

ストレス誘発性痛覚過敏に関与するアストロサイト- 神経相互作用の特定

川邊, 陸

<https://hdl.handle.net/2324/7363731>

出版情報 : Kyushu University, 2024, 博士 (創薬科学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :



ストレス誘発性痛覚過敏に関与するアストロサイト - 神経相互作用の特定

薬理学分野 3PS22001N 川邊（小林） 陸

【序論】

脊髄後角（SDH）は末梢からの感覚情報を脳に伝達するだけでなく、脳からの下行性神経を介した制御も受けているため、感覚伝達の処理・統合に重要な領域である。脳幹の青斑核（LC）から脊髄後角へ投射するノルアドレナリン神経（LC→^{SDH}-NA 神経）は、痛覚伝達を抑制することが古くから知られている¹。そのメカニズムの一つとして、脊髄後角の抑制性介在神経に発現するアドレナリン α_{1A} 受容体への作用が重要であることが報告されている²。一方で、脊髄後角に存在するアストロサイト（グリア細胞の一種）のうち、当研究室が見出した新規アストロサイトサブセットである Hes5 陽性アストロサイトも α_{1A} 受容体を発現しており、同受容体を介して痛覚過敏を誘発することを明らかにしている³。このように LC→^{SDH}-NA 神経は Hes5 陽性アストロサイトおよび抑制性介在神経を介して痛みを促進と抑制の両方向に制御すると考えられるが、それぞれの作用が統合されるメカニズムは不明である。加えて、Hes5 陽性アストロサイトを介した痛覚過敏の生理的意義はまだ十分に解明されていない。

LC-NA 神経は、複数の外的および内的ストレス因子に反応する⁴。また、ストレスは痛み行動を顕著に変化させることが知られており、痛みが促進される場合と抑制される場合の両方が報告されている^{5,6}。しかし、特にストレス誘発性の痛み促進に関するメカニズムはほとんど不明である。そこで本研究では、LC→^{SDH}-NA 神経とそのターゲットである Hes5 陽性アストロサイトがストレス誘発性痛覚過敏に関与しているという仮説を立て、これを検証した。

【方法】

・拘束ストレスモデルの作製

空気穴を開けた 50 ml チューブにマウスを入れ、1 時間保持することで拘束ストレスを与えた。無処置群では、ハンドリングをした後すぐに飼育ケージに戻した。

・疼痛行動試験

ストレス処置後、von Frey フィラメントを用いて足底部に軽度機械刺激を与え、刺激に対する逃避閾値を算出することで疼痛レベルの解析を行った。

・ファイバーフォトメトリー法を用いた LC および脊髄 *in vivo* Ca^{2+} イメージング

光ファイバー入りカニューーラを GCaMP6 発現マウスの LC または脊髄直上に留置し、光ファイバーを介して GCaMP6 シグナルの収集を行った。

・アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターの作製および投与

蛍光 Ca^{2+} センサー GCaMP を用いて LC-NA 神経の Ca^{2+} イメージングを行うため、AAV-flex[GCaMP6s]を *NET-Cre* マウスの LC に注入した。ジフテリア毒素受容体（DTR）を用いて LC→^{SDH}-NA 神経を除去するため、AAVretro-ESYN-Cre を野生型マウスの第 4 腰髄に、AAV-flex[DTR-EGFP] を LC に注入した。赤色光に反応する陽イオンチャネル ChrimsonR を用いて LC→^{SDH}-NA 神経を光遺伝学的に活性化させるため、AAV-flex[ChrimsonR-tdTomato]を *NET-Cre* マウスの LC に注入した。蛍光 NA センサー GRAB_{NE1m} を用いて脊髄 NA イメージングを行うため、AAV-gfaABC₁D-GRAB_{NE1m} を *NET-Cre* マウスの第 4 腰髄に注入した。GCaMP を用いて脊髄アストロサイト Ca^{2+} イメージング

