

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15730

研究課題名（和文）海馬の疼痛記憶形成異常仮説による舌痛症モデル動物の構築と解析

研究課題名（英文）Analysis and establishment of glossodynia model mouse from the view of the pain memory malformation hypothesis in hippocampal area

研究代表者

柳川 徹（YANAGAWA, Toru）

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：10312852

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：舌痛症が疼痛の記憶形成異常であるという仮説を動物モデル上で表現するため、1) マウスにCFAを注入し、IDO-1の海馬での局在を免疫染色で調べ、長期持続疼痛の記憶の形成を検討したが今回の条件では確認できなかった。2) 子宮内エレクトロポレーションによるCRISPR/Cas9のゲノム編集でアクチンを体性感覚野の皮質第2/3層に発現させる事が可能であることを確認した。3) パッチクランプによるニューロン活動の差異を測定し、ノックインマウス（R704C）の急性海馬スライスと分散神経培養でのneuroligin2 ノックダウンで異常が認められた。以上より疼痛の閾値に変化が起こる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：We hypothesized that glossodynia was caused by memory formation abnormality, and performed following experiments and obtained results. 1) CFA was injected into mouse and checked the IDO-1 expression in hippocampal area by immunostaining but there seemed to be no relation between pain memory and IDO-1 expression. 2) actin expression in the 2/3 layer of the somatic sensory area by genome editing of CRISPR/Cas9 and the in utero electroporation was confirmed. 3) Difference of the neuronal activity with the patch clamp was observed in hippocampal slice of knock in mouse (R704C) and in the dispersion neuroligin2 knockdown nerve culture. These results show the possibility that the pain threshold was changed in the model mouse.

研究分野：口腔外科学

キーワード：舌痛症 neuroligin 急性海馬スライス

1. 研究開始当初の背景

国際頭痛分類第3版では、「舌痛症」は、口腔内灼熱症候群の名前で中枢性顔面痛の一つとして分類されており、口の中の痛みまたは不快な異常感覚を連日繰り返すもので、臨床的に明らかな原因疾患を認めない病態である。抗うつ薬を中心とした薬物療法が有効とされているが、明確な原因は未だに解明されていない。この異常感覚は中枢性の異常と考えられ様々な検討が加えられているが、近年、舌痛症患者には海馬と前頭前皮質内側部の異常が認められ、健常者と比較して橋、1次体性感覚野(S1)、1次運動野(M1)、両側後頭葉、楔部、上側頭回などとの機能的な連結性が上昇していることが Functional magnetic resonance imaging (fMRI)の解析で判明した。また、疼痛の記憶が海馬の Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO1)の上昇として表現されることなども解ってきた。以前から申請者の柳川らは p62 遺伝子改変マウスを制作して、神経疾患との関わりを解析していた。一方、田淵らは neuroigin-3 (NLGN3) の変異が自閉症の原因となるメカニズムについてシナプスの成熟異常のマウスの行動異常について解析を行っていた。自閉症患者の痛覚閾値は異常を来している知見から、舌痛症における痛みが外界からの刺激なしで疼痛の閾値や記憶の異常を起こすことによって、本来ないはずの疼痛を大脳皮質が誤って認識しているという仮説の着想に至り、従来の遺伝子改変マウスの解析の経験から本研究を立案した。

2. 研究の目的

従来より、舌痛症などの中枢性疼痛では、その場所に傷害された組織がないものに対する症状を研究するという非常に困難な解析を強いられていた。これらを解明するのに、人間を対象とした心理テストやアンケート調査、自律神経系のテストや fMRI を用いた血流の変化などによる判定、薬効からの類推などが限界であった。一方、実験動物を対象とした検討では、2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) の舌投与により舌痛症モデルマウスを作製し、痛覚の変化を見たり、transient receptor potential vanilloid receptor 1 (TRPV1)陽性神経の増加など、組織学的な変化を中心に見るものであった。しかし、疼痛とは生理的かつ可逆的なもので、組織学的に変化を来す異常が直接の解明に結びつくかは疑問もあった。本研究は、舌痛症の本体が痛覚の情報の処理の異常という観点から、従来の三叉神経の投射する経路を見るのではなく、遺伝子変異による痛覚の閾値や記憶形成の異常に焦点を当てて検討することを目的としている。本研究では、自閉症の遺伝子異常の判明している neuroigin の遺伝子変異マウスの解析をおこない、モデ

