

令和元年5月16日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10925

研究課題名(和文) 遺伝子改変動物を用いた関節由来の疼痛ストレスにおける中枢および末梢応答の病態解明

研究課題名(英文) Hypothalamo-neurohypophysial and hypothalamo-spinal nociceptive pathways in the arthritis using transgenic rats

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：膝関節炎モデルラットを用いて視床下部・下垂体および脊髄経路における神経細胞の活性化を調べた。その結果、視床下部オキシトシン細胞およびバゾプレッシン細胞、下垂体前葉ストレス関連細胞、脊髄後角細胞における疼痛受容に關与するI-II層の活性化がみられ、侵害受容およびストレス関連ホルモンの合成は、膝関節炎によって増加することが明らかになった。加えて、transient receptor potential vanilloid (TRPV) 1および4欠損マウスを用いて侵害刺激に対する脊髄後角細胞の反応も観察し、これらの遺伝子欠損することで脊髄後角III-IV層神経細胞活性化が促されることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疼痛受容において、全身の疼痛反応に密接に関係していると考えられている中枢神経系の役割は不明な点が多い。本研究課題では、関節炎発症による疼痛モデルラットを用い、疼痛受容経路(視床下部・脊髄後角 層および 層)に局在するニューロンの活性化を最初期遺伝子であるc-Fosを指標に可視化・定量評価し、侵害受容およびストレス関連ホルモンの合成が増加していることを明らかにした。また、TRPV1および4に着目し、疼痛刺激により、これらの遺伝子欠損は脊髄後角I-II層だけでなく、III-IV層神経細胞活性化を促すことを確認した点は、疼痛治療のターゲットとして注目される可能性があり社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the neurological reaction in the hypothalamo-neurohypophysial and spinal pathway using the knee arthritis model. The neuronal activity in the hypothalamus, anterior pituitary (AP) and lumbar segments (L4) were examined. The neuronal activities of oxytocin (OXT) and vasopressin (AVP) cells in the hypothalamus, and the lamina I-II cells associated nociceptive modulation of the ipsilateral dorsal horn in the L4, and the cells in the AP associated stress modulation were increased in the arthritis rats. The synthesis of nociceptive and stress related hormones such as OXT and AVP, corticotropin-releasing hormone and proopiomelanocortin were increased simultaneously by arthritis. In addition, transient receptor potential vanilloid (TRPV) 1 and 4 knock out mice were used to observe the responses of spinal dorsal horn cells to nociceptive stress. The result suggested that the deletion of these genes associated the neuronal activation in the lamina III-IV cells.

研究分野：整形外科学

キーワード：関節炎 オキシトシン バゾプレッシン 視床下部 下垂体 副腎軸 脊髄後角 c-Fos遺伝子 TRPV

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

### 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に関する基礎・臨床研究は医学全般はもとより整形外科領域においても極めて重要な課題であり、近年、疼痛情報の伝達に関する研究が多く見られる。欧米諸国においては、就労における疼痛の悪影響および社会的な損失が注目されており、本邦においても在日米商工会議所の報告によれば、疼痛による経済的な損失は年間約 3,700 億円にもおよびるとされている。疼痛を伴う代表的な整形外科的疾患として、関節炎を伴う関節リウマチや変形性関節症が挙げられるが、厚生労働省によれば、本邦における関節リウマチの患者数は約 70~80 万人、変形性股関節症の患者数は約 120~510 万人、変形性膝関節症の患者数は約 1,000~3,000 万人にのぼると推測されており、関節炎および関節症に起因した疼痛患者が多く存在し、そのことが社会的損失に繋がっていると考えられる。

また、高齢化の進行に伴い上記疾患の患者数は増加すると考えられており、実際に我々整形外科医の日常診療でもそれを実感している。以上のように、生体にとっての急性および慢性疼痛・炎症に対する生理的防御反応のメカニズムを解明することは、疼痛治療薬の創薬および社会的損失の軽減に結びつくと考えられ、極めて重要な研究課題である。

