

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592289

研究課題名(和文) 光遺伝学的アプローチによる疼痛受容機構の解明および疼痛制御法の開発

研究課題名(英文) Investigation of pain receptor mechanism and development of pain control system by optogenetic approach

研究代表者

大西 英生(OHNISHI, Hideo)

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：20279342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：c-fos-eGFPトランスジェニックラットとc-fos-ChR2-eGFP トランスジェニックラットを使用し、急性疼痛負荷時の疼痛受容機構の可視化および疼痛受容にかかわる Fos-ChR2 発現ニューロンの光照射による操作を試みることを目的とした。その結果、急性疼痛ストレス時の視床下部、脊髄、下垂体前葉、および副腎皮質におけるc-fos-eGFP発現を *in vitro* もしくは *ex vivo* で可視化できた。また、Fos-ChR2 発現ニューロンにおけるChR2 の細胞膜での発現を eGFP を指標に可視化することができた。

研究成果の概要(英文)：We have generated a novel transgenic rat system that enables the visualization of c-fos expression, using an enhanced green fluorescent protein (eGFP) tag (c-fos-eGFP transgenic rat). Furthermore, we have generated rats bearing an c-fos-channelrhodopsin 2 (ChR2) -eGFP fusion transgene (c-fos-ChR2-eGFP transgenic rat). The purposes of the study were to visualize the mechanism of acceptance against nociceptive stress and to try operating the neural activities of Fos-ChR2 expressing neurons by light irradiation, using these transgenic rats. We succeeded in visualizing the c-fos-eGFP expression in the hypothalamus, spinal cord, anterior pituitary, and adrenal cortex after nociceptive stress in *in vitro* or *ex vivo* in c-fos-eGFP transgenic rats. In addition, ChR2-eGFP expression on the cell membrane in the hypothalamus and the spinal cord was observed after nociceptive stress in c-fos-ChR2-eGFP transgenic rats.

研究分野：医歯薬学

キーワード：疼痛 c-fos遺伝子 トランスジェニック動物 光遺伝学 蛍光タンパク

1. 研究開始当初の背景

骨折や火傷などの外傷において、急性の炎症細胞(好中球)の浸潤、肥満細胞や血小板からのヒスタミンやセロトニンの放出による局所の腫脹と共に疼痛が誘発され、炎症反応の抑制に非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)が広く使用されている。一方、関節リウマチ(RA)は多関節炎・関節痛を主徴とする全身性の慢性炎症性疾患であり、関節炎が生じている局所では炎症細胞(活性化したT細胞)の浸潤、免疫反応を介した多量のケミカルメディエーター(TNF α 、IL-1、IL-6などのサイトカイン)の産生による炎症性滑膜炎、関節破壊などにより関節痛を引き起こす。現在、RA患者の治療のために炎症反応の抑制や活性化したT細胞やサイトカインを標的とした生物学的製剤が治療戦略として用いられるようになった。

申請者らはこれまでにコラーゲン誘発性関節炎マウス、アジュバント関節炎ラットおよびホルマリン疼痛誘発ラットを用いて急性・慢性疼痛ストレスに伴う神経内分泌反応の変化ならびに脊髄後角における疼痛受容機構について検討してきた。これら一連の研究から、疼痛モデル動物において視床下部-下垂体-副腎(HPA)系ならびに脊髄後角-II層のニューロン群が賦活化され、急性・慢性の疼痛受容においてその賦活様式はそれぞれ異なることを見出した。そして、急性および慢性疼痛モデル動物における全身性の反応であるHPA系の変化と疼痛を受容する脊髄後角との機能連関を明らかにすることが、疼痛機序の解明ならびに疼痛抑制機構の確立に重要であるとの認識に至った。

最近、光感受性タンパクを発現させた細胞にレーザー(光)を照射して光感受性タンパクの機能を操作する技術(オプトジェネティクス;光遺伝学)が開発されている。具体的には、Channelrhodopsin 2(チャネルロドプシン(ChR)2;光興奮タンパク)を発現した細胞では、光(~470 nm)照射で細胞が興奮し、Halorhodopsin(ハロロドプシン;光抑制タンパク)を発現した細胞では光(~580 nm)照射で細胞は抑制される(Gradinaru et al., Cell 2010)。

