椎弓除去を施し、2光子励起顕微鏡を使用することで第3~4腰髄のアストロサイト Ca^{2+} イメージングを行った。カプサイシンを足裏に投与することで一次求心性神経を刺激した。

Ex vivo Ca^{2+} イメージング

脊髄アストロサイトに GCaMP6m を発現させたマウスから脊髄を摘出し、ミクロトームを用いて急性スライス標本を作製した。共焦点顕微鏡を使用することで Ca^{2+} イメージングを行った。

痛み行動測定

カプサイシンを後肢に投与した後、5分間でマウスが後肢をなめる時間を計測した。

von Frey フィラメントを用いてマウス後肢足底部に軽度機械刺激を与えた際の後肢逃避行動の有無を確認し、その刺激に対する逃避閾値を算出することで解析した。

【結果】

侵害刺激による脊髄後角アストロサイトの Ca^{2+} 応答

脊髄後角アストロサイトが痛覚シグナルを受容して活性化を示すか否かを検討するために、2光子励起顕微鏡を用いてアストロサイトの *in vivo* Ca^{2+} イメージングを行った。アデノ随伴ウイルスを利用して脊髄アストロサイト選択的に Ca^{2+} センサー GCaMP6m を発現したマウスを作製し、一次求心性神経刺激時のアストロサイトの Ca^{2+} 応答を観察した。Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1) アゴニストのカプサイシンをマウスの左後肢に投与して一次求心性神経を刺激したところ、アストロサイトが Ca^{2+} 応答を示した (Figure 1)。この結果から、脊髄後角アストロサイトが侵害シグナルを受容して活性化を示すことが明らかになった。続いて、観察側脊髄と反対側の後肢にカプサイシン刺激を行ったところ、アストロサイトの細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が観察された (Figure 1)。これらの結果から、侵害シグナルは脊髄後角アストロサイトへと入力する経路は一次求心性神経だけでなく、他の経路も存在する可能性が示唆された。

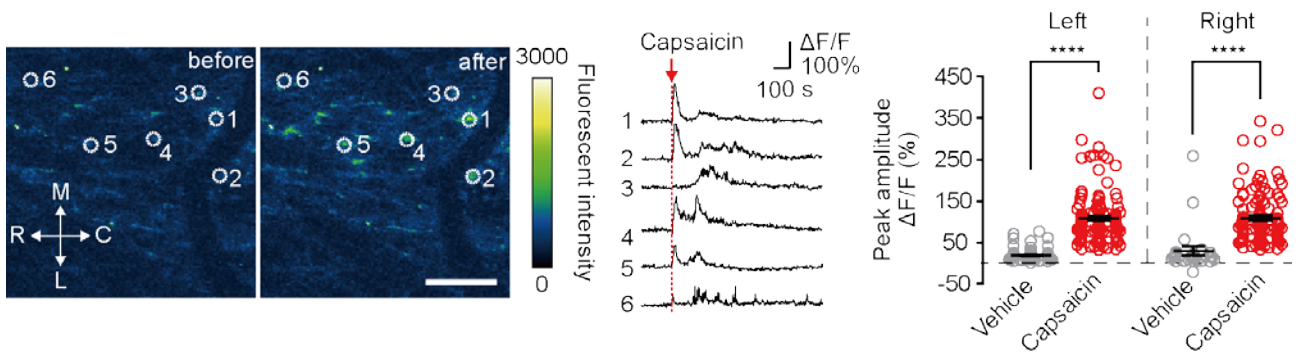


Figure 1.

後肢へのカプサイシン刺激は脊髄後角アストロサイトの細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させる。

ノルアドレナリンは脊髄アストロサイトの細胞内 Ca^{2+} 上昇を引き起こす

脊髄後角アストロサイトを活性化させる一次求心性神経以外の経路として、脳幹から脊髄後角へと投射する下行性痛覚調節系に着目した。下行性経路から放出される代表的モノアミンであるノルアドレナリン (NA) とセロトニンのうち、NA に対して脊髄アストロサイトが強い応答性を有することを急性スライス標本でのイメージング解析にて明らかにした。さらに薬理的検討により、NA によるアストロサイトの応答は α_{1A} -アドレナリン受容体 (α_{1A} -AR) の寄与が最も高いことを明らかにした (Figure 2)。

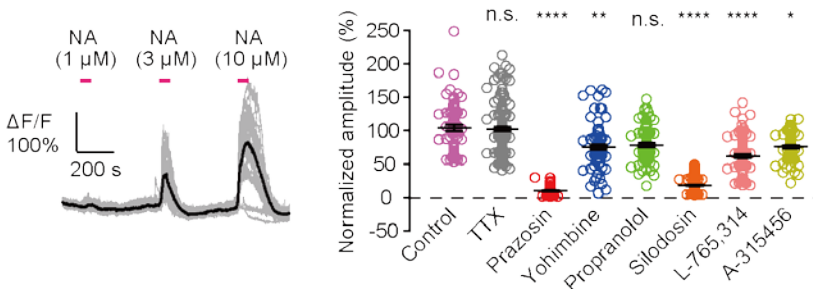


Figure 2.

