

平成21年 5月21日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007-2008

課題番号：19590228

研究課題名 (和文) 痛みの知覚の性差とそのメカニズム (2)

研究課題名 (英文) Sex difference in pain response and its mechanism (2)

研究代表者

田中 (貴邑) 富久子 (TANAKA (KIMURA) FUKUKO)

横浜市立大学・大学院医学研究科・客員教授

研究者番号：40046066

研究成果の概要：

分界条床核外側核の CREB の作用をアデノウイルスを用いて dominant negative に抑制すると、雌性特異的な痛み反応が消失した。A10 領域からのドーパミンニューロン投射は性差があり、雌性の方が多いが、分界条床核外側核のドーパミン分泌には性差がなかった。この部位にドーパミン受容体拮抗剤を局所投与すると雌性のみ、痛み反応が増強された。以上の結果から、分界条床核外側核は、雌性特異的な痛み反応に関与していることが推測された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生理学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学

キーワード：ホルマリンテスト, pCREB, 分界条床核, エストロジェン, ドーパミン

1. 研究開始当初の背景

ホルマリンテストは二相性で、初期5分はラットは激しく痛み (第一相) 10-15 分間はいったん痛みがおさまる (中間相)。そして第二相の痛みが発現してきて約1時間、持続する。そして、この中間相にこそもっとも明確な性差が存在し、雌性の方が痛覚過敏で

ある。少なくともエストロジェン依存性の反応であることは推測されていたが分子基盤は全く不明であった。その機序を知る目的で CREB のリン酸化された状態を特異的に認識する抗体で免疫組織をしたところ、エストロジェン依存性に、かつ、中間相特異的、かつ、雌性ラットにおいてのみ分界条床核外側核に pCREB が発現することが明らかとなった。

2. 研究の目的

我々は、分界条床核外側核に、雌性特異的かつエストロゲン依存性に誘導される pCREB が、ホルマリンによる痛み誘発侵害刺激においていかなる役割を果たすかを明らかにするために、(1) pCREB 発現とホルマリントテストの関係を dominant negative に抑制する CREB の変異体、mCREB を分界条床核外側核にアデノウイルスを用いて発現させることにより調べる。また、(2) どのような神経細胞が pCREB を発現しているのかを調べる。次に、ドーパミン系を中心に、いかなる機序で分界条床核外側核に pCREB が発現するのかを明らかにする。具体的には、(3) ドーパミンニューロンは A10 領域のどこから投射されてくるのか、それに性差はあるのか、(4) 分界条床核外側核のドーパミン分泌に性差はあるのか、(5) 分界条床核外側核へのドーパミン受容体拮抗剤局所投与のホルマリントテストに及ぼす影響、を調べる。

3. 研究の方法

(1) pCREB 発現を dominant negative に抑制する CREB の変異体 (mCREB) を組み込んだアデノウイルス (AV-mCREB-His-tag)、および対照として β Gal のみを組み込んだ AV- β Gal は、山梨大学有田先生より提供を受ける。脳定位手術により分界条床核外側部に、AV-mCREB-His-tag、もしくは AV- β Gal を投与し、2 週間後に実験に用いる。まず高架式十字迷路で、ラットの不安状態を検討する。次に、ラットの右後肢足底部に 2%ホルマリン溶液 50 μ l を皮下投与する。その後 60 分間、痛み行動 (足あげ反応) を観察する (ホルマリントテスト) (2) pCREB を発現する分界条床核外側核ニューロンの同定はまず DARPP32 に焦点をあて、調べる。(3) ドーパミンニュー

ロンは A10 領域のどこから投射されてくるのか調べる。7-8 週齢の雄性ラットおよび発情前期雌性ラットを用いて、脳定位手術により、分界条床核外側部に 4% Fluoro-Gold (UV により青色に励起される逆行性標識物) 溶液 1 μ l を投与し、48 時間後に致死量のペントバルビタールを投与して脳を環流固定する。免疫組織化学により、抗チロシン水酸化酵素 (TH、DA ニューロンのマーカー) 抗体を用いて A10 領域の DA ニューロンを ABC 法により染色する。TH は Cy3 (オレンジ色) で蛍光標識する。(4) マイクロダイアリシス法を用いて、連続的に分界条床核外側部のドーパミン分泌のホルマリントテストにおける変化と、その性差について検討する。(5) 分界条床核外側核へのドーパミン受容体拮抗剤局所投与のホルマリントテストに及ぼす影響を調べるために、雄性ラットおよび発情前期雌性ラットの分界条床核外側核に薬物投与用のステンレスパイプを、脳定位手術により留置する。手術侵襲より回復の後、ドーパミン D1 受容体拮抗剤 (SCH23390)、もしくは D1 受容体刺激剤を留置パイプより 0.5 μ l を投与し、30 分後にホルマリントテストを行う。

4. 研究成果

(1) pCREB 発現を dominant negative に抑制する CREB の変異体 (mCREB) を組み込んだ AV-mCREB-His-tag、対照として AV- β Gal を、脳定位手術により分界条床核外側部に投与し、2 週間後に実験に用いた。高架式十字迷路を 5 分間行い、不安状態を調べたが、性差に影響はなかった。上記の観察の 24 時間後に、ラットの右後肢足底部に 2%ホルマリン溶液 50 μ l を皮下投与し。その後 60 分間、痛み行動 (足あげ反応) を観察した (ホルマリントテスト)。その結果、雄性ラットでは、ホルマリントテストに影響を及ぼさなかった

が、雌性ラットの場合、mCREBを投与した群は、雄性の群と痛み行動に差がなくなり、従って、痛み行動の性差は、この領域のCREBが担っていると考えられた。(2)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- 1 Hagiwara H, Funabashi T, Mitsushima D, Kimura F, 2007, Effects of neonatal testosterone treatment on sex differences in formalin-induced nociceptive behavior in rats, *Neurosci Lett*, 412:264-267
- 2 Takase K, Mitsushima D, Funabashi T, Kimura F, 2007, Sex difference in the 24-h acetylcholine release profile in the premotor/supplementary motor area of behaving rats, *Brain Res*, 1154:105-115
- 3 Ohtaki K, Aihara M, Takahashi H, Fujita H, Takahashi K, Funabashi T, Hirasawa T, Ikezawa Z, 2007, Effects of tributyltin on the emotional behavior of C57BL/6 mice and the development of atopic dermatitis-like lesions in DS-Nh mice, *J Dermatol Sci*, 47:209-216
- 4 Tin-Tin-Win-Shwe, Mitsushima D, Yamamoto S, Fukushima A, Funabashi T, Kobayashi T, Fujimaki H, 2008, Changes in neurotransmitter levels and proinflammatory cytokine mRNA expressions in the mice olfactory bulb following nanoparticle exposure, *Toxicol Appl Pharmacol*, 226:192-198
- 5 Mitsushima D, Takase K, Funabashi T, Kimura F, 2008, Gonadal steroid hormones maintain the

stress-induced acetylcholine release in the hippocampus: simultaneous measurements of the extracellular acetylcholine and serum corticosterone levels in the same subjects, *Endocrinology*, 149:802-811

- 6 Takase K, Mitsushima D, Funabashi T, Kimura, 2008, Postpubertal feeding experience affects sex-specific spatial ability in rats, *Physiol Behav*, 93:553-559
- 7 貴邑 (田中) 富久子, 船橋利也, 美津島大, 2007, 性差研究の発展のために-ラットおよびヒト脳に関する性差研究の戦略と方法-, *日本臨床*, 65:1135-1145
- 8 貴邑富久子, 船橋利也, 2007, GnRH のパルス状発生器とサージ発生器-多ニューロン発射活動記録法による研究をもとに, *Horm Front Gynecol*, 14:105-110
- 9 船橋利也, 貴邑富久子, 2008, 摂食行動の性差と糖代謝, *Diabetes Front* 19, 454-459

[学会発表] (計 1 件)

- 1 船橋利也, 貴邑富久子, 2007, 摂食行動の性差. 環境ストレスに対する生理応答と性ホルモン, 第 84 回日本生理学会大会シンポジウム

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 (貴邑) 富久子 (TANAKA (KIMURA) FUKUKO)

横浜市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：40046066

(2)研究分担者

船橋 利也(FUNABASHI TOSHIYA)

横浜市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：70229102

(3)連携研究者

なし