

痒み刺激により延髄および上部頸髄ニューロンに誘導される extracellular signal-regulated kinase のリン酸化

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

越前谷 澄 典

(指導：岩田 幸一 教授，篠田 雅路 准教授，片桐 綾乃 助教)

緒言

痒みは非常に不快な感覚として知られているが、その詳細な発症機構に関しては不明な点が多く残されている。これまでの多くの研究により、痒みの発症にはC-線維の末梢端を形成している自由神経終末の膜上に存在する histamine 受容体が関与することが報告されている¹⁻⁴⁾。一方で、C-線維の末端部を構成する自由神経終末には、痒みだけでなく transient receptor potential (TRP) チャンネルや ATP 受容体などの侵害受容に関与する受容体が多く存在することから、痛みと痒みは同様のメカニズムで引き起こされると考えられていた⁵⁾。しかし最近、histamine の刺激に対して特異的に反応する C-線維が同定され、痛みと痒みの情報処理は異なる末梢神経機構による可能性が考えられるようになってきた⁶⁾。脊髓レベルにおいては、ネコ足裏への histamine 投与にのみ応答し、機械および温度侵害刺激には応答しない視床投射ニューロンが存在することが報告され、脊髓レベルにおいても histamine に特異的な応答を示すニューロンの存在が確かめられた⁷⁾。このようなニューロンは受容野が不明瞭で、histamine の注入のみに反応することから、特異的侵害受容ニューロンや広作動域ニューロンと異なり、histamine 特異ニューロンとして分類されている。また、結合腕傍核に軸索を送る三叉神経脊髄路核ニューロンにおいて、histamine, chloroquine および capsaicin

を顔面皮下に注入することによって発現する c-Fos タンパクを調べた研究において、侵害刺激と痒み刺激とが同一ニューロンによって活性化する可能性も示されている⁸⁾。以上の結果から、痒みの情報処理において、三叉神経脊髄路核ニューロンは痒み特異的な応答を示すものと、侵害情報と痒み情報の両方の情報処理に関係したものが存在する可能性があると考えられる。これまでの複数の研究で用いられてきた c-Fos 発現は、刺激後 1 – 2 時間がピークであることから、Vc における様々な介在ニューロンの興奮が引き起こされた後の結果しか見ることができず、刺激後の早い時間に起こる現象の解析には適さない。一方、ニューロンに発現する MAP kinase ファミリーの一つとして知られている extracellular signal-regulated kinase (ERK) は、興奮後数分以内にリン酸化されることがわかっており、リン酸化 ERK (pERK) は興奮マーカーとして用いられている。

口腔顔面領域を支配する C-線維刺激によって数分以内に Vc および C1-C2 に分布するニューロンにおいて ERK のリン酸化が始まると報告されている⁹⁾。また、抗 pERK 抗体に対して陽性を示す細胞 (pERK 陽性細胞) 数は刺激強度依存的に増加することが明らかにされている。このようなことから、pERK 陽性細胞は口腔顔面の C-線維入力を受けて興奮したニューロンである可能性が高いとされている。

そこで、本研究では、痒み刺激によって早期に活動するニューロンを視覚化す

る手段の一つとして、pERK を指標とし、痒みを誘発することが知られている histamine を顔面皮下に投与することによって発現する pERK 陽性細胞の延髄における分布様式を検索し、痒み感覚情報処理機構の一端を明らかにした。

材料および方法

本研究は、日本大学歯学部実験動物委員会の許可（AP16D008）を得、同委員会の指針および国際疼痛学会の基準に従って行われた¹⁰⁾。実験には Sprague-Dawley 系雄性ラット 10 匹を用いた。

1. Histamine 投与

2% isoflurane にて麻酔し、さらに sodium pentobarbital (80 mg/kg, i.p.) で深く麻酔したラットを保温パッド上に仰臥位にした状態で、0.9% 生理食塩液に溶解した histamine 溶液 (10 μ l, 5 μ g/ μ l) を左側口ひげ部皮下に静かに注入した。また、vehicle として 0.9 % 生理的食塩液を同量、同部位に注入し、コントロールとした。histamine 溶液注入 5 分後、500 ml 生理食塩液にて脱血後、0.1 M phosphate buffer にて希釈した 4% paraformaldehyde 溶液 (pH 7.4, 4°C) 500 ml を用いて灌流固定を行った。灌流固定終了後に延髄を含む全脳部位を摘出し、同様の固定液で 4°C にて 2 日間、後固定を行った。

