

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10500

研究課題名(和文)急性・慢性疼痛ストレスに対する生体防御逃避行動の分子基盤

研究課題名(英文) Investigation of neuronal activity in the central nervous system and flight reaction induced by acute or chronic nociceptive stress

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：野生型、TRPV1ノックアウト、TRPV4ノックアウト、およびTRPV1V4ノックアウトマウスを用いて種々の侵害刺激に対する中枢神経系の活動性をFosタンパクもしくはFosBタンパクを指標に定量評価した。また、環境中の有害物質に対する逃避行動を比較した。急性侵害刺激モデルにおける視床下部室傍核の活動性にTRPV1が、術後疼痛モデルにおける脊髄後角III-IV層の活動性にTRPV1およびTRPV4が関与する可能性が示唆された。慢性侵害刺激(多発関節炎)による脊髄後角I-II層の活動性や環境中の有害物質(揮発ホルマリン)に対する逃避行動にTRPV1およびTRPV4の明らかな関与を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：We investigated Fos protein or FosB protein expression as markers of neuronal activity in the central nervous system after various nociceptive stimuli in wild type, TRPV1 knockout, TRPV4 knockout, and TRPV1V4 knockout mice. We also evaluated flight reaction against volatilized formalin in these mice. The results suggested that TRPV1 is involved in neuronal activity in the PVN after acute nociceptive stimuli. In the postoperative pain model, it is suggested that TRPV1 and TRPV4 are involved in neuronal activity in laminae III-IV of the dorsal spinal cord. There was no relevance between TRPV1/TRPV4 and FosB protein expression in laminae I-II of the dorsal spinal cord after chronic nociceptive stimuli caused by type II collagen antibody induced arthritis. Moreover, there was no difference among flight reaction of these mice against volatilized formalin.

研究分野：整形外科

キーワード：視床下部 侵害刺激 脊髄 ノックアウトマウス Fos FosB TRPV1 TRPV4

1. 研究開始当初の背景

急性・慢性疼痛の受容・調節に関わる生理的メカニズムおよび生体防御反応のメカニズムを解明することは重要である。近年、非選択的陽イオンチャネルである TRP (transient receptor potential) チャネルが、疼痛刺激(侵害刺激)の受容に大きく関与することが明らかとなっている。TRP チャネルは7つのサブファミリーに分類され、侵害刺激には TRPA、TRPV、TRPM などのサブファミリーが関与していると考えられている。この中で、最も研究が進んでいるのが TRPV サブファミリーである。このサブファミリーに属する TRPV1 は一次感覚神経の無髄 C 線維や有髄 A 線維に発現しており、ポリモーダル受容器として機能している。また、同じく TRPV サブファミリーに属する TRPV4 も一次感覚神経に発現するポリモーダル受容器と考えられている。侵害刺激により一次感覚神経で発生したシグナルは脊髄後角ニューロンを活性化させ、その後、脊髄視床路などを上行して視床、視床下部、および大脳辺縁系などを活性化させる。また、侵害刺激により、種々の生体防御反応や抗炎症反応といった生理的応答が惹起される。しかしながら、TRPV1 や TRPV4 が関与する侵害刺激の種類、TRPV1 や TRPV4 が侵害刺激後の中枢神経系の活動性にどの程度関与しているか、またそれらが環境中の有害物質に対するセンサーとして機能しているかなど、TRPV1 および TRPV4 と侵害刺激の受容との関連には未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、TRPV1 および TRPV4 の種々の侵害刺激に対する中枢神経系の活性化や環境中の有害物質に対する逃避行動への関与を検討することを目的とした。具体的には、野生型 (WT) マウス、TRPV1 ノックアウト (*Trpv1*^{-/-}) マウス、TRPV4 ノックアウト (*Trpv4*^{-/-}) マウス、および TRPV1V4 ノックアウト (*Trpv1*^{-/-}*v4*^{-/-}) マウスを用いて、種々の侵害刺激に対する中枢神経系の活動性および環境中の有害物質に対する逃避行動を定量評価して検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 急性侵害刺激モデルを用いた検討