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、疼痛および炎症により視床下部-下垂体-副腎系が賦活化されることを確認し、疼痛および炎症の受容に視床下部が関与していることを明らかにした (Kawasaki et al., 2006; Suzuki et al., 2009a)。さらに、これらのモデルラットにおいて視床下部におけるオキシトシン (OXT) やバゾプレッシン (AVP) の合成が亢進しており、疼痛の抑制に関与していることを明らかにした (Suzuki et al., 2009a; Suzuki et al., 2009b; Matsuura et al., 2015; Matsuura et al., 2016)。また、疼痛刺激を受容する一次ニューロンの A 線維および C 線維が脊髄後角 I-II 層に入力して二次感覚神経のニューロンに接合し、神経伝達物質を介して疼痛刺激を伝達していることが確認されており、疼痛および炎症により脊髄後角 I-II 層および視床下部のニューロンが活性化されることを明らかにしている (Suzuki et al., 2009a; Ishikura et al., 2012)。しかし、これまでに一側の単関節炎における疼痛受容機構および疼痛抑制機構を視床下部の観点から詳細に解明した報告はない。

### 2. 研究の目的

本申請課題では、ニューロンの活動性の指標として汎用される c-fos 遺伝子に eGFP 遺伝子を挿入した融合遺伝子を用いて作出された c-fos-eGFP トランスジェニック (TG) ラットを使用するため、視床下部および脊髄後角におけるニューロンの活動性を簡便に可視化・定量評価することが可能である (Motojima et al., 2017)。我々は、この TG ラットを使用し、滑膜炎に起因する単関節炎時における視床下部および脊髄後角 I-II 層に局在するニューロンの活動性を経時的に可視化・定量評価することで、疼痛受容機構および脊髄後角抑制性介在ニューロンを含めた疼痛抑制機構を解明することを目的とした。

また近年、非選択的陽イオンチャネルである transient receptor potential vanilloid (TRPV) の侵害受容への関与が注目されている。TRPV1 および TRPV4 は一次感覚神経線維に発現しており、ポリモーダル受容器として種々の刺激に応答することが報告されているため、新規鎮痛薬のターゲットとなる可能性がある。我々は、TRPV1 ノックアウト (KO) マウスおよび TRPV4 KO マウスを用いて、TRPV1 および TRPV4 が侵害受容性疼痛の受容機序に関与する可能性を明らかにしてきた (Ishikura et al., 2015)。様々な疼痛モデルにおける TRPV1 ならびに 4 の関与を明らかにすることで難治性疼痛の治療・創薬に大きく貢献し得ると考えるに至った。TRPV1 KO マウスならびに TRPV4 KO マウスを用いて足底を切開する術後疼痛モデルを作成し、視床下部および脊髄後角 I-II 層に局在するニューロンの活動性を野生型マウスと経時的に比較することで、疼痛受容機構における TRPV1 ならびに V4 の関連性を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) c-fos-eGFP TG ラットを用いて単関節炎モデルを作成し、視床下部ならびに脊髄後角におけるニューロンの活性化を可視化・定量評価した。方法としては、単関節炎モデルとして汎用されている海藻由来の 3%カラゲニン 100  $\mu$ L を両後肢膝関節内に投与し、投与後 3 時間、6 時間、12 時間および 24 時間に深麻酔下で灌流固定を行い、脳および脊髄を採取した。採取した試料は、ミクロトームを用いて視床下部視索上核 (SON) ならびに室傍核 (PVN)、L4 脊髄後角を含む切片を作成した。その後、蛍光顕微鏡を用いて c-fos-eGFP 緑色蛍光の発現を観察し、SON、PVN ならびに L4 脊髄後角 I-II 層における c-fos-eGFP 陽性細胞数をカウントした。また、同上の切片を用いて、抗 c-Fos 抗体に対する蛍光免疫組織学的染色を行い、c-fos-eGFP の発現と比較し、TG ラットの有用性を評価した。

(2) Wistar ラットを用いて単関節炎モデルを作成し、膝関節炎の評価ならびに疼痛閾値の評価を行った。方法としては、処置前、3%カラゲニン 100  $\mu$ L を右後肢膝関節内投与後 3 時間、6 時間、12 時間に、膝関節炎の評価として右後肢膝関節の横径変化量の測定、機械刺激に対する痛覚閾値の評価として von Frey test を行なった。

