

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07747

研究課題名(和文) 痛み行動の性差発現における分界条床核背外側CRHニューロンの役割

研究課題名(英文) Role of CRH neurons in the dorsolateral subdivision of the bed nucleus of the stria terminalis (BSTDL) in sex differences in pain behavior

研究代表者

萩原 裕子 (Hagiwara, Hiroko)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：90468207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：痛み行動の性差発現に分界条床核背外側部のCRHニューロンの関与を検討するため、CRHニューロンを選択的に時間分解能が優れた方法で操作することによりホルマリンテスト行動への影響について検討した。ラットの分界条床核背外側部にAAVを投与し、同時に、光ファイバーを留置し、光ファイバーの先端から特定波長の光を照射しCRHニューロンを興奮、もしくは抑制させ、行動の変化を観察することを目的とした。しかし、実験方法の確立やウィルスの感染性の同定などに時間がかかり、また、光刺激が出力されたか否かの確認がin vitro とin vivoで異なることが推測されたので、これ以上実験を遂行することが困難と思われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

痛み研究は脊髄レベルでの研究が多く報告されている。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、情動における中枢神経内のメカニズムに関する研究は少ない。本研究はBSTLのCRHニューロンが痛み行動の性差発現にどのような役割を演じているかを解明することにある。時間的分解能の高い光遺伝学手法を用い、痛み刺激により起こる分子レベルでの変化と行動をつなげることにより、痛み行動とその分子基盤とが明らかになることが期待される。痛み行動の性差において、BSTLでのCRHニューロンの役割の確立が期待される先駆的な研究である。

研究成果の概要(英文)：To investigate the involvement of CRH neurons in the dorsolateral subdivision of the bed nucleus of the stria terminalis (BSTDL) in sex differences in pain behavior, we examined the effects on formalin test by selectively manipulating CRH neurons in a manner with high temporal resolution. We tried to establish that injection of AAV into the BSTDL, and at the same time, implanted an optical fiber. To irradiate light of a specific wavelength from the tip of the optical fiber might excite or inhibit CRH neurons during the behavior. However, it took time to establish the experimental method and to identify the infectivity of the virus, and it was also presumed that the confirmation of whether or not the optical stimulation was successful would differ between in vitro and in vivo, so it seemed difficult to carry out the experiment further.

研究分野：疼痛学

キーワード：疼痛 性差 分界条床核 AAV CRHニューロン formalin test

1. 研究開始当初の背景

痛み反応は、身体の損傷に対する警告であり、さらなる損傷を回避するためにも、生存する上で重要な生体応答である。また、痛みは単純な感覚として受容されるのみならず、極めて多様な側面を持っており、逆に様々な事象は、痛み行動に影響を及ぼす。さらに、扁桃体が関与する情動が、下行性疼痛抑制系に影響を及ぼしていることも示唆されている。このような痛みの情動的側面は (Minami, 2009)、その多様な面があるゆえに、研究を困難にしている。

性差も痛み反応や情動などに様々な側面を持ち、例えば、男性よりも女性の方が痛みに敏感であることが報告されている (Mogil and Chanda, 2005)。しかし、痛みの性差について研究されてはいるものの、中枢神経系メカニズムに関する研究は極めて少ない。そこで、痛みは情動を形成し、情動が痛みを調節する中枢メカニズムを性差からアプローチすることを考えた。これまでの研究により、我々に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、特徴のある研究となると考えた。我々は、これまでの研究で、痛み刺激としてホルマリンテストを用い、一度痛みが抑制される時期に性差が認められること、その時期に分界条床核背外側部 (BSTDL) で雌性特異的に CREB のリン酸化が起こることを明らかにした (Hagiwara et al., European Journal of Neuroscience, 2009)。また、同部位は Corticotropin-releasing hormone (CRH) ニューロンが局在している特徴的な領域でもある。そこで、BSTDL における CRH ニューロン活動の変化と痛みの関係について電気生理学的に検討し、ホルマリン投与により行動上性差のある時期においてのみ、雌性マウス BSTDL における CRH ニューロンでの miniature Excitatory Postsynaptic Current (mEPSC) 頻度が増加し、有意な性差があることを発見した (Hagiwara et al., Brain Res, 2021)。