実験動物は、成熟雄性のWTマウス、*Trpv1*^{-/-}マウス、および*Trpv4*^{-/-}マウスを用いた。急性侵害刺激モデルとして片側の後肢足底に0.5%ホルマリン液を10 μ L皮下注射し、対照群には9%生理食塩水を10 μ L皮下注射した(各群6匹)。注射後90分で灌流固定を行い、脳および脊髄

を摘出しホルマリン固定した。厚さ30 μ mの視床下部室傍核(PVN)、視床室傍核(PVT)、内側手綱核(MHb)、扁桃体中心核内側部(CeM)、扁桃体中心核外包部(CeC)を含む脳切片、第4腰髄(L4)レベルの脊髄後角I-II層を含む脊髄切片を作成した。最初期遺伝子の遺伝子産物であるFosタンパクに対する免疫組織化学的染色法(IHC)で活性化したニューロンを可視化し、各領域におけるFosタンパク陽性細胞数を計測して比較した。

(2) 慢性侵害刺激モデルを用いた検討

実験動物は、成熟雄性のWTマウス、*Trpv1*^{-/-}マウス、*Trpv4*^{-/-}マウス、および*Trpv1*^{-/-}*v4*^{-/-}マウスを用いた。慢性侵害刺激モデルとして抗II型コラーゲン抗体(CA)の腹腔内投与による抗コラーゲン抗体誘発性関節炎(CAIA)モデルを作成し、対照群としてWTマウスの9%生理食塩水腹腔内投与群を設けた(各群3-4匹)。投与3、5、および7日後の関節炎スコア(合計0-16点)を計測し、投与7日後に灌流固定を行い脊髄を摘出しホルマリン固定した。厚さ30 μ mのL4レベルの脊髄後角I-II層を含む脊髄切片を作成した。最初期遺伝子の遺伝子産物であるFosBタンパクに対するIHCで活性化したニューロンを可視化し、各領域におけるFosBタンパク陽性細胞数を計測して比較した。

(3) 術後疼痛モデルを用いた検討

実験動物は、成熟雄性のWTマウス、*Trpv1*^{-/-}マウス、および*Trpv4*^{-/-}マウスを用いた。各マウスにおいて、術後疼痛モデルとして汎用されている片側後肢足底切開モデルを作成し、対照群としてWTマウスの無処置群を設けた(各群5匹)。処置後2時間で灌流固定を行い、脳および脊髄を摘出しホルマリン固定した。厚さ30 μ mの視床下部室傍核(PVN)、視床室傍核(PVT)、および扁桃体中心核(CeA)を含む脳切片、第5腰髄(L5)レベルの脊髄後角I-II、III-IV、およびV層を含む脊髄切片を作成した。Fosタンパクに対するIHCで活性化したニューロンを可視化し、各領域におけるFosタンパク陽性細胞数を計測して比較した。

(4) 環境中の有害物質に対する逃避行動の検討

実験動物は、成熟雄性のWTマウス、*Trpv1*^{-/-}マウス、*Trpv4*^{-/-}マウス、および*Trpv1*^{-/-}*v4*^{-/-}マウスを用いた(各3-4匹)。環境中の有害物質として揮発ホルマリンを用いた。各マウスを5%ホルマリン液より発生する揮発ホルマリンが充填された容器内に静置し、その容器内から逃避するまでの時間を計測し各系統間で比較した。

4. 研究成果

(1) 急性侵害刺激モデルを用いた検討

脊髄後角I-II層では、ホルマリン皮下注射後のFos陽性細胞数は対照群と比較して有意に増加したが、各系統間における有意差は認めなかった。PVNでは、ホルマリン皮下注射後のFos陽性細胞数は対照群と比較して有意に増加し、*Trpv1*^{-/-}マウスのホルマリン注射群のFos陽性細胞数はWTマウスのホルマリン注射群のFos陽性細胞数と比較して有意に少なかった(図1)。PVT、MHb、CeM、およびCeCではホルマリン皮下注射後のFos陽性細胞数は対照群と比較して有意差を認めず、各系統間における有意差も認めなかった(図2)。

