

令和元年6月9日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08998

研究課題名(和文) 分界条床核外側部CRHニューロンの痛み行動における性腺ステロイドホルモンの役割

研究課題名(英文) The role of gonadal steroid hormones in pain responses of CRH neurons in the BSTDL

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は分界条床核背外側部が痛みの反応性に関与していることを発見した。今回、同部位のCRHニューロンの活動が痛み反応の経過においてどのように変化するか検討した。CRF-Venus Neoマウスを用いパッチクランプを行なった結果、雌性マウスのホルマリンテストの中間相でのみmEPSCの頻度が増加した。雌雄の性腺摘除し、低濃度エストロゲンチューブ(E2)を皮下に留置し同様の実験を行ったところ、雌性マウスでは、E2投与によりmEPSCの頻度が増加した。以上のことから、痛み行動における性差は、分界条床核背外側部のCRHニューロンのエストロゲン感受性が鍵を握る事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの痛み研究は脊髄レベルでの研究が多く報告されていた。近年、痛みの情動成分の重要性が報告されているが、情動には多様な側面があり研究は困難であった。一方、女性の痛みに対する高い脆弱性の基盤や、情動における中枢神経系内メカニズムに関する研究は少ない。本研究は、情動が痛みを調節するメカニズムについて性差に着目し、BSTDLにおけるCRHニューロンをターゲットに分子基盤と行動発現がどのように作用しているかを明らかにした先駆的な研究である。

研究成果の概要(英文)：We found that the dorsolateral subdivision of the bed nucleus of the stria terminalis (BSTDL) plays a role in controlling pain response. We studied the electrophysiological properties of Corticotropin-releasing hormone (CRH) neurons of the BSTDL in mice with a yellow fluorescent protein under the control of the CRH promoter. Whole-cell patch-clamp recordings were performed to analyze miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSC) in CRH neurons in the BSTDL slices. The voltage clamp analysis revealed that the frequency of mEPSC was increased by formalin injection in female mice but not in male mice. In gonadectomized male and female mice, low concentration estrogen tube (E2) was replaced subcutaneously and similar experiments were performed. In female mice but not in male mice, the frequency of mEPSC was increased by E2 implantation. The present study suggests that the sex difference in pain responses may be mediated by estrogen sensitivity of CRH neurons in the BSTDL.

研究分野：疼痛学

キーワード：疼痛 性差 分界条床核 formalin test

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

痛みは、末梢神経を介して脊髄、視床、そして体性感覚野に伝えられる一方、痛みの閾値はオピオイドを中心とした下行性抑制系によって主として脊椎レベルで調節されている。また、痛みは単純に痛みという感覚を受容するのみならず極めて多用な側面を持っている。例えば、痛みは、「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) で定義されているように、「快」「不快」と言った情動をつくりだす。気分がよければ同じ痛みでも痛く感じないし、神経質な状態では、痛み過敏となる。このように痛みの研究は、情動成分の研究の重要性がクローズアップされつつある。しかしながら、痛みも情動もその多様な側面があるがゆえ、研究を困難にしていた。

性差も痛み反応や情動の様々な側面の存在を示す一例であり、例えば痛みの場合、内部臓器で生じる痛みを含む侵害刺激に対し、男性よりも女性の方が敏感であることがあげられる (Mogil and Chanda, 2005)。また、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。しかし、これら女性の痛みに対する高い脆弱性の基盤、そもそも痛み反応の情動面をつくる中枢神経系内メカニズムに関する研究は少なく、脊椎レベルでPKC が痛み反応の性差を作ると報告されているが (Dina et al, 2001)、上位の中枢神経系では、その分子基盤を含めて未解決である。