以上の結果から、痛み行動の性差発現に BSTDL の CRH ニューロンが重要な役割を演じていると考えている。そこで分子基盤と行動発現がどのように関連しているのか、BSTDL における CRH ニューロンの神経活動を高い時間精度で選択的に操作することが必要となった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、BSTDL の CRH ニューロンが痛み行動の性差発現にどのような役割を演じているか解明することにある。遺伝子改変動物やウイルスベクターを用いて、BSTDL の CRH ニューロンが痛み行動に関与しているのかどうかを、性差をキーワードに検討する。痛み刺激により起こる分子レベルでの変化 (CRH ニューロンの選択的な活動操作) と行動 (ホルマリンテストによる痛み行動観察) をつなげることにより、痛み行動とその神経基盤が明らかになることが期待される。本研究は、我々の得意とする性差の観点から、痛み行動の性差における BSTDL での CRH ニューロンの役割の確立に寄与することが期待される。

3. 研究の方法

行動実験において、(1) 自由行動下で痛み行動を観察するには、マウスよりも大型であるラットの方が有利であること、(2) マウスと比較してラットの痛み行動はより明瞭な性差が認められること、(3) その性差はホルマリンテストの中間相 = 短時間に認められるこ

とから、本研究には CRH-Cre ラット (RRRC:00852) を使用し、時間分解能の高い光遺伝学手法を用いて検討する。このラットは、Cre リコンビナーゼが CRH プロモーターにより誘導されるトランスジェニックラットであり、BSTDL の CRH ニューロンに限局して Cre が発現することが報告されている (Matthew et al., 2015)。そして、Adeno associated virus (AAV) をもちいた遺伝子導入によって光応答性タンパク質を CRH ニューロンに発現させる。この AAV は、目的とする蛋白質とマーカーとなる蛍光物質のフュージョン蛋白質の遺伝子が loxP 配列に挟まれた状態で逆向きに挿入されているため、通常では機能しない。しかし、Cre 蛋白質が発現している細胞に感染すると loxP で挟まれた配列が反転し、導入遺伝子が発現するようになる (DIO システム)。痛み行動の指標として、ホルマリンテストを用いた。ホルマリンテストは雌雄マウスの右後肢背足に 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に入れる。投与後 0 分後から 60 分までの行動を観察し、各 5 分間に足を上げている時間を記録する。

実験 1 オプトジェネティクス (光遺伝学) による検討

雌雄のラットに、AAV をもちいた遺伝子導入によって光応答性タンパク質を CRH ニューロンに発現させ、目的とする BSTDL に光を照射し、痛み行動の応答変化を検討する。CRH-Cre ラットの BSTDL に脳定位固定装置を用いて、①AAV-EF1a-DIO-hChR2(C128s/D156A)-EYFP (AAV9) (addgene,#35503)、もしくは、②AAV-EF1a-DIO-eNpHR3.0-EYFP (AAV9) (addgene,#26966) を投与する。同時に、光ファイバーを脳に挿入留置し、BSTDL に光ファイバーの先端を固定する。脳手術 1 ヶ月後、ホルマリンテストを行い、光ファイバーの先端から特定波長の光を照射し CRH ニューロンを興奮、もしくは抑制させ、行動の変化を観察する。

実験 2 性腺ステロイドホルモンの影響—オプトジェネティクス (光遺伝学) による検討

性腺を摘出した雌雄の CRH-Cre ラットにエストロゲンとしてエストラジオール (E2) もしくは、テストステロン (Test) を補充した CRH-Cre ラットを用いる。ラットの BSTDL に脳定位固定装置を用いて、①AAV-EF1a-DIO-hChR2(C128s/D156A)-EYFP (AAV9) (addgene,#35503)、もしくは、②AAV-EF1a-DIO-eNpHR3.0-EYFP (AAV9) (addgene,#26966) を投与し、同時に、光ファイバーを脳に挿入留置し、BSTDL に光ファイバーの先端を固定する。脳手術 1 ヶ月後、ホルマリンテストを行い、光ファイバーの先端から特定波長の光を照射し CRH ニューロンを興奮、もしくは抑制させ、行動の変化を観察する。