2. 抗 pERK 抗体による免疫染色方法

取り出した脳脊髄標本を 0.01 M phosphate buffered saline (PBS) にて希釈した

20% スクロース溶液 (w/v) に移し換え、2 日間、4°C に保存した。

その後、脳標本を O.T.C. Compound (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) で包埋してドライアイスで凍結し、三叉神経脊髄路核を含む延髄の連続切片標本 (厚さ 50 μm) を作製して 3 切片毎に 1 切片を取り出し、以下の方法によって nickel-cobalt 加 3,3'-diaminobenzidine tetra hydrochloride (DAB, Sigma, St Louis, MO, USA) 染色を施した。まず、厚さ 50 μm の切片を 0.3% H_2O_2 加 0.01 M PBS に 30 分間浸漬し、内因性ペルオキシダーゼを不活性化した後、0.01 M PBS にて 5 分間の洗浄を 3 回行った。洗浄終了後、0.3% Triton X 100/5% normal goat serum (NGS)-PBS に 1 時間浸漬し、ブロッキングを行った。その後、一次抗体である rabbit anti-phospho-p44/42 MAP kinase antibody (1: 1000, Cell Signaling Technology, U.S.A) に 4°C で 3 日間浸漬し、0.01 M PBS にて 10 分間の洗浄を 3 回行った。次いで切片を二次抗体である biotinylated goat anti-rabbit IgG (H+L) (1: 500, Vector Labs, Burlingame, CA, USA) に室温で 2 時間浸漬した。その後 ABC kit (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) を用いて室温で 1 時間、反応させた。0.01 M PBS による 10 分間の洗浄を 3 回繰り返した後、0.01% hydrogen peroxide 加 DAB を用いて反応産物を可視化した。次いで、切片を 0.01 M PBS にて洗浄し、MAS-GP (Matsunami, Tokyo, Japan) でコートしたスライドガラスに貼り付け、室温にて乾燥させた後、アルコールとキシレンにより脱水・透徹を行い、封入した。また、

pERK 陽性細胞を DAB 反応させた切片を光学顕微鏡下で観察し，Neuro-Lucida (Micro Bright Field Bioscience, Williston, VT, USA) を用いて描画し，pERK 陽性細胞の分布状態および細胞数の解析を行った。

3. 統計学的解析

データは平均 \pm 標準誤差で表し，有意差検定には Student's *t*-test を用いた。

また，有意水準は $p < 0.05$ とした。

結果

本研究では麻酔ラットの口ひげ部皮下に histamine を微量投与し、Vc を含む延髄および C1-C2 領域のニューロンにおける ERK のリン酸化について検索した。その結果、Vc, RF, C1-C2 および NTS から多くの pERK 陽性細胞が検出された。

1. 延髄および C1-C2 領域における pERK 陽性細胞発現

第 1 図には、口ひげ部皮下に histamine あるいは vehicle を微量投与して 5 分経過したラットの延髄において、Vc および孤束核 (NTS) で観察された pERK 陽性細胞の代表例を示した。pERK 陽性細胞数は Vc と NTS に多く、他の領域においては少数であった。また、本研究で観察された pERK 陽性細胞は細胞質および核が共に黒色に濃染された小型の円形を呈するものと、第 1 図 E に示したように線維状の構造物を有し比較的大型の楕円形の細胞体を有するものが観察された。

本研究では、細胞質および核が黒色に濃染された細胞を免疫陽性細胞と判断して顕微鏡下で検出し、Neuro-Lucida で描画しパーソナルコンピュータ上に表して pERK 陽性細胞の分布様式および発現数を算出した。第 2 図には Neuro-Lucida にて切片を描画した分布図を示した。この分布図から明らかなように、histamine

および vehicle 投与ラットともに、Vc において両側性に分布していたが、同側においてより多くの陽性細胞を認めたのに対し、NTS および Vc 腹側部の RF においては刺激測でやや多い傾向を認めたが有意な左右差はなかった。

2. Vc および C1-C2 領域における pERK 陽性細胞の吻尾側方向の広がり

本研究ではさらに、多くの pERK 陽性細胞発現を認めた Vc について、pERK 陽性細胞数の吻尾側方向の分布様式について解析を行った。第 3 図に示したように、pERK 陽性細胞は histamine 投与群で投与と同側において、obex から 1800 μm 尾側部 (-1800 μm) の部位にピークを示す分布を示していた (第 3 図の矢印)。