研究分担者の上田らはすでに、さまざまな刺激に反応して活性化したニューロンを同定するためにニューロンの活動性の指標として汎用される*c-fos*遺伝子産物のFosタンパクに改変緑色蛍光タンパク(enhanced Green Fluorescent Protein; eGFP)もしくは単量体赤色蛍光タンパク(monomeric Red Fluorescent Protein 1; mRFP1)遺伝子を挿入した遺伝子改変動物(トランスジェニックラット)を作出してきた。これらのトランスジェニックラットでは、ストレス負荷で活性化したニューロンに特異的に緑色もしくは

は赤色の蛍光タンパクが発現した(Fujihara et al., Endocrinology 2009; Ishikura et al., Brain Res 2012; Katoh et al., J Neuroendocrinol 2014)。我々のこれまでの経験をもとに、*c-fos*-eGFPトランスジェニックラットを用いて脊髄後角における疼痛受容反応ならびに視床下部における全身への疼痛反応を*in vivo*で明らかにすること、さらにはFosタンパクを疼痛刺激により発現したニューロンに特異的に光感受性タンパクを発現させて、例えば疼痛受容により活性化した脊髄後角に光照射することでFos-光感受性タンパク発現ニューロンのみを興奮または抑制させることができるのではないかとこの着想に至った。この場合、標的としているニューロンが散在していても光照射範囲内であれば光刺激によりそれらのニューロンのみを特異的に興奮または抑制させることができ、光照射のオン・オフにより短時間に目的としたニューロンの活動性を操作できるという時間特異性も確保できるなどの利点がある。

2. 研究の目的

生体にとって急性および慢性炎症に対する生理的防御反応はきわめて重要で急性・慢性炎症時にHPA系が活性化されるが、その賦活様式はそれぞれ異なる。近年、光感受性タンパクを発現させたニューロンにレーザー(光)照射することによりそのニューロン活動を操作する技術(オプトジェネティクス;光遺伝学)が開発された。我々は、この技術を応用してニューロンの活動性の指標として汎用される*c-fos*遺伝子産物のFosタンパクが疼痛刺激により発現したニューロンに光感受性タンパクを特異的に発現させて疼痛受容にかかわるニューロンの活動性を光照射により操作することで、疼痛受容機構の可視化ならびに神経内分泌反応との機能連関を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *c-fos*-eGFPトランスジェニックラットに、急性疼痛ストレスとして5%ホルマリン液100 μ lを両側後肢足底部に無麻酔下に皮下注射した。皮下注射3時間後に灌流固定し、脳および脊髄を採取し、ミクロトームを用いて下垂体後葉ホルモンを産生する視床下部視索上核(SON)、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)を産生する視床下部室傍核小細胞領域(pPVN)、下垂体後葉ホルモンを産生する視床下部室傍核大細胞領域(mPVN)、足底部からの疼痛刺激を受容する第4-5腰髄(L4-5)レベルの脊髄後角-II層、下垂体前葉、および副腎皮質を含む30 μ mの切片を作成し、蛍光顕微鏡(DS-QiMc (Nikon))を用いてeGFP発現を観

察した。SON、pPVN、mPVN および脊髄後角 - 層においては、eGFP 陽性細胞数を計測し、結果はコントロール群と比較した。

(2) *c-fos*-eGFP トランスジェニックラットに、急性疼痛ストレスとして 1% カプサイシン液 30 μ l を片側後肢足底部に無麻酔下に皮下注射した。皮下注射 2 時間後にラットを素早く断頭して脊髄を採取し、HEPESS バッファー液中に浸した。L4-5 レベルの脊髄を、スライサーを用いて 350 μ m のスライス切片として作成し、生細胞の状態では蛍光顕微鏡 (DS-Qi1Mc (Nikon)) を用いて脊髄後角 - 層における蛍光発現を観察し、コントロールと比較した。

