

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790583

研究課題名(和文) 痛み反応の性差と情動に關与する分界条床核外側部ニューロンの電気生理学的解析

研究課題名(英文) Electrophysiological analysis for pain response by the lateral bed nucleus stria terminalis

研究代表者

萩原 裕子 (Hagiwara, Hiroko)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：90468207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：我々は分界条床核外側部が痛みの反応性に影響を及ぼす事を発見した。逆に分界条床核外側部は痛み反応に影響される。そこで分界条床核外側部と痛み反応の関係を詳しく調べるために、分界条床核外側部やストレス反応の必須領域の室傍核、そして、情動反応の発現に重要な扁桃体中心核に特異的に発現している corticotropin-releasing hormone (CRH) ニューロンに焦点をあて、電気生理学的に解析する事にした。方法はスライスパッチクランプ法を用いるので、CRHニューロンを生きのまま標識するために蛍光を発する遺伝子改変動物を作成している。

研究成果の概要(英文)：We discovered that the lateral bed nucleus stria terminalis (BST) is involved in the pain response during formalin test. Conversely, the function of the lateral BST influences the pain response by the formalin. This concept indicates the emotion and pain is related to each other. CRH neurons are expressed the brain area such as the periventricular hypothalamus associated with stress and the central amygdala related to outflow of the emotional response. Thus, CRH neurons in the lateral BST may be involved in emotion side during the formalin test. To this end we must label CRH neurons as fluorescence since we will analyze by patch-clamp technique. So we are now generating transgenic mouse which CRH neurons have bright fluorescence and useful for electrical analyse.

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：ホルマリンテスト マウス 分界条床核外側部 CRH GFP パッチクランプ スライス 性差

1. 研究開始当初の背景

(1) 痛みは末梢神経から視床を介して体性感覚野に伝えられる。しかし、「組織の実質的な、または、潜在的傷害と関連した、またはそのような傷害の言葉によって表される不快な感覚、情緒的経験」と国際疼痛学会 (The International Association for the Study of Pain, 1994) で痛みが定義されているように、痛みという感覚は極めて多用な側面を持っている。例えば、情緒的経験は情動と考える事が可能で、情動を調節できれば痛みをコントロールすることが可能であると考えている。実際、情動をコントロールすることによって痛みの閾値が変化する可能性が指摘されており (Jasmin et al, 2003)、従って、痛みと情動は密接な相互関係をもっている可能性が高い (Tracey and Mantyh, 2007)。形態学的にも相互の結びつきの強さも示唆されている (Braz et al, 2005)。

(2) 一方、痛みや情動反応には性差があり (Mogil and Chanda, 2005)、痛みの関係する疾患に女性の方が罹りやすいとも言われている (Dina et al, 2001)。そこで申請者は、痛みは情動を形成し、また、情動が痛みを調節するメカニズムを、性差から迫ろうと考えた。そして責任部位の同定から試みた。ホルマリンテストに性差が認められ、雌性の方が痛く、すなわち、痛覚過敏となる (Aloisi et al, 1994; Gaumond et al, 2002)。指標としたのは cAMP response element-binding protein (CREB) のリン酸化反応である。そして分界条床核外側部に、雌性特異的な CREB のリン酸化が起こり、ホルマリンテストの性差と時間的に一致する事を発見した。エストロゲンに依存していることを明らかに、この領域のリン酸化 CREB の働きをアデノウイルスを用いて dominant negative 体で抑制すると、痛み反応も抑制された。分界条床核外側野はその他にも性自認 (Zhou et al, 1995) やゴナドトロピンなど生殖内分泌系、そして不安をも調節している (Alon et al, 2009)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、分界条床核外側部の痛み反応の性差における役割を知ることにある。

(1) 本研究ではマウスを用いるので、マウスのホルマリンテストの系の確立と性差、エストロジェンの作用を検証する。

(2) 電気生理学的に分界条床核外側部の CRH ニューロンの活動を解析し、痛み反応の性差の分子基盤を明らかにするために、GFP-CRH トランスジェニックマウスを作成する。そして急性スライスを用いて電気生理学的な解析を行えるために生きている状態で同定できるようにする。

(3) そのマウスを用いて蛍光顕微鏡下で CRH ニューロンを同定しつつ、パッチクランプ法によりシナプス入力の変化と痛み反応の性差の関係を明らかにする。

3. 研究の方法

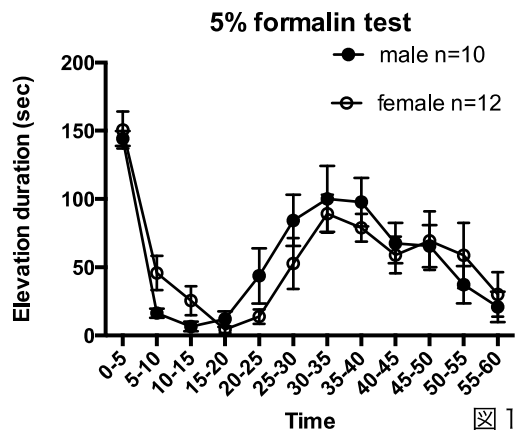
(1) 雌雄のマウスを用いて、足底の皮下に典型的に 5%ホルマリン溶液を 1匹あたり 20 ul をインスリンシリンジにより投与した。足をあげている時間を 1 時間にわたり観察した (ホルマリンテスト)。雌性マウスは膣スミアを採取して発情前期に実験に供与した。次に雌性マウスの性腺を摘除して 2 週間してから、以下の処置をした。エストロジェンを 200 μg、もしくはコレステロールを処置した対照群を用いてホルマリンテストを解析した。次の実験は、5%ホルマリン溶液を 0.83 ul/g の割合で投与しホルマリンテストを行った。

