

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19591771

研究課題名（和文） 関節炎発症における中枢・末梢応答の遺伝子改変動物を用いた可視的評価と病態解明

研究課題名（英文） Visible evaluation and pathologic clarification for response at central nervous system and peripheral tissue in arthritis of transgenic animal.

研究代表者：大西英生 (OHNISHI HIDEO)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：20279342

研究成果の概要：関節リウマチの動物モデルラットでは、体液を保持する働きがあるホルモンのバソプレシンと新陳代謝の制御や免疫反応に関わるホルモンのコルチコステロンの血液中濃度が上昇した。この機序として、下垂体後葉から分泌されるバソプレシンが、副腎皮質刺激ホルモンの分泌刺激を通してコルチコステロン濃度を上昇させることを、視床下部バソプレシン分泌神経細胞と神経線維が緑色に光る遺伝子を導入したラットを用いて明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：関節炎、遺伝子改変動物、バソプレッシン、ストレス、緑色蛍光タンパク

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 関節リウマチ(RA) は多関節炎・関節痛を主徴とする全身性の慢性炎症性疾患であり、その病態は滑膜組織に対する原因不明の自己免疫疾患と考えられている。関節炎が生じている局所では、炎症細胞(活性化したT細胞)の浸潤、免疫反応を介した多量のケミカルメディエーター(TNF, IL-1, IL-6などの炎症性サイトカイン)の産生、血管新生、滑膜増殖、関節破壊などが見られる。

一方、RA 患者において内在性副腎皮質ホルモン分泌の日内変動の消失、ストレスに対する脆弱性などの神経内分泌系の異常が見られる。

これまでに、関節炎モデル動物(アジュバン

ト関節炎(AA)ラット)を用いて①血中副腎皮質ホルモン分泌の異常亢進、②ACTH 分泌亢進にも関わらず視床下部 corticotropine-releasing hormone (CRH)産生が抑制されていること、③ACTH 分泌亢進には視床下部バソプレッシン(AVP)産生の亢進や下垂体内でのサイトカイン産生が関与していることが報告されている。

(2) 研究分担者の上田らが作成に成功した AVP-enhanced green fluorescent protein (eGFP)トランスジェニックラットは、細胞工学的手法を用いて *in vivo* の状態でも視床下部 AVP ニューロンおよびその神経線維を eGFP の緑色蛍光によって同定できることが特徴である(Ueta *et al.*, 2005)。本トランスジ

エニックラットは AVP ニューロンにおける eGFP 遺伝子発現および緑色蛍光が種々のストレス刺激(例えば、副腎摘除やエンドトキシンショック)によって敏感に変動する (Shibata *et al.*, 2007)ことをすでに報告している。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、AVP-eGFP トランスジェニックラットを用いてアジュバント関節炎(AA)を作成し、神経内分泌系の反応(特に視床下部-下垂体-副腎系の反応)を eGFP の緑色蛍光を指標に視覚的に評価する方法を確立し、RA における病態を神経内分泌系の視点から解明することである。

## 3. 研究の方法

(1) AVP-eGFP トランスジェニックラットの尾部皮内に 1 mg の結核死菌を接種する。抗原接種 1 日、15 日および 22 日目に断頭し体幹血、脳、下垂体、脾臓および胸腺を採取する。脳と下垂体はドライアイス上で凍結させ、クリオスタットで視床下部神経核(視索上核および室傍核)を含む 12  $\mu$ m の凍結脳切片を作成する。eGFP ならびに CRH mRNA レベルをその神経活動の指標とし、<sup>35</sup>S を使用した RI ラベリングを行い、切片の eGFP と CRH mRNA に相補的なオリゴヌクレオチドプローブを使用し *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) 法を行う。mRNA 発現細胞を同定できるように X 線フィルムに感光させ、イメージアナライザー (MCID 画像解析装置) で定量評価する。フィルムオートラジオグラフィ法に続いて ISH 法を行った切片上に直接乳剤を塗布して感光させ、乳剤オートラジオグラフィ法にて mRNA を可視化する。また、体幹血はラジオイムノアッセイ法で AVP およびコルチコステロン濃度を測定する。