脊髄アストロサイトは α_{1A} -AR を介して NA を受容し、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を引き起こす。TTX, 電位依存性 Na^{+} チャンネル阻害薬; Prazosin, α_{1} -AR 阻害薬; Yohimbine, α_{2} -AR 阻害薬; Propranolol, β -AR 阻害薬; Silodosin, α_{1A} -AR 阻害薬; L-765,314, α_{1B} -AR 阻害薬; A-315456, α_{1D} -AR 阻害薬

カプサイシンによる脊髄後角アストロサイトの Ca^{2+} 応答は α_{1A} -AR を介して引き起こされる

カプサイシン処置により惹起される脊髄後角アストロサイトの Ca^{2+} 上昇は α_{1A} -AR アンタゴニストの silodosin の処置、ならびに脊髄後角へと投射する NA 作動性神経の主要な起始核である青斑核(LC)に対して選択的に作用する神経毒素 N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP-4) の処置によって有意に抑制された (**Figure 3**)。これらの結果から、脊髄後角アストロサイトの活性化には LC の NA 作動性神経が関与することが示された。

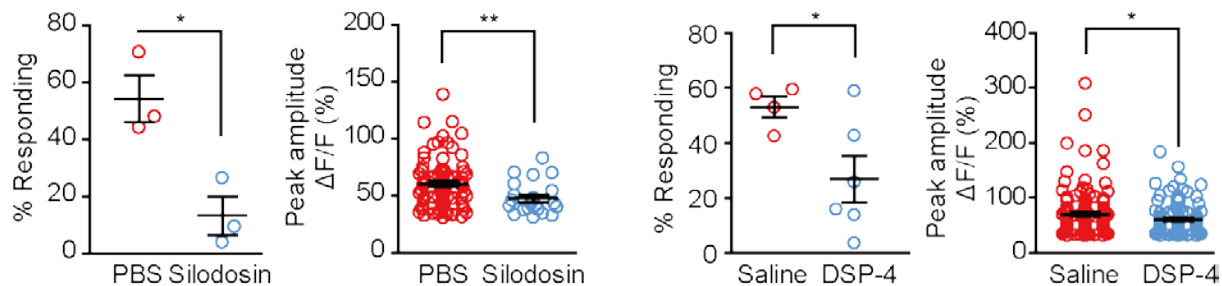


Figure 3.

Silodosin ならびに DSP-4 処置によってカプサイシン誘発性のアストロサイト Ca^{2+} 応答が抑制される。

LC-NA シグナルおよび脊髄 α_{1A} -AR の阻害はカプサイシンによる機械性痛覚過敏の形成を阻害する

続いて、これらのシグナルが疼痛行動に与える影響を検討した。足裏へのカプサイシン投与は即時的に自発的疼痛行動を引き起こし、その後に軽度機械刺激に対する過敏行動を惹起する。DSP-4 の処置により、カプサイシン誘発性の痛覚過敏形成が抑制され、その一方で即時的な自発疼痛行動については変化が生じなかった (**Figure 4**)。また、脊髄後角アストロサイト特異的な α_{1A} -AR のノックダウンにより、カプサイシン誘発の痛覚過敏形成および即時的疼痛行動の両方が抑制された (**Figure 4**)。さらに、 α_{1A} -AR アゴニスト phenylephrine の脊髄くも膜下腔内投与によって軽度機械刺激に対する一過性の痛覚過敏が形成された (**Figure 4**)。

