

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860388

研究課題名(和文) 痛み反応に関与する分界条床核外側部CRHニューロンの電気生理学的解析 その2

研究課題名(英文) Electrophysiological analysis for pain response by the lateral bed nucleus stria terminalis part2

研究代表者

萩原 裕子 (HAGIWARA, HIROKO)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：90468207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は分界条床核外側部(BSTL)が痛みの反応性に影響を及ぼす事を発見した。そこで、BSTLのCRH陽性ニューロンの電気生理学的な特徴と痛みの関係性について検討した。今回、視床下部室傍核のCRH発現細胞にてVenus由来の強い蛍光を示すCFR-Venus Neoマウスを用いて実験を行った。CFR-Venus Neoマウス6週齢でスライスを作成し、蛍光がBSTLに発現していることを確認し、さらにin situ hybridization法でBSTLのVenus陽性細胞とCRHニューロンの一一致率は95%以上であることを確認した。現在、電気生理学的な解析をすすめている。

研究成果の概要(英文)：Since corticotropin-releasing hormone (CRH) neurons are specifically expressed in the lateral subdivision of the bed nucleus of the stria terminalis (BSTL), we determined the electrophysiological property of CRH neurons in this area. Here, we studied the electrophysiological properties of BSTL CRH neurons in male and female transgenic mice with an improved version of enhanced green fluorescent protein under the control of the CRH promoter (CRF-Venus Neo). We firstly confirmed that Venus expressing cells in BSTL were CRH neuron. Whole-cell patch-clamp recordings with fluorescent microscopy were performed to analyze miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSC) in CRH neurons in the BSTL slices prepared from CRF-Venus Neo mice. Voltage clamp analysis showed that there was no sex difference in the frequency and amplitude of mEPSC in CRH neurons. We currently examining whether the electrophysiological property is affected by pain response in CRH neurons in the BSTL.

研究分野：疼痛学

キーワード：分界条床核 CRHニューロン 痛み ホルマリンテスト パッチクランプ

1. 研究開始当初の背景

痛みは、「組織の実質的な、または、潜在的障害と関連した、またはそのような傷害の言葉によって表される不快な感覚、情緒的経験」と国際疼痛学会(The International Association for the study of pain, 1994)で定義されているように、「快」「不快」といった情動を作り出すなど痛みという感覚は極めて多様な側面を持っている。例えば、情緒的経験は情動と考える事が可能で、情動を調節できれば痛みをコントロールすることが可能であると考えている。実際、情動をコントロールすることによって痛みの閾値が変化する可能性が指摘されており(Jasmin et al, 2003)、それゆえ、痛みと情動は密接な相互関係をもっている可能性が高い(Tracey and Mantyh, 2007)。また、形態学的に相互の結びつきの強さも示唆されている(Braz et al, 2005)。

一方、痛みや情動反応には性差があり(Mogil and Chanda, 2005)、痛みの関係する疾患には女性の方が罹りやすいともいわれている(Dina et al, 2001)。そこで、申請者は、痛みは情動を形成し、また、情動が痛みを調節するメカニズムを性差から迫ろうと考えた。そこで、性差のある痛み反応時の脳の活動を調べ、その責任部位を同定することから研究を開始した。痛みテストであるホルマリンテストでは性差が認められ、雌性の方が痛がる、すなわち、痛覚過敏となる(Alios et al, 1994; Gaumond et al, 2002)ことが示唆されている。我々は cAMP response element-binding protein(CREB)のリン酸化反応を指標として、痛み反応時の脳の活動変化を検討した。そして、分界条床核外側部に雌性特異的な CREB のリン酸化がおり、ホルマリンテストの痛みの性差と時間的に一致する事を発見した。さらに、この痛みの性差はエストロジェンに依存している事を明らかにし、この領域のリン酸化 CREB の働きに対し、アデノウイルスを用いて dominant negative 体で抑制すると痛み反応も抑制されることを発見した。分界条床核外側部はその他にも性自認(Zhou et al, 1995)やゴナドトロピンなど生殖内分泌系、そして不安をも調節している(Alon et al, 2009)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、分界条床核外側部の CRH(Corticotropin- releasing hormone)ニューロンの痛み反応における役割を明らかにするために、ホルマリンテストに着目し、痛みを感じている時の CRH ニューロンのシナプスの変化を検討する。そのために蛍光標識した CRH ニューロンにホールセルモードでパッチクランプを行い、興奮性シナプス入力および抑制性シナプス入力の変容を調べる。そして、ドーパミン受容体による CRH