また、特に obex の 600 μm 尾側からその 1800 μm 尾側においては、histamine 投与群の方が vehicle 投与群に比べ有意に多くの pERK 陽性細胞を認めた。これに対し、histamine 投与の反対側においては、第 4 図に示したように、吻側から尾側にかけて、pERK 陽性細胞数の分布に明らかな偏りは認められなかった。また、histamine 投与の同側と対側における pERK 陽性細胞の発現数を比較すると、obex から 300 μm 吻側部から 600 μm 尾側の範囲および、obex から尾側へ 2400 μm から 3300 μm の範囲では左右差は認められなかった。一方、vehicle 投与群では吻側から尾側にかけて一様な分布を示した (第 3 図および第 4 図)。

3. Vc および C1-C2 領域における pERK 陽性細胞数の比較

Vc および C1-C2 領域において検出された pERK 陽性細胞数の違いを第 5 図に示した。本研究では Vc および C1-C2 領域において検出された pERK 陽性細胞数を加算して、histamine 投与群と vehicle 投与群とで発現数を比較した。その結果、histamine 注入と同側および対側ともに、注入群の方が vehicle 注入群より有意に多かった（同側： $p < 0.01$ ，対側： $p < 0.05$ ）。

考察

1. 顔面皮膚の痒みに対する Vc および C1-C2 ニューロンの働き

従前の研究から Vc および C1-C2 領域には口腔顔面領域からの侵害情報を含む様々な感覚情報が投射すると報告されている¹¹⁾。これらの領域は細胞が層構造をなして配列しており、表層部には無髄の C-線維が深層には有髄の A β -線維が投射している。Vc 領域は C1-C2 と同様な構造を有することから延髄後角とも呼ばれている^{12,13)}。また、第一層には強い侵害刺激にのみ反応を示す NS ニューロンおよび侵害刺激と非侵害刺激の両方に反応する WDR ニューロンが認められ、深層には WDR ニューロンと低閾値機械受容ニューロンが存在することが知られている¹⁴⁾。これまでの脊髄後角の侵害受容ニューロン活動を解析した研究では、多くの WDR ニューロンは histamine の足底部皮下への注入に対して spike 応答を増加させ、これらは脊髄表層だけでなく深層からも検出されたと報告されている¹⁵⁾。また、これらの WDR ニューロンは histamine 投与によって受容野が拡大したと報告されている¹⁶⁾。一方、本研究では histamine の口ひげ部皮下への投与によって検出された pERK 陽性細胞は Vc および C1-C2 領域の表層のみから検出された。従って、histamine 投与によって興奮する Vc および C1-C2 ニューロンは主に顔面皮膚の C-線維入力を受けると考えられる。ま

た、histamine 投与に反応する WDR ニューロンは C-線維の入力だけでなく、有髄の A-線維入力を受けた介在ニューロンから間接的に入力を受ける可能性が高い。

また、本研究で検出された pERK 陽性細胞の形態をみると、第 1 図 E に示したように、小型の細胞体を有するものと、矢印で示した線維状の構造物を有する大型の細胞も多数検出された。これまでの、脊髄後角ニューロンの形態を解析した研究から、上位中枢へと投射軸索を送る投射ニューロンの多くは脊髄後角の表層に分布し、その細胞体は扁平で大型であるといわれている¹⁷⁾。一方で、局所介在ニューロンは小さな細胞体を有する円形の細胞であることが明らかにされている。以上のことから、histamine 投与によって発現した pERK 陽性細胞には投射ニューロンと介在ニューロンの両方が含まれると考えられる。おそらく、histamine 感受性の投射ニューロンは痒み情報を直接上位中枢へ伝えるのに対し、介在ニューロンは痒み感覚の変調に関与していると推察される。

これまでの口腔顔面の侵害入力を受ける Vc および C1-C2 ニューロンにおける pERK 陽性細胞発現パターンを調べた研究では、口ひげ部皮下への capsaicin 注入によって検出される pERK 陽性細胞は obex よりやや尾側部を中心とした領域であるといわれている⁹⁾。本研究で検出された pERK 陽性細胞の分布領域も、これまでに報告された口ひげ部への capsaicin 投与によって pERK 陽性細胞発現