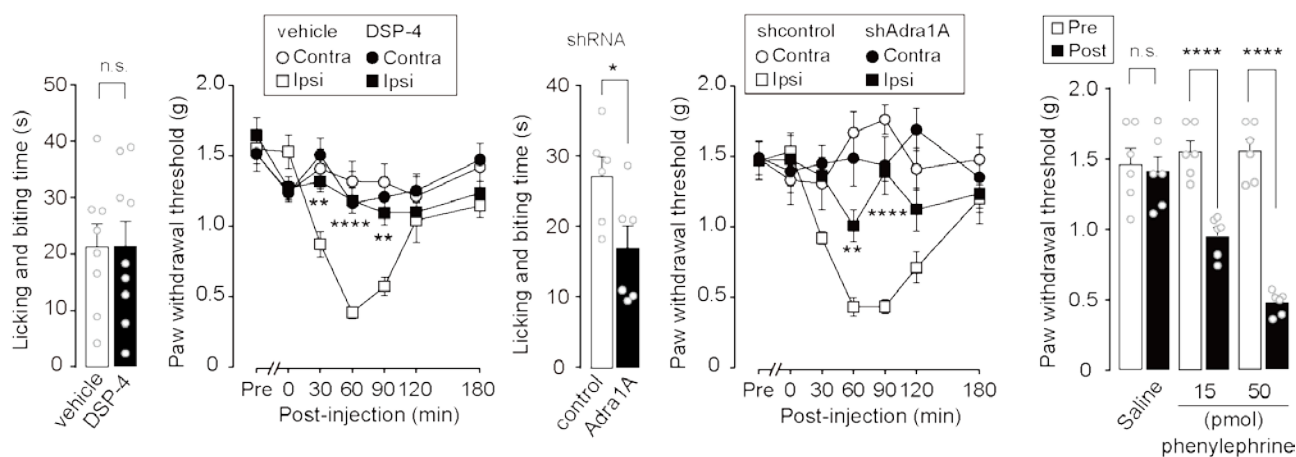


Figure 4.

LC/NA シグナルおよび α_{1A} -AR は軽度機械刺激に対する痛覚過敏の形成に重要である。

【考察】

脊髄後角アストロサイトが感覚伝達時にどのようなシグナル経路で活性化を示し、感覚プロセッシングそのものにどのような影響を及ぼすのかを明らかにするために、生体イメージングを用いて脊髄アストロサイトの応答を解析し、行動薬理的解析によってアストロサイトの痛覚伝達回路への影響を検討した。その結果、LC-NA神経が放出するNAが α_{1A} -ARを介して脊髄後角アストロサイトの活性化を引き起こすこと、そしてその活性化が末梢へと入力される軽度機械刺激を痛みへと変調することを明らかにし、脊髄後角における新しい感覚情報制御機構の存在を明らかにした。

下行性LC-NA神経による痛覚調節系は「下行性疼痛抑制系」と呼ばれており、主に脊髄の興奮性神経や一次求心性神経の中枢端に発現する α_2 -ARを介して痛みを抑制すると考えられている。一方で、いくつかの研究によってLC-NA神経は疼痛促進としての役割を担う場合があることが指摘されていたが、そのメカニズムは全く明らかにされていなかった。本研究により、これまで神経細胞による説明だけでは理解が難しかったNAシグナルを介した疼痛促進機構において、脊髄後角アストロサイトがキープレイヤーとして機能している可能性が初めて示された。

現在、神経障害性疼痛の第一選択薬として使用されているプレガバリンは下行性NA経路機能を高めることがその鎮痛メカニズムの一つであると考えられている。しかし、この治療薬が奏功するのは一部の患者に留まっている上、めまいや傾眠といった副作用を高頻度で引き起こすことから患者の治療満足度は高くない。近年、LCによる疼痛制御には疼痛抑制と促進の二面性があることが指摘されており(Hickey et al., 2014)、既存の治療薬はLCによる疼痛抑制・促進の両作用を誘導してしまうために、鎮痛作用が十分に発揮されていない可能性が考えられる。実際、 α_1 -ARの機能抑制が α_2 -ARアゴニストによる鎮痛作用をより強く引き出すことが報告されていることから(Gil et al., 2009)、脊髄後角アストロサイト α_{1A} -ARを介した疼痛促進機能を選択的に抑制することができれば、既存の薬物の純粋な鎮痛効果を取り出し、薬物の投与量を減量することで好ましくない副作用の軽減につながる可能性が期待される。本研究成果より、脊髄後角アストロサイトを切り口とした疼痛制御機構の解明、ならびに脊髄後角アストロサイトを標的とした新たな疼痛治療戦略構築に繋がることを期待する。

【引用文献】

Gil, D.W., Cheevers, C.V., Kedzie, K.M., Manlapaz, C.A., Rao, S., Tang, E., and Donello, J.E. Alpha-1-adrenergic receptor agonist activity of clinical alpha-adrenergic receptor agonists interferes with alpha-2-mediated analgesia. *Anesthesiology* 110, 401-407 (2009).

Hickey, L., Li, Y., Fyson, S.J., Watson, T.C., Perrins, R., Hewinson, J., Teschemacher, A.G., Furue, H., Lumb, B.M., and Pickering, A.E. Optoactivation of locus ceruleus neurons evokes bidirectional changes in thermal nociception in rats. *J Neurosci* 34, 4148-4160 (2014).

Shiratori-Hayashi, M., Koga, K., Tozaki-Saitoh, H., Kohro, Y., Toyonaga, H., Yamaguchi, C., Hasegawa, A., Nakahara, T., Hachisuka, J., Akira, S., et al. STAT3-dependent reactive astrogliosis in the spinal dorsal horn underlies chronic itch. *Nature medicine* 21, 927-931 (2015).

Tsuda, M., Kohro, Y., Yano, T., Tsujikawa, T., Kitano, J., Tozaki-Saitoh, H., Koyanagi, S., Ohdo, S., Ji, R.R., Salter, M.W., et al. JAK-STAT3 pathway regulates spinal astrocyte proliferation and neuropathic pain maintenance in rats. *Brain* 134, 1127-1139 (2011).