

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860164

研究課題名(和文) 最初期遺伝子発現を可視化した遺伝子改変動物を用いた難治性疼痛機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of nociceptive pathways using c-fos eGFP transgenic rats

研究代表者

鈴木 仁士 (Suzuki, Hitoshi)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：80644880

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：c-fos 遺伝子に改変緑色蛍光タンパク遺伝子 (enhanced green fluorescent protein; eGFP) を挿入したc-fos-eGFPトランスジェニックラットを使用し、急性疼痛刺激における c-fos-eGFP の発現動態を観察した。発現のピークは、脊髄後角で6時間後、視床下部で3時間後であった。また、視床下部オキントシン (OXT) ニューロンを免疫組織化学的染色法で染色すると、野生型ラットより高感度に活性化した OXT ニューロンを検出することができた。c-fos-eGFPトランスジェニックラットは疼痛の受容・調節機序の解明に有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We evaluated whether a c-fos-enhanced green fluorescent protein (eGFP) transgenic rat line can be useful for the study of nociceptive pathways and processing. A comparison of eGFP in transgenic rats and Fos-like immunoreactivity (LI) in wild type rats was made in the dorsal spinal cord, paraventricular nucleus (PVN) and supraoptic nucleus (SON). Oxytocin-LI (OXT-LI) was carried out to examine the activation of OXT neurons in the PVN and SON. Following acute nociceptive stimuli, eGFP was maximally expressed at 6 h in the spinal cord and 3 h in the PVN and SON, whereas, Fos-LI was maximally expressed at 1.5 h in all the regions we analyzed. Induction of eGFP in the OXT neurons was more sensitive than that of Fos after acute nociceptive stimuli. These results suggested that the c-fos-eGFP transgenic rat line can be useful for the study of nociceptive pathways and processing.

研究分野：慢性疼痛

キーワード：慢性疼痛 最初期遺伝子 視床下部 遺伝子改変動物

1. 研究開始当初の背景

近年痛み治療に対する関心が高まり、慢性疼痛に対する対策が強く求められている。日本における慢性疼痛保有者の実態調査、Pain in Japan 2010 によると慢性疼痛の有病率は全成人の 22.5 %、推定患者数は 2,315 万人におよぶものの、必ずしも患者の治療に対する満足度は高くないのが現状である。骨折や火傷などの外傷において、急性の炎症細胞の浸潤や局所の腫脹とともに疼痛が誘発され、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慢性炎症性疾患であり、ケミカルメディエーターの産生による炎症性滑膜炎が関節痛を引き起こす。当教室ではこれまでにコラーゲン誘発性関節炎マウスやアジュバント関節炎ラット、ホルマリン疼痛誘発ラットを用いて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 (Suzuki *et al.*, J Neuroendocrinol 2009; Suzuki *et al.*, J Neurosci 2009)。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第 II 層が賦活化され、かつ急性・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、また HPA 系の賦活化には視床下部の関与が大きいことを見出した。したがって今後、様々な疼痛モデル動物を使用して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抑制機構の確立に重要であるとの認識に至った。

2. 研究の目的

我々は、ニューロンの活動性の指標として汎用される *c-fos* 遺伝子発現を緑色蛍光タンパク (enhanced green fluorescent protein: eGFP) で標識することにより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 *c-fos*-eGFP トランスジェニックラットを作出した。本研究課題の目的は、*c-fos*-eGFP トランスジェニックラットを用いて急性疼痛刺激後の脊髄後角および視床下部に局在するニューロンの活動性を eGFP を指標に可視化・定量評価し、その発現動態を野生型ラットにおける Fos タンパクの発現動態と比較することによって、*c-fos*-eGFP トランスジェニックラットが疼痛受容機序の解明に有用なツールとなりうることを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) *c-fos*-eGFP トランスジェニックラットに、急性疼痛刺激として 15 % カプサイシン溶液もしくは 5 % ホルマリンを両側後肢足底部に各 100 μ L 皮下注射した。コントロール群として、無処置群、15% エタノール皮下注射群および生理食塩水皮下注射群を設

けた。処置後 1.5、3、6 および 24 時間で灌流固定して脳および脊髄を採取し、ミクロトームを用いて足底部からの疼痛刺激を受容する第 5 腰髄 (L5) レベルの脊髄後角 I-III 層、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) および同じく下垂体後葉ホルモンを産生する視床下部視索上核 (SON) を含む厚さ 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。各領域において eGFP 陽性細胞数を計測し、結果をコントロール群と比較した。