が認められた領域とほぼ一致していた。このことから、histamine 投与によってこの領域に発現した pERK 陽性細胞は、histamine によって活性化した C-線維入力だけでなく、皮膚の侵害情報を伝える C-線維や A-線維からの入力も受けている可能性があると考えられる。histamine によって駆動される Vc および C1-C2 侵害受容ニューロンの多くは皮膚の侵害情報処理に対しても重要な役割を担っている可能性がある。

2. NTS および RF の顔面皮膚の痒み情報処理に対する役割

本研究では Vc および C1-C2 領域だけでなく NTS や RF においても口ひげ部下への histamine 投与によって pERK 陽性細胞発現を認めた。従来の研究から NTS および RF は自律神経系調節に密接にかかわっていることが知られている¹⁸⁾。特に NTS は嚥下や味覚など口腔の運動や感覚情報処理に対して重要な役割を有する核として知られており¹⁹⁾、histamine 刺激によって活性化し pERK を発現したニューロンは痒みの感覚情報処理だけでなく、痒み感覚に随伴した自律神経系の調節にも関与する可能性が考えられる。また、RF は自律神経系の調節だけでなく、全身の侵害入力を受けるニューロンが存在することが知られている²⁰⁾。従って、histamine 刺激によって駆動され pERK を発現したニューロンは痒み感覚情報処理と同時に全身の痛覚情報処理にも関与する可能性がある。

結論

麻酔ラットの口ひげ部皮下への histamine 投与によって、延髄および上部頸髄における pERK 陽性細胞発現様式について詳細な検討を加え、以下の結論を得た。

1. 口ひげ部皮下へ histamine を投与したラットの延髄では、Vc の背側部と Vc 腹側部の RF および NTS に pERK 陽性細胞発現を認めた。

2. histamine 投与ラットの Vc および C1-C2 において刺激と同側で多くの pERK 陽性細胞発現を認めたのに対し、NTS および RF においては、発現数において左右差は認められなかった。

3. pERK 陽性細胞は histamine 投与群で投与と同側において、obex から 1800 μm 尾側部 (1800 μm) の部位にピークを示す分布を示していた。また、obex の 600 μm 尾側からその 1800 μm 尾側までの範囲においては、vehicle 投与群よりも histamine 投与群の方が有意に多くの pERK 陽性細胞を認めた。

4. Vc および C1-C2 領域において検出された pERK 陽性細胞数は histamine 注入と同側および対側ともに、注入群の方が vehicle 注入群より有意に多かった。

以上から、顔面領域の痒み情報処理は obex からやや尾側部の Vc および C1-C2 の表層に分布するニューロンによって行われ、その中でも大型のニューロン

は上位中枢へ痒み情報を送るのに対し、小型のニューロンは局所回路を形成して痒み情報調節に関与している可能性が示された。

文 献

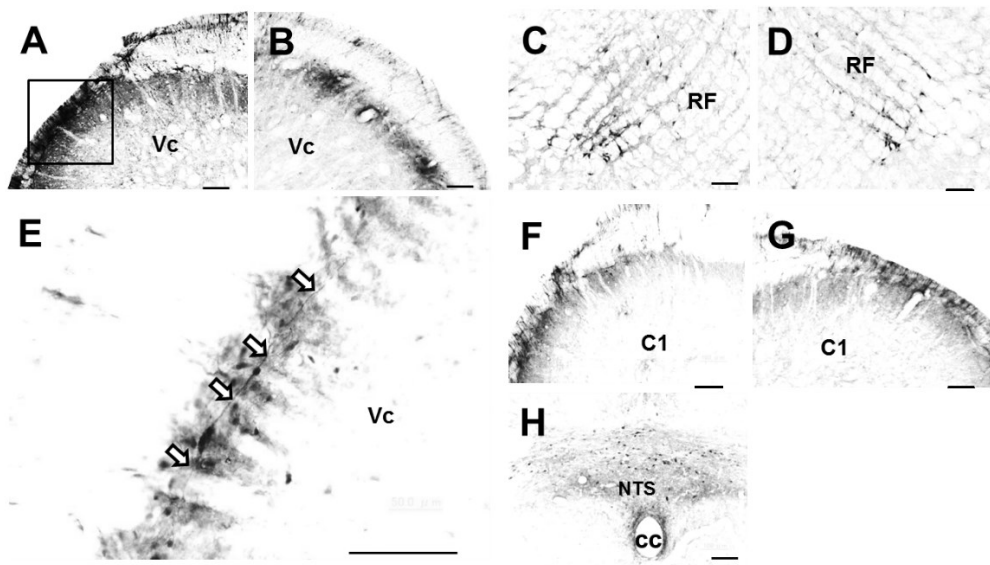
- 1) Kuraishi Y (2015) Methods for preclinical assessment of antipruritic agents and itch mechanisms independent of mast-cell histamine. *Biol Pharm Bull* 38, 635-644.
- 2) De Benedetto A, Yoshida T, Fridy S, Park JE, Kuo IH, Beck LA (2015) Histamine and skin barrier: Are histamine antagonists useful for the prevention or treatment of atopic dermatitis? *J Clin Med* 4, 741-755.
- 3) Werfel T, Biedermann T (2015) Current novel approaches in systemic therapy of atopic dermatitis: specific inhibition of cutaneous Th2 polarized inflammation and itch. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 15, 446-452.
- 4) Chuquilin M, Alghalith Y, Fernandez KH (2016) Neurocutaneous disease: Cutaneous neuroanatomy and mechanisms of itch and pain. *J Am Acad Dermatol* 74, 197-212.
- 5) Andresen MC, Hofmann ME, Fawley JA (2012) The unsilent majority-TRPV1 drives "spontaneous" transmission of unmyelinated primary afferents within

