

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462391

研究課題名(和文) 遺伝子改変動物を用いた疼痛ストレスにおける脳内生理活性物質の分子基盤の解明

研究課題名(英文) The elucidation of molecular mechanism for the physiologically active substance in the brain induced by pain stress using transgenic animal model

研究代表者

川崎 展 (KAWASAKI, Makoto)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：40644860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：下垂体後葉ホルモンの一つであるオキシトシン(OXT)は疼痛調整に関与していることが示唆されている。本研究の目的は、OXT-単量体赤色蛍光タンパク1(mRFP1)トランスジェニックラットを用いて、急性ならびに慢性炎症・疼痛モデルラットを作製し、視床下部・下垂体後葉・脊髄におけるOXT-mRFP1融合遺伝子の発現動態を可視化・定量化し、OXTの役割を検討した。その結果、急性および慢性疼痛・炎症モデルラット、いずれにおいても下垂体後葉系におけるOXTの産生・分泌の亢進および視床下部室傍核-脊髄経路のOXT系が活性化しており、温痛覚の感受性に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Oxytocin (OXT) as one of neurohypophysial hormones is suggested to play an important role in pain modulation. OXT binding sites, as well as OXT receptor expression are located in the dorsal horn of spinal cord in rats. A population of parvocellular OXTergic neurons of the paraventricular nucleus project to the spinal cord. However, little is known about the neuronal networks responsible for OXT effects. In the present study, using OXT-monomeric red fluorescent protein 1 (mRFP1) transgenic rats, we examined the response to acute (by formalin test) and chronic (by induced adjuvant arthritis) nociception in rat models. The OXT-mRFP1 expression in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN), posterior pituitary and spinal cord were significantly increased in acute and chronic nociceptive models in rats. The results suggest that OXT expression was up-regulated by acute and chronic inflammatory stress, and also that OXT in the PVN-spinal pathway may be involved in pain sensory modulation.

研究分野：整形外科

キーワード：オキシトシンによる疼痛調整作用 急性炎症ストレス 慢性炎症ストレス トランスジェニックラット  
神経内分泌 関節リウマチ

## 1. 研究開始当初の背景

生体にとって急性および慢性疼痛・炎症に対する生理的防御反応は極めて重要であり、近年、疼痛情報の伝達に対する研究が注目されている。欧米諸国において、慢性的な疼痛は社会的に活動・コスト面とも最も不利益をもたらす原因とされてきた。つまり、慢性的な疼痛は生活の質を低下させ、就労を困難にさせるなどの社会的な損失が大きいとされている。疼痛のメカニズムについて研究する事は、単に疼痛を緩和するという目的だけではなく、社会全体に対して利益をもたらす事につながると考えている。日本社会の高齢化が進む中で、高齢者が腰椎・股・膝関節等の変性疾患により疼痛に悩まされることが多くなっている。私(整形外科医として)は、日常診察で、このような疼痛に悩んでいる患者と向き合い、疼痛コントロールを図る事が、患者並びに社会にとって重要であると考えに至った。疼痛をストレスとして捉え、疼痛ストレスを受け、生体は脳を介して血圧・心拍の変化や気分・行動の変容など様々な生体反応が引き起こされる。生体のストレス反応のうち、自律神経系を介した生体反応や内分泌反応は、自律神経系と内分泌系を介して引き起こされていることは良く知られている。疼痛発生機序については、主に皮膚神経終末の痛み・酸・温度センサーである transient receptor potential V1(TRPV1)をはじめとした受容体活性化型Caチャンネル並びに酸感受性イオンチャンネルであるacid-sensing ion channels(ASICs)が後根神経節(DRG)細胞における疼痛受容に関与するとされている。これら末梢での疼痛刺激の情報は、後根に含まれる1次感覚ニューロンの活動電位により脊髄後角部(膠様質)へ伝えられる。この情報は、膠様質で1次感覚ニューロンや脊髄固有ニューロン、脳幹や視床下部などの下行性ニューロンから放出された内因性鎮痛物質、またそこに介在する神経回路の働きなどによ