ルマウスを樹立し、舌痛症のメカニズムの原因を基礎的に解析することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 疼痛モデルの制作：マウスの下肢のフットパッドに Complete Freund Adjuvant (CFA) 0.1ml と対照群に PBS を等量注入し、3週間飼育を行い慢性疼痛の記憶が形成された後、屠殺し、10%フォルマリンで固定をおこなった。海馬での神経の組織学変化と免疫染色による観察を行った。免疫染色は、1次抗体 Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO1) (BOSTER BIOLOGICAL TECHNOLOGY, Pleasanton, USA) とし、LsAB 法で免疫染色をおこない、光学的顕微鏡で海馬領域のアストロサイト・ミクログリア・神経細胞での発現を確認し、健側での発現、および、対照との比較を行った。

(2) 分散神経培養：Banker Method により、初代分散神経培養をおこなった。ICR マウス胎児から出生後 0 日目に大脳皮質を採取し、室温で 5 分間 1%トリプシンおよび 0.1% DNaseI (SIGMA) で処理し、続いて 5%ウシ胎児血清 (FBS) を含む Neurobasal-A (Invitrogen) で洗浄をおこなったのち、0.01%DNアーゼI、0.03%トリプシンインヒビター (SIGMA) および 2mM MgCl₂ を含有するリン酸緩衝化生理食塩水中でパスツールピペット内を繰り返し通過させた。その後、ポリ-L-リシン (SIGMA) およびマウスラミニン (Invitrogen) 被覆細胞培養ディッシュ上に 1×10^5 細胞/cm² の密度で播種した。2% B-27 サプリメント (Invitrogen)、1% Glutamax (Invitrogen)、1% Pen / Strep (Invitrogen) および 5% FBS を含有する Neurobasal-A 中で、プレATING後、最初の日に細胞を培養した。翌日、FBS を含まない培地と交換した。

(3) ノックダウンおよびノックイン実験：培養神経細胞に対しての shRNA コンストラクトは以下の通り。

Neuroigin2(NLGN2):
5'-TGGAGCAAGTTCAACAGCAATTCAAGAGATTGCTGTGAACTTGCTCCTTTT-3'、および、スクランブルを L309 Back bone vector 57 に導入して用いた。

子宮内エレクトロポレーションによる脳内のニューロンへのノックインに対しては、CRISPR / Cas9 システムを利用してゲノムにシとして -アクチン遺伝子を選択した。20ヌクレオチドの Cas9 標的部位を探索し、オフターゲット効果を最小限にするために、CRISPR 設計ツール

(<http://crispr.mit.edu/>)を使用した。sgRNA 配列を CAG (チキン -アクチン) の制御下にヒトコドン最適化 Cas9 (hCas9) および sgRNA と、同時発現をおこなすサイトメガロウイルスエンハンサーに関連するプロモ-

ター)およびヒト U6 プロモーターとともに挿入した。

発現ベクターは pTagRFP-C (Evrogen) を鋳型とし、pCAG-139 にクローニングして pCAG-TagRFP を得た。

-アクトチンの翻訳開始コドン 600 bp ゲノムを含む DNA 断片を、プライマー
5'-CTGCAGGGTCCGCCTCCGGGCCAGCG-3'
5'-GAATTCGGTGAGCAGCACAGGGTGCTC-3'
を用いて ICR マウスゲノム DNA を鋳型として、pCAG-EGxxFP (#50716, Addgene) の PstI-EcoRI 部位にクローニングした。pCAG-EGxxFP- -アクトチンを産生する。ヒト U6 プロモーターおよび sgRNA の足場を保有する 467bp の DNA 断片をテンプレートとして pgRNA_GFP-T1 (#41819; Addgene) を用いて PCR により増幅し、pBluescript II SK (+) (Stratagene) で処理して pGSapI を得た。CAG-NFCas9pA40 を有する 6.5kb の NotI 断片を NotI にクローニングした。