- cardiorespiratory NTS. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 303, 1207-1216.
- 6) Andersen HH, Sorensen AR, Nielsen GA, Molgaard MS, Stilling P, Boudreau SA, Elberling J, Arendt-Nielsen L (2017) A test-retest reliability study of human experimental models of histaminergic and non-histaminergic itch. *Acta Derm Venereol*, 97, 198-207.
- 7) Andrew D, Craig AD (2001) Spinothalamic lamina I neurons selectively sensitive to histamine: a central neural pathway for itch. *Nat Neurosci* 4, 72-77.
- 8) Jinks SL, Simons CT, Dessirier JM, Carstens MI, Antognini JF, Carstens E (2002) C-fos induction in rat superficial dorsal horn following cutaneous application of noxious chemical or mechanical stimuli. *Exp Brain Res* 145, 261-269.
- 9) Noma N, Tsuboi Y, Kondo M, Matsumoto M, Sessle BJ, Kitagawa J, Saito K, Iwata K (2008) Organization of pERK-immunoreactive cells in trigeminal spinal nucleus caudalis and upper cervical cord following capsaicin injection into oral and craniofacial regions in rats. *J Comp Neurol* 507, 1428-1440.
- 10) Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109-110.
- 11) Sessle BJ (1999) Neural mechanisms and pathways in craniofacial pain. *Can J Neurol Sci* 26 Suppl 3, S7-11.

- 12) Okamoto K, Tashiro A, Thompson R, Nishida Y, Bereiter DA (2012) Trigeminal interpolaris/caudalis transition neurons mediate reflex lacrimation evoked by bright light in the rat. *Eur J Neurosci* 36, 3492-3499.
- 13) Iwata K, Imamura Y, Honda K, Shinoda M (2011) Physiological mechanisms of neuropathic pain: the orofacial region. *Int Rev Neurobiol* 97, 227-250.
- 14) Iwata K, Tashiro A, Tsuboi Y, Imai T, Sumino R, Morimoto T, Dubner R, Ren K (1999) Medullary dorsal horn neuronal activity in rats with persistent temporomandibular joint and perioral inflammation. *J Neurophysiol* 82, 1244-1253.
- 15) Jinks SL, Carstens E (2000) Superficial dorsal horn neurons identified by intracutaneous histamine: chemosensitive responses and modulation by morphine. *J Neurophysiol* 84, 616-627.
- 16) Akiyama T, Nagamine M, Davoodi A, Iodi Carstens M, Cevikbas F, Steinhoff M, Carstens E (2015) Intradermal endothelin-1 excites bombesin-responsive superficial dorsal horn neurons in the mouse. *J Neurophysiol* 114, 2528-2534.
- 17) Lu GW, Willis WD (1999) Branching and/or collateral projections of spinal dorsal horn neurons. *Brain Res Brain Res Rev* 29, 50-82.
- 18) Sevoz-Couche C, Brouillard C (2016) Key role of 5-HT₃ receptors in the nucleus

tractus solitarii in cardiovagal stress reactivity. *Neurosci Biobehav Rev*, in press.