(2) 上記と同様の方法で AVP-eGFP トランスジェニックラットに AA を発症させる。抗原接種 22 日後に灌流固定し、脳と下垂体を採取する。ホルマリン固定の後にマイクロトームで視索上核、室傍核、ならびにこれらの核に局在する細胞体から軸索の投射を受ける正中隆起を含む 30  $\mu$ m の脳切片を作成し、蛍光顕微鏡を用いて AVP-eGFP 細胞の発現を観察する。

(3) 急性疼痛ストレスモデルとして 5% ホルマリン溶液を AVP-eGFP トランスジェニックラットの足底部に皮下注射する。①皮下注射 15 分後、2 時間後、6 時間後の室

傍核における eGFP mRNA、CRH mRNA の発現の変化を (1) と同様 *in situ* ハイブリダイゼーション法で検出する。また、検体採取の際に体幹血を採取し、血中 AVP 濃度を測定する。

②皮下注射 6 時間後に灌流固定し、(2) と同様に室傍核、正中隆起、下垂体後葉における eGFP 蛍光の変化を観察する。

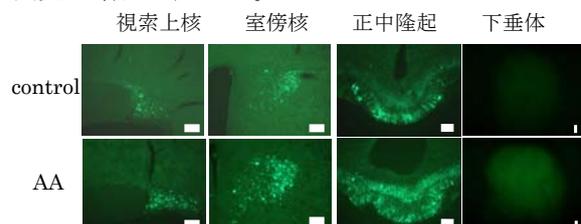
## 4. 研究成果

(1) ①抗原接種 10 日後より AVP-eGFP トランスジェニックラットは AA を発症し、以降体重の増加が見られなくなった。抗原接種 1 日後では血中 AVP 濃度に変化を認めなかったが、AA を発症している 15 日後と 22 日後では血中 AVP 濃度の有意な上昇を認めた。一方、血中コルチコステロン濃度は抗原接種 1 日後から上昇し、AA を発症した 15 日後と 22 日後でも上昇したままであった。

②抗原接種 15 日および 22 日後では脾臓は肥大し、胸腺は萎縮していた。

③視索上核および室傍核における eGFP mRNA レベルは抗原接種後 15 日および 22 日で有意に上昇する一方、CRH mRNA レベルは 15 日および 22 日で有意に低下していた。また、室傍核における eGFP mRNA レベルは、大細胞群と小細胞群の両方において増加を認め、特に大細胞群に有意な増加を認めた。

(2) 抗原接種 22 日後には視索上核、室傍核、正中隆起ならびに下垂体後葉において eGFP 蛍光の増強を認めた。また、室傍核は (1) ③と同様に、大細胞群と小細胞群の両方で eGFP 蛍光が増強し、大細胞群の方で有意であった。正中隆起においても、大細胞群から軸索の投射を受ける内層と小細胞群から軸索の投射を受ける外層の両方において蛍光の増強を認めた。

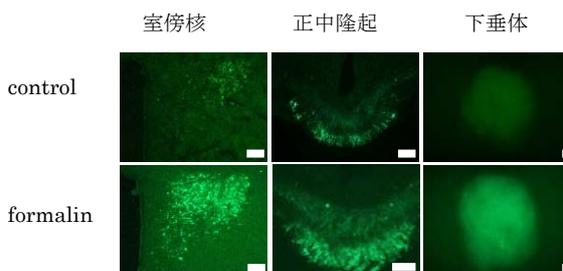


以上の結果から、①AA では血中 AVP とコルチコステロン濃度が増加すること、②脾臓は炎症性に脾腫を来す一方、胸腺は血中コルチコステロン濃度に鋭敏に反応して萎縮すること、③血中コルチコステロン濃度の上昇には室傍核 CRH でなく、室傍核小細胞群由来の AVP が関与していること、④室傍核大細胞群由来の AVP は血中 AVP 濃度の上昇に関与し、過去の報告 (Berson *et al.*, 1983, Berkowitz *et al.*, 1982) より疼痛閾値の変化