続いて pGSapI の gRNA 断片をアニールしたオリゴヌクレオチドで置換して pCGSapI を得た。オリゴヌクレオチドの配列は以下の通り：

5'-GAAGAGCCTCGAGGAATTCGCTCTTC-3'
5'-GAAGAGCGAATTCCTCGAGGCTCTTC-3'
アニールしたオリゴヌクレオチドを pCGSapI の SapI 部位に挿入した pCGSapI- -アクトチン-sgRNA #1、pCGSapI- -アクトチン-sgRNA #2、および pCGSapI-LacZ-gRNA をそれぞれ製作した。オリゴヌクレオチドの配列は以下の通り

-アクトチン-sgRNA #1,
5'-ACCGGGATGACGATATCGCTGCGCG-3'
5'-AAACGCGCAGCGATATCGTCATCCC-3'
-アクトチン-sgRNA #2,
5'-ACCGCGCAGCGATATCGTCATCCAG-3'
5'-AAACTGGATGACGATATCGCTGCGC-3'

LacZ-sgRNA
5'-ACCGTGC GAATACGCCACGCGATG-3'
5'-AAACATCGCGTGGGCGTATTCGCAC-3'。
ICR マウスゲノム DNA を鋳型として用いたエキソン 2 を有する 1.0kb ゲノム DNA 断片

-アクトチン遺伝子をプライマー
5'-GACTCACTATAGGGCTGGGATGCCACTGCGCGTGC-3'
5'-ACCCTCACTAAAGGGTGGGAGAACGGCAGAAGAAA-3'

GeneArt Seamless Cloning を用いて pBluescript SK (+) (Stratagene) とアセンブリキット (Invitrogen) を用いて pBSSK- -アクトチンを産生した。

緑色蛍光タンパク質はコード配列 (EGFP) を鋳型として pEGFP-C1 (Clontech) を用いて PCR により増幅し挿入した。

(4) 子宮内エレクトロポレーション:

子宮内エレクトロポレーションが E15.5 の妊娠 ICR マウスを麻酔し、子宮角を露出させ引き出し、ホウケイ酸ガラス細管 (B120F-4; World Precision Instruments)

を用いて、0.01% のファストグリーンを含む約 1 μ l の DNA 溶液を胚の側脳室に注入した。DNA 溶液は、1.0 μ g/ μ l のノックダウンベクター、2.0 μ g/ μ l のレスキューベクター (該当する場合) および 0.7 μ g/ μ l の tdTomato 発現ベクターを含有している。ほとんどの tdTomato 陽性細胞がレスキューベクターおよびノックダウンベクターの両方で同時トランスフェクトされることを確認できるようにプラスミドの濃度を決定した。子宮の胚の頭部を直径 5mm のピンセット型電極 (CUY650P5; NEPA Gene) の間ではさみ、胚をエレクトロポレーター (CUY21E; NEPA Gene) を用いて 5 つの正方形の電気パルス (35V、50msec、1Hz) を加えた。エレクトロポレーションの後、胚を腹腔に戻して、連続的な発達を可能にした。トランスフェクトされた胎児は P0-2 で、RFP フィルターを備えた LED 光を用いて頭皮を介して tdTomato シグナルの有無によって検出した。

