

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月3日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591964

研究課題名（和文） 遺伝子改変動物を用いた外傷および関節炎における疼痛・ストレス反応の分子基盤の解明

研究課題名（英文） Molecular basis clarification for pain and stress reaction in injury and arthritis of transgenic animals.

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（和文）：

本研究課題では、急性疼痛ストレスにおける中枢神経系（視床下部-下垂体-副腎系および脊髄後角の反応）および末梢（炎症部位）での疼痛・ストレス受容反応の分子基盤を疼痛受容と神経内分泌反応との機能連関という視点での解明を目的とした。具体的には、(1)急性疼痛ストレスモデルであるホルマリンテストによる視床下部における神経内分泌反応を明らかにした。(2)ニューロンの活動性の指標として汎用される前初期遺伝子の脊髄後角や視床下部室傍核における動態を明らかにした。(3)疼痛機序において、痛み・酸・温度センサーとして注目されているtransient receptor potentialをはじめとした受容体活性化型Ca<sup>2+</sup>チャネルの疼痛受容反応における役割を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of the study was to examine the relationship between acceptance of nociceptive stress at peripheral tissue and response against the stress at the central nervous system. We obtained significant results as follow. (1)Formalin test which was acute nociceptive stress model induced rapid neuroendocrine response in the hypothalamus. (2)Immediate early gene expression which was widely used for indication of activated of neurons was observed in the dorsal horn of the spinal cord and the hypothalamic paraventricular nucleus after nociceptive stress. (3) Receptor-activated Ca<sup>2+</sup>-channels such as transient receptor potential involved in processing nociceptive stress in the peripheral tissue.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	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：疼痛ストレス、遺伝子改変動物、前初期遺伝子、赤色蛍光タンパク、視床下部室傍核、脊髄後角

## 1. 研究開始当初の背景

骨折や火傷などの外傷では局所で炎症細胞（好中球）の浸潤、ヒスタミンやセロトニンの放出による局所の腫脹とともに、ブラジキニンやプロスタグランディン E<sub>2</sub> の産生によって疼痛が誘発される。

これらの疼痛機序において、痛み・酸・温度センサーとして注目されているtransient receptor potential V1 (TRPV1)やV4 (TRPV4)をはじめとした受容体活性化型Ca<sup>2+</sup>チャネルが後根神経節 (DRG) 細胞における疼痛受容に関与すると考えられている。この受容体の興奮はDRG細胞（一次求心性ニューロン）から脊髄後角（二次求心性ニューロン）に伝達されるが、この際に転写調節因子でニューロンの活動性の指標として汎用される*c-fos*の発現が脊髄後角において増加することが確認されており、末梢での疼痛刺激が一次・二次求心性ニューロンを経て中枢へ伝達されると考えられている。

申請者らは、これまでに疼痛モデル動物における全身性の反応である視床下部-下垂体-副腎系の変化について遺伝子改変動物（バゾプレッシン (AVP) -eGFP トランスジェニックラット）を用いて解析を行ってきた。

本研究では、疼痛が生じている局所における疼痛受容と視床下部-下垂体-副腎系の機能関連を明らかにするために、AVP-eGFP トランスジェニックラットに加え、ニューロンの活動性の指標として汎用される*c-fos*を赤色蛍光タンパク (monomeric Red Fluorescent Protein: mRFP) で標識することによりニューロンの活性化を生細胞で可視化することを可能にしたトランスジェニックラットを用いる事にした。さらに、TRPV1 ならびにTRPV4 ノックアウトマウスも疼痛受容反応の変化を観察するため用いる事にした。

## 2. 研究の目的

本研究では、これらの遺伝子改変動物に急性疼痛モデルを作成し、中枢神経系の反応（視床下部-下垂体-副腎系ならびに脊髄後角）疼痛受容反応を mRFP の赤色蛍光ならびに eGFP の緑色蛍光を指標に *in vivo* の状態で視覚的に評価する方法を確立し、疼痛・ストレス反応の分子基盤を疼痛受容と神経内分泌反応との機能連関という新たな視点で解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) AVP-eGFP トランスジェニックラットの両側足底に 5%ホルマリン溶液を皮下注射した。注射 15 分後、2 時間後、6 時間後に灌流固定し、ホルマリン固定の後に視床下部視索上核、室傍核、ならびにこれらから軸索の投射を受ける正中隆起を含む脳切片を作成し、蛍光顕微鏡で AVP-eGFP 蛍光を観察した。灌流固定

の際、血液も同時に採取し、血中 AVP 濃度を測定した。

(2) *c-fos* mRFP トランスジェニックラットの両側足底に 5%ホルマリン溶液を皮下注射した。注射 0 分後、30 分後、90 分後、3 時間後、6 時間後および 24 時間後に灌流固定し、ホルマリン固定の後に視床下部視索上核と室傍核、ならびに L4 レベルの脊髄を含む切片を作成し、蛍光顕微鏡で *c-fos* mRFP 蛍光を観察した。また、これらの切片で免疫組織化学的染色法により Fos タンパクの発現も観察した。