り修飾を受けている。修飾を受けた疼痛情報は、脊髄を上行し、視床を經由して大脳皮質の一次感覚野に至り、疼痛として認識される。疼痛の伝導経路には、このような感覚面の経路だけではなく、情動面の経路も指摘されており、例えば慢性疼痛に対する情報は視床下部など脳幹に入力され、島や扁桃体など大脳辺縁系にも伝えられ、情動・自律神経・記憶・摂食などのさまざまな神経機能に影響を及ぼしている事が考えられる。

本研究では急性、慢性疼痛および炎症時に視床下部-下垂体-副腎系が活性化される事に着目した。これまで我々は急性および慢性疼痛・炎症モデルのラットを使用し、視床下部-下垂体-副腎系の賦活化には強い相関があることが確認され、特に視床下部バソプレッシン(AVP)系の関与を見出した(Kawasaki et al., 2006; Suzuki et al., 2009)。最近の研究では、脊髄後角にオキシトシン(OXT)の受容体が存在する事が示唆され、疼痛に関与していると考えられている。しかし、視床下部OXT系の疼痛に対する関与については、詳細な機序が見出されていない。一般的にOXTは子宮の収縮、乳汁の分泌や愛のホルモンとして知られており、また社会の形成、信頼関係・摂食にも関与しているとされている。しかし、OXTの詳細な作用機序については、十分には解明されていない。したがって急性および慢性疼痛・炎症モデル動物において、OXTの視床下部-下垂体-副腎系並びに脊髄後角部における発現・経時変化について明らかにすることが、疼痛ストレスに対する視床下部におけるストレス反応を理解するのに重要であると考えたのが本研究の発端である。

近年、蛍光タンパクを特定のニューロンに可視化する技術が頻繁に応用されている。本研究では、視床下部OXTを赤色蛍光タンパク(monomeric Red Fluorescent Protein 1: mRFP1)で標識することにより、ニューロンの活性化を生細胞でも可視化できるトランスジ

エニック(TG)ラットを用いる。研究分担者の上田らはすでにOXT-mRFP1 TGラットの作製に成功している(Katoh et al, 2011)。本TGラットでは、*in vivo*の状態でも視床下部OXTニューロンおよび神経線維をmRFP1の赤色蛍光によって同定することが理論上可能である。これまでの研究で、AVPニューロンにおけるenhanced-Green Fluorescent Protein (eGFP) 遺伝子発現および緑色蛍光が種々のストレス刺激(急性ならびに慢性疼痛)によって敏感に変動することを既に報告している(Ueta et al., 2005; Suzuki et al., 2009)。

本申請研究では、遺伝子改変動物に急性・慢性疼痛モデルを作成し、OXTの中樞神経系の反応(視床下部-下垂体-副腎系の反応)並びに脊髄での疼痛反応を、視覚的に評価・解析することにより、下垂体後葉での神経内分泌反応と機能連関という視点で解明する。

## 2. 研究の目的

下垂体後葉ホルモンであるOXTは子宮の収縮、乳汁の分泌や愛のホルモンとして知られており、近年では社会の形成・信頼関係・摂食にも関与しているとされている。最近の研究では、脊髄後角にOXTの受容体が存在する事が示唆され、疼痛に関与している事が考えられている。しかし、視床下部OXT系の疼痛に対する関与については、詳細な機序が見出されていない。

本研究では、遺伝子改変動物に外傷並びに慢性関節炎に伴う急性・慢性疼痛モデルを作成し、OXTの中樞神経系の反応(視床下部-下垂体-副腎系の反応)並びに脊髄での疼痛反応をmRFP1の赤色蛍光を指標に、薄切切片ならびにスライス切片における*in vitro*下での測定・評価する方法により、急性・慢性の疼痛ストレス反応に対する下垂体後葉での神経内分泌反応と機能連関という視点で解明する事を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) OXT-mRFP1 TGラットを用いて慢性疼痛ストレスモデルでのOXTニューロンの可視化およびその機能について検討した。方法としては、リウマチ関節炎モデルの一つである結核死菌を用いたアジュバント関節炎(AA)ラットを作製し、結核死菌投与後1日目、15日目および22日目に深麻酔下で灌流固定を行い、脳およびL4-5レベルの脊髄を採取した。採取した試料にて、ミクロトームを用いて視床下部神経核(視索上核および室傍核)、下垂体および脊髄後角切片を作成し、切片を蛍光・共焦点レーザー顕微鏡でmRFP1赤色蛍光の発現を観察、イメージアナライザーで視床下部神経核と脊髄後核におけるmRFP1赤色蛍光の面積と輝度を定量的に評価した。さらに同様のタイムコースで断頭し、視床下部神経核を含む薄切脳切片を作成し、*in situ* hybridization (ISH)法を用いて遺伝子発現の解析を行った。mRFP1 mRNA発現ニューロンを、イメージアナライザー(MCID画像解析装置)を用いて定量的に評価した。また*in vitro*下においても蛍光タンパクを用いて、視床下部OXTニューロンが可視化・定量できるか確認した。