(3) *c-fos*-ChR2-eGFP トランスジェニックラットに、5% ホルマリン液 100 μ l を両側後肢足底部に無麻酔下に皮下注射した。皮下注射 3 時間後、6 時間後および 12 時間後に灌流固定し、脳および脊髄を採取し、マイクロームを用いて SON、視床下部室傍 (PVN) および L4-5 レベルの脊髄後角 - 層を含む 30 μ m の切片を作成し、蛍光顕微鏡 (DS-Qi1Mc (Nikon)) および共焦点レーザー顕微鏡 (Pascal (Zeiss)) を用いて eGFP 発現細胞を観察した。また、皮下注射 3 時間後の Fos タンパクを免疫組織化学的染色法 (Fos-immunoreactivity; Fos-ir) を用いて赤色蛍光抗体で可視化し、コントロール群と比較した。

4. 研究成果

(1) ホルマリン液皮下注射 3 時間後における SON、pPVN、mPVN、脊髄後角 - 層、下垂体前葉および副腎皮質における eGFP 蛍光はコントロール群と比較し増加傾向であることが確認できた (図 1)。また、SON、pPVN、mPVN、脊髄後角 - 層における、eGFP 発現細胞数はコントロール群と比較し有意に増加していた (図 2)。以上の結果から、急性疼痛ストレス負荷後の *c-fos*-eGFP トランスジェニックラットにおいて、Fos タンパクの発現動態が、eGFP 蛍光タンパクの発現によって可視化できることが確認できた。

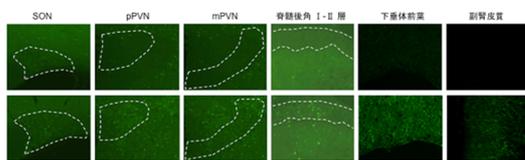


図 1. *c-fos*-eGFP トランスジェニックラットに 5% ホルマリン液 100 μ l を両側後肢足底部に皮下注射し、投与 3 時間後の SON、pPVN、mPVN、脊髄後角 - 層、下垂体前葉、および副腎皮質における eGFP 蛍光の発現を観察した。

Scale bar = 100 μ m

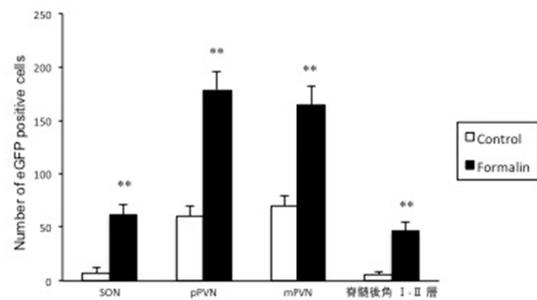


図 2. *c-fos*-eGFP トランスジェニックラットに 5% ホルマリン液 100 μ l を両側後肢足底部に皮下注射し、投与 3 時間後の SON、pPVN、mPVN および脊髄後角 - 層における eGFP 発現細胞数を計測した。各群 n=5 ** $p < 0.01$ vs Control

(2) カプサイシン液皮下注射 2 時間後の脊髄のスライス標本において、eGFP 発現細胞がコントロールと比較して増加していることが確認できた (図 3)。スライス標本ではあるが、生細胞でも eGFP の発現細胞を可視化できるため、*c-fos*-eGFP トランスジェニックラットが生細胞でも蛍光発現を観察できる有用なモデルであることが確認できた。

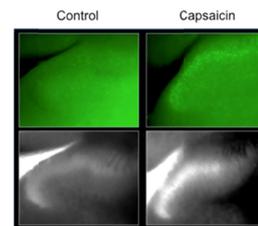


図 3. *c-fos*-eGFP トランスジェニックラットに 1% カプサイシン液 30 μ l を片側後肢足底部に皮下注射し、投与 2 時間後の脊髄後角 - 層における eGFP 蛍光の発現を観察した。