ニューロンのシナプス修飾も合わせて検討する。

3. 研究の方法

1) CRH のプロモーターの下流に蛍光物質を発現させた遺伝子組換えマウスを作成するため、B6.FVB-Tg(Crh-cre)1Kres/J(ジャクソン社)と R26-CAG-LoxP-mTFP1 (理研)を掛け合わせる事により Crh-cre-mTFP1 マウスを作成した。作成後、mTFP1 陽性細胞が CRH ニューロンであることを免疫組織化学法にて観察した。

2) 同じ部位で、dopamine-and cAMP-regulated phosphoprotein 32kDa(DARPP32)の蛍光を発する B6.Cg-Tg(Drd1a-tdTomato)6Calak/J マウスを用いて、DopamineD1 受容体発現細胞が CRH ニューロンであることを免疫組織化学法にて観察した。

3) C57BL/6N-Crh<tml(venus)Ksak>マウス (CRF 遺伝子の Venus ノックインマウス(エクスオン 2 の開始コドン ATG に Venus-frt-flanked-PKG-neo カセットが挿入されているマウス))の改変型、CRF-Venus Neo マウスが発表された(Endocrine Society, 東北大学井樋先生ら)。本マウスは蛍光強度がより強い改変型マウスであり、視床下部室傍核の CRH 発現細胞にて Venus 由来の強い蛍光を示す事が報告されている。そこで、CRF-Venus Neo マウスを用いて分界条床核外側部において Venus 陽性細胞が、CRH ニューロンであることを免疫組織化学および in situ hybridization 法により観察した。

4) 蛍光標識した CRH ニューロンの電気生理学的な解析を、急性スライスを用いて、ボルテージクランプモードによるパッチクランプ法を用いて解析した。

4. 研究成果

1) これまで、B6.FVB-Tg(Crh-cre)1Kres/J(ジャクソン社)と B6.FVB-TG(Cre-floxed Neo-EGFP)REP080sb(理研)を掛け合わせて、GFP-CRH マウスを作成した。CRH ニューロンを顕微鏡下で蛍光確認しようと試みてきたが、GFP-CRH マウスの GFP 蛍光が弱く使用に耐えられない事が判明した。そこで GFP より蛍光強度の強い R26-CAG-LoxP-mTFP1 (理研)と、B6.FVB-Tg(Crh-cre)1Kres/J(ジャクソン社)を掛け合わせ、Crh-cre-mTFP1 マウスを作成した。首尾よく妊娠、出産し、ジェノタイプでは、メンデルの法則に従って、Cre と mTFP1 に陽性の仔をえた。生後 6 週齢でスライスを作成し mTFP1 の蛍光を顕微鏡下で観察すると、分界条床核外側部、室傍核、扁桃体中心核に限局して存在していた。すなわち、蛍光を発した細胞は CRH ニューロンであると思われる。そこで、TFP1 陽性細胞が CRH ニューロンであることを免疫組織化学法にて観察した。しかし、CRH 抗体により免疫染色した CRH

ニューロン部位と TFP1 陽性細胞が完全一致せず、使用できない事が判明した(写真1)。

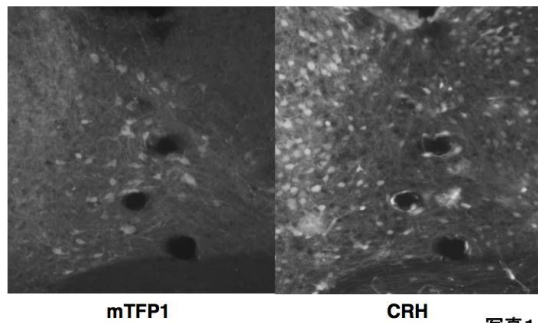


写真1

2) つぎに我々は、分界条床核外側部は dopamine-and cAMP-regulated phosphoprotein 32kDA(DARPP32) を発現しており、かつ、CRH ニューロンが存在している部分であること、扁桃体中心核と相互連絡があることに着目した。そこで、dopamine-and cAMP-regulated phosphoprotein 32kDA(DARPP32) の蛍光を発