(2) OXT-mRFP1 TGラットを用いて急性炎症・疼痛ストレスモデルにおけるOXTニューロンの可視化およびその発現量について検討した。方法としては、両側足底部皮下に生理食塩水(コントロール)もしくは5%ホルマリン溶液(ホルマリンテスト)を注射後15分、2時間、4時間、6時間後に脳、下垂体および脊髄を摘出し、体幹血も採取した。採取した試料にて、ミクロトームを用いて視床下部神経核(視索上核および室傍核)、下垂体および脊髄後角薄切切片を作成し、切片を蛍光・共焦点レーザー顕微鏡を用いmRFP1赤色蛍光の発現を観察、イメージアナライザーを用い視床下部神経核および脊髄後核におけるmRFP1赤色蛍光の面積と輝度を定量的に評価した。またホルマリン注射後2時間およ

び6時間後に断頭を行い、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いてPVNおよびSONにおけるOXT mRNAおよびmRFP1 mRNAを定量的に評価した。体幹血からはRIA法によりOXT濃度を測定した。

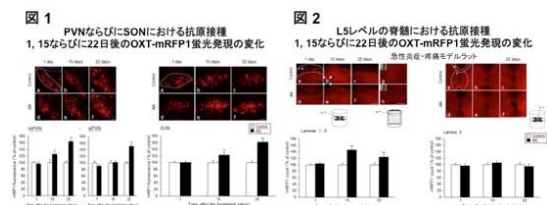
(3) 慢性ならびに急性炎症・疼痛モデルラットにおける活性化したOXTの役割を検討するために、OXTのtarget toxinであるサボリン(SAP)を使用し、脊髄ならびに脳内でのOXTの役割について検討した。成熟雄性ラットの髄腔ならびに第4脳室内に、麻酔下でBlank-SAPもしくはOXT-SAPを投与した。OXT-SAPはOXT受容体を持つ細胞に対してアポトーシスを引き起こし、生体内でのOXT受容体の機能を低下させることが知られている。その状況下において慢性および急性炎症・疼痛モデルを作製した。慢性炎症・疼痛モデルについては、これまでの実験と同様、アジュバント関節炎ラットを使用した。OXT-SAPもしくはBlank-SAP投与3週間後のラットに対し、結核死菌を接種し、各日でarthritis index・体重・食餌量・飲水量・尿量の変化について代謝ゲージを用いて計測した。急性炎症・疼痛モデルについては、OXT-SAPもしくはBlank-SAP投与1、2、3週間後のラットに対し知覚の閾値をvon FreyとHot plateテストを用いて確認した上で、両側足底部皮下に5%ホルマリン溶液(ホルマリンテスト)の注射を行い、疼痛逃避行動について観察した。

#### 4. 研究成果

方法(1)~(3)に対応して記載する。

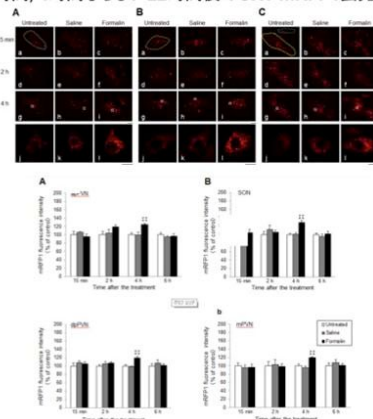
(1) AAラットにおいて、OXT-mRFP1蛍光輝度が、下垂体後葉、視床下部視索上核・室傍核、そして脊髄では後角部のみ有意な増加を認めた。また視床下部OXT-mRFP1 mRNAレベルも有意な増加を認めた(図1、2)。慢性関節炎を引き起こしたAAラットでは視床下部OXTの増加が認められ、また視床下部-下垂体後葉系ならびに視床下部室傍核-脊髄経