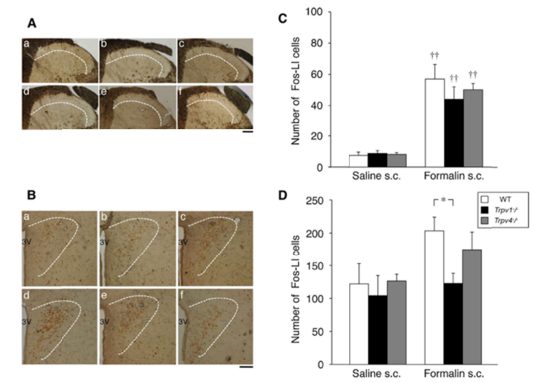


図1: 片側後肢足底ホルマリンおよび生理食塩水皮下注射90分後のFos陽性細胞。

- (A) 脊髄後角I-II層: a-c, ホルマリン皮下注射群; d-f, 生理食塩水皮下注射群; a・d, WT; b・e, *Trpv1*^{-/-}; c・f, *Trpv4*^{-/-}. Scale bar=100 μm.
 (B) PVN: a-c, ホルマリン皮下注射群; d-f, 生理食塩水皮下注射群; a・d, WT; b・e, *Trpv1*^{-/-}; c・f, *Trpv4*^{-/-}. 3V, third ventricle. Scale bar=100 μm.
 (C) 脊髄後角I-II層のFos陽性細胞数: †† $P < 0.01$ vs対照群(生理食塩水皮下注射群).
 (D) PVNのFos陽性細胞数: * $P < 0.05$.

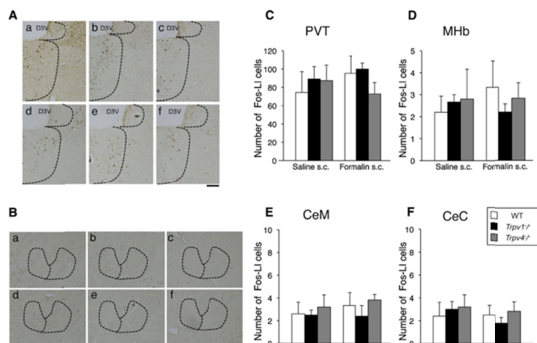


図2: 片側後肢足底ホルマリンおよび生理食塩水皮下注射90分後のFos陽性細胞。

- (A) PVTおよびMHb: a-c, ホルマリン皮下注射群; d-f, 生理食塩水皮下注射群; a・d, WT; b・e, *Trpv1*^{-/-}; c・f, *Trpv4*^{-/-}. D3V; dorsal third ventricle. Scale bar=100 μm.
 (B) CeMおよびCeC: a-c, ホルマリン皮下注射群; d-f, 生理食塩水皮下注射群; a・d, WT; b・e, *Trpv1*^{-/-}; c・f, *Trpv4*^{-/-}. Scale bar=100 μm.
 (C) PVTのFos陽性細胞数.
 (D) MHbのFos陽性細胞数.
 (E) CeMのFos陽性細胞数.
 (F) CeCのFos陽性細胞数.

(2) 慢性侵害刺激モデルを用いた検討

WT マウス、*Trpv1*^{-/-}マウス、*Trpv4*^{-/-}マウス、および *Trpv1*^{-/-}*Trpv4*^{-/-}マウスのCA腹腔内投与7日後の関節炎スコアは、WTマウスの対照群と比較して有意に増加した。また、*Trpv1*^{-/-}マウス、*Trpv4*^{-/-}マウス、および *Trpv1*^{-/-}*Trpv4*^{-/-}マウスの関節炎スコアはWTマウスの関節炎スコアと比較して有意に小さかった(図3)。脊髄後角I-II層におけるFosB陽性細胞数は、すべての群で有意差を認めなかった(図4)。

