

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861602

研究課題名(和文) 蛍光遺伝子を用いた頭頸部癌性疼痛緩和へのオキシトシン系関与の新規解明

研究課題名(英文) New elucidation of the oxytocin system involvement in head and neck cancer pain relief using a fluorescent gene

研究代表者

加藤 明子 (KATO, AKIKO)

九州大学・大学病院・その他

研究者番号：90412650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：オキシトシン-mRFP1トランスジェニックラットの口腔内粘膜に酢酸含有濾紙を接触させて作成した口内炎モデルラットを用いて、視床下部視索上核および室傍核に局在するオキシトシンニューロンの活性化を、mRFP1赤色蛍光強度を指標にオキシトシン遺伝子の発現変化として観察した。口内炎モデルラット群では、室傍核大細胞領域および小細胞領域に局在するオキシトシンニューロンのmRFP1赤色蛍光強度がコントロール群と比較して有意に増加しており、口腔内の疼痛刺激によってオキシトシンニューロンが活性化したことが示された。今後、頭頸部の炎症・癌性疼痛制御に視床下部オキシトシン系が関与しているかどうかについて検討したい。

研究成果の概要(英文)：Stomatitis model was created by contacting the acetic acid-containing filter paper in the oral mucosa of oxytocin-mRFP1 transgenic rats, and the activation of oxytocin neurons localized in the hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei (PVN) was quantified by mRFP1 red fluorescent intensity as changes of the expression of the oxytocin gene. In stomatitis model group, mRFP1 red fluorescent intensity in the parvocellular and magnocellular divisions of the PVN has been increased significantly in comparison with control group. This result suggests that stomatitis-induced nociceptive stimulation may cause activation of oxytocin neurons in the PVN. Further study should examine whether hypothalamic oxytocinergic pathways may be involved in regulation of pain in head and neck during inflammation and cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：遺伝子改変動物 オキシトシン 蛍光タンパク遺伝子 口内炎

## 1. 研究開始当初の背景

オキシトシンは、バゾプレッシンと同様に視床下部室傍核および視索上核に局限する大細胞性神経分泌ニューロンで産生され、下垂体後葉に投射した軸索終末から血中に分泌される。血中オキシトシンは、分娩時の子宮筋収縮や乳児の吸乳刺激による射乳反射を引き起こすホルモンであることはよく知られている。近年、オキシトシンは脳内にも作用（脳内にオキシトシン受容体が豊富に存在）し、愛情行動や信頼感等の社会性を高める作用が報告されている。

我々はオキシトシン遺伝子発現を単量体赤色蛍光タンパク 1 (monomeric Red Fluorescent Protein 1 : mRFP1) 遺伝子で標識することによりオキシトシンニューロンの活性化を生細胞で可視化することを可能にしたオキシトシン-mRFP1 トランスジェニックラットの開発に成功した。本トランスジェニックラットを用いることにより、蛍光顕微鏡下で mRFP1 蛍光を指標にオキシトシン発現を容易に同定することができる。オキシトシンの末梢もしくは中枢内投与により鎮痛作用が生じることが数多く報告されている。オキシトシン遺伝子をノックアウトしたマウスでは、野生型マウスと比べて拘束ストレスに対する視床下部室傍核小細胞性神経分泌ニューロンの CRH mRNA の増加が有意に増大していることなどから、オキシトシンのストレス緩和作用が示唆されている。また、実臨床でも癌の疼痛緩和ケアにオキシトシン分泌促進療法（タクテイルセラピー）が利用されている。そこで、このオキシトシン-mRFP1 トランスジェニックラットを用いてオキシトシン系が頭頸部炎症・癌性疼痛制御に関与している可能性を明らかにすることができるのではないかとこの着想に至った。

## 2. 研究の目的

オキシトシン-mRFP1 トランスジェニックラットを用いて口内炎モデルを作成し、視床

下部視索上核 (supraoptic nucleus : SON) および室傍核 (paraventricular nucleus : PVN) に局在するオキシトシンニューロンの活性化を、mRFP1 赤色蛍光を指標にオキシトシン遺伝子の発現変化として観察した。