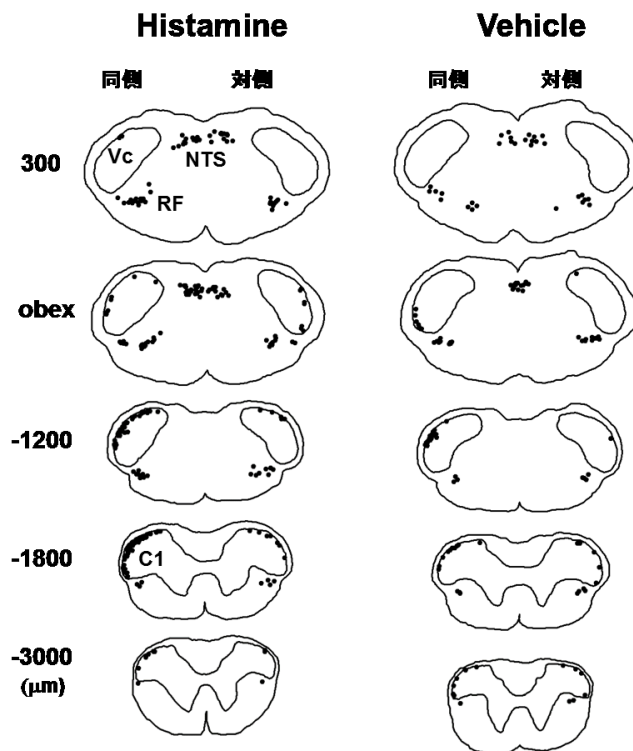
- 19) Tsujimura T, Kondo M, Kitagawa J, Tsuboi Y, Saito K, Tohara H, Ueda K, Sessle BJ, Iwata K (2009) Involvement of ERK phosphorylation in brainstem neurons in modulation of swallowing reflex in rats. *J Physiol* 587, 805-817.
- 20) Liu RH, Tang JS, Hou ZL (1989) Electrophysiological identification of spinally projecting neurons in the lateral reticular nucleus of the rat. *Brain Res* 481, 350-355.



第1図

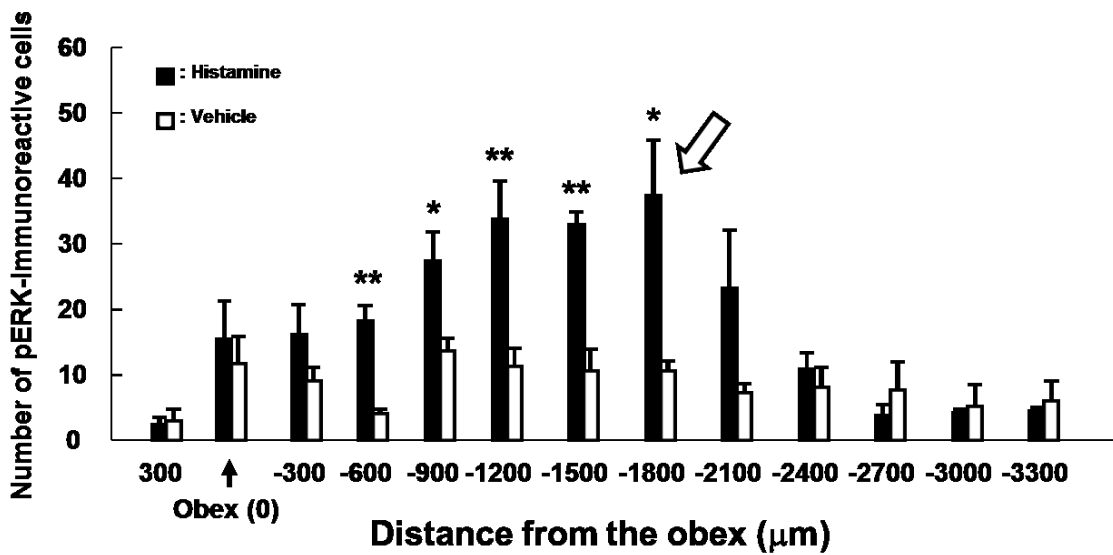
pERK陽性細胞が検出された延髄領域の顕微鏡写真

A: Histamine投与と同側のVc, B: Histamine投与と対側のVc, C: Histamine投与と同側の網様体(RF), D: Histamine投与と対側のRF, E: Aの強拡大写真, F: Histamine投与と同側のC1, G: Histamine投与と対側のC1, NTS, H: Histamine投与ラットのRF, cc: 中心管, 矢印: 線維状構造物, スケールバー: 100 μ m