を行うため, AAV-gfaABC1D-GCaMP6m を *NET-Cre* マウスの第 4 腰髄に注入した。人工受容体 hM3Dq を用いて *Hes5* 陽性アストロサイトを化学遺伝学的に活性化するため, AAV-flex[hM3Dq] を *Hes5-CreERT2* マウスの第 4 腰髄に注入した。CRISPR-Cas9 システムを用いて脊髄抑制性介在神経 A₁ 受容体をノックダウンするため, AAV-flex[*SaCas9*] および AAV-flex[mCherry]-U6-sgAdora1 を *Vgat-Cre* マウスの第 4 腰髄に注入した。

・脊髄スライスを用いた細胞外 NA/細胞内 Ca²⁺ イメージング

GRAB_{NE1m} もしくは GCaMP6m 発現マウスの脊髄を摘出し, 脊髄スライスを作製した。共焦点蛍光顕微鏡を使用して, 脊髄後角の NA イメージングおよびアストロサイト Ca²⁺ イメージングを行った。

・RNAscope *in situ* ハイブリダイゼーション

マウスを paraformaldehyde (PFA) 溶液で灌流固定した。脊髄を摘出して切片を作製し, RNAscope™ v2 アッセイを用いて *Slc32a1* および *Adora1* mRNA を検出した。

・脊髄スライスを用いた電気生理学的記録

マウスの脊髄を摘出し, 脊髄スライスを作製した。ホールセルパッチクランプ法を用いて, 脊髄後角 II 層抑制性介在神経から膜電位の記録を行った。また, 脊髄後角 II 層膠様質神経から自発性抑制性シナプス後電流 (sIPSC) の記録を行った。

・Aβ 線維の電気刺激および脊髄後角における pERK 陽性細胞の解析

拘束ストレスに曝露させた後, マウスをウレタンで深く麻酔した。その後 Aβ 線維選択的な電気刺激 (触刺激を模倣) を後肢に処置し, マウスを PFA 溶液で灌流固定した。脊髄を摘出して切片を作製し, 免疫組織染色法を用いて pERK 陽性細胞を染色した。

【結果】

① LC→^{SDH}-NA 神経は, 急性拘束ストレス後の機械的痛覚過敏に重要である

マウスに拘束ストレスを 1 時間負荷すると, 軽度機械刺激に対する痛覚過敏が誘発された (Fig. 1a)。ファイバーフォトメトリー法を用いてストレス処置中の LC-NA 神経活動を解析したところ, ストレス中に同神経の活動が顕著に上昇することを確認した (Fig. 1b)。次に, ストレス誘発性痛覚過敏に対する LC→^{SDH}-NA 神経の関与を調べるため, ジフテリア毒素による細胞除去系を用いて, 同神経を選択的に除去したマウスを作製した。このマウスは, ストレスに曝露しても痛覚過敏を生じなかった (Fig. 1c)。逆に, 赤色光に反応する陽イオンチャネル ChrimsonR を用いて LC→^{SDH}-NA を光遺伝学的に活性化した場合, 痛覚過敏が誘導された (Fig. 1d)。よって, LC→^{SDH}-NA 神経はストレスによって活性化され, ストレス誘発性痛覚過敏に必要であるだけでなく, その行動応答を表現するのに十分であることが示された。