(2) 野生型ラットに、急性疼痛刺激として 15 % カプサイシン溶液もしくは 5 % ホルマリンを両側後肢足底部に各 100 μ L 皮下注射した。コントロール群として、無処置群、15% エタノール皮下注射群および生理食塩水皮下注射群を設けた。処置後 1.5、3 および 6 時間で灌流固定して脳および脊髄を採取し、ミクロトームを用いて L5 レベルの脊髄後角 I-III 層、pPVN、mPVN および SON を含む厚さ 30 μ m の切片を作成し、免疫組織化学的染色法 (LI) を用いて各領域における Fos タンパク陽性細胞数を計測し、結果をコントロール群と比較した。

(3) *c-fos*-eGFP トランスジェニックラットに、急性疼痛刺激として 15 % カプサイシン溶液もしくは 5 % ホルマリンを両側後肢足底部に各 100 μ L 皮下注射した。コントロール群として、無処置群、15% エタノール皮下注射群および生理食塩水皮下注射群を設けた。処置後 3 時間で灌流固定して脳を採取し、ミクロトームを用いて pPVN、mPVN および SON を含む厚さ 30 μ m の切片を作成した。また、処置後 1.5 時間後の野生型ラットからも同様の切片を作成した。オキシトシンを免疫組織化学的染色で可視化し、OXT-LI 陽性細胞に占める eGFP 陽性細胞もしくは Fos-LI 陽性細胞の割合を計測することで、pPVN、mPVN および SON における OXT ニューロンの活性化を定量評価しコントロール群と比較した。

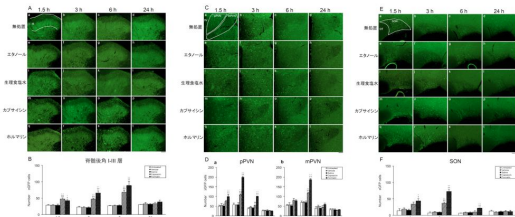
(4) *c-fos*-eGFP トランスジェニックラットに、急性疼痛刺激として 5% ホルマリン 100 μ L を片側後肢足底部に皮下注射し、3 時間後にラットを断頭して脊髄を採取した。L5 レベルの脊髄後角、PVN および SON を含む厚さ 200 μ m のスライス切片を作成し、生細胞の状態での eGFP 陽性細胞を観察し、無処置群と比較した。

4. 研究成果

(1) *c-fos*-eGFP トランスジェニックラットにおいて、カプサイシン群およびホルマリン群の L5 脊髄後角 I-III 層 (図 1A)、PVN (図 1C) および SON (図 1E) における eGFP 発現を観察した。カプサイシン群およびホルマリン群の L5 脊髄後角 I-III 層、PVN およ

び SON における eGFP 陽性細胞数はコントロール群と比較して有意に増加した。eGFP 陽性細胞数のピークは、L5 脊髄後角 I-III 層では処置後 6 時間 (図 1B)、PVN および SON では処置後 3 時間 (図 1D および F) であった。

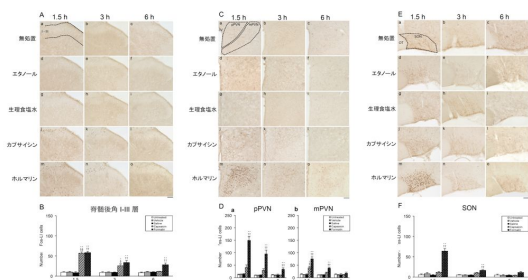
図 1.



(図 1.) *c-fos-eGFP* トランスジェニックラットの処置後 1.5、3、6 および 24 時間の L5 脊髄後角 I-III 層 (A)、PVN (C) および SON (E) における eGFP 発現。L5 脊髄後角 I-III 層 (B)、PVN (D) および SON (F) における eGFP 陽性細胞数。Scale bars = 100 μm . Data are presented as the mean \pm SEM (各群 $n = 4-6$). * $P < 0.05$ vs 無処置群. ** $P < 0.01$ vs 無処置群. $\S P < 0.05$ vs エタノール群. $\S\S P < 0.01$ vs エタノール群. † $P < 0.05$ vs 生理食塩水群. †† $P < 0.01$ vs 生理食塩水群.

