

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 19 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791671

研究課題名（和文）急性・慢性関節炎におけるバゾプレッシンの生理的役割解明：遺伝子改変動物を用いて

研究課題名（英文）Clarification of the physiological role of vasopressin in acute and chronic arthritis: using transgenic animals

研究代表者

石倉 透 (ISHIKURA TORU)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：70580281

研究成果の概要（和文）：*c-fos*-mRFP1 トランスジェニックラットにホルマリンあるいは TRPV4 アゴニストを皮下注射し、脊髄後角ならびにバゾプレッシン産生ニューロンを含む視床下部室傍核の賦活化を *c-fos*-mRFP1 融合遺伝子発現により可視化した。ホルマリンあるいは TRPV4 アゴニスト注射後、mRFP1 蛍光は著明に発現しており、本トランスジェニックラットが侵害受容機構を調べる上で有用な動物モデルであることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We examined the expression of the *c-fos*-mRFP1 fusion gene in dorsal horn of the spinal cord and the paraventricular nucleus after acute nociceptive stimulation by subcutaneous (s.c.) injection of formalin or TRPV4 agonist in hind paw of the *c-fos*-mRFP1 transgenic rats. We observed significant increases of mRFP1 fluorescence after s.c. injection of formalin or TRPV4 agonist. These transgenic rats are useful models to study central nervous system responses to nociceptive stress.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：整形外科学・関節病学

キーワード：遺伝子改変動物、*c-fos* 遺伝子、蛍光タンパク、バゾプレッシン、疼痛

## 1. 研究開始当初の背景

生体にとって急性および慢性炎症に対する生理的防御反応は極めて重要である。下垂体後葉ホルモンの一つであるバゾプレッシンは腎臓の集合管に作用して水の再吸収を促進することから抗利尿ホルモンとも呼ばれる。一方、血漿浸透圧は一定であるにもかかわらず疼痛時等にも一過性にバゾプレッシンが分泌される。急性・慢性炎症時に視床下部-下垂体後葉系が活性化されるが、その機能的意義については未解決である。

当時、我々はニューロンの活動性指標として汎用される *c-fos* 遺伝子発現を単量体赤色蛍光タンパク 1 (monomeric red fluorescent protein1: mRFP1) 遺伝子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 *c-fos*-mRFP1 トランスジェニックラットの開発に成功した。本トランスジェニックラットを用いることにより、蛍光顕微鏡下で mRFP1 蛍光を指標に生細胞のまま活性化したニューロンを容易に同定することが可能となった。この *c-fos*-mRFP1 トランスジェニックラットに侵害刺激を与えると、バゾプレッシン産生ニューロンを含む侵害刺激に特異的に反応するニューロンを可視化できることが予想された。

## 2. 研究の目的

急性侵害刺激後に、脊髄後角のニューロンなどに Fos タンパクが発現することが知られ

ている。c-fos-mRFP1 トランスジェニックラットでは、Fos タンパクを mRFP1 蛍光により可視化することができること予想されるが、Fos タンパクと mRFP1 蛍光の空間・時間的な発現パターンと発現量に相違があるかどうかは不明である。そこで我々は、c-fos-mRFP1 トランスジェニックラットに急性侵害刺激を与え、脊髄後角およびバゾプレッシンを産生するニューロンを含む視床下部室傍核 (paraventricular nucleus: PVN) における mRFP1 蛍光の発現パターンおよび時間経過を免疫組織化学的染色法による Fos タンパクの場合と比較した。さらに、TRPV4 アゴニスト (4 $\alpha$ -phorbol 12, 13-didecanoate (4 $\alpha$ -PDD)) を用いて同様の検討に加え、行動変化を観察した。