に關与している可能性、を見出した(Suzuki *et al.*, 2009)。

(3) ①血中 AVP 濃度は皮下注射 15 分後に著明に上昇し、2 時間および 6 時間後には正常化していた。室傍核における eGFP mRNA レベルは皮下注射 15 分後では変化を認めなかったが、2 時間および 6 時間後では有意に発現が増加した。また、室傍核の大細胞群と小細胞群の両方で eGFP mRNA レベルが増加したが、特に小細胞群での増加が著明であった。室傍核における CRH mRNA レベルは皮下注射 2 時間後に上昇したが、15 分および 6 時間後では有意な変化を認めなかった。

②室傍核における eGFP 蛍光は大細胞群と小細胞群の両方で増強し、小細胞群の増強が著明であった。正中隆起においても、内層および外層で蛍光の増強を認めたが、外層の増強が有意であった。下垂体後葉でも蛍光の増強が見られた。



(4) 以上の結果から、AVP はストレス応答に密接に關連しており、視床下部-下垂体-副腎軸の賦活化に重要な役割を担うことが示唆された。また、急性疼痛ストレスと慢性炎症・疼痛ストレスではその発現様式に違いを認めることが明らかとなった。

## 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 6 件)

- 1) 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. (2009) Response of arginine vasopressin-enhanced green fluorescent protein fusion gene in the hypothalamus of adjuvant-induced arthritic rats. *Journal of Neuroendocrinology* 21(3):183-190 査読あり

- 2) Hashimoto, H. Kitamura, K. Kawasaki, M. Saito, T. Suzuki, H. Otsubo, H. Ohbuchi, T. Yokoyama, T. Fujihara, H. Takei, Y. & Ueta, Y. (2008) Adrenomedullin 2 / intermedin-like immunoreactivity in the hypothalamus and brainstem of rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 139(1-2):46-54 査読あり

- 3) Shibata, M. Mondal, MS. Date, Y. Nakazato, M. Suzuki, H. & Ueta, Y. (2008) Distribution of orexins-containing fibers and contents of orexins in the rat olfactory bulb. *Neuroscience Research* 61(1): 99-105 査読あり

- 4) Hashimoto, H. Fujihara, H. Kawasaki, M. Saito, T. Shibata, M. Otsubo, H. Takei, Y. & Ueta, Y. (2007) Centrally and peripherally administered ghrelin potently inhibits water intake in rats. *Endocrinology* 148(4):1638-1647 査読あり

- 5) Hashimoto, H. Hyodo, S. Kawasaki, M. Shibata, M. Saito, T. Suzuki, H. Otsubo, H. Yokoyama, T. Fujihara, H. Higuchi, T. Takei, Y. & Ueta, Y. (2007) Adrenomedullin 2 (AM2)/intermedin is a more potent activator of hypothalamic oxytocin-secreting neurons than AM possibly through an unidentified receptor in rats. *Peptides* 28(5): 1104-1112 査読あり

- 6) Mera, T. Fujihara, H. Saito, J. Kawasaki, M. Hashimoto, H. Saito, T. Shibata, M. Onaka, T. Tanaka, Y. Oka, T. Tsuji, S. Ueta, Y. (2007) Downregulation of prolactin-releasing peptide gene expression in the hypothalamus and brainstem of diabetic rats. *Peptides* 28(8): 1596-1604 査読あり

[学会発表] (計 10 件)