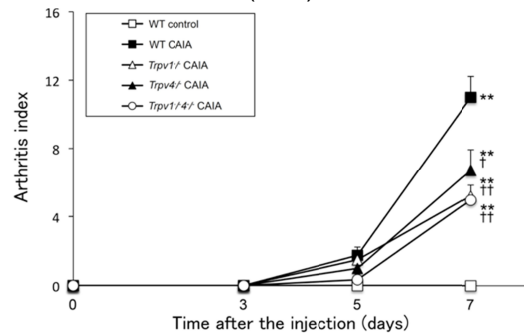


図3: CAIAモデルにおける関節炎スコア。
 ** $P < 0.01$ vs WT control. † $P < 0.01$ vs WT CAIA. †† $P < 0.05$ vs WT CAIA.

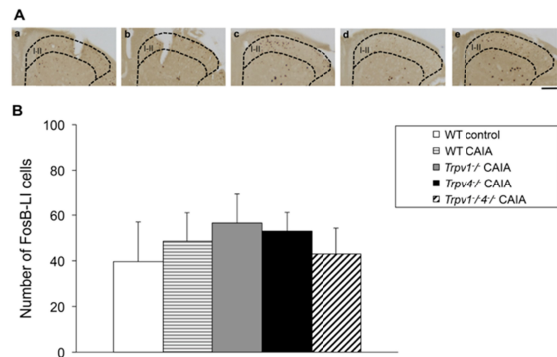


図4: CAIAモデル(CA腹腔内投与7日後)におけるFosB陽性細胞。

- (A) 脊髄後角: a, WT control; b, WT CAIA; c, *Trpv1*^{-/-} CAIA; d, *Trpv4*^{-/-} CAIA; e, *Trpv1*^{-/-}*v4*^{-/-} CAIA. Scale bar=100 μm.
 (B) 脊髄後角 I-II 層の FosB 陽性細胞数.

(3) 術後疼痛モデルを用いた検討

脊髄後角 I-II 層および PVN において、WT マウス、*Trpv1*^{-/-} マウス、および *Trpv4*^{-/-} マウスの足底切開モデルにおける Fos 陽性細胞数は WT マウスの無処置群における Fos 陽性細胞数と比較して有意に増加した。脊髄後角 III-IV 層においては、*Trpv1*^{-/-} マウスおよび *Trpv4*^{-/-} マウスの足底切開モデルにおける Fos 陽性細胞数は WT マウスの足底切開モデルにおける Fos 陽性細胞数と比較して有意に増加した。足底切開モデルにおける脊髄後角 V 層、PVT、CeA における Fos 陽性細胞数に各系統間における有意差を認めなかった(図5)。

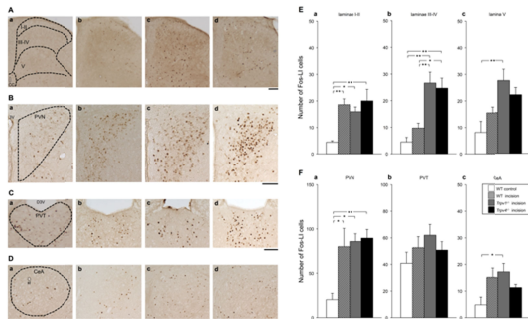


図5: 足底切開モデルにおける Fos 陽性細胞.

A, 脊髄後角; B, PVN; C, PVT; D, CeA.

A-Da, WT control; A-Db, WT incision; A-Dc, *Trpv1*^{-/-} incision; A-Dd, *Trpv4*^{-/-} incision.

Ea, 脊髄後角 I-II 層; Eb, 脊髄後角 III-IV 層; Ec, 脊髄後角 V 層.

Fa, PVN; Fb, PVT; Fc, CeA.

CC, central canal; st, stria terminalis; D3V, dorsal third ventricle; 3V, third ventricle. Scale bars=100 μm. ***P*<0.01. **P*<0.05.