## 3. 研究の方法

動物は成熟雄性オキシトシン-mRFP1 トランスジェニックラットを用いた。これらのラットに吸入麻酔下にて、50%酢酸 10 $\mu$ l を浸した 9 (3 $\times$ 3) mm<sup>2</sup>濾紙を門歯前の口腔粘膜に 60 秒間接触させることで口内炎モデルラットを作成し、水 10 $\mu$ l を浸した 9 (3 $\times$ 3) mm<sup>2</sup>濾紙を門歯前の口腔粘膜に 60 秒間接触させてコントロールラット (図 1) とした。5 日後に深麻酔下で灌流固定し、脳および下垂体を取り出し、後固定の後に切片を作成し、下垂体後葉、視床下部 SON および PVN の mRFP1 蛍光を蛍光顕微鏡により観察し、mRFP1 蛍光強度を定量的に評価した。なお、PVN では小細胞領域 (前側および背側) と大細胞領域に分けて mRFP1 赤色蛍光強度を測定した。

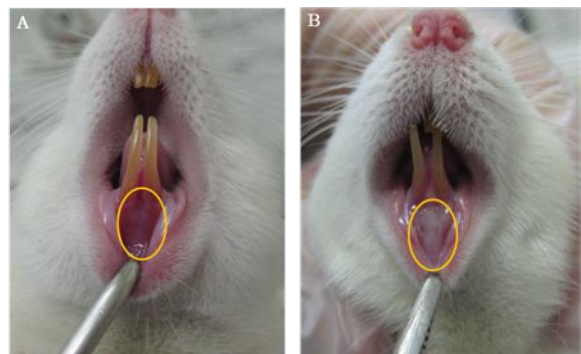


図 1 . コントロールラット (A) と口内炎モデルラット (B) の門歯前の口腔粘膜

## 4. 研究成果

(1) オキシトシン-mRFP1 トランスジェニックラットを用いたことにより、口内炎モデルでの視床下部オキシトシンニューロンの活性化を mRFP1 赤色蛍光を指標とすることで視覚的に捉えることができた (図 2)。

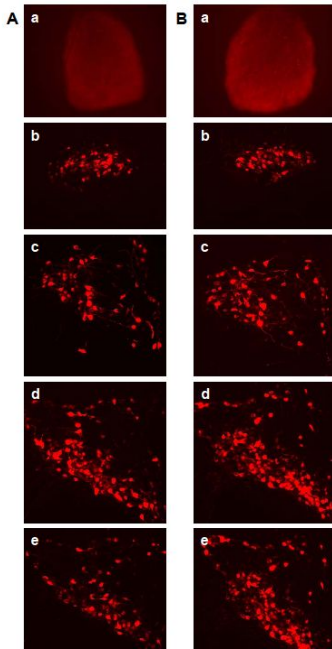


図2 .A a-e コントロール群 B a-e 口内炎モデル群での mRFP1 蛍光

a.下垂体後葉 b.視索上核 c.室傍核小細胞領域前側 d. 室傍核小細胞領域背側 e. 室傍核大細胞領域

(2) 口内炎モデル群では、コントロール群と比べて mRFP1 赤色蛍光強度が PVN の小細胞領域 (前側および背側) と大細胞領域のいずれの領域においても有意に増加した (図3)。