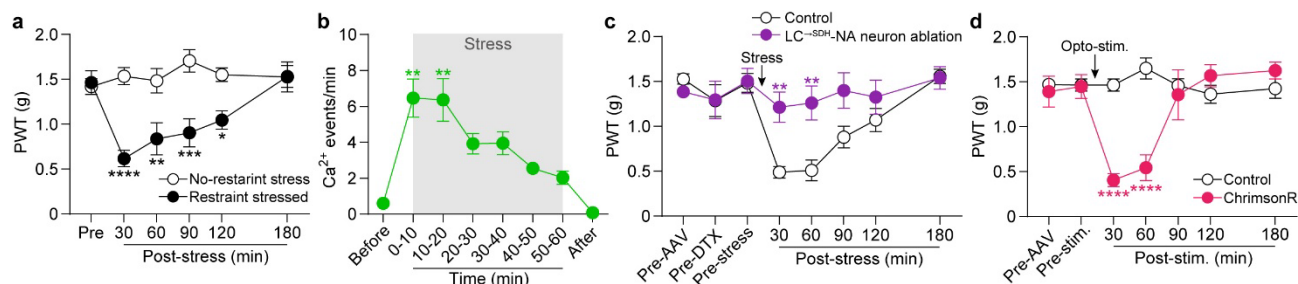


Fig. 1

(a) 1 時間の拘束ストレス曝露後のマウスにおける, 軽度機械刺激に対する後肢逃避閾値 (PWT) の変化。(b) 拘束ストレス曝露時の, LC-NA 神経における Ca²⁺ 活動の頻度。(c) LC→^{SDH}-NA 神経除去マウスにおける拘束ストレス後の PWT の変化。(d) LC→^{SDH}-NA 神経を光遺伝学的に活性化した際の PWT の変化。

②LC→SDH-NA 神経は、Hes5 陽性アストロサイトの α_{1A} 受容体を介して痛覚過敏を引き起こす

LC→SDH-NA 神経の活性化が痛覚過敏を誘発するメカニズムを調べるため、蛍光センサー GRAB_{NEIm} および GCaMP6m を用いて、細胞外 NA およびアストロサイト Ca^{2+} イメージングを行った。急性脊髄スライスにおいて LC→SDH-NA 神経を光遺伝学的に活性化すると、脊髄後角での NA 放出およびアストロサイト細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が確認され、後者は α_{1A} 受容体特異的アンタゴニストの silodosin により抑制された (Fig. 2a–c)。行動試験においても、LC→SDH-NA 神経の活性化による痛覚過敏は silodosin の脊髄くも膜下腔内投与により抑制された。次に、ストレス誘発性痛覚過敏も同様のメカニズムで生じるかどうかを検討した。ファイバーフォトメトリー法を用いて、ストレス処置中に α_{1A} 受容体を介して脊髄アストロサイトの Ca^{2+} 活動が上昇することを確認した (Fig. 2d)。そこで Hes5 陽性アストロサイト特異的 α_{1A} 受容体欠損マウス (*Hes5-CreERT2;Adra1a^{fl/fl}*) にストレスを負荷したところ、痛覚過敏が抑制された (Fig. 2e)。以上より、LC→SDH-NA 神経は、Hes5 陽性アストロサイトの α_{1A} 受容体を介してストレス誘発性痛覚過敏を引き起こすことが示された。

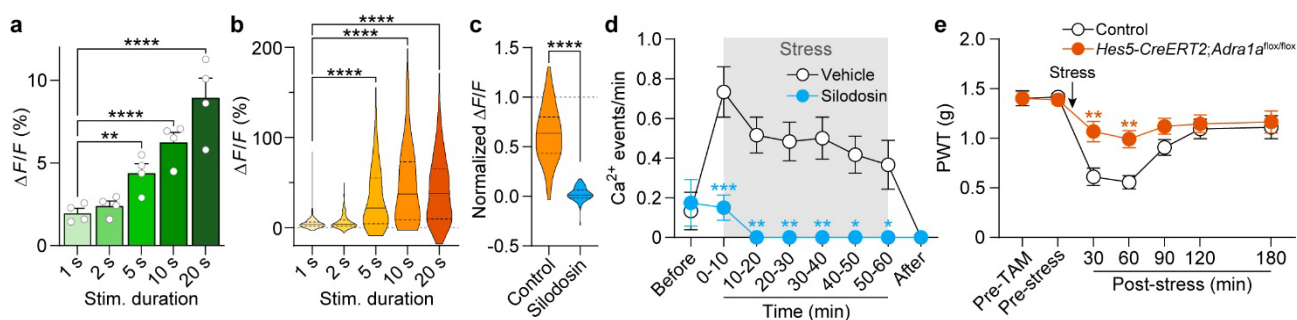


Fig. 2

(a–b) LC→SDH-NA 神経を活性化 (1~20 s) した際の、GRAB_{NEIm} (a) および GCaMP6m (b) シグナルの蛍光強度変化率。 (c) Silodosin を前処置した際の、光刺激 (10 秒) による GCaMP6m 蛍光強度変化率。 (d) 拘束ストレス曝露時の、脊髄後角アストロサイトにおける Ca^{2+} 活動の頻度。 (e) Hes5 陽性アストロサイト特異的 α_{1A} 受容体欠損マウス (*Hes5-CreERT2;Adra1a^{fl/fl}*) に拘束ストレスを処置した後の PWT の変化。