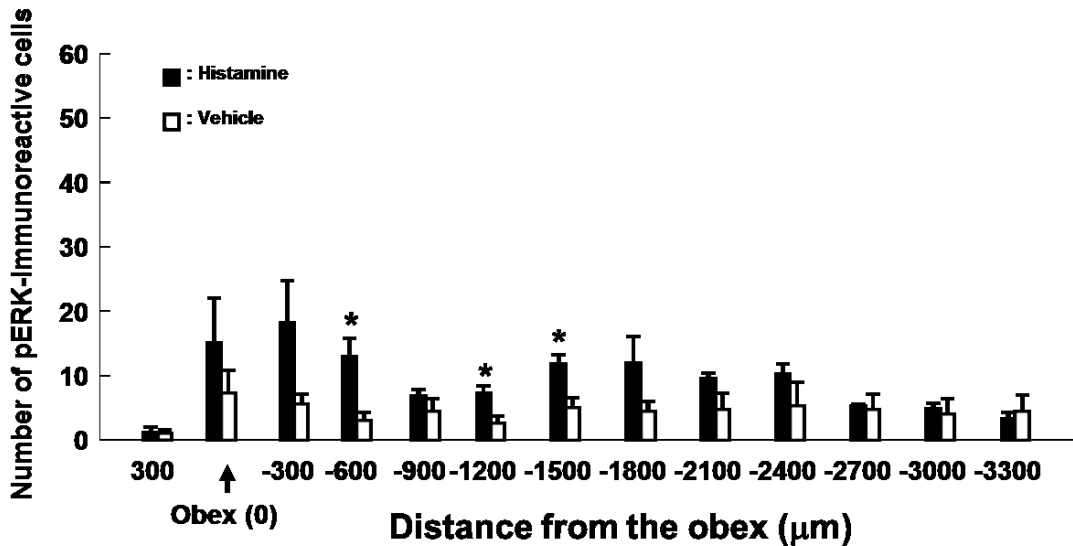
第2図

pERK陽性細胞が検出された切片のNeuro-Lucida描画像



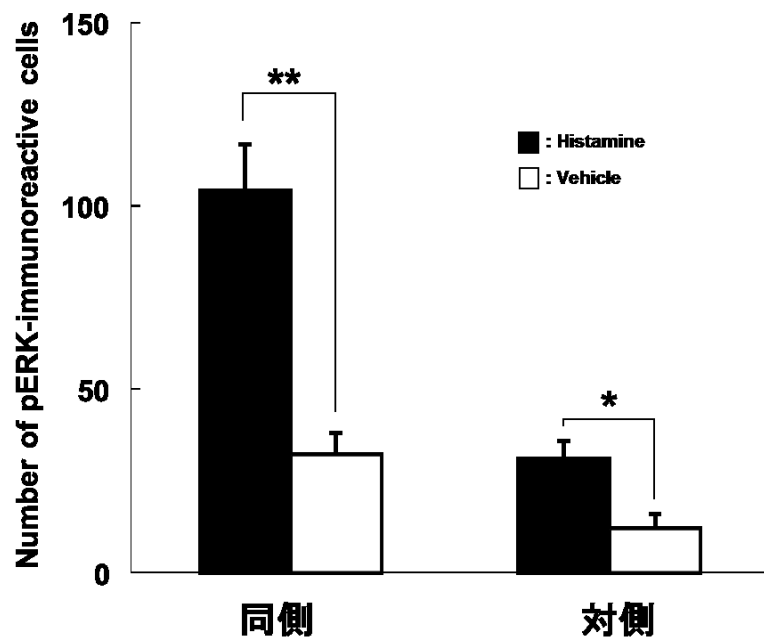
第3図

Histamine注人と同側のVcおよびC1-C2において検出されたpERK-陽性細胞の吻尾側方向における分布, 矢印:ピーク, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$



第4図

Histamine注人と対側のVcおよびC1-C2において検出されたpERK-陽性細胞の吻尾側方向における分布, *: $p < 0.05$



第5図

Histamine 投与ラットおよびvehicle投与ラットの, Vclにおいて検出されたpERK陽性細胞数の比較, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$