そこで研究代表者は、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、性差から追ろうと考えた。これまでの研究により、我々は性差という変数の取り扱いに関して長年のノウハウがあり、従って、特色のある研究が可能となった。より重要なことに、雌性の痛み反応から雄性の痛み反応を差し引けば、単純に雌性特有の痛みと情動が抽出でき、そこから逆に一般的な痛みと情動の関係を検討できるのでは、という独創的な発想に基づいている研究である。そこで我々は性差が認められた痛み行動時の脳の活動を調べ、その責任部位の同定から試みた。痛み刺激としてホルマリンテストを用いて、ホルマリンテストにより活性化される脳部位の同定から研究を開始した。CREB のリン酸化を指標とすると、分界条床核背外側部に、雌性特異的なCREB のリン酸化がおり、ホルマリンテストの痛み反応の性差が認められた時間と一致する事を発見した (業績参照)。ホルマリンテストの痛み反応は、時間経過にともなって第 相と第 相にピークを持つ痛み反応が観察され、それらの中間相では痛み反応が一過性に抑制される。研究代表者はこの中間相で、雌性の場合、雄性と比較して痛み反応の抑制が弱く、同時に、分界条床核背外側部の細胞が性特異的にCREBのリン酸化を受けること、そしてそれはエストロゲンに依存していること (業績参照)、エストロゲンに対する反応性の獲得は、通常の性分化の結果ではない事 (業績参照)、等を明らかにした。さらにこの領域のCREB を dominant negative 体で抑制すると、痛み反応も抑制されることを明らかにした (業績参照)。これらの研究は、痛みの性差の分子基盤として、分界条床核背外側部の機能に新たな側面を付け加えた。さらに、この部位は Corticotropin-releasing hormone (CRH) ニューロンが局在している特徴的な部分である。そこで研究代表者は、分界条床核背外側部におけるCRHニューロンの機能と痛みの関係について深く興味を持った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、分界条床核背外側部のCRHニューロンの痛み反応の情動成分における役割と性ステロイドホルモンの作用を明らかにするために、ホルマリンテストの性差に着目し、痛み反応の時のCRH ニューロンのシナプス入力の変化を検討することにある。そのために雌雄を比較し、性腺ステロイドホルモン環境の変化や、発達時期による変化、思春期での変化等を検討する。実際には、蛍光標識したCRH ニューロンにホールセルモードでパッチクランプを行い、また、性腺ステロイドホルモンの影響によるCRH ニューロンのシナプス入力の変化を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

CRHニューロンを蛍光標識するために、紆余曲折があったが、結局、すべての実験は、CRF-Venus Neo マウスを用いることにした。このマウスは、コルチコトロピン放出因子 (CRF) 遺伝子座に変異型黄色蛍光タンパク質 (Venus) 遺伝子が挿入されたCRF-Venusマウスから、pgk-Neo カセットを除去したCRF-Venus Neo マウスである (東北大学井樋教授より供与)。CRH ニューロンを顕微鏡下で同定して (励起462nm、蛍光492nm)、電気生理学的な検討を行った。ホールセルモードのスライスパッチクランプにより、痛み反応とCRH ニューロンのシナプス入力の変化、および、性腺ステロイドホルモンの影響に着目し検討した。