(3) Wistar ラットを用いて単関節炎モデルを作成し、視床下部ならびに脊髄後角における二

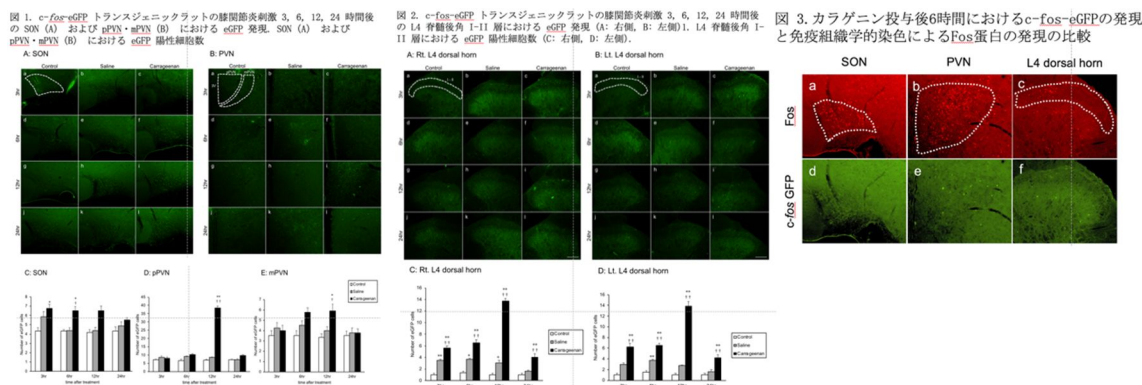
ニューロンの活性化を可視化・定量評価し、さらに視床下部においては OXT、AVP ニューロンならびに副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) ニューロンの活性化および発現量について検討した。方法としては、3%カラゲニン 100  $\mu$ L を右後肢膝関節内投与後 3 時間、12 時間に深麻酔下で灌流固定を行い、脳および脊髄を採取した。採取した試料は、マイクロトームを用いて SON、PVN および L4 脊髄後角を含む切片を作成した。視床下部切片は抗 c-Fos 抗体と AVP もしくは OXT との蛍光免疫組織学的染色を行った。脊髄切片は抗 c-Fos 抗体に対する蛍光免疫組織学的染色を行った。その後、顕微鏡を用いて、SON、PVN ならびに右側 L4 脊髄後角 I-II 層における Fos 陽性細胞数をカウントした。更に、SON ならびに PVN における、OXT ならびに AVP ニューロンの Fos 陽性細胞率を計測した。また、カラゲニン投与後 2 時間、6 時間で断頭を行い、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて SON および PVN における OXT mRNA、AVP hnRNA および CRH mRNA を定量的に評価した。断頭の際に得られた体幹血からは RIA 法により OXT、AVP 濃度を、ELISA 法によりコルチコステロン濃度を測定した。

(4) 野生型マウス (C57BL/6J)、TRPV1KO マウスおよび TRPV4KO マウスを用いて術後疼痛モデルマウスを作成し、視床下部ならびに脊髄後角におけるニューロンの活性化を可視化・定量評価した。方法として、吸入麻酔下に右後肢足底に 5mm の皮膚切開を施し 6-0 ナイロン糸で 1 針縫合した。対照群として野生型マウスの無処置群を設け、野生型マウス、TRPV1KO マウスおよび TRPV4KO マウスの術後疼痛モデル群の 4 群で比較検討を行なった。処置後 2 時間に深麻酔下で灌流固定を行い、脳および脊髄を採取した。採取した試料は、マイクロトームを用いて PVN、視床室傍核 (PVT) および扁桃体中心核 (CeA)、L5 脊髄後角を含む切片を作成した。脳ならびに脊髄切片はペルオキシダーゼ反応を利用した抗 c-Fos 抗体に対する免疫組織学的染色を行なった。その後、顕微鏡を用いて PVN、PVT、CeA ならびに右側 L5 脊髄後角 I-II、III-IV、V 層における Fos 陽性細胞数をカウントした。