③Hes5 陽性アストロサイト由来アデノシンは A_1 受容体を介して抑制性介在神経の活動を抑制する

脊髄後角において、 α_{1A} 受容体は Hes5 陽性アストロサイトだけでなく抑制性介在神経にも発現している。また、抑制性介在神経の α_{1A} 受容体は痛覚を抑制することが知られているが、同神経の α_{1A} 受容体を欠損させたマウスではストレス誘発性痛覚過敏に変化は生じなかった。同じ受容体を発現しているにもかかわらず、ストレス時に Hes5 陽性アストロサイトの痛覚過敏作用が優位になる理由として、NA が Hes5 陽性アストロサイトを介して抑制性介在神経の機能を抑制する可能性を考えた。そこで、グリア伝達物質の一つであるアデノシンに着目した。まず、*in situ* ハイブリダイゼーションを用いて、抑制性介在神経にアデノシン A_1 受容体が発現していることを確認した (Fig. 3a)。電気生理学的記録によって抑制性介在神経の活動を解析したところ、同神経は NA に応答して脱分極を引き起こし、その作用は A_1 受容体選択的アンタゴニストの 8-cyclopentyl-1,3-dimethylxanthine (CPT) によって抑制された (Fig. 3b)。さらに、CRISPR-Cas9 システムを用いて同神経特異的に A_1 受容体をノックダウンさせたマウスでは、NA 誘発性脱分極に対する CPT の効果が消失したことから、同神経に発現する A_1 受容体の重要性が示された (Fig. 3b)。また、アデノシンシグナルが Hes5 陽性アストロサイト由来であるか否かを調べるため、同細胞選択的に人工受容体 hM3Dq を発現させた。このマウスでは、hM3Dq の活性化により抑制性介在神経の活動指標である sIPSC の頻度が減弱しており、さらにその作用は A_1 受容体阻害によってキャンセルされた (Fig. 3c–f)。よって、Hes5 陽性アストロサイトから放出されるアデノシンシグナルが、 A_1 受容体を介して抑制性介在神経の活動を抑制していることが示唆された。

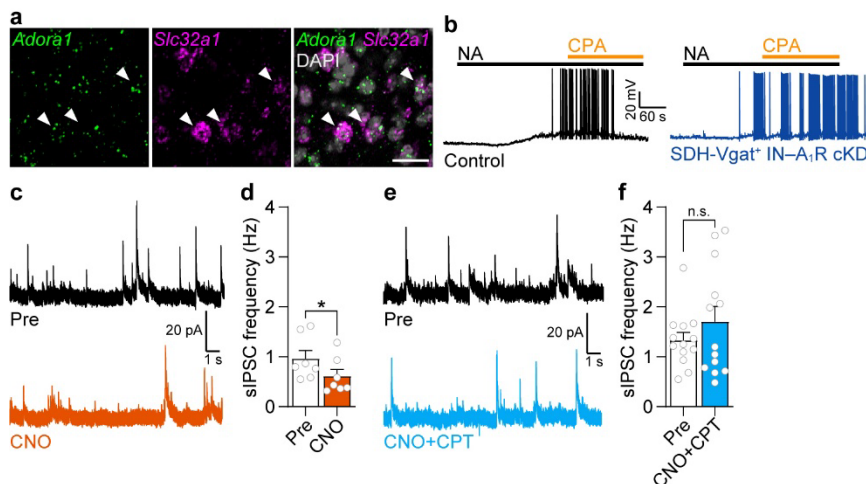


Fig. 3

(a) 脊髄後角における *Adora1* (A_1 受容体) mRNA (緑), *Slc32a1* (Vgat, 抑制性介在神経マーカー) mRNA (マゼンタ) の発現 (Scale bar, 25 μ m)。 (b) コントロールマウス (左) および抑制性介在神経 A_1 受容体欠損マウス (右) から記録した, NA および CPA 灌流時における抑制性介在神経膜電位の代表的なトレース。 (c-f) Hes5 陽性アストロサイトに hM3Dq を発現させたマウスの膠様質神経から記録した, CNO 灌流前後の sIPSC の代表的なトレース (c) および sIPSC の頻度 (d) もしくは, CNO と CPT の同時灌流前後の sIPSC の代表的なトレース (e) および sIPSC の頻度 (f)。