(5) 急性海馬スライスの作成

P14-P16 マウスの脳を取り出し、氷冷した人工髄液 (ACSF, mM: 85 NaCl、75 スクロース、2.5 KCl、1.25 NaH₂PO₄、24 NaHCO₃、25 グルコース、0.5 CaCl₂ および 4 MgCl₂) 95%O₂/5%CO₂ で 2 分間処理した。冷却した脳は、カミソリの刃で海馬断面で冠状断状に整え、ピプラトームチャンバー (Campden 7000smz) で厚さ 350 μ m の急性海馬スライス切片とした。ACSF (mM: 126 NaCl、2.5 KCl、1.25 NaH₂PO₄、26 NaHCO₃、10 グルコース、2 CaCl₂ および 2 MgCl₂) を充填した回収チャンバーに移し、続いて 32 \pm 30 分間、次いで室温で 1 時間。錐体ニューロンを、細胞内液 (mM: 130 K-グルコン酸、6 KCl、10 HEPES、1 EGTA、2.5 MgCl₂、2 マグネシウム ATP、0.5 ナトリウム GTP、10 リン酸クレアチン) を満たしたガラスピペット (4-8 Mohm) ナトリウム、290mOsm) 内で蛍光顕微鏡 (BX50-WI、Olympus) 下で測定した。

(6) パッチクランプによる解析:

CA1 錐体ニューロンをパッチクランプし、CA3 からパッチしたニューロンに投射する Schaffer 側枝を電気刺激し、応答の振幅を記録した。シナプス応答の記録は広く用いられている手法であるが、刺激電極の微妙な位置のずれや脳スライスの微妙な角度の違いが結果に影響を及ぼしやすく、これらによりバイアスが生じる可能性があるため、同一ニューロンで得られた NMDA/AMPA 比を AMPA 受容体機能低下のパラメーターとして用いることにより、バイアスを排除した。また、興奮性受容体機能遮断薬存在下で、電気刺激に対する抑制性シナプス機能 (GABA 受容体機能) を解析した。パッチクランプによって LPT, NMDA/AMA 比, NR2B/NR2A 比など、シナプスの伝導に有意な差が見られた遺伝子変異マウスと野生型マウスとの比較をおこなっ

た。測定の場合は、電流クランプモードでは全細胞記録を確立した後、休止膜電位を測定した。活動電位は、500ms の持続時間の正の電流刺激によって誘発された。電位の時間速度が 10mV/ms に達する膜電位を活動電位閾値と定義した。自発的な EPSC は、電圧クランプモードで記録され、60mV の電位を保持し、GABA A 受容体の逆転電位を保持した。入力抵抗は、2mV ステップパルスに対する電流応答を用いて計算した。すべてのデータは、Patch Master ソフトウェア (HEKA) 制御による EPC10 ダブルアンプ (HEKA) で取得した。アクセス抵抗は記録を通して監視し、25MΩ 以上のアクセス抵抗または 25% 以上変化したセルは不適合とした。データ解析は、Mini Analysis Program (Synaptosoft) および Igor Pro (WaveMetrics) を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 疼痛モデルの制作：

海馬における疼痛記憶の IDO の発現による検出をおこない、健側と患側の発現の比較を CFA 注入群、コントロール群の IDO の発現を免疫染色によって調べたところ、本条件では検出が困難であった。

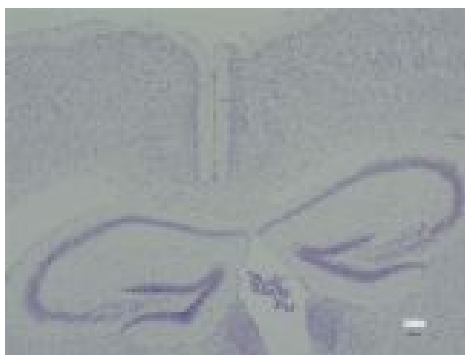


図 1 海馬における IDO の発現の確認

(2) 子宮内エレクトロポレーションによる部位特異的遺伝子改変マウスの制作：

CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を子宮内エレクトロポレーションで行えるための準備をした。胎児の側脳室に アクチン特異的な sgRNA の配列を含むプラスミドベクターを、pCAG-EGFP プラスミドベクターとともにエレクトロポレーションを行い、EGFP-のシグナルを指標に選択し、アクチンを体性感覚野の皮質第 2/3 層の錐体ニューロンに発現させる事が可能であることを確認した。グナルを指標に選択し、アクチンを体性感覚野の皮質第 2/3 層の錐体ニューロンに発現させる事が可能であることを確認した。

(3) 分散神経培養による neuroigin2(NLGN2)