路のOXT増加が、温痛覚の感受性に関わっていることが示唆された。



(2) コントロール群と比較してホルマリン注射後2時間において脊髄後角におけるmRFP1赤色蛍光の有意な増加を認め、またホルマリン注射後4時間において、PVNおよびSONにおけるmRFP1蛍光の有意な増加を認めた(図3)。一方、PVNおよびSONにおけるOXT mRNAおよびmRFP1 mRNAレベルはホルマリン注射後2時間において有意に増加した。血中OXT濃度は、ホルマリン注射後15分のみ有意に増加した。つまり急性疼痛・炎症モデルラットでも、ラット下垂体後葉系におけるOXTの産生・分泌の亢進および視床下部-脊髄系におけるOXT系が活性化していることが示唆された。

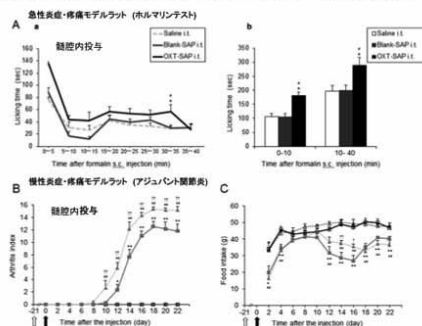
図3 PVNならびにSONにおけるホルマリン両側足底刺激後15分、2時間、4時間ならびに22時間後のOXT-mRFP1蛍光発現の変化



(3) Blank-SAP投与群に対してOXT-SAP投与群は、髄腔内投与3週間後に知覚の閾値が低下し、またホルマリンテスト(急性炎症・疼痛モデル)での疼痛逃避行動の増加が認められた(図4A)。急性炎症・疼痛モデルラットでは、生体内のOXTが脊髄レベルにおいて知覚の閾値に関与していることが示唆された。また慢性炎症・疼痛モデルラットでは、

Blank-SAP 投与群に対して OXT-SAP 投与群においては、髄腔内投与では arthritis index の増悪 (図 4B)、第4脳室内投与では関節炎発症時に認める摂食抑制の減弱が認められた(図 4C)。

図4 急性ならびに慢性炎症・疼痛ラットモデルでのOXT-Saporin (SAP)の効用



慢性炎症・疼痛モデルラットにおいては、知覚の閾値以外の生理作用として OXT 受容体が脊髄レベルでは炎症、脳幹部レベルでは摂食に関与してことが示唆された。つまり急性ならびに慢性炎症・疼痛ストレスで増加した視床下部 OXT が単に疼痛応答はもちろん、炎症作用や摂食作用にも影響を及ぼしていることを明らかにした。

#### < 引用文献 >

Kawasaki M, Onaka T, Saito J, Hashimoto H, Suzuki H, Otsubo H, Fujihara H, Okimoto N, Ohnishi H, Nakamura T, Ueta Y. Effects of the short chain sugar acid 2-buten-4-olide on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in normal and adjuvant-induced arthritic rats. *Journal of Neuroendocrinology* 19 (1), 2006, 54-65

Suzuki H, Kawasaki M, Ohnishi H, Otsubo H, Ohbuchi T, Katoh A, Hashimoto H, Yokoyama T, Fujihara H, Dayanithi G, Murphy D, Nakamura T, Ueta Y. Exaggerated response of a vasopressin-enhanced green fluorescent protein transgene to nociceptive stimulation in the rat. *Journal of Neuroscience* 29 (42), 2009, 13182-13189