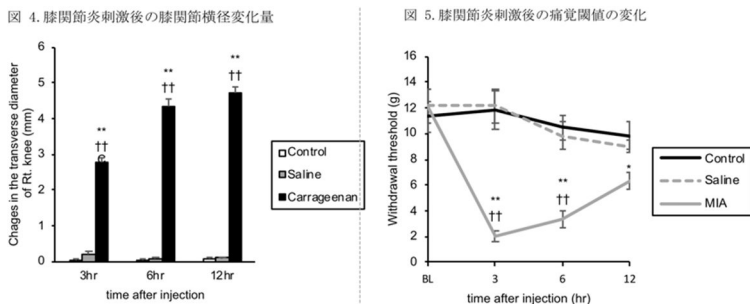
#### 4. 研究成果

方法 (1) ~ (4) に対応して記載する。

(1) カラゲニン投与後の SON、PVN ならびに L4 脊髄後角 I-II 層における c-fos-eGFP 陽性細胞数は対照群と比較し有意に増加し、増加のピークは刺激後 12 時間であった (図 1、2)。しかし、抗 c-Fos 抗体に対する蛍光免疫組織学的染色法との比較では、蛍光免疫組織学的染色法において Fos 陽性細胞数がより多く確認でき、TG ラットの有用性を示すことはできなかった (図 3)。そのため、以降の実験は TG ラットではなく、Wistar ラットを用いて蛍光免疫組織学的染色法による実験へと変更した。



(2) 右後肢膝関節の横径変化量はカラゲニン投与後 3 時間から対照群と比較し有意に高値であり、投与後 6 時間、12 時間においても同様であった (図 4)。また、痛覚閾値はカラゲニン投与後 3 時間、6 時間では対照群と比較し有意に低値であり、投与後 12 時間では回復傾向であったものの無処置群と比較し、いまだ低値であった (図 5)。以上のことから、右後肢膝関節の腫脹は投与後 12 時間でも持続しているものの痛み自体は改善していると考えられた。



(3) 視床下部における Fos 陽性細胞数はカラゲニン投与後 3 時間で対照群と比較し有意に高値であったが、12 時間では対照群と同等の値まで低下していた (図 6)。右側 L4 脊髄後角 I-II 層における Fos 陽性細胞数はカラゲニン投与後 3 時間、12 時間で対照群と比較し有意に高値で



あったが、12 時間ではかなり減少していた（図 7）。カラゲニン投与後 3 時間、12 時間で OXT ならびに AVP ニューロンにおける Fos 陽性率を測定したところ、両ニューロンともカラゲニン投与後 3 時間では対照群と比較し有意に高値であった（図 8, 9）。遺伝子発現レベルを *in-situ* ハイブリダイゼーション法を用いて定量評価した結果、OXT mRNA、AVP hnRNA、CRH mRNA（図 10）の発現レベルはカラゲニン投与後 2 時間、6 時間とも対照群と比較し有意に高値であった。また、血中 OXT、AVP、CORT 濃度もカラゲニン投与後 2 時間、6 時間とも対照群と比較し有意に高値であった。以上から、関節炎に対する抗侵害受容ならびに抗炎症作用のために OXT、AVP、CRH ニューロンが一斉に活性化したと考えられた。

図 6. 膝関節炎刺激後 3, 12 時間の SON (A), mPVN (B) および apPVN (C) における Fos 蛋白の発現。SON (D), mPVN (E), pPVN (F) および apPVN (G) における Fos 陽性細胞数。

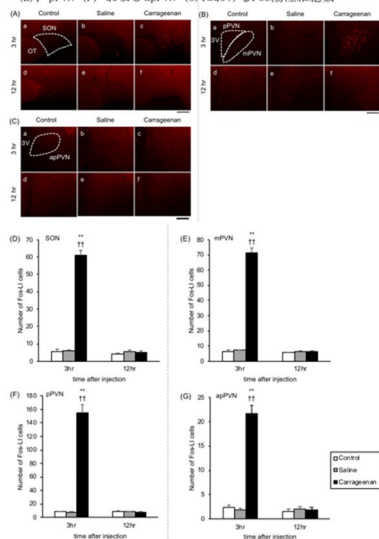


図 7. 膝関節炎刺激後 3, 12 時間の L4 脊髄後角 1-11 層における Fos 蛋白の発現 (A: 右, B: 左)。L4 脊髄後角 1-11 層における Fos 陽性細胞数 (A: 右, B: 左)。