### 3. 研究の方法

動物はウィスター系成熟雄性野生型ラットならびに成熟雄性 c-fos-mRFP1 トランスジェニックラットを用いた。1) これらのラットの両後肢足底部に 5%ホルマリン溶液および生理食塩水を 100  $\mu$ l ずつ皮下注射し、90 分後の脊髄後角 (L3-5, I, II 層) および PVN における野生型ラットでの Fos タンパクの発現を免疫組織化学的染色法で、トランスジェニックラットでの mRFP1 蛍光を蛍光顕微鏡により観察した。2) これらの発現を皮下注射後 0 分、30 分、90 分、3 時間、6 時間および 24 時間でそれぞれの部位で、定量的に評価した。3) 500  $\mu$ M の 4 $\alpha$ -PDD、5%ホルマリン溶液および生理食塩水を 100  $\mu$ l ずつそれぞれのラットの左後肢足底部に皮下注射し、注射後の生体防御行動ならびに後肢の腫脹を計測した。さらに、500  $\mu$ M の 4 $\alpha$ -PDD および生理食塩水を 100  $\mu$ l ずつそれぞれのラットの両後肢足底部に皮下注射し、3 時間後の脊髄後角および PVN における野生型ラットでの Fos タンパクおよびトランスジェニックラットでの mRFP1 蛍光の発現を定量的に評価した。

### 4. 研究成果

(1) ホルマリンを注射すると、野生型ラットでは Fos タンパクが、トランスジェニックラットでは mRFP1 蛍光の発現が脊髄後角および PVN において増加した (図 1)。

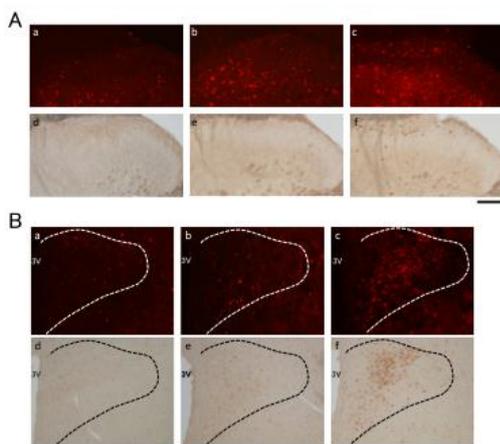


図 1. 処置無し (Aa)、生理食塩水注射 90 分後 (Ab)、ホルマリン注射 90 分後 (Ac) のラットの脊髄後角における mRFP1 蛍光の発現および処置無し (Ad)、生理食塩水注射 90 分後 (Ae)、ホルマリン注射 90 分後 (Af) ラットの PVN における Fos タンパクの発現。処置無し (Ba)、生理食塩水注射 90 分後の (Bb)、ホルマリン注射 90 分後の (Bc) ラットの脊髄後角における mRFP1 蛍光の発現および処置無し (Bd)、生理食塩水注射 90 分後の (Be)、ホルマリン注射 90 分後の (Bf) ラットの脊髄後角における Fos タンパクの発現。

(2) 脊髄後角において野生型ラットでは注射 90 分後から 3 時間後に Fos タンパクの発現のピークがあり、6 時間後にはほとんど消退していた。トランスジェニックラットでは mRFP1 蛍光は注射 3 時間後をピークに 6 時間後まで増強していた。mRFP1 蛍光は Fos タンパクより 2 倍以上多く発現していた。PVN において、野生型ラットでは注射 90 分後に Fos タンパク発現のピークがあり、6 時間後には 1/3 以下に消退していた。一方、トランスジェニックラットでは mRFP1 蛍光は注射 3 時間後をピークに 6 時間後まで増強していた (図 2)。

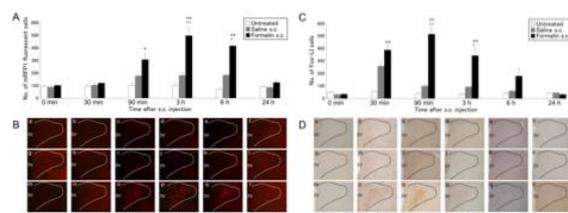


図 2. PVN における mRFP1 蛍光 (A) ならびに Fos タンパク (C) の発現動態。それぞれ処置無し (Ba-f)、生理食塩水注射後 (Bg-l)、ホルマリン注射後 (Bm-r) の mRFP1 蛍光および処置無し (Da-f)、生理食塩水注射後 (Dg-l)、ホルマリン注射後 (Dm-r) の Fos タンパクを示す。