④ ストレスはアデノシンによる抑制性介在神経の活動抑制を介して、痛覚過敏を引き起こす

ストレス誘発性痛覚過敏に対する抑制性介在神経 A_1 受容体の関与を調べるため, Fig. 3b で作製した抑制性介在神経 A_1 受容体欠損マウスにストレスを負荷したところ, 痛覚過敏が抑制された (Fig. 4a)。次に, アデノシンシグナルを介したアストロサイト - 抑制性介在神経間の相互作用が, 脊髄後角の痛覚伝達神経の活動レベルを上昇させるか否かを検討した。活動レベルの定量は, 脊髄後角表層神経の侵害刺激受容マーカーである ERK のリン酸化 (pERK) を組織学的に解析することで行った。ストレス曝露後に $A\beta$ 線維刺激を組み合わせただけの場合のみ, pERK 陽性神経の数が有意に増加し, その作用は, CPT の脊髄くも膜下腔内投与により抑制された (Fig. 4b)。以上より, 拘束ストレスを受けたマウスにおいて, Hes5 陽性アストロサイト由来のアデノシンシグナルを介した抑制性介在神経の負の制御が, $A\beta$ 線維シグナルに対する脊髄後角神経の異常な反応性, すなわち, 痛覚過敏に直結する作用を引き起こすことを示唆した。

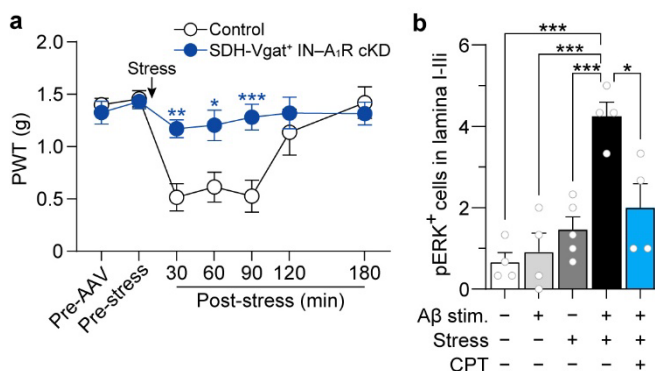


Fig. 4

(a) 抑制性介在神経 A_1 受容体欠損マウスに拘束ストレスを処置した際の PWT の変化。 (b) 脊髄後角表層 (第 I-II 層) における pERK 陽性細胞の数に対する, $A\beta$ 線維刺激, 拘束ストレスおよび脊髄くも膜下腔内への CPT 投与の影響。

【考察】

本研究では, ストレス誘発性痛覚過敏のメカニズムとして, $LC \rightarrow^{SDH} NA$ 神経を介した Hes5 陽性脊髄後角アストロサイト α_{1A} 受容体の活性化によってアデノシンが放出され, 抑制性介在神経の活動を減弱させることが示唆された^{7,8}。ストレス等によって発症する新しいタイプの慢性疼痛である痛覚変調性疼痛は, そのメカニズムがほとんど解明されていないため, 本成果が痛覚変調性疼痛の治療における新規戦略の創出へと繋がることを期待される。

【引用文献・発表論文】

1. Yoshimura and Furue, *J Pharmacol Sci* 101(2): 107-117 (2006)
2. Uchiyama et al., *Mol Brain* 15: 6 (2022)
3. Kohro et al., *Nat Neurosci* 23: 1376-87 (2020)
4. Valentino and Van Bockstaele, *Eur J Pharmacol* 583: 194-203 (2008)
5. Butler and Finn, *Prog Neurobiol* 88: 184-202 (2009)
6. Jennings et al., *Prog Neurobiol* 121: 1-18 (2014)
7. Kawanabe et al., *Mol Brain* 14: 79 (2021)
8. Kawanabe-Kobayashi et al., *eLife* (Reviewed Preprint) (2025)