(3) 野生型マウス、TRPV1 ならびに TRPV4 ノックアウトマウスの片側足底皮下にセボフルレン麻酔下に 0.5%ホルマリン溶液を皮下注射し、注射後 60 分間これらのマウスの生体防御行動を観察し、その積算時間を記録した。さらに注射 90 分後に灌流固定し、視床下部室傍核ならびに L4 レベルの脊髄を含む切片を作成し、免疫組織化学的染色法により Fos タンパクの発現を観察した。

## 4. 研究成果

(1) AVP-eGFP トランスジェニックラットへのホルマリン注射後 15 分で血中 AVP 濃度が上昇し、2 時間後には正常化していた。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。正中隆起では、内層よりも外層の蛍光がより増強した一方、下垂体後葉でも蛍光の増強が見られた。

(2) *c-fos* mRFP トランスジェニックラットにホルマリンを注射すると、室傍核における mRFP 蛍光が注射後 3 時間をピークに 90 分から 6 時間にかけて増強し、免疫組織化学的染色法による Fos タンパクと同様の結果を得た。下肢からの疼痛刺激を受容する L4 レベルの脊髄後角では第 I、II 層で注射 90 分後から 6 時間後まで mRFP 蛍光の増強を認めた。Fos タンパクの発現も脊髄後角第 I、II 層で注射 90 分後から 3 時間後まで増加を認めた。さらに、脊髄後角における mRFP 蛍光は Fos タンパクより約 3 倍多く発現しており、疼痛刺激に鋭敏に反応した。

(3) TRPV1 ならびに V4 ノックアウトマウスにホルマリンを注射すると、ホルマリンによる直接刺激とされる第 1 相 (注射 0 分~10 分) では野生型マウスが有意に TRPV1 や TRPV4 ノックアウトマウスよりも生体防御行動を多く認めた。炎症を介した二次性の疼痛とされる第 2 相 (注射 10 分~60 分) では TRPV1 ノックアウトマウスのみ生体防御行動を野生型よりも少なく認めた。また脊髄後角第 I、II 層における Fos タンパクの発現は、注射側が非注射側よりも増加し、かつ野生型マウスが TRPV1 ならびに TRPV4 ノックアウトマウスと比較して有意に増加した。一方、室傍核に

おける Fos タンパクの発現は、TRPV1 ノックアウトマウスが野生型マウスよりも有意に減少した。この結果は、上記第 2 相の生体防御行動をおおむね反映するものであった。

#### 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 5 件)

1) Central diabetes insipidus associated with impaired renal aquaporin-1 expression in mice lacking liver X receptor  $\beta$ .

Gabbi C, Kong X, Suzuki H, Kim HJ, Gao M, Jia X, Ohnishi H, Ueta Y, Warner M, Guan Y, Gustafsson JÅ.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Feb 21;109(8):3030-4. Epub 2012 Feb 7. 査読あり

[DOI : 10.1073/pnas.1200588109](https://doi.org/10.1073/pnas.1200588109)

2) Similar changes of hypothalamic feeding-regulating peptides mRNAs and plasma leptin levels in PTHrP-, LIF-secreting tumors-induced cachectic rats and adjuvant arthritic rats.

Suzuki H, Hashimoto H, Kawasaki M, Watanabe M, Otsubo H, Ishikura T, Fujihara H, Ohnishi H, Onuma E, Yamada-Okabe H, Takuwa Y, Ogata E, Nakamura T, Ueta Y.

Int J Cancer. 2011 May 1;128(9):2215-23. 査読あり

[DOI : 10.1002/ijc.25535.](https://doi.org/10.1002/ijc.25535)

3) Exaggerated response of a vasopressin-enhanced green fluorescent protein transgene to nociceptive stimulation in the rat.

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. 査読あり

J Neurosci. 2009 Oct 21;29(42):13182-9.

[DOI:10.1523/JNEUROSCI.2624-09.2009](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2624-09.2009)

4) Regulatory mechanism of the arginine vasopressin-enhanced green fluorescent protein fusion gene expression in acute and chronic stress.

Suzuki H, Kawasaki M, Ohnishi H, Nakamura T, Ueta Y.

Peptides. 2009 Sep;30(9):1763-70. Epub 2009 Jun 6. Review. 査読あり

[DOI:10.1016/j.peptides.2009.05.025](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.05.025)

5) Response of arginine vasopressin-enhanced green fluorescent protein fusion gene in the hypothalamus of adjuvant-induced arthritic rats.

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.