(3) ホルマリン注射後、それぞれのラットともに著明に生体防御行動は増加した。4 $\alpha$ -PDD および生理食塩水注射後は、有意な生体防御行動の増加を認めなかった。また、ホルマリン注射後の後肢に著明な腫脹を、4 $\alpha$ -PDD 注射後でも中程度の腫脹を認めた。4 $\alpha$ -PDD 注射後、野生型ラットでは Fos タンパク、トランスジェニックラットでは mRFP1 蛍光が脊髄後角および PVN において有意に増加した。以上より c-fos-mRFP1 トランスジェニックラットを用いることで簡便に c-fos 遺伝子の発現を mRFP1 蛍光として検出することが可能となった。mRFP1 蛍光は Fos タンパクよりも侵害受容に鋭敏でかつ長時間持続する傾向にあった。TRPV4 アゴニスト皮下注射後、生体防御行動は増加しなかったものの、脊髄後

角およびPVNにおけるFosタンパクならびにmRFP1蛍光の発現は有意に増加しており、TRPV4による侵害受容機構は一元的ではないことが考えられた(図3)。

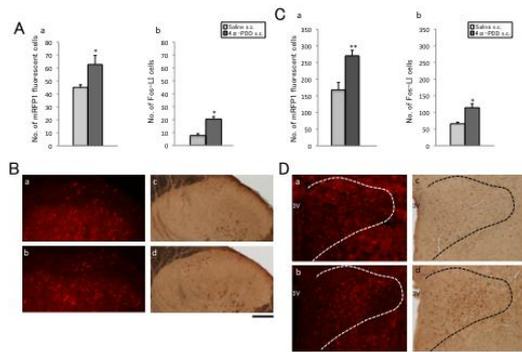


図3. 4α-PDD注射3時間後の脊髄後角におけるmRFP1蛍光の数(Aa)およびFosタンパクの数(Ab)ならびにPVNにおけるmRFP1蛍光の数(Ca)およびFosタンパクの数(Cb)。4α-PDD(Ba)および生理食塩水(Bb)注射3時間後の脊髄後角におけるmRFP1蛍光発現。4α-PDD(Bc)および生理食塩水(Bd)注射3時間後の脊髄後角におけるFosタンパク発現。4α-PDD(Da)および生理食塩水(Db)注射3時間後のPVNにおけるmRFP1蛍光発現。4α-PDD(Dc)および生理食塩水(Dd)注射3時間後のPVNにおけるFosタンパク発現。

c-fos-mRFP1 トランスジェニックラットは、侵害受容に関与するニューロンの反応を脊髄後角やバゾプレッシン産生ニューロンを含むPVNにおいてmRFP1蛍光として可視化することができることから、中枢神経系での侵害受容機構を調べる上で有用な動物モデルであると考えられる。また、mRFP1蛍光を指標に生細胞の状態でc-fos遺伝子発現の同定が可能であることから、多様な生理学的研究に応用できる可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

1. Yoshimura, M. Ohkubo, J. Katoh, A. Ohno, M. Ishikura, T. Kakuma, T. Yoshimatsu, H. Murphy, D. Ueta, Y. (2013) A c-fos-monomeric red fluorescent protein 1 fusion transgene is differentially expressed in rat forebrain and brainstem after chronic dehydration and rehydration. *Journal of Neuroendocrinology* 25(5): 478-487. (査読有)  
DOI: 10.1111/jne.12022
2. Ohno, M. Fujihara, H. Iwanaga, M. Todoroki, M. Katoh, A. Ohbuchi, T. Ishikura, T. Hamamura, A. Hachisuka, K.

& Ueta, Y. (2012) Induction of arginine vasopressin-enhanced green fluorescent protein expression in the locus coeruleus following kainic acid-induced seizures in rats. *Stress* 15(4): 435-442.