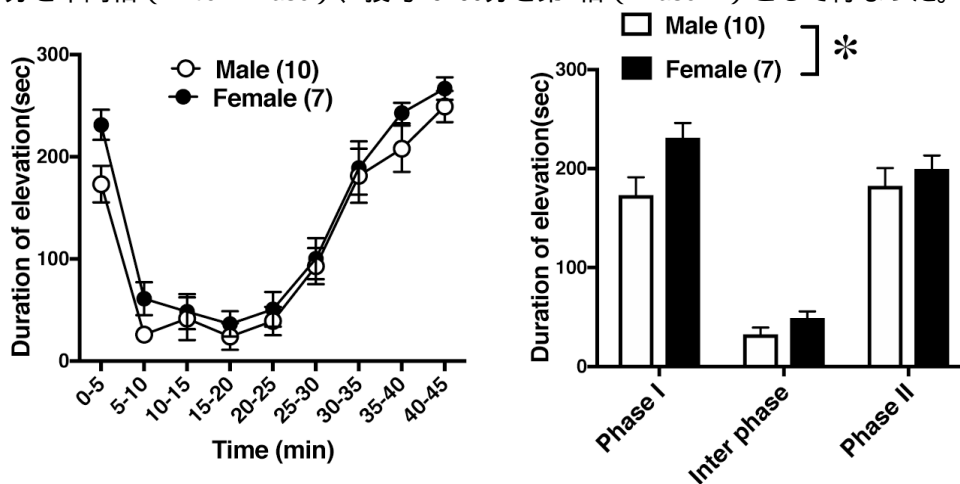
ホルマリンテストは、雌雄マウスの右後肢足背に1-5%のホルマリンを20 μ l 皮下投与し、投与後すぐに行動観察箱 (透明プラスチック製30 cm x 30 cm x 30 cm) に入れた。詳細に行動を観察するために観察箱の下には45°の角度で鏡を置き、投与後0分から60分までの行動を観察し、各5分間に足を挙げている時間を記録する。

はじめに、これまでの我々の研究から性差が認められた投与10分後(痛み第1相と第2相の間の中間相)におけるCRHニューロンのシナプス入力の変化を電気生理学的に検討した。電気生理学的解析のために、まずイソフルラン麻酔後に脳を摘出し、スライス切片をピプラトームで作成した。顕微鏡下で境界条床核背外側部のCRHニューロンを用いて、パッチクランプ膜電位固定法(TTX存在下でシナプス入力を遮断し、ピククリン存在下で-60 mVに電位を固定してmEPSC(miniature Excitatory Postsynaptic Current)、TTX存在下でシナプス入力を遮断し、CNQX存在下で0 mVに電位を固定して、mIPSC(miniature Inhibitory Postsynaptic Current))の記録を行なった。

次に、性腺ステロイドホルモンの役割に焦点をあてCRF-Venus Neoマウス6週齢で雌雄の性腺を摘除し、8週齢で低濃度エストロジェンチューブ(20 ug/ml)、対照群としてコントロールチューブ(sesame oil)を皮下に留置し、9週齢で痛み刺激としてホルマリンテストを行った。このdoseは、我々の研究から報告されたestrogenのnegative feedbackのみが引き起こされる量である。これまでの研究で性差が認められたホルマリン投与10分後に脳を摘出し、パッチクランプホールセル法で膜電位固定法により-60 mVに電位を固定、TTX存在下でシナプス入力を遮断し、ピククリン存在下でmEPSC(miniature Excitatory Postsynaptic Current)を検討した。

4. 研究成果

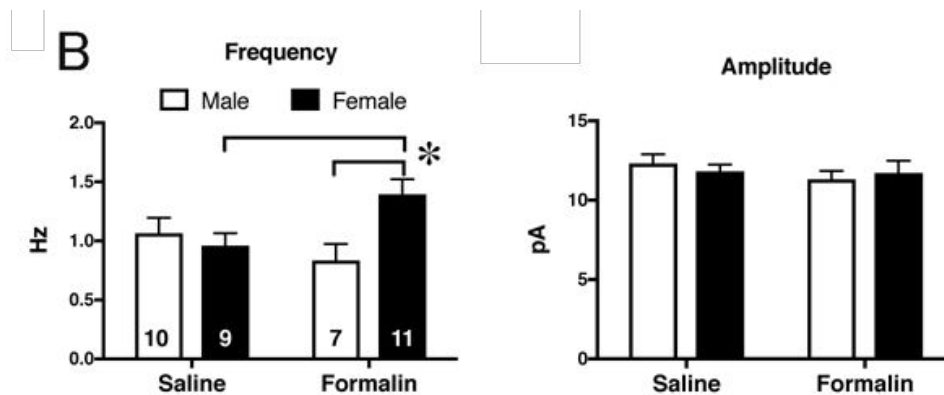
全ての実験には、CRF-Venus Neoマウスを用いた。ホルマリン投与により認められる痛み行動はラットと一致して、生食投与群では雌雄ともに痛み行動は示さなかったが、ホルマリン投与により雌雄ともに痛み行動を示し、雌性では雄性と比較して有意に痛み行動が強かった。解析は、痛み行動の違いが認められる時間で分類をし、ホルマリン投与0-5分を第1相(Phase I)、投与5-25分を中間相(Inter Phase)、投与25-60分を第2相(Phase II)として行なった。