ノックダウン細胞のパッチクランプによるニューロンの活動の差異の測定：遺伝子導入個体について、急性海馬スライス切片を作成し、NLGN2 shRNA 導入錐体ニューロンを識別し、パッチクランプを行った。また、テトロドトキシン非存在下で電気刺激により誘発される抑制性シナプス応答 (IPSC) を解析した結果、NLGN2 shRNA 導入ニューロンでは

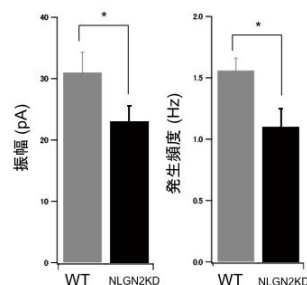


図 2 NLGN2 ノックダウン細胞の微小 IPSC

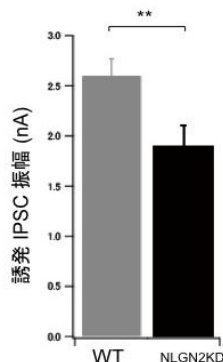


図 3 NLGN2 ノックダウン細胞の誘発 IPSC

IPSC の振幅の低下が見られた。これらのことから、NLGN2 遺伝子の発現抑制により、抑制性シナプス機能が低下していると推測された。

(4) 急性海馬スライスに対するパッチクランプによる遺伝子改変モデルマウスニューロンの活動の差異を測定：neuroigin 3 の 704 番目のアルギニンをシステインに置換したノックインマウス (R704C) について、脳の海馬スライスで細胞外記録をとり、R704C では field EPSP が低下していることを確認した。また、選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) のフルオキサセチン投与で field EPSP の低下が回復したが、オキシトシン添加ではこの効果がみられなかった。field EPSP は、興奮性のグルタミン作動性シナプス伝達を反映しているため、痛みの中枢への伝達経路で異常が起きていることから、大脳皮質体性感覚野で疼痛の閾値に変化が起こる可能性を検証するモデルとして使えることを確認した。

以上より、シナプスを構成する一遺伝子である neuroigin の変異が、大脳皮質体性感覚野に投射するシナプス伝達の閾値を変えていることが証明され、遺伝子の変異により投射する信号に異常が生じている可能性が示された。一方、疼痛の記憶の形成については、今回の方法では十分でないことが判明した。また、ゲノム編集と子宮内エレクトロポレーションによって脳内の部位特異的に遺伝子発現の制御ができることが可能であることが示された。すなわち、遺伝子の変異によって、痛覚の異常や投射の異常が起こりうる事が判明したことにより、今後、これらのマウスを疼痛の異常のモデルマウスとして利用すると同時に、特異的に中枢のどの部分の変異が生じた場合に舌痛症が起こりうるかが本研究により解明できる端緒となり得たと考えられる。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

柳川 徹 (YANAGAWA, Toru)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：10312852

(2)研究分担者

田淵 克彦 (TABUCHI, Katsuhiko)
信州大学・学術研究院医学系・教授
研究者番号：20546767

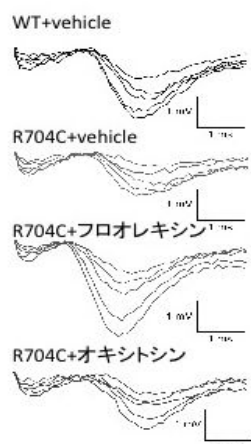


図4 フィールド EPSP への効果

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Uemura T, Mori T, Kurihara T, Kawase S, Koike R, Satoga M, Cao X, Li X, Yanagawa T, Sakurai T, Shindo T, Tabuchi K. Fluorescent protein tagging of endogenous protein in brain neurons using CRISPR/Cas9-mediated knock-in and in utero electroporation techniques. Sci Rep. 査読有、6巻、2016、35861
doi: 10.1038/srep35861.

Baig DN, Yanagawa T, Tabuchi K. Distortion of the normal function of synaptic cell adhesion molecules by genetic variants as a risk for autism spectrum disorders. Brain Res Bull. 査読有、129巻、2017、