(査読有)

DOI: 10.3109/10253890.2011.637185

3. Ishikura, T. Suzuki, H. Yoshimura, M. Ohkubo, J. Katoh, A. Ohbuchi, T. Ohno, M. Fujihara, H. Kawasaki, M. Ohnishi, H. Nakamura, T. & Ueta, Y. (2012) 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 formalin injection. *Brain Research* 1479: 52-61. (査読有)  
DOI: 10.1016/j.brainres.2012.08.033
4. Ishikura, T. Suzuki, H. Matsuura, T. Ohnishi, H. Nakamura, T. Ueta, Y. (2012) Visualization of the response in the central nervous system after nociceptive stimulation using transgenic animals. *Journal of UOEH* 34(4): 315-321. (査読有)  
DOI: なし

〔学会発表〕(計21件)

1. 石倉 透、鈴木 仁士、松浦 孝紀、大久保 淳一、吉村 充弘、丸山 崇、大西 英生、中村 利孝、上田 陽一 (2013年3月27日-29日) 急性疼痛ストレスに対する内分泌反応および行動変化へのTRPV1およびTRPV4の役割～ノックアウトマウスを用いた検討～: 第90回日本生理学会大会、東京
2. 大久保 淳一、大淵 豊明、吉村 充弘、丸山 崇、石倉 透、松浦 孝紀、加藤 明子、鈴木 秀明、上田 陽一 (2013年3月27日-29日) ラット視索上核バゾプレッシンおよびオキシトシンの蛍光タンパク遺伝子導入による同定とカイニン酸応答の検討: 第90回日本生理学会大会、東京
3. 丸山 崇、大久保 淳一、吉村 充弘、松浦 孝紀、石倉 透、上田 陽一 (2013年1月12日) ラット視交叉上核におけるアルギニンバゾプレッシン-改変緑色蛍光タンパク融合遺伝子発現の日内変動と電気生理学的特性の検討: 第23回バゾプレッシン研究会、東京
4. 丸山 崇、大久保 淳一、吉村 充弘、大野 素子、石倉 透、上田 陽一 (2012年12月1日) ラット視交叉上核におけるアルギニンバゾプレッシン-改変緑色蛍光タンパク融合遺伝子発現の日内変動と電気生理学的特性の検討: 第40回自律神