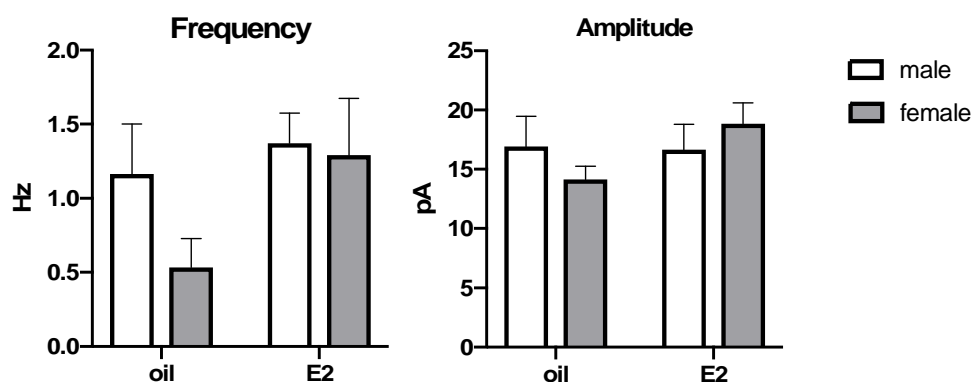
出現したmEPSCはCNQX投与により完全に消失することからAMPA受容体を介したグルタミン酸の興奮性入力であることを確認した。同様に、出現したmIPSCはピククリン投与により完全に消失することからGABA_A受容体を介した抑制性入力であることを確認した。

実験の結果、雄性マウスにホルマリンを投与した群ではホルマリン投与における影響は認められなかった。しかし、雌マウスにホルマリンを投与した群ではmEPSCの頻度が有意に増加することが分かった。一方、mIPSCでは雌雄差及びホルマリン投与における変化は認められなかった(図A:mEPSC, B:mIPSC)ことから、痛み行動における性差にはAMPA受容体を介したグルタミン酸の興奮入力における伝達物質の放出変化、すなわち、グルタミン酸の放出増加の可能性が示唆された。





さらに、性腺ステロイドホルモンの役割に焦点をあてた実験では、雄性マウスではエストロゲンによる影響はmEPSCの頻度や振幅ともに有意な変化は認められなかった。一方、雌性マウスでは、卵巣を摘除するとmEPSCの振幅には変化が認められなかったが、頻度が抑制され、低濃度エストロゲンチューブにより頻度が増加する事が明らかとなった。



これらのことから、痛み行動における性差はAMPA受容体を介したグルタミン酸の興奮性入力における伝達物質の放出確率が関与する可能性があるが、推測どおり雄性ではエストロゲンの影響を受けないこと、一方、雌性ではエストロゲンによる痛み行動の変化が、分界条床核背外側部のCRHニューロンが関与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Kubota T, Fukushima A, Hagiwara H, Kamiya Y, Furuta M, Miyazaki T, Fujioka H, Fujiwara SE, Funabashi T, Akema T. (2018) Short-term fasting decreases excitatory synaptic inputs to ventromedial tuberoinfundibular dopaminergic neurons and attenuates their activity in male mice. *Neuroscience letters*. 査読あり, 10(671), 70-75

〔学会発表〕(計19件)

M Furuta, A Fukushima, T Akema, T Funabashi, The effect of maternal experiences on spatial learning and hippocampal neural plasticity., The 48th Society for Neuroscience, (2018年)