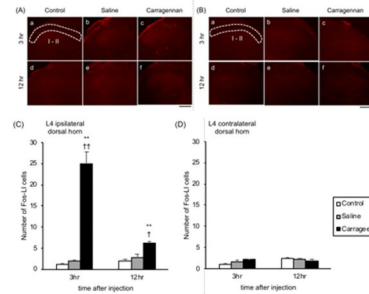


図 8. 膝関節炎刺激後 3, 12 時間の視床下部の OXT ニューロンにおける Fos 陽性細胞数。

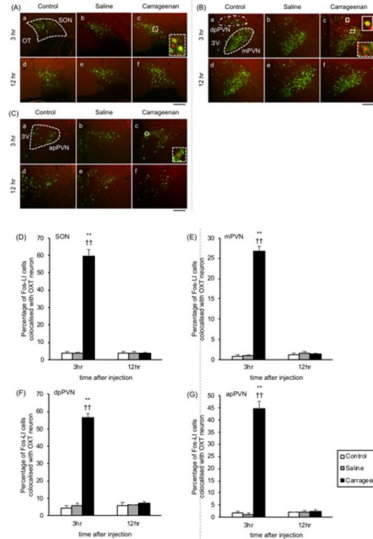


図 9. 膝関節炎刺激後 3, 12 時間の視床下部の AVP ニューロンにおける Fos 陽性細胞数。

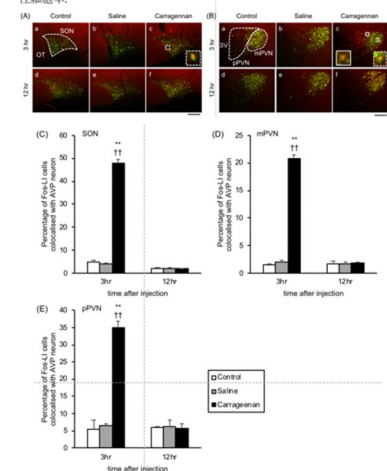
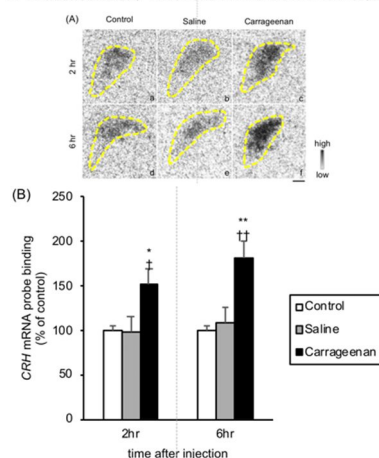


図 10. 膝関節炎刺激後 2, 6 時間の視床下部における CRH mRNA の発現。



(4) PVN における Fos 陽性細胞数は全ての系統のマウスの術後疼痛群で野生型無処置群と比較し有意に高値であった。PVT においては各群間で有意差は認めなかった。CeA においては TRPV1 KO の術後疼痛モデルで野生型無処置群と比較し有意に高値であった。脊髄後角 1-11 層における Fos 陽性細胞数は全ての系統のマウスの術後疼痛群で野生型無処置群と比較し有意に高値であった。一方、111-IV 層においては TRPV1 KO マウスと TROV4 KO の術後疼痛群で野生型無処置群と比較し有意に高値であった。V 層においては TRPV1 KO の術後疼痛モデルで野生型無処置群と比較し有意に高値であった（図 11, 12）。これらの結果から、術後疼痛は脊髄後角 1-11 層における神経細胞の活性化に影響しているが、TRPV1 や 4 が遺伝子欠損することで脊髄後角 111-IV 層における神経細胞の活性化を促すことが示唆された。

図 11. 右後肢足底皮膚切開後 2 時間の右側 L5 脊髄後角、PVN、PVT、CeA における Fos 陽性細胞の発現。

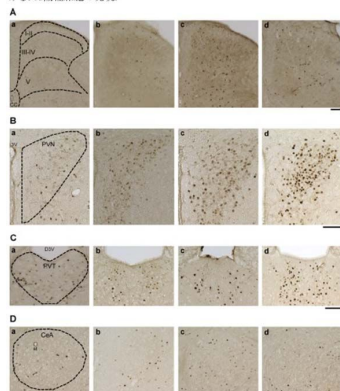
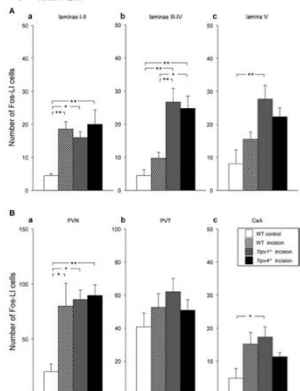