(3) ホルマリン液皮下注射 3 時間後に脊髄後角 - 層、SON および PVN において、細胞膜の ChR2-eGFP および核内の Fos 免疫陽性が共に陽性である細胞が確認でき (図 4)、*c-fos* 遺伝子の発現により、Fos タンパクとともに ChR2-eGFP が合成されることが確認できた。また、ホルマリン液皮下注射 3 時間、6 時間および 12 時間後の脊髄後角 - 層、SON および PVN において、細胞質および細胞膜に eGFP 蛍光を発現する

ChR2-eGFP 陽性細胞を認め (図 5)、細胞膜での eGFP 発現が経時的な増加傾向を呈するため、細胞質で合成された ChR2-eGFP が経時的に細胞膜に移行することが示唆された (図 6)。

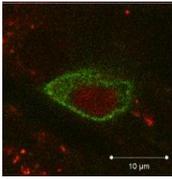


図 4. ホルマリン液皮下注射 3 時間後の SON における ChR2-eGFP (細胞膜の緑色) および Fos 免疫陽性細胞 (核内の赤色)。

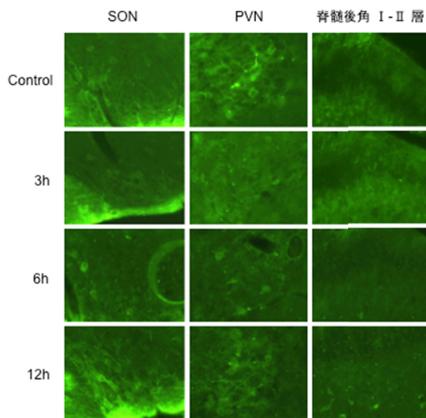


図 5. ホルマリン液皮下注射 3 時間、6 時間および 12 時間後の SON、PVN および脊髄後角 I-II 層における eGFP 蛍光の発現。Scale bar = 10 μm

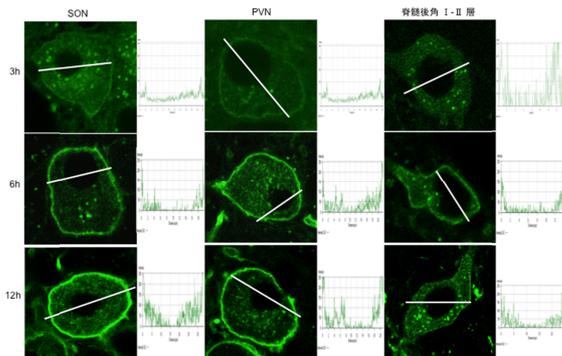


図 6. ホルマリン液皮下注射 3 時間、6 時間および 12 時間後の SON、PVN および脊髄後角 I-II 層における ChR2-eGFP 陽性細胞および断面の蛍光輝度。Scale bar = 10 μm

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Matsuura, T. Kawasaki, M. Hashimoto, H. Ishikura, T. Yoshimura, M. Ohkubo, J.-I. Maruyama, T. Motojima, Y. Sabanai, K. Mori, T. Ohnishi, H. Sakai, A. & Ueta, Y. (2015) Fluorescent visualisation of oxytocin in the

hypothalamo-neurohypophysial/-spinal pathways after chronic inflammation in oxytocin-monomeric red fluorescent protein 1 transgenic rats. *Journal of Neuroendocrinology* (査読有)

DOI ; 10.1111/jne.12290.

Gabbi, C. Kong, X. Suzuki, H. Kim, HJ. Gao, M. Jia, X. Ohnishi, H. Ueta, Y. Warner, M. Guan, Y. & Gustafsson, JÅ. (2012) Central diabetes insipidus associated with impaired renal aquaporin-1 expression in mice lacking liver X receptor β . *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*109(8): 3030-3034 (査読有)

DOI ; 10.1073/pnas.1200588109.