(4) 環境中の有害物質に対する逃避行動の検討

WT マウス、*Trpv1*^{-/-} マウス、*Trpv4*^{-/-} マウスおよび *Trpv1*^{-/-}*v4*^{-/-} マウスにおいて、揮発ホルマリンに対する逃避行動(揮発ホルマリンから逃避するまでの時間)に有意差を認めなかった(図6)。

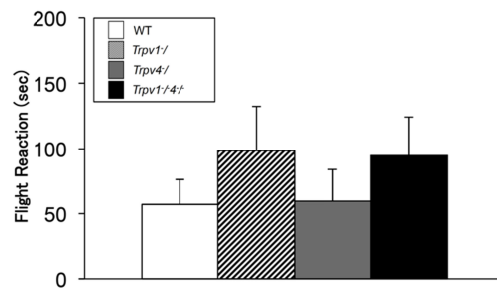


図6: 揮発ホルマリンに対する逃避行動.

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 6 件)

Comparison of the induction of c-fos-eGFP and Fos protein in the rat spinal cord and hypothalamus resulting from subcutaneous capsaicin or formalin injection.

Motojima Y, Matsuura T, Yoshimura M, Hashimoto H, Saito R, Ueno H, Maruyama T, Sonoda S, Suzuki H, Kawasaki M, Ohnishi H, Sakai A, Ueta Y.

(Neuroscience. 2017 Jul 25;356:64-77) (査読有)

DOI; 10.1016/j.neuroscience.2017.05.015.

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. (2016):

Effects of central administration of oxytocin-saporin cytotoxin on chronic inflammation and feeding/drinking behaviors in adjuvant arthritic rats (Neuroscience Letters 621 104-110) (査読有)

DOI; 10.1016/j.neulet.2016.04.010.

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 2016) (査読有)

DOI; 10.1111/jne.12396

Motojima, Y. Kawasaki, M. Matsuura, T. Saito, R. Yoshimura, M. Hashimoto, H.

Ueno, H. Maruyama, T. Suzuki, H. Ohnishi, H. Sakai, A. & Ueta, Y. (2016): Effects of peripherally administered cholecystokinin-8 and secretin on feeding/drinking and oxytocin-mRFP1 fluorescence in transgenic rats. (Neuroscience Research 109 : 63-69)

(査読有)

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. (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 27(7):636-646 (査読有) 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. Mizuki, M. & Ueta, Y.(2015) Possible involvement of TRPV1 and TRPV4 in nociceptive stimulation-induced nocifensive behavior and neuroendocrine response in mice. Brain Research Bulletin 118:7-16 (査読有) DOI; 10.1016/j.brainresbull.2015.08.004.

〔学会発表〕(計 17 件)

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 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. (2017/3 American Academy of Orthopaedic Surgeons : San Diego.)

Fluorescent visualization of oxytocin neurons activated by acute nociceptive stimuli in the c-fos-eGFP transgenic rats Yasuhito Motojima, Haruki Nishimura, Takanori Matsuura, Mitsuhiro Yoshimura, Hirofumi Hashimoto, Reiko Saito, Hiromichi Ueno, Takashi Maruyama, Satomi Sonoda, Kazuaki Nishimura, Kentaro Tanaka, Hitoshi Suzuki, Makoto Kawasaki, Hideo Ohnishi, Akinori Sakai and Yoichi Ueta (2017/9/27-29 Fourth World Congress of Reproductive Biology (WC R B 2017): 沖縄コンベンションセンター)

炎症・疼痛刺激に対するラット脊髄・視床下部の c-fos-eGFP および Fos タンパクの発現動態の検討 元嶋 尉士、川崎 展、大西 英生、鈴木 仁士、松浦 孝紀、森 俊陽、佐羽内 研、塚本 学、上田 陽一 (2017/4/24 第 61 回日本リウマチ学会総会・学術大会：福岡国際会議場)