- 1) Suzuki, H. Kasai, M. Kawasaki, M. Ohnishi, H. Otsubo, H. Saito, T. Hashimoto, H. Yokoyama, T. Fujihara, H. Nakamura, T. & Ueta, Y. (2008 年 3 月 16-20 日) The expression of the hypothalamic feeding-regulating peptides genes in adjuvant-induced arthritic rats. 9<sup>th</sup> International NPY Meeting, Okinawa, Japan
- 2) Suzuki, H. Kawasaki, M. Ohnishi, H. Otsubo, H. Yokoyama, T. Fujihara, H. Dayanithi, G. Murphy, D. Nakamura, T. & Ueta, Y. (2008 年 7 月 18-19 日) Response of arginine vasopressin-enhanced green fluorescent protein fusion gene in the

hypothalamus of formalin-induced nociceptive stimulated rats. The 3<sup>rd</sup> Asian Pain Symposium, Fukuoka, Japan

3) Suzuki, H. Kawasaki, M. Ohnishi, H. Otsubo, H. Ohbuchi, T. Hashimoto, H. Yokoyama, T. Fujihara, H. Dayanithi, G. Murphy, D. Nakamura, T. & Ueta, Y. (2008年11月15-19日) Effects of formalin-induced nociceptive stimulation in the hypothalamus of arginine vasopressin-enhanced green fluorescent protein transgenic rats. Society for Neuroscience Annual Meeting, Washington DC, USA

4) Suzuki, H. Onaka, T. Kasai, M. Kawasaki, M. Ohnishi, H. Otsubo, H. Fujihara, H. Nakamura, T. Dayanithi, G. Murphy, D. & Ueta, Y. (2007年11月3-7日) Response of arginine-enhanced green fluorescent protein fusion gene in the hypothalamus of adjuvant-induced arthritic rats. Society for Neuroscience 36th Annual Meeting, San Diego, California

5) Saito, T. Dayanithi, G. Watanabe, T. X. Urabe, T. Hashimoto, H. Suzuki, H. Yokoyama, T. Fujihara, H. Onaka, T. Hirata, Y. & Ueta, Y. (2007年11月3-7日) Salusin-b evoked the neurohypophyseal hormone release from the neurohypophysis. Society for Neuroscience 36th Annual Meeting, San Diego, California

6) 鈴木 仁士、尾仲 達史、笠井 聖仙、川崎 展、大西 英生、藤原 広明、Govindan Dayanithi、David Murphy、中村 利孝、上田 陽一 (2007年10月19-20日) バゾプレッシン(AVP)-eGFPトランスジェニックラットを用いたアジュバント関節炎におけるAVPの役割の検討、第58回西日本生理学会、福岡

7) 鈴木 仁士、尾仲 達史、笠井 聖仙、川崎 展、大西 英生、大坪 広樹、藤原 広明、Govindan Dayanithi、David Murphy、中村 利孝、上田 陽一 (2007年9月1日) アジュバント関節炎におけるバゾプレッシン(AVP)の役割：AVP-eGFPトランスジェニックラットを用いた検討、第7回日本内分泌学会九州地方会、福岡

8) 川崎 展、齋藤 淳、橋本 弘史、鈴木 仁士、大坪 広樹、藤原 広明、上田 陽一 (2007年3月20-22日) 急性浸透圧刺激時のラット下垂体後葉におけるガラニン様ペプチド遺伝子発現、第84回日本生理学会、大阪

9) 橋本 弘史、兵藤 晋、川崎 展、齋藤 健、大坪 広樹、藤原 広明、樋口 隆、竹井 祥郎、上田 陽一 (2007年3月20-22日) アドレノメデュリン2の神経内分泌系への作用のアドレノメデュリンとの比較、第84回日本生理学会、大阪

10) 橋本 弘史、藤原 広明、川崎 展、柴田 美雅、齋藤 健、大坪 広樹、竹井 祥郎、上田 陽一 (2007年3月19日) ラットの中脳および末梢に投与したグレリンの飲水への影響、第3回環境生理学プレコングレス、大阪

#### 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・講師  
研究者番号：20279342

##### (2) 研究分担者

##### (3) 連携研究者

中村 利孝 (NAKAMURA TOSHITAKA)  
産業医科大学・医学部・教授  
研究者番号：50082235

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

田中 伸哉 (TANAKA SHINYA)  
産業医科大学・医学部・助教  
研究者番号：20412645