図 12. 右後肢足底皮膚切開後 2 時間の右側 L5 脊髄後角、PVN、PVT、CeA における Fos 陽性細胞数。



## < 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
- Suzuki H, Onaka T, Kasai M, Kawasaki M, Ohnishi H, Otsubo H, Saito T, Hashimoto H, Yokoyama T, Fujihara H, Dayanithi G, Murphy D, Nakamura T, Ueta Y. Response of Arginine Vasopressin-Enhanced Green Fluorescent Protein Fusion Gene in the Hypothalamus of Adjuvant-Induced Arthritic Rats. *Journal of Neuroendocrinology* 21, 2009, 183-190
- 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* 27, 2015, 636-646
- 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* 28, 2016
- Ishikura T, Suzuki H, Yoshimura M, Ohkubo J, Katoh A, Ohbuchi T, Ohno M, Fujiwara H, Kawasaki M, Ohnishi H, Nakamura T, Ueta Y. Expression of the c-fos-monomeric red fluorescent protein 1 fusion gene in the spinal cord and the hypothalamic paraventricular nucleus in transgenic rats after nociceptive stimulation. *Brain Research* 1479, 2012, 52-61
- Ishikura T, Suzuki H, Shoguchi K, Koreeda Y, Aritomi T, Matsuura T, Yoshimura M, Ohkubo J, 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* 118, 2015, 7-16
- 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. 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. *Neuroscience* 356, 2017, 64-77

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 3 件)

Motojima Y, Nishimura H, Ueno H, Sonoda S, Nishimura K, Tanaka K, Saito R, Yoshimura M, Maruyama T, Matsuura T, Suzuki H, Kawasaki M, Ohnishi H, Sakai A, Ueta Y. Role of Trpv1 and Trpv4 in surgical incision-induced tissue swelling and Fos-like immunoreactivity in the central nervous system of mice. 査読有り, *Neuroscience Letters*, 678: 76-82, 2018. DOI: 10.1016/j.neulet.2018.05.001.

Nishimura H, Kawasaki M, Suzuki H, Matsuura T, Motojima Y, Ohnishi H, Yamanaka Y, Yoshimura M, Maruyama T, Saito R, Ueno H, Sonoda S, Nishimura K, Onaka T, Ueta Y, Sakai A. Neuropathic pain upregulates hypothalamo-neurohypophysial and hypothalamo-spinal oxytocinergic pathways in oxytocin-monomeric red fluorescent protein 1 transgenic rat. 査読有り, *Neuroscience*, 406: 50-61, 2019. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2019.02.027.

松浦孝紀、元嶋尉士、川崎展、大西英生、酒井昭典、上田陽一、下垂体後葉ホルモン・オキシトシンと疼痛ならびに炎症調節作用との関連 (総説) 査読なし、*産業医科大学雑誌*、38巻4号、P325-334, 2016

### 〔学会発表〕(計 5 件)

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・学術集会、2016 年

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、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、第 61 回日本リウマチ学会・学術集会、2017 年

西村春来、川崎展、元嶋尉士、鈴木仁士、大西英生、吉村充弘、丸山崇、齋藤玲子、上野啓通、園田里美、西村和朗、田中健太郎、上田陽一、酒井昭典、オキシトシン-mRFP1 トランスジェニックラットを用いた神経障害性疼痛モデルにおける中枢神経系生理活性について、第 40 回日本疼痛学会、2018 年

西村春来、川崎展、元嶋尉士、鈴木仁士、大西英生、上田陽一、c-fos-eGFP トランスジェニックラットを用いた膝関節炎モデルにおける中枢神経系生理活性の解明、第 62 回日本リウマチ学会・学術集会、2018 年

Kawasaki M, Nishimura H, Matsuura T, Suzuki H, Ohnishi H, Yamanaka Y, Ueta Y, Sakai A, Neuropathic Pain Upregulates the Hypothalamo-neurohypophysial/-spinal Oxytocinergic Pathways in the Oxytocin-mRFP1 Transgenic Rat. 65<sup>th</sup> Orthopaedic Research Society, 2019

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：上田 陽一

ローマ字氏名：UETA, Yoichi

所属研究機関名：産業医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号：10232745

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：鈴木 仁士

ローマ字氏名：SUZUKI, Hitoshi

研究協力者氏名：大西 英生

ローマ字氏名：OHNISHI, Hideo

研究協力者氏名：酒井 昭典

ローマ字氏名：SAKAI, Akinori

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。