Ishikura, T. Suzuki, H. Yoshimura, M. Ohkubo, J. Katoh, A. Ohbuchi, T. Ohno, M. Fujihara, H. Kawasaki, M. Ohnishi, H. Nakamura, T. & Ueta, Y. (2012) Expression of the c-fos-monomeric red fluorescent protein 1 fusion gene in the spinal cord and the hypothalamic paraventricular nucleus in transgenic rats after nociceptive stimulation. *Brain Research* 1479: 52-61 (査読有)

DOI ; 10.1016/j.brainres.2012.08.033.

Ishikura, T. Suzuki, H. Matsuura, T. Ohnishi, H. Nakamura, T. & Ueta, Y. (2012) Visualization of the response in the central nervous system after nociceptive stimulation using transgenic animals. *J UOEH* 34(4): 315-321 (査読有)

DOI ; なし

〔学会発表〕(計 17 件)

松浦 孝紀、元嶋 尉士、齋藤 玲子、吉村 充弘、大久保 淳一、丸山 崇、橋本 弘史、石倉 透、鈴木 仁士、川崎 展、大西 英生、尾仲 達史、酒井 昭典、上田 陽一 (2015 年 3 月 20 日) 急性疼痛モデルラットにおける下垂体後葉系および視床下部 - 脊髄系のオキシトシンの動態とその役割の検討: 第 10 回環境生理学プレコングレス、ホテル北野プラザ六甲荘 (兵庫県神戸市)

Matsuura, T. Kawasaki, M. Motojima, Y. Suzuki, H. Yoshimura, M. Ohkubo, J. Maruyama, T. Hashimoto, H. Ohnishi, H. Sakai, A. & Ueta, Y. (2014 年 11 月 15-19 日) The expression of the oxytocin-monomeric red fluorescent protein 1

fusion gene in the hypothalamus and spinal cord after acute nociceptive stimulation in transgenic rats. Neuroscience 2014. Washington DC, USA.

松浦 孝紀、吉村 充弘、大久保 淳一、元嶋 尉士、丸山 崇、橋本 弘史、石倉 透、鈴木 仁士、川崎 展、大西 英生、酒井 昭典、上田 陽二 (2014年10月31-11月2日)慢性関節炎モデルラットにおけるオキシトシンの発現動態ならびにその役割について:第41回日本神経内分泌学会学術集会(内分泌学ウイーク2014)、都道府県会館(東京都千代田区)

元嶋 尉士、松浦 孝紀、齋藤 玲子、大久保 淳一、吉村 充弘、橋本 弘史、鈴木 仁士、川崎 展、大西 英生、酒井 昭典、上田 陽一(2014年10月23-24日)消化管ホルモン末梢投与後の視床下部オキシトシンニューロンの活性化~オキシトシン-mRFP1トランスジェニックラットを用いた検討~:第65回西日本生理学会、琉球大学(沖縄県中頭郡)

Motojima, Y. Matsuura, T. Yoshimura, M. Ohkubo, J. Hashimoto, H. Kawasaki, M. Ohnishi, H. Sakai, A. & Ueta, Y. (2014年8月17-20日) Fluorescent visualization of the hypothalamic oxytocin neurons activated by nociceptive stress and gastrointestinal hormones in rats expressing oxytocin-monomeric red fluorescent protein 1 fusion transgene. 8th International Congress of Neuroendocrinology 2014, Sydney, Australia.

松浦 孝紀、吉村 充弘、丸山 崇、橋本 弘史、川崎 展、大西 英生、酒井昭典、上田 陽二 (2014年8月8-10日)ラットアジュバント関節炎におけるオキシトシンの発現動態ならびにその役割について:第24回日本病態生理学会大会、北九州国際会議場(福岡県北九州市)

松浦 孝紀、吉村 充弘、大久保 淳一、元嶋 尉士、丸山 崇、橋本 弘史、石倉 透、鈴木 仁士、川崎 展、大西 英生、酒井 昭典、上田 陽二 (2014年7月10-12日)慢性関節炎モデルラットにおけるオキシトシンの発現動態ならびにその役割について:第32回内分泌代謝学サマーセミナー、富士レークホテル(山梨県南都留郡)