(2) 野生型ラットにおいて、カプサイシン群およびホルマリン群の L5 脊髄後角 I-III 層 (図 2A)、PVN (図 2C) および SON (図 2E) における、Fos タンパク発現を観察した。カプサイシン群およびホルマリン群の L5 脊髄後角 I-III 層、PVN および SON における Fos-LI 陽性細胞数はコントロール群と比較して有意に増加した。Fos-LI 陽性細胞数のピークは、L5 脊髄後角 I-III 層、PVN および SON で処置後 1.5 時間 (図 2B、D および F) であった。

図 2.

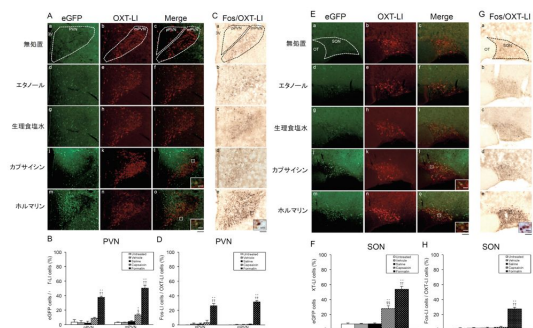


(図 2.) 野生型ラットの処置後 1.5、3 および 6 時間の L5 脊髄後角 I-III 層 (A)、PVN (C) および SON (E) における Fos-LI 発現。L5 脊髄後角 I-III 層 (B)、PVN (D) および SON (F) における Fos-LI 陽性細胞数。Scale bars = 100 μm . Data are presented as the mean \pm SEM (各群 $n = 4-6$). * $P < 0.05$ vs 無処置群. ** $P < 0.01$ vs 無処置群. $\S P < 0.05$ vs エタノール群. $\S\S P < 0.01$ vs エタノール群. † $P < 0.05$ vs 生理食塩水群. †† $P < 0.01$ vs 生理食塩水群.

0.05 vs 生理食塩水群. †† $P < 0.01$ vs 生理食塩水群.

(3) *c-fos-eGFP* トランスジェニックラットおよび野生型ラットのカプサイシン群およびホルマリン群の PVN (図 3A および C) および SON (図 3E および G) において、OXT-LI 陽性細胞、eGFP 陽性細胞および Fos-LI 陽性細胞を観察した。ホルマリン群の PVN および SON において、*c-fos-eGFP* トランスジェニックラットおよび野生型ラットで OXT ニューロンの有意な活性化を検出できたが、カプサイシン群の PVN および SON においては、*c-fos-eGFP* トランスジェニックラットでのみ OXT ニューロンの有意な活性化を検出できた。以上より、*c-fos-eGFP* トランスジェニックラットでは野生型ラットより高感度に活性化したニューロンを検出できることが示唆された。

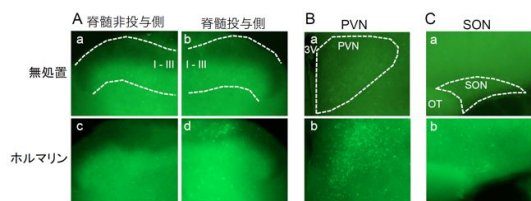
図 3.



(図 3.) *c-fos-eGFP* トランスジェニックラット処置後 3 時間および野生型ラット処置後 1.5 時間の PVN (A および C) および SON (E および G) における eGFP、Fos-LI および OXT-LI の観察。PVN (B および D) および SON (F および H) における OXT ニューロンの活動性。Scale bars = 100 μm . Data are presented as the mean \pm SEM (各群 $n = 4-6$). * $P < 0.05$ vs 無処置群. ** $P < 0.01$ vs 無処置群. $\S P < 0.05$ vs エタノール群. $\S\S P < 0.01$ vs エタノール群. † $P < 0.05$ vs 生理食塩水群. †† $P < 0.01$ vs 生理食塩水群.

(4) *c-fos-eGFP* トランスジェニックラットおよび野生型ラットの処置後 3 時間の PVN (A) および SON (E) における eGFP、Fos-LI および OXT-LI の観察。PVN (B および D) および SON (F および H) における OXT ニューロンの活動性。Scale bars = 100 μm . Data are presented as the mean \pm SEM (各群 $n = 4-6$). * $P < 0.05$ vs 無処置群. ** $P < 0.01$ vs 無処置群. $\S P < 0.05$ vs エタノール群. $\S\S P < 0.01$ vs エタノール群. † $P < 0.05$ vs 生理食塩水群. †† $P < 0.01$ vs 生理食塩水群.

図 4 .



(図 4.) *c-fos-eGFP* トランスジェニックラットの L5 脊髄後角 (A)、PVN (B) および SON (C) におけるホルマリリン注射後の *eGFP* 陽性細胞の生細胞での観察。Scale bars = 100 μ m.