(2) CRH の約 3 kbp のプロモーターの下流に GFP を導入したトランスジェニックマウスを用いた (Freedman 先生提供)。分界条床核外側部の GFP 陽性細胞が、CRH ニューロンであることを免疫組織化学および in situ hybridization 法により観察した。

(3) CRH ニューロンの電気生理学的な解析を、急性スライスを用いて、ボルテージクランプモードによるパッチクランプ法を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) マウスにおいては、ラットに認められたような第一相、痛みのおさまる中間相、そして再び痛がる第二相が観察された。しかし、ラットに見られたような中間相における性差、すなわち、雄性動物の方が雌性動物に比



較して痛みがおさまる、という性差は、ホルマリンテストにより確認できなかった (図 1)。すなわち、雌性も雄性と同じような中間相の痛みの抑制反応が 5-20 分間に認められた。そこで、性差が本当はないのか、エストロジェンの作用をホルマリンテストにおいて観察する事にした。

次に、卵巣摘除マウスにエストロジェンを投与して、ホルマリンテストにおける効果を観察した。エストロジェンの作用は、性行動を惹起し、子宮を拡張したことから、投与量は十分であったことが明らかである (Data

not shown) ,そしてホルマリンテストにおい

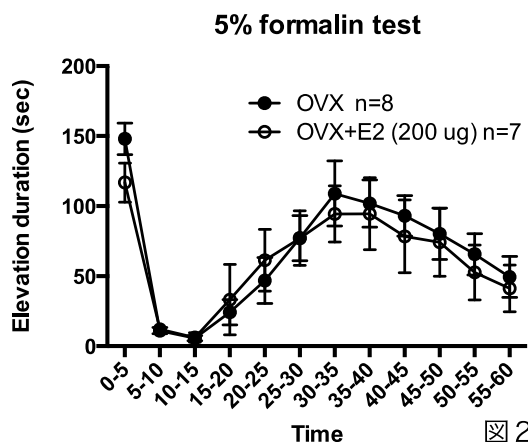


図 2

て、対照群と比較してエストロジェンの作用は認められなかった(図2)。

5% formalin test as function of body weight

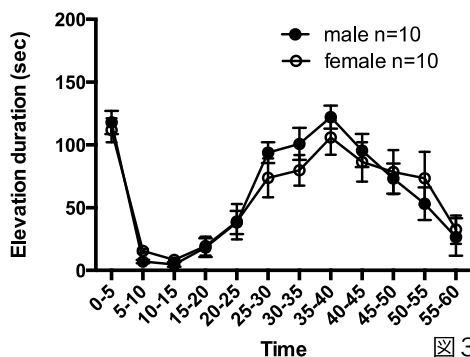


図 3

マウスはラットと比較して小型の動物なので、体重あたりの投与量にホルマリンテストに変更したが、有意な効果は認められなかった(図3)。

(2) Freedman の持つ GFP-CRH マウスを導入することにしたが、GFP-CRH マウスの GFP 蛍光が弱く使用に耐えられない事が判明した。そこで B6.FVB-Tg(Crh-cre)1Kres/J (ジャクソン社) と B6.Cg-Tg(CAG-floxed Neo-EGFP)REP080sb (理研) を掛け合わせる事にした。これは CAG プロモーターにクラゲ緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を接続した導入遺伝子を持ち、CAG と GFP のところに LoxP が挿入してあり、また、ネオマイシン耐性遺伝子の下流に poly A を導入してあるので、このままでは GFP を産生しない。しかし、マウス CRH 遺伝子プロモーターに Cre 遺伝子を接続した導入遺伝子を持つマウスとかけあわせることにより Cre recombinase が発現すると LoxP が切り出され、ストップコドンがなくなるので GFP を発現する仕組みである。CAG プロモーターは強力であり強い GFP の蛍光が期待できると考えた。首尾よく繁殖し、掛け合わせたマウスが妊娠、出産を確認したが、成熟してスライスを作成したところ、GFP の蛍光が弱い事が判明した。そこでより強い蛍光が期待できる R26-CAG-LoxP-mTFP1 (理研) を掛け合わせた。ジェノタイプでは、メ

ンデルの法則に従って、Cre と mTFP1 に陽性の仔をえた。生後6週令でスライスを作成し mTFP1 の蛍光を観察でき、分界条床核外側部、室傍核、扁桃体中心核に局限していた。すなわち、蛍光を発した細胞は CRH ニューロンと思われた。現在、in situ hybridization 法で、mTFP1 陽性細胞と CRH ニューロンの一致率を解析中である。

(3) CRH ニューロンを特定しないで分界条床核外側部の細胞から電気生理学的な解析を、急性スライスを用いて、ボルテージクランプモードによるパッチクランプ法を用いて行った。電気刺激に应答する電気活動が記録できたことから、パッチクランプ法自体は確立していると考えられた (Data not shown)。

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)

Fukushima A, Hagiwara H, Yoshioka N, Kimura F, Akema T, Funabashi T. Expression of phosphorylated cyclic AMP response element-binding protein in melanin concentrating hormone neurons and orexin neurons in male and female rats during ad libitum feeding. NeuroReport, 査読有, 2014 in press.

Hagiwara H, Funabashi T, Akema T, Kimura F, Sex-specific differences in pain response by dopamine in the bed nucleus of the stria terminalis in rats. NeuroReport, 査読有, 2013, 181-185

[学会発表](計0件)

[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:
取得年月日:

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.marianna-u.ac.jp/physiology/study/010027.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

萩原 裕子 (Hagiwara, Hiroko)
聖マリアンナ医科大学・医学部・助教
研究者番号： 90468207

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：