松浦 孝紀、吉村 充弘、大久保 淳一、丸山 崇、橋本 弘史、石倉 透、川崎 展、大西 英生、上田 陽一 (2014年4月24-26日)関節炎における視床下部・脊髄でのオキシトシンの役割についての検討:第87回日本内分泌学会学術総会、

福岡国際会議場(福岡県福岡市)

松浦 孝紀、吉村 充弘、大久保 淳一、丸山 崇、橋本 弘史、石倉 透、川崎 展、大西 英生、上田 陽一 (2014年3月16-18日)ラットアジュバント関節炎での視床下部および脊髄後角におけるオキシトシン発現動態の可視化:第91回日本生理学会大会、鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)

松浦 孝紀、川崎 展、大西 英生、上田 陽二 (2013年11月22-23日)アジュバント関節炎における視床下部と脊髄後角でのオキシトシン発現動態の可視化:第17回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)

Matsuura, T. Ishikura, T. Yoshimura, M. Ohkubo, J. Maruyama, T. Kawasaki, M. Ohnishi, H. Hashimoto, H. & Ueta, Y. (2013年11月9-13日) The expression of the oxytocin-monomeric red fluorescent protein 1 fusion gene in the hypothalamus and spinal cord of adjuvant-induced arthritic rats. Neuroscience 2013, San Diego, USA

Ueta, Y. Ishikura, T. Matsuura, T. Yoshimura, M. Ohkubo, J. Maruyama, T. & Ohnishi, H. (2013年6月25-30日) Nocifensive behavior and neuroendocrine response after nociceptive stimulation in TRPV1 and TRPV4 knockout mice. International Behavioral Neuroscience Society, Malahide, County Dublin, Ireland

石倉 透、鈴木 仁士、松浦 孝紀、大久保 淳一、吉村 充弘、丸山 崇、大西 英生、中村 利孝、上田 陽一 (2013年3月27日-29日)急性疼痛ストレスに対する内分泌反応および行動変化へのTRPV1およびTRPV4の役割~ノックアウトマウスを用いた検討~:第90回日本生理学会大会、タワーホール船堀(東京都江戸川区)

Ishikura, T. Suzuki, H. Matsuura, T. Yoshimura, M. Ohkubo, J. Maruyama, T. Ohnishi, H. & Ueta, Y. (2012年11月15-17日) Neuroendocrine response and nocifensive behavior after nociceptive stimulation in TRPV1 and TRPV4 knockout mice. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer, Kanazawa

石倉 透、鈴木 仁士、松浦 孝紀、大久

保 淳一、吉村 充弘、大野 素子、丸山 崇、
上田 陽一、大西 英生、中村 利孝 (2012 年
10 月 20 日) 急性疼痛ストレスに対する TRPV1
および TRPV4 の役割 ~ ノックアウトマウスを用
いた検討 ~ : 第 30 回産業医科大学学会、産業医
科大学 (福岡県北九州市)

石倉 透、鈴木 仁士、松浦 孝紀、大久保 淳
一、吉村 充弘、大野 素子、丸山 崇、大西 英
生、上田 陽一 (2012 年 8 月 4-5 日) 急性疼痛ス
トレスに対する TRPV1 および V4 の役割 - ノック
アウトマウスを用いた検討 - : 第 22 回日本病態生
理学会、湯布院厚生年金病院 (大分県由布市)

Ueta, Y., Ishikura, T., Matsuura, T., Yoshimura, M.,
Ohkubo, J. & Ohnishi, H. (2012 年 6 月 5 - 10 日)
Effects of nociceptive stimulation on fos expression and
behavior in mice. 21st International behavioral
neuroscience society annual meeting, Hawaii, USA.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

大西 英生 (OHNISHI Hideo)
産業医科大学・医学部・非常勤医師
研究者番号 : 20279342

(2) 研究分担者

上田 陽一 (UETA Yoichi)
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 10232745

(3) 連携研究者

中村 利孝 (NAKAMURA Toshitaka)
国立国際医療研究センター病院・院長
研究者番号 : 50082235
森 俊陽 (MORI Toshiharu)
産業医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 80525444