Matsuura, T. Motojima, Y. Yoshimura, M. Saito, R. Ueno, H. Maruyama, T. Hashimoto, H. Kawasaki, M. Ishikura, T. Ohnishi, H. Onaka, T. Sakai, A. & Ueta, Y. (2016 年 1 月 22-23 日) Possible involvement of the rat hypothalamo-neurohypophysial /spinal oxytocinergic pathways in acute nociceptive responses : Interdisciplinary of Medical, Dental and Soft-material Researches on the move -Showcase Review in Kitakyushu-, Kitakyushu, Japan

Motojima, Y. Suzuki H. Matsuura T. Yoshimura M. Hashimoto H. Saito R. Ueno H. Maruyama T. Sonoda S. Kawasaki M. Ohnishi H. Sakai A. Ueta Y. (2016 年 8 月 25 日 佐賀大学) Regional and time-course differences in the induction of c-fos-eGFP fluorescence in the spinal cord and hypothalamus of transgenic rats after subcutaneous injections of capsaicin and formalin. : The 13th Japan-Korea Joint Symposium on Brain Science and Cardiac and Smooth Muscles.

松浦 孝紀、元嶋 尉士、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 (2016 年 1 月 9 日) 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 26 回バゾプレッショ研究会、東京

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 (2016 年 3 月 24 日) 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、札幌 札幌コンベンションセンター

上田 陽一、松浦 孝紀、元嶋 尉士、吉村 充弘、將口 加奈子、丸山 崇、橋本 弘史、石倉 透、川崎 展、大西 英生、酒井 昭典 (2016 年 3 月 24 日) 浸透圧および非浸透圧刺激によるマウス飲水行動への効果：TRPV1 ならびに TRPV4 の関与の可能性：第 93 回日本生理学会大会、札幌 札幌コンベンションセンター

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(2016年4月21日)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、横浜 パシフィコ横浜

元嶋 尉士、鈴木 仁士、松浦 孝紀、吉村 充弘、橋本 弘史、齋藤 玲子、上野 啓道、丸山 崇、園田 里美、川崎 展、大西 英生、酒井 昭典、上田 陽一(2016年7月14-15日)4日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34回内分泌代謝学サマーセミナー、福岡県糟屋郡、ホテル夢家

元嶋 尉士、上野 啓通、吉村 充弘、丸山 崇、橋本 弘史、齋藤 玲子、園田 里美、川崎 展、鈴木 仁士、大西 英生、酒井 昭典、上田 陽一(2016年10月7-8日発表)ラット尾懸垂時の延髄および視床下部における Fos タンパクの発現動態:第67回西日本生理学会、鹿児島県鹿児島市、レインボー桜島

Ueta, Y. Matsuura, T. Motojima, Y. Yoshimura, M. Shoguchi, K. Maruyama, T. Hashimoto, H. Kawasaki, M. Ohnishi, H. & Sakai, A. (2015年6月2-7日) Effects of osmotic and non-osmotic stimuli on drinking behavior in TRPV1 and TRPV4 knockout mice: International Behavioral Neuroscience Society 2015, Victoria, Canada

Ueta, Y. Matsuura, T. Motojima, Y. Yoshimura, M. Shoguchi, K. Maruyama, T. Hashimoto, H. Ishikura, T. Kawasaki, M. Ohnishi, H. & Sakai, A. (2015年11月3-4日) Possible involvements of TRPV1 and TRPV4 in neuroendocrine response and drinking behavior: The 13th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception, Fukuoka, Japan

14 松浦 孝紀、川崎 展、元嶋 尉士、鈴木 仁士、大西 英生、上田 陽一(2015年4月23-25日)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、名古屋

15 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(2015年7月31日-8月2

日) 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、松山

16 松浦 孝紀、元嶋 尉士、上野 啓通、齋藤 玲子、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(2015年10月9-10日)アジュバンド関節炎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役割:第66回西日本生理学会、久留米

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

酒井 昭典 (SAKAI Akinori)

産業医科大学・医学部・教授
研究者番号:90248576

森 俊陽 (MORI Toshiharu)

産業医科大学・医学部・非常勤医師
研究者番号:80525444

川崎 展 (KAWASAKI Makoto)

産業医科大学・医学部・講師
研究者番号:40644860