実験 3 TRECK 法 (ジフテリア毒素受容体介した細胞ノックアウト法) の応用による検討

BSTDL の CRH ニューロンをターゲットに Toxin Receptor-mediated Cell Knockout (TRECK 法) を応用して、痛み行動と性差の関係を調べる。CRH-Cre ラットの BSTDL に、脳定位固定装置を用いて、AAV9-mCherry-Flex.dtA (Virus Vector Core, #4196) を投与する。この AAV 投与により Cre 依存的に FLEX で挟まれた遺伝子が逆転し、dtA (diphtheria toxin fragment A) が機能的に発現する。その結果、その細胞だけを消去することができる。実験には、雌雄の CRH-Cre ラット、もしくは、性腺摘除後に E2 または、Test を補充した CRH-Cre ラットを用いる。ラットの BSTDL における CRH ニューロンのみを消去し、投与 1 ヶ月後に実験 1 と同様の条件下でホルマリンテストを行う。

4. 研究成果

全ての実験には、CRH-Cre ラット (RRRC:00852) を用いた。まず、CRH-Cre ラットの BSTDL に脳定位固定装置を用いて、①AAV-EF1a-DIO-hChR2(C128s/D156A)-EYFP (AAV9) (addgene,#35503)、もしくは、②AAV-EF1a-DIO-eNpHR3.0-EYFP (AAV9) (addgene,#26966) を局所投与し、AAV が感染し Cre によって目的の遺伝子が発現した細胞が CRH ニューロンであることを in situ hybridization 法を用いて確認した。すでに、B6(Cg)-Crh^{tm1(cre)Zjh}/J マウスの同様のウイルスを BSTDL に局所投与した実験では、AAV が感染し Cre によって目的の遺伝子が発現した細胞の約 92%が CRH ニューロンであることを確認していた。しかし本実験で使用したラットでは、ウイルスを局所投与した BSTDL において、YFP 発現が認められなかった。そこで、AAV が感染し Cre によって目的の遺伝子が発現した可能性のある細胞に対して YFP 抗体を用いて免疫染色法を行ったところ、YFP の発現が認められた(図1)。このことから、BSTDL へのウイルスを局所投与により、AAV が感染していることが示唆された。また、同様のウイルスを使用したマウスでは十分な感染力と発現量を示していることを考えると、本ラットにおける BSTDL での Transfection 効率に問題がある可能性が考え、セロタイプなどを再検討したが実験に使用できるウイルスの発見には至らなかった。そのため、感染した細胞への YFP 抗体を用いた免疫染色後、もしくは前に、in situ hybridization 法を用いた CRH ニューロンの同定(図2:CRH mRNA 陽性細胞の確認:ISH 法単独)を行ったが同時検出は困難を極めた。さらに、連続切片を作成しそれぞれの切片で免疫染色法と in situ hybridization 法を行い、合成させる方法も検討したが困難を極め同定には至らなかった。

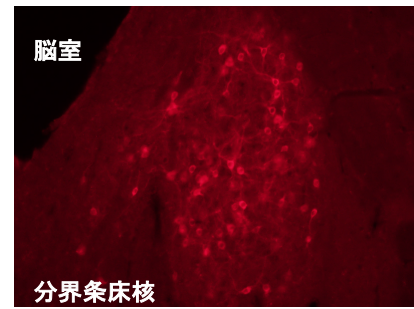


図1

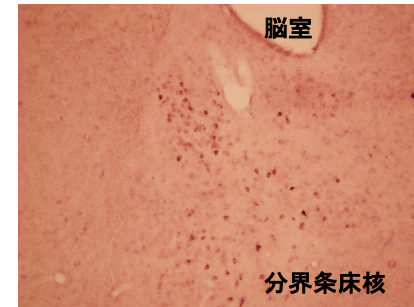


図2

行動実験のため、CRH-Cre ラットの BSTDL に脳定位固定装置を用いて、①AAV-EF1a-DIO-hChR2(C128s/D156A)-EYFP (AAV9) (addgene,#35503)、もしくは、②AAV-EF1a-DIO-eNpHR3.0-EYFP (AAV9) (addgene,#26966) を投与した。同時に光