- 経生理研究会、東京
5. 加藤 明子、石倉 透、丸山 崇、鈴木 秀明、上田 陽一 (2012年11月23-24日) 急性浸透圧刺激および CCK-8 抹消投与による視床下部における神経活動の遺伝子改変ラットを用いた可視化の試み：第16回日本心血管内分泌代謝学会学術集会、東京
  6. Ishikura, T. Suzuki, H. Matsuura, T. Yoshimura, M. Ohkubo, J. Maruyama, T. Ohnishi, H. Ueta, Y (2012年11月15-17日) Neuroendocrine response and nocifensive behavior after nociceptive stimulation in TRPV1 and TRPV4 knockout mice. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer, Kanazawa
  7. 上田 陽一、大野 素子、岩永 勝、吉村 充弘、丸山 崇、石倉 透 (2012年10月25-26日) カイニン酸誘発けいれんモデルラットにおける視床下部および青斑核におけるバゾプレッシン遺伝子発現：第65回日本自律神経学会総会、東京
  8. 石倉 透、鈴木 仁士、松浦 孝紀、大久保 淳一、吉村 充弘、大野 素子、丸山 崇、上田 陽一、大西 英生、中村 利孝 (2012年10月20日) 急性疼痛ストレスに対する TRPV1 および TRPV4 の役割～ノックアウトマウスを用いた検討～：第30回産業医科大学学会、福岡
  9. 丸山 崇、大久保 淳一、吉村 充弘、松浦 孝紀、大野 素子、石倉 透、上田 陽一 (2012年10月19-20日) ラット視交叉上核におけるアルギニンバゾプレッシン-改変緑色蛍光タンパク融合遺伝子発現の日内変動と電気生理学的特性の検討：第63回西日本生理学会、大分
  10. 大久保 淳一、大淵 豊明、大野 素子、丸山 崇、松浦 孝紀、加藤 明子、吉村 充弘、石倉 透、鈴木 秀明、上田 陽一 (2012年10月19-20日) ラット視交叉上核バゾプレッシンおよびオキシトシンの蛍光タンパク遺伝子導入による同定とカイニン酸応答の電気生理学的検討：第63回西日本生理学会、大分
  11. Ishikura, T. Suzuki, H. Matsuura, T. Yoshimura, M. Ohkubo, J. Ohno, M. Ohnishi, H. Nakamura, T. Kannan, H. Ueta, Y. (2012年10月13-17日) 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 formalin injection. Neuroscience 2012, New Orleans, USA
  12. 上田 陽一、吉村 充弘、橋本 弘史、石倉 透、横山 徹、上園 保仁、(2012年9月19-21日) シスプラチン投与におけるラット摂食抑制反応に対する六君子湯の胃内投与効果：第71回日本癌学会学術総会、札幌
  13. 大久保 淳一、大淵 豊明、大野 素子、丸山 崇、吉村 充弘、松浦 孝紀、加藤 明子、石倉 透、鈴木 秀明、上田 陽一 (2012年8月25日) ラット視交叉上核 AVP および OXT ニューロンの蛍光タンパク遺伝子導入による同定とカイニン酸応答の検討：第12回日本内分泌学会九州地方会、久留米
  14. 石倉 透、鈴木 仁士、松浦 孝紀、大久保 淳一、吉村 充弘、大野 素子、丸山 崇、大西 英生、上田 陽一 (2012年8月4-5日) 急性疼痛ストレスに対する TRPV1 および V4 の役割-ノックアウトマウスを用いた検討-：第22回日本病態生理学会、大分
  15. Ueta, Y. Ishikura, T. Matsuura, T. Yoshimura, M. Ohkubo, J. Ohnishi, H. (2012年6月5-10日) Effects of nociceptive stimulation on fos expression and behavior in mice. 21st International Behavioral Neuroscience Society annual meeting, Hawaii, USA.
  16. Katoh, A. Ishikura, T. Yoshimura, M. Ohkubo, J. Onaka, T. Suzuki, H. Ueta, Y. (2012年6月5-10日) Oxytocin synthesis in the hypothalamus are influenced by fasting and refeeding in the oxytocin-monomeric red fluorescent protein 1 transgenic rat. 21st International Behavioral Neuroscience Society annual meeting, Hawaii, USA.
  17. 上田 陽一、加藤 明子、吉村 充弘、石倉 透、鈴木 秀明 (2012年4月19-21日) ラットオキシトシン産生ニューロンの赤色蛍光タンパクによる可視化および生理学的刺激に対する反応性の検討：第85回日本内分泌学会学術総会、名古屋
  18. 橋本 弘史、吉村 充弘、石倉 透、藤原 広明、上園 保仁、上田 陽一 (2012年3月29-31日) コレシストキニンおよびアポモルフィン抹消投与によるラット室傍核における *c-fos* mRNA 発現の検討：第89回日本生理学会大会、松本
  19. 吉村 充弘、大久保 淳一、加藤 明子、大野 素子、石倉 透、加隈 哲也、吉松 博信、上田 陽一 (2012年3月29-31日) *c-fos*-単量体赤色蛍光タンパク (RFP) トランスジェニックラットの視床下部および脳幹部における浸透圧負荷後の RFP 発現パターン：第89回日本生理学会大会、松本
  20. 吉村 充弘、大久保 淳一、加藤 明子、大野 素子、石倉 透、加隈 哲也、吉

松 博信、上田 陽一 (2012 年 3 月 1-3 日) The *c-fos*-monomeric red fluorescent protein 1 fusion gene expresses differentially in the forebrain and the brainstem after chronic dehydration and rehydration in transgenic rats :

- 細胞機能と分子活性の多次元蛍光生体イメージング第2回 Vivid Workshop、加賀
21. 大久保 淳一、大淵 豊明、大野 素子、岩永 勝、加藤 明子、吉村 充弘、石倉 透、鈴木 秀明、上田 陽一 (2012 年 1 月 7 日) 下垂体後葉ホルモン産生ニューロンにおけるカイニン酸応答：電気生理学的検討：第 22 回バゾプレシン研究会、東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石倉 透 (ISHIKURA TORU)  
産業医科大学・医学部・助教  
研究者番号：70580281

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし