

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：33905

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590724

研究課題名(和文) 繰り返し寒冷ストレスによる痛み受容器の末梢性感作に関する網羅的遺伝子発現解析

研究課題名(英文) Global gene expression analysis of mechanical hyperalgesia induced by repeated cold stress in rats

研究代表者

小崎 康子 (KOZAKI, Yasuko)

金城学院大学・薬学部・准教授

研究者番号：20126882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：繰り返し寒冷ストレス(RCS)負荷は、血圧低下と痛覚過敏を伴う副交感神経緊張型病態を引き起こす。RCS負荷による痛覚過敏の発生機序は、中枢性機序、すなわち、下行性疼痛抑制系の抑制によるものと考えられてきた。本報では、SHRSP5/DmcrラットにRCSを負荷して痛み受容細胞(脊髄後根神経節細胞)における遺伝子の発現変化をcDNA サブトラクション法とDNAマイクロアレイ法を用いて解析した。その結果、8種の痛み関連遺伝子に有意な発現変化が認められた。これらの痛み関連遺伝子の少なくとも一部は、RCSによる痛覚過敏の末梢性感作機序に重要な役割を果たす可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Repeated cold stress (RCS) is known to transiently induce autonomic imbalance associated with hypotension and hyperalgesia. This hyperalgesia is thought to be caused by hypofunction of pain inhibitory systems. In this study, we detected changes in pain-related genes expression in the dorsal root ganglion cells (DRGs) by means of two methods, PCR-based cDNA subtraction analysis and DNA microarray analysis in SHRSP5/Dmcr rats. We found significant increase or decrease expressions in eight pain related genes at post-RCS. At least some of these genes in DRG may play key roles to hyperalgesia induced by RCS.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・疼痛学

キーワード：繰り返し低温ストレス 痛覚過敏 遺伝子発現 末梢性疼痛機序

## 1. 研究開始当初の背景

慢性関節リウマチや遅発性筋痛などによる可塑的变化—痛覚過敏は、各種環境ストレスによりさらに修飾されると推測される。本報では、環境ストレスモデルとして、繰り返し寒冷ストレス (RCS) に注目した。RCS は、副交感神経緊張亢進型の自律神経失調モデルとして知られ、痛覚過敏と血圧低下を引き起こすことが知られている。その発生機序は、主に、下行性疼痛抑制系の抑制—すなわち中枢性の機序によるものと考えられてきた。RCS による痛覚過敏についての末梢性の感作機序に関する研究は少ない。

## 2. 研究の目的

RCS 負荷による痛覚過敏の発生機序は、下行性疼痛抑制系の抑制によるものとされてきたが、末梢性機序が存在する可能性もある。

本報では、RCS モデル動物を作成し、RCS による痛覚過敏に中枢性感作機序の1つとして視床下部が関与することを確認し、さらに末梢の痛み受容細胞 (脊髄後根神経節細胞、DRG) における痛み関連遺伝子の発現変化を調べることによって、その末梢性痛覚感作機序の存在を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

動物としては、雄性 SHRSP5/Dmcr ラットを用いた。SHRSP5/Dmcr ラットは、高血圧自然発症ラット (SHR) から派生した反応性高脂血症のモデル動物である (Yamori et al., J. Cir. J. 45:1068, 1981) が、SHR (秦ら、Shinshin-Igaku 24: 39, 1984) と同様に痛覚閾値が高く、痛覚閾値の低下を観察するのに適した動物であると推測して使用した。

痛覚閾値は、ラット足底部皮膚の von Frey hair による機械的刺激に対する足上げ逃避反応を指標として経日的に測定した。通常時の痛覚閾値を Wistar ラットと比較した。

RCS 負荷は、飼育温度を昼間は 30 分ごとに室温 (24°C) と低温 (4°C) に変化させ、夜間は低温にするというサイクルを 2 日間繰り返し、夜間の低温飼育を 2 日間追加する方法で行った。

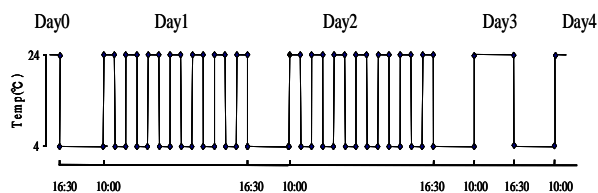


図1 RCS 負荷プロトコール

血圧は、ラット非観血圧測定装置を用いて最高血圧、最低血圧、脈拍を測定した。最高血圧値と最低血圧値の変化は平行していたので、解析には、平均血圧の値を用いた。

RCS 負荷終了後 (Day4) に、後肢支配領域の DRG (L3~L6) と視床下部を採取した。

RCS を負荷しないコントロール群も同時に痛覚閾値と血圧値の測定を行い、DRG と視床下部を採取し、total RNA を抽出した。

まず、視床下部 副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) の関与を調べるために、RCS 群とコントロール群の視床下部 各 12 サンプルの total RNA を用いて、CRH の発現変化を RT-PCR 法により調べた。

次に DRG において発現が変化する痛み関連遺伝子を検索するために、RCS 群とコントロール群の DRG 各 2 サンプルの total RNA を用いて、cDNA サブトラクション法と DNA マイクロアレイ法を行った。

上記の検索の結果、発現変化が検出された痛み関連遺伝子について、RCS 群とコントロール群の DRG 各 12 サンプルの total RNA を用いて RT-PCR 法によって発現変化の有意性を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) SHRSP5/Dmcr ラットの痛覚閾値：

SHRSP5/Dmcr ラットでは、足底部皮膚への von Frey hair による機械的刺激によって安定した痛覚閾値が観測され、通常時の痛覚閾値は Wistar ラットに比べて高いことが判明した。SHRSP5/Dmcr ラットは、閾値の低下を観察しやすく、痛覚過敏を研究する際に有用なモデル動物となる可能性がある。

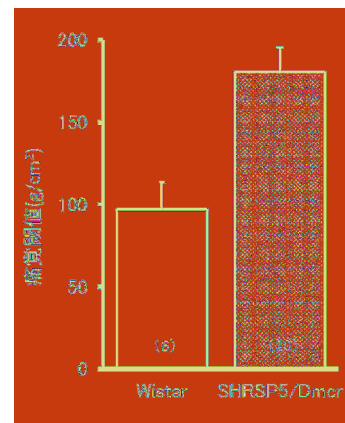


図2 痛覚閾値の比較

(2) RCS 負荷：全 3 日半の RCS 負荷法を開発し、SHRSP5/Dmcr に RCS を負荷したところ、Day4 において痛覚閾値の有意な低下 (n=12, p<0.05 vs control by Student's

t-test)と血圧の有意な低下が観察された (n=8、p<0.05 vs control by Student's t-test)。これまで、ラットに対しては-3℃を負荷することが多かったが、SHRSP5/Dmcr ラットにおいては、4℃という比較的マイルドな条件のRCS負荷によっても明らかな痛覚過敏と血圧低下が観察された。

**(3) 視床下部におけるRCS負荷によるCRHの発現変化：**視床下部におけるCRHの発現をRT-PCR法により調べたところ、RCSにより有意な増加が確認された (n=12、p<0.01 vs control by Student's t-test)。

RCSによる痛覚過敏は、中枢性の疼痛抑制系の抑制によるものと考えられてきた。視床下部の切除によってRCSによる生体反応が減弱されるという報告があり、視床下部の関与が示唆されてきた。本報においても、視床下部におけるCRHの有意な発現変化が確認され、中枢性の疼痛抑制機序のうち視床下部CRHの関与が確認された。

**(4) DRGにおいてRCS負荷によって発現が変化する痛み関連遺伝子のcDNAサブトラクション法による検索：**以下の4種の痛み関連遺伝子の発現変化が認められた。

発現増加：Tac 1

発現減少：S100a10、CatB、Fst11

**(5) DRGにおいてRCS負荷によって発現が変化する痛み関連遺伝子のcDNAアレイ法による検索：**以下の6種の痛み関連遺伝子の発現変化が認められた。

発現増加 (2倍以上に増加)：St8sial, Fyn, Grin2b, Map2k1

発現減少 (1/2以下に減少)：Npy, Itpr1

**(6) DRGにおいてRCS負荷によって発現が変化する痛み関連遺伝子のRT-PCR法による発現変化の確認：**(4)、(5)で発現変化の可能性が認められた10種の遺伝子について、RT-PCR法により発現変化を調べた。

Grin2b, Map2k1については、有意な発現変化は認められなかったが、他の8種の遺伝子については有意な増加あるいは減少が認められた。

有意な増加：Tac 1, Fyn, St8sial (n=12, p<0.05 vs control by Student's t-test)  
有意な発現減少：S100a10, CtsB, Fst11, Itpr1, Npy (n=12, p<0.05 vs control by Student's t-test)

遺伝子発現変化の検索法として、cDNAサブトラクション法とDNAマイクロアレイ法を用いたところ、異なる遺伝子の発現変化が検出された。複数の検索法を併用することは有

用であると考えられる。

RCSは中枢性機序、すなわち、下行性疼痛抑制系の抑制により痛覚過敏を引き起こすと考えられてきた。本報においても、視床下部におけるCRHの発現変化が認められた。本報では、さらにDRGにおいて8種の痛み関連遺伝子の有意な発現変化も検出された。これらの痛み関連遺伝子の中には、シナプス伝達の修飾に拘わるものや、イオンチャネルのtraffickingに拘わるとされるものなども含まれている。発現変化が認められた痛み関連遺伝子のうち少なくとも一部はRCSによる痛覚過敏の末梢性痛覚感作機序に重要な役割を果たす可能性があると考えられる。

## 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2件)

1. Mechanical hyperalgesia induced by repeated cold stress in SHRSP5/Dmcr rats: PCR-based cDNA subtraction analysis for peripheral expression changes in pain related genes (Abst.) Yasuko Kozaki, Rena Umetsu, Yukako Mizukami, Aya Yamamura, and Kazuya Kitamori. J. Physiol. Sci., vol. 64, (Suppl. 1), S157, 2014. 3.
2. Cutaneous mechanical hyperalgesia induced by a high-fat-cholesterol diet in SHRSP5/Dmcr rats: upregulation of Mss4 in dorsal root ganglion cells (Abst.) Yasuko Kozaki, Yuka Hasegawa, Yukako Mizukami, Rena Umetsu, Chinami Ishikawa, Yukie Nakagawa, Yuri Morikawa, Haruhi Yasue, Aya Yamamura, and Kazuya Kitamori. J. Physiol. Sci., vol. 63, (Suppl. 1): S162, 2013. 3.

〔学会発表〕(計8件)

1. SHRSP5/Dmcr ラットにおける繰り返し寒冷ストレス負荷による痛覚過敏とDNAマイクロアレイによる痛み関連遺伝子の発現解析. 小崎康子、梅津麗菜、水上裕佳子、新井かおり、山村 彩、北森一哉、日本薬学会第134年会 (熊本) 2014. 3. 27.
2. 高コレステロール食摂取がSHRSP5/Dmcr ラットの機械的刺激に対する痛覚閾値に及ぼす影響. 島田果歩、森川友理、渡邊佳央里、北森一哉、小崎康子、日本薬学会第134年会 (熊本) 2014. 3. 27.
3. SHRSP5/Dmcr ラットにおける高脂肪・高コレステロール食摂取時の機械的刺激に対

- する痛覚過敏：脊髄後根神経節細胞における遺伝子発現の変化. 長江佳菜、新井かおり、大山由帆、北森一哉、小崎康子、日本薬学会第134年会（熊本）2014.3.27.
4. SHRSP5/Dmcr ラットにおける繰り返し寒冷ストレス負荷時の痛覚過敏：末梢における痛み関連遺伝子発現変化のPCR-based cDNA subtraction 法による解析. 小崎康子、梅津麗菜、水上裕佳子、山村彩、北森一哉、第91回日本生理学会（鹿児島）2014.3.16.
  5. SHRSP5/Dmcr ラットにおける高脂肪・コレステロール食摂取時の機械的刺激に対する皮膚痛覚過敏：脊髄後根神経節細胞における Mss4 の発現増加. 小崎康子、長谷川祐佳、水上裕佳子、梅津麗菜、石川知奈美、中川由貴江、森川友里、安江春陽、山村 彩、北森一哉、第90回日本生理学会大会（東京）2013.3.27.
  6. 動脈脂肪沈着易発症ラットにおける SART（繰り返し寒冷）ストレス負荷時と高脂肪食摂取時の機械的刺激に対する皮膚痛覚過敏. 小崎康子、長谷川祐佳、水上裕佳子、梅津麗菜、日下部彩、新井かおり、林田麻美、尾内彩乃、北森一哉、奥山治美、第35回日本神経科学大会（名古屋）2012.9.18.
  7. 動脈脂肪沈着易発症ラットにおける繰り返し寒冷ストレス負荷時の痛覚過敏：cDNA サブトラクション法による解析. 梅津麗菜、長谷川祐佳、新井かおり、水上裕佳子、北森一哉、小崎康子、日本薬学会第132年会（札幌）2012.3.29.
  8. 動脈脂肪沈着易発症ラットにおける高脂肪食摂取時の機械的刺激に対する痛覚過敏：cDNA サブトラクション法による解析. 長谷川祐佳、梅津麗菜、林田麻美、松田理沙、北森一哉、奥山治美、小崎康子、日本薬学会第132年会（札幌）2012.3.29.

**【その他】**（計1件）

ホームページ等

<http://www.kinjo-u.ac.jp/kozaki/index.html>

**6. 研究組織**

(1) 研究代表者

小崎 康子 (KOZAKI, Yasuko)  
金城学院大学・薬学部・准教授  
研究者番号：20126882

(2) 研究分担者

北森一哉 (KITAMORI, Kazuya)  
金城学院大学・生活環境学部・准教授