Katoh A, Fujihara H, Ohbuchi T, Onaka T, Hashimoto T, Kawata M, Suzuki H, Ueta Y. Highly visible expression of an oxytocin-monomeric red fluorescent protein 1 fusion gene in the hypothalamus and posterior pituitary

of transgenic rats. *Endocrinology*. 152 (7), 2011, 2768-2774

Ueta Y, Fujihara H, Serino R, Dayanithi G, Ozawa H, Matsuda K, Kawata M, Yamada J, Ueno S, Fukuda A, Murphy D. Transgenic expression of enhanced green fluorescent protein enables direct visualization for physiological studies of vasopressin neurons and isolated nerve terminals of the rat. *Endocrinology*; 146 (1), 2005, 406-413

#### 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 5 件)

Matsuura T, Kawasaki M, Hashimoto H, Yoshimura M, Motojima Y, Saito R, Ueno H, Maruyama T, Ishikura T, Sabanai K, Mori T, Ohnishi H, Onaka T, Sakai A, Ueta Y. Possible involvement of the rat hypothalamo-neurohypophysial /-spinal oxytocinergic pathways in acute nociceptive responses. *Journal of Neuroendocrinology*, 査読有, (In press), 2016, DOI: 10.1111/jne.12396.

Matsuura T, Kawasaki M, Hashimoto H, Yoshimura M, Motojima Y, Saito R, Ueno H, Maruyama T, Sabanai K, Mori T, Ohnishi H, Sakai A, Ueta Y. Effects of central administration of oxytocin-saporin cytotoxin on chronic inflammation and feeding/drinking behaviors in adjuvant arthritic rats. *Neuroscience Letters*, 査読有, 621, 104-110, 2016, DOI: 10.1016/j.neulet.2016.04.010.

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, 2016 (In press), DOI: 10.1016/j.neures.2016.02.005.

Matsuura T, Kawasaki M, Hashimoto H, Ishikura T, Yoshimura M, Ohkubo JI, Maruyama T, Motojima Y, Sabanai K, Mori T, Ohnishi H, Sakai A, Ueta Y.

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, 27 (7), 2015, 636-646 DOI: 10.1111/jne.12290.

Ishikura T, Suzuki H, Shoguchi K, Koreeda Y, Aritomi T, Matsuura T, Yoshimura M, Ohkubo JI, Maruyama T, Kawasaki M, Ohnishi H, Sakai A, Mizuno A, Suzuki 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 5 件)

Matsuura T, Ishikura T, Yoshimura M, Ohkubo J, Maruyama T, Kawasaki M, Hashimoto H, Ueta Y. 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*, 2013年11月9~13日, San Diego, USA

Motojima Y, Matsuura T, Yoshimura M, Ohkubo J, Hashimoto H, Kawasaki M, Ohnishi H, Sakai A, Ueta Y. 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. 8<sup>th</sup> International Congress of Neuroendocrinology 2014, 2014年8月17~20日 Sydney, Australia

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、川崎展、上田陽一 アジュバ

ント関節炎におけるオキシトシンの発現動態並びに役割について、第58回日本リウマチ学会総会・学術集会、2014年4月24~26日、グランドプリンスホテル高輪、東京都港区

松浦孝紀、元嶋尉士、齋藤玲子、吉村克弘、大久保淳一、橋本弘史、川崎展、大西英生、酒井昭典、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後角におけるオキシトシン発現動態の可視化、第92回日本生理学会退会、2015年3月21~23日、神戸国際会議場、兵庫県神戸市

〔図書〕(計 1 件)

上田陽一 東京：日本ストレス学会、ストレス調節ホルモンとしてのオキシトシンの役割、*ストレス科学：日本ストレス学会誌* 29(4)、2015、366-372

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川崎 展 (KAWASAKI, Makoto)  
産業医科大学・医学部医学科・講師  
研究者番号：40644860

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

酒井 昭典 (SAKAI, Akinori)  
産業医科大学・医学部医学科・教授  
研究者番号：90248576

森 俊陽 (MORI, Toshiharu)  
産業医科大学・医学部医学科・講師  
研究者番号：80525444

佐羽内 研 (Sabanai, Ken)  
産業医科大学・医学部医学科・助教  
研究者番号：70644863

橋本 弘史 (HASHIMOTO, Hirofumi)  
産業医科大学・医学部医学科・准教授  
研究者番号：10454935