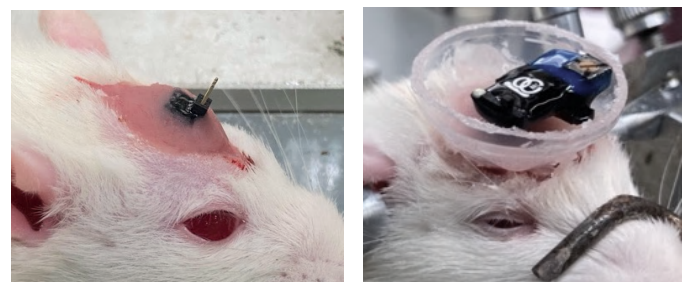
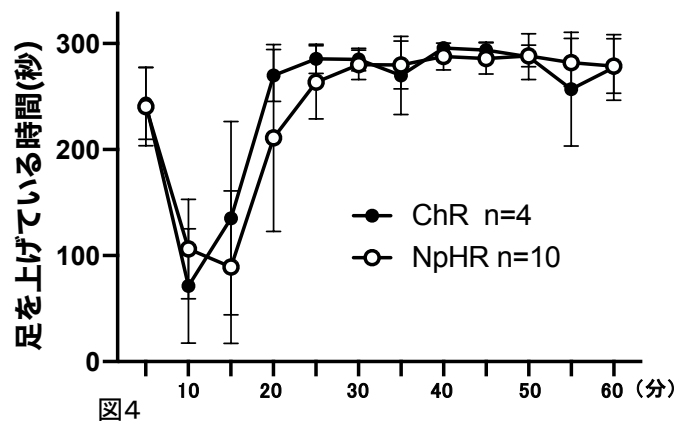


図3

ファイバーを脳に挿入留置し、BSTDL に光ファイバーの先端を固定した(図3:左)。オプトジェネティクスの装置として、バイオリサーチ株式会社が開発した「テレオプト」を実験に供した。テレオプトは無線式光照射装置で、送信機がパルスジェネレーターの入力を受け、赤外線信号を照射し、小型の赤外線受信機が赤外線信号を受信してLEDを点灯させる。そのLEDの光は集光されてプラスチック光ファイバーに導かれ、先端から導出される仕組みである。脳への光ファイバーの固定法においても、固定後の安静期間中に動物自身による脱落などの問題点があり、カバーを設置するなどの対策をとった(図3:右、テレオプト装着中)。脳手術1ヶ月後、ホルマリンテストを行い、光ファ

イバーの先端から特定波長の光を照射した。照射条件は、ホルマリン投与により痛みの性差が認められた投与 10 分後に①は、470 nm で 2 s 刺激、②は、590 nm で 10 min 光刺激を与えることで CRH ニューロンを興奮、もしくは抑制させ、行動の変化を観察したがウイルス投与による影響は認められなかった。また、行動実験後にフ



アイバーから光刺激が出力されたか否かの確認を行ったが、in vitro と in vivo で異なることが推測されたためこれ以上の実験を遂行することが困難と思われ実験を中止した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hagiwara Hiroko, Sakimura Kenji, Abe Manabu, Itoi Keiichi, Kamiya Yoshinori, Akema Tatsuo, Funabashi Toshiya	4. 巻 1773
2. 論文標題 Sex differences in pain-induced modulation of corticotropin-releasing hormone neurons in the dorsolateral part of the stria terminalis in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 147688 ~ 147688
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2021.147688	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 萩原裕子	4. 巻 56(1)
2. 論文標題 痛み行動の性差発現における分界条床核外側部CRHニューロンの役割	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 月刊細胞	6. 最初と最後の頁 47-51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	船橋 利也 (Funabashi Toshiya) (70229102)	聖マリアンナ医科大学・医学部・教授 (32713)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------