J Neuroendocrinol. 2009 Mar;21(3):183-90. 査読あり

[DOI:10.1111/j.1365-2826.2009.01841.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2009.01841.x)

[学会発表] (計 12 件)

1) 石倉 透、鈴木 仁士、大野 素子、加藤 明子、吉村 充弘、大久保 淳一、大西 英生、中村 利孝、上田 陽一 (2011年10月18日) 急性疼痛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：c-fos-mRFPトランスジェニックラットを用いた検討、第29回産業医科大学学会総会、産業医科大学、北九州

2) Ishikura, T. Suzuki, H. Ohnishi, H.

Nakamura, T. & Ueta, Y. (2011年9月6-9日)

Expression of Fos protein in the spinal cord and hypothalamus after acute arthritis in the

c-fos-monomeric red fluorescent protein  
transgenic rats. SICOT 2011, Prague, Prague  
Congress Centre, Czech Republic

3) 石倉 透、鈴木 仁士、大野 素子、吉村 充  
弘、加藤 明子、大西 英生、中村 利孝、上田  
陽一 (2011年8月20-21日) 急性疼痛による脊髄お  
よび視床下部におけるFosタンパクの発現動態：

c-fos-mRFPトランスジェニックラットを用いた検  
討、第21回日本病態生理学会、日本大学医学部、  
東京

4) 石倉 透、鈴木 仁士、大西 英生、上田 陽  
一 (2011年7月17-20日) 急性関節炎によるFosタン  
パクの発現動態：トランスジェニックラットを  
用いた検討、第55回日本リウマチ学会総会・学術  
集会、神戸国際会議場、神戸

5) 石倉 透、鈴木 仁士、大野 素子、加藤 明  
子、大淵 豊明、藤原 広明、大西 英生、上田  
陽一 (2011年4月21-23日) 急性疼痛による脊髄お  
よび視床下部におけるFosタンパクの発現動態：  
c-fos-mRFPトランスジェニックラットを用いた検  
討、第84回日本内分泌学会学術総会、神戸国際会  
議場、神戸

6) 石倉 透、鈴木 仁士、藤原 広明、大西 英  
生、上田 陽一 (2010年9月2-4日) 侵害刺激はト  
ランスジェニックラットの脊髄および視床下部に  
c-fos-mRFP遺伝子の発現を引き起こす、Neuro2010、  
神戸コンベンションセンター、神戸

7) 鈴木 仁士、川崎 展、大西 英生、大坪 広  
樹、藤原 広明、中村 利孝、上田 陽一 (2009  
年11月5-6日) 関節炎モデルラットにおける視床下  
部摂食関連ペプチド遺伝子発現変化の検討、第24  
回日本整形外科学会基礎学術集会、パシフィコ横  
浜、横浜

8) 鈴木 仁士、川崎 展、大坪 広樹、藤原 広  
明、大西 英生、中村 利孝、上田 陽一 (2009  
年9月4-5日) 急性疼痛ストレスにおけるAVPの役  
割：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検討、第36回日本神経内分泌  
学会、北九州国際会議場、北九州

9) 鈴木 仁士、川崎 展、大西 英生、大坪 広  
樹、横山 徹、藤原 広明、中村 利孝、上田 陽  
一 (2009年9月26-27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  
急性疼痛ストレスに対するAVPの役割の検討、第50  
回日本組織細胞化学会、ピアザ淡海、滋賀

10) Suzuki, H. Kawasaki, M. Ohnishi, H. Otsubo,  
H. Fujihara, H. Nkamura, T. & Ueta, Y. (2009  
年9月4-8日) Nociceptive stimulation causes  
exaggerated response of arginine  
vasopressin-enhanced green fluorescent  
protein gene expression in rats. th World  
Congress on Neurohypophysial Hormones,  
Kitakyushu International Conference Center,  
Kitakyushu, Japan

11) Suzuki, H. Kawasaki, M. Ohnishi, H. Otsubo,  
H. Fujihara, H. Nakamura, T. & Ueta, Y. (2009  
年8月2-4日) Nociceptive stimulation causes  
exaggerated response of arginine  
vasopressin-enhanced green fluorescent  
protein gene expression in rats. 2nd School of  
Neuroendocrinology 2009, Yufuhin Sansuikan,  
Ohita, Japan

12) Suzuki, H. Hashimoto, H. Kawasaki, M. Azuma,  
Y. Otsubo, H. Fujihara, H. Ohnishi, H. Onuma,  
E. Yamada-Okabe, H. Takuwa, Y. Ogata, E.  
Nakamura, T. & Ueta, Y. (2009年7月27-8月1日)

Expression of the  
hypothalamic feeding-regulating peptides is  
independent of serum calcium level in  
cachectic syndromes. 36th International  
Congress Of Physiological Sciences, Kyoto  
International Conference Center, Kyoto, Japan

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

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

なし