萩原裕子、崎村建司、阿部学、井樋慶一、明間立雄、船橋利也、CRF-Venus Neo マウスの分界条床核外側部CRHニューロンのシナプス入力の性差の電気生理学的な検討-ホルマリンテストを用いて、第45回日本神経内分泌学会学術集会(2018年)

福島篤、明間立雄、船橋利也、血小板由来成長因子受容体(PDGFR)を介した細胞内シグナルは行動量を変化させることによりマウス視床下部による摂食の調節に関与する、第45回日本神経内分泌学会学術集会(2018年)

福島篤、萩原裕子、明間立雄、船橋利也、血小板由来成長因子受容体を介した細胞内シグナルは雄マウスの視床下部による摂食の調節に関与する、第41回日本神経科学大会(2018年)

福島篤、萩原裕子、船橋利也、絶食後の再摂食は視床下部の血小板由来成長因子受容体（PDGFR- α ）発現を抑制する。第95回日本生理学会大会（2018年）

萩原裕子、崎村建司、井樋慶一、船橋利也、CRF-Venus Neoマウスの分界条床核外側部CRHニューロンのシナプス入力性の性差-ホルマリンテストを用いて、第40回日本神経科学大会（2017年）

古田都、福島篤、掛橋千彰、船橋利也、妊娠-出産-子育て経験による視床下部TIDAニューロンへの興奮性シナプス入力への影響、第40回日本神経科学大会（2017年）

萩原裕子、崎村建司、井樋慶一、船橋利也、CRF-Venus Neoマウスの分界条床核外側部CRHニューロンのシナプス入力性の性差と痛み反応の性差、第94回日本生理学会大会（2017年）

古田都、福島篤、船橋利也、妊娠-出産-子育ての経験が視床下部TIDAニューロンへの興奮性シナプス入力へ及ぼす影響、第94回日本生理学会大会（2017年）

福島篤、船橋利也、マウス中枢神経系のPDGFR α 系を介する摂食調節作用は末梢とは異なる、第12回環境生理学プレングレス（2017年）

萩原裕子、福島篤、船橋利也、視床下部PDGF受容体 α を介した摂食調節作用に関する研究、第43回日本神経内分泌学会（2016年）

萩原裕子、崎村建司、井樋慶一、明間立雄、船橋利也、分界条床核におけるCRHニューロンのシナプス入力性の性差、第39回日本神経科学大会（2016年）

古田都、福島篤、船橋利也、幼弱期雌性ラットにおけるニコチン投与および母性様行動の成体期における母性行動と空間学習に及ぼす影響、第39回日本神経科学大会（2016年）

藤岡仁美、福島篤、船橋利也、明間立雄、リポポリサッカライドによるLHサージ状分泌抑制に関する終板脈絡器官のIL-1 β 産生細胞の特徴、第39回日本神経科学大会（2016年）

萩原裕子、福島篤、明間立雄、船橋利也、血小板由来成長因子はマウスの視床下部による摂食調節に関する、第93回日本生理学会大会（2016年）

藤岡仁美、福島篤、船橋利也、明間立雄、ミノサイクリンはリポポリサッカライドによるLHパルス状分泌抑制を回復しない、第93回日本生理学会大会（2016年）

古田都、福島篤、船橋利也、雌性ラットの幼弱期ニコチン投与ならびに母性行動が成体期の母性行動および空間学習に及ぼす影響、第93回日本生理学会大会（2016年）

福島篤、萩原裕子、明間立雄、船橋利也、肝臓のPDGFR α 系を介したSTAT5のリン酸化は高脂肪食による肥満と糖耐性の低下に関する、第93回日本生理学会大会（2016年）

萩原裕子、福島篤、明間立雄、船橋利也、血小板由来成長因子はマウスの視床下部による摂食調節に関する、第93回日本生理学会大会（2016年）

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：福島 篤

ローマ字氏名：(Atsushi, Fukushima)

所属研究機関名：聖マリアンナ医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁): 10442716