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 3 件)

Okuno, T. Suzuki, H. Inoue, A. & Kusakawa, J. Restricted Mandibular Movement Attributed to Ossification of Mandibular Depressors and Medial Pterygoid Muscles in Patients with Fibrodysplasia Ossificans Progressiva: A Report of Three Cases. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 査読有, in press, DOI: 10.1016/j.joms.2017.03.005

Motojima, Y. Kawasaki, M. Matsuura, T. Saito, R. Yoshimura, M. Hashimoto, H. Ueno, H. Maruyama, T. Suzuki, H. Ohnishi, H. Sakai, A. & Ueta, Y.: Effects of peripherally administered cholecystokinin-8 and secretin on feeding/drinking and oxytocin-mRFP1 fluorescence in transgenic rats. *Neuroscience Research*, 査読有, 109:63-69, 2016, DOI: 10.1016/j.neures.2016.02.005

Ishikura, T. Suzuki, H. Shoguchi, K. Koreeda, Y. Aritomi, T. Matsuura, T. Yoshimura, M. Ohkubo, JI. Maruyama, T. Kawasaki, M. Ohnishi, H. Sakai, A. Mizuki, M. & Ueta, Y. Possible involvement of TRPV1 and TRPV4 in nociceptive stimulation-induced nocifensive behavior and neuroendocrine response in mice. *Brain Research Bulletin*, 査読有, 118:7-16, 2015, DOI: 10.1016/j.brainresbull.2015.08.004

[学会発表](計 9 件)

Motojima, Y. Kawasaki, M. Suzuki, H. Ohnishi, H. Matsuura, T. Yoshimura, M. Hashimoto, H. Saito, R. Ueno, H. Maruyama, T. Sonoda, S. Mori, T. Sabanai, K. Sakai, A. Ueta, Y. Regional and time-course differences in the induction of *c-fos-eGFP* fluorescence in the spinal cord and hypothalamus of transgenic rats after nociceptive and inflammatory stimuli. American Academy of Orthopaedic Surgeons 2017 Annual Meeting, 2017 年 3 月 14-18 日,

San Diego, USA

元嶋尉士、松浦孝紀、鈴木仁士、齋藤玲子、吉村充弘、橋本弘史、上野啓通、丸山崇、川崎展、大西英生、酒井昭典、上田陽一 侵害刺激による脊髄および視床下部における Fos タンパクの発現動態の *c-fos-eGFP* トランスジェニックラットを用いた検討、第 93 回日本生理学会大会 2016 年 3 月 22-24 日、札幌コンベンションセンター、北海道札幌市

元嶋尉士、松浦孝紀、鈴木仁士、川崎展、大西英生、森俊陽、佐羽内研、塚本学、上田陽一 炎症・疼痛ストレスに対する脊髄および視床下部における Fos タンパクの発現動態の *c-fos-eGFP* トランスジェニックラットを用いた検討、第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2016 年 4 月 21-23 日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市

松浦孝紀、川崎展、元嶋尉士、鈴木仁士、大西英生、上田陽一 急性炎症・疼痛モデルラットでの視床下部および脊髄におけるオキシトシン - 単量体赤色蛍光タンパク 1 融合遺伝子の発現動態ならびにその役割について、第 59 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2015 年 4 月 23-25 日、名古屋国際会議場、愛知県名古屋市

元嶋尉士、松浦孝紀、齋藤玲子、上野啓通、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 TRPV1 および TRPV4 ノックアウトマウスにおける浸透圧・非浸透圧刺激後の飲水行動の検討、第 25 回日本病態生理学会、2015 年 7 月 31 日-8 月 2 日、愛媛大学城北キャンパス、愛媛県松山市

Matsuura, T. Kawasaki, M. Motojima, Y. Suzuki, H. Yoshimura, M. Ohkubo, J. Maruyama, T. Hashimoto, H. Ohnishi, H. Sakai, A. Ueta, Y. 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*, 2014 年 11 月 15-19 日, 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、上田陽一 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、2014 年 7 月 10-12 日、富士レークホテル、山梨県南都留郡富士河口湖町

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 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、2014 年 10 月 23-24 日、琉球大学 研究者交流施設 50 周年記念館、沖縄県中頭郡西原町

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、上田陽一 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、2014 年 10 月 31-11 月 2 日、都道府県会館、東京都千代田区

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 仁士 (SUZUKI,Hitoshi)
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号：80644880