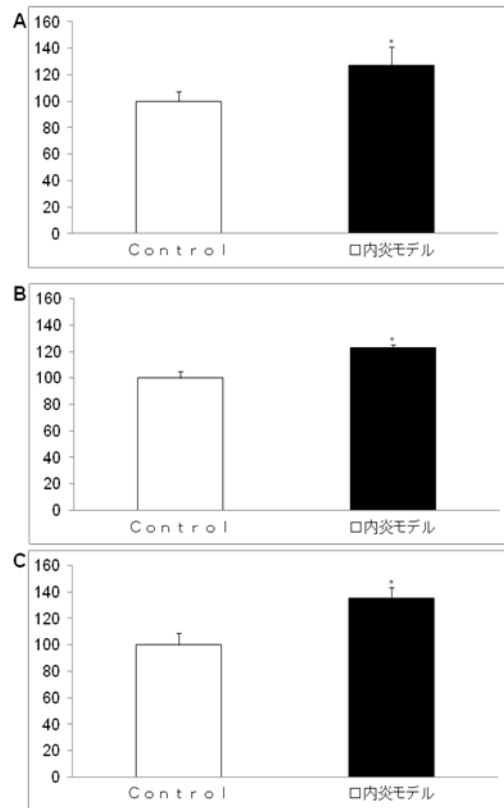


図3 . mRFP1 赤色蛍光の発現変化の定量化  
A 室傍核小細胞領域前側 B 室傍核小細胞領域背側 C 室傍核大細胞領域

本研究において、オキシトシン-mRFP1 トランスジェニックラットを用いることでオキシトシン遺伝子の発現を mRFP1 赤色蛍光の変化として定量的に検出することができた。口内炎モデルラットでは、PVN の下垂体後葉系に軸索を投射する大細胞領域のオキシトシンニューロンのみならず脳内、特に延髄や脊髄にその軸索を投射している小細胞領域のオキシトシンニューロンをも活性化していることが判明した。口腔内からの神経性疼痛経路としては三叉神経系が考えられ、視床下部オキシトシンニューロンからの軸索が三叉神経核へ投射している可能性がある。今回はこの部位については観察していないので今後の検討課題である。さらに、口腔内の炎症・癌性疼痛制御に視床下部オキシトシン系が関与をしている可能性について今後検討する必要がある。

(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 3件)

1 . Kato, A. Shoguchi, K. Matsuoka, H. Yoshimura, M. Ohkubo, JI. Matsuura, T. Maruyama, T. Ishikura, T. Aritomi, T. Fujihara, H. Hashimoto, H. Suzuki, H. Murphy, D. & Ueta, Y. (2014) Fluorescent visualisation of the hypothalamic oxytocin neurones activated by cholecystokinin-8 in rats expressing c-fos-enhanced green fluorescent protein and oxytocin-monomeric red fluorescent protein 1 fusion transgenes. Journal of Neuroendocrinology 26(5):341-347 (査読有)

DOI: 10. 1111/jne. 12150

2 .Yoshimura, M. Ohkubo, J. Kato, A. Ohno, M. Ishikura, T. Kakuma, T. Yoshimatsu, H. Murphy, D. & Ueta, Y.(2013) A c-fos-monomeric red fluorescent protein 1 fusion trasngene is differentially expressed in rat forebrain and brainstem after chronic dehydration and rehydration. Journal of Neuroendocrinology 25(5):478-487. (査読有)

DOI: 10. 1111/jne.12022

3 . 加藤 明子、上田 陽一、鈴木 秀明 (2013)遺伝子改変技術を用いたオキシトシンニューロンの蛍光タンパクによる可視化の試み . J UOEH (産業医科大学雑誌) 35:165-171. (査読有)

DOI:なし

〔学会発表〕(計 6件)

1 .Hashimoto, H. Matsuura, T. Yoshimura, Ohkubo, Kato, A. Maruyama, T. & Ueta, Y. (2014 年 7 月 15-18 日 )The oxytocin-monomeric red fluorescent protein 1 fusion gene expression after central administration of colchicine in transgenic rat. :第 37 回内藤カンファレンス、

北海道

2 . 加藤 明子、松浦 孝紀、吉村 充弘、丸山 崇、橋本 弘史、上田 陽一 (2014 年 6 月 20-21 日 )口内炎モデルにおける視床下部オキシトシン発現の変動～オキシトシン-mRFP ラットを用いた検討～ :第 36 回日本疼痛学会、大阪

3 .加藤 明子、松浦 孝紀、大久保 淳一、吉村 充弘、丸山 崇、橋本 弘史、上田陽一 (2014 年 4 月 24-26 日 )ラット大細胞性神経分泌ニューロンにおけるオキシトシン分泌顆粒と神経活動の蛍光タンパクによる可視化 :第 87 回日本内分泌学会学術総会、福岡

4 . 橋本 弘史、松浦 孝紀、吉村 充弘、大久保 淳一、加藤 明子、丸山 崇、上田陽一 (2014 年 3 月 16-18 日 )トランスジェニックラット脳室内へのコルヒチン投与によるオキシトシン-mRFP1 発現変化 :第 91 回日本生理学会大会、鹿児島

5 . 加藤 明子、松浦 孝紀、大久保淳一、吉村 充弘、丸山 崇、橋本 弘史、上田 陽一 (2013 年 7 月 27 日 )下垂体後葉ホルモン研究における蛍光タンパクの応用 :トランスジェニックラットによる浸透圧負荷の検討 :第 12 回九州脳・高血圧・循環生後検討会、福岡

6 . 佐藤 慧太、越智 拓海、モリス ジョン F、加藤 明子、上田 陽一、坂本 竜哉、坂本 浩隆(2013 年 5 月 11 日 12 日 )バゾプレシン- eGFP トランスジェニックラットにおける eGFP 分子の動態解析 :中国四国筑生物系三学会合同大会 (徳島大会) 徳島

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :

種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加藤 明子 (KATO AKIKO)

九州大学・医学部・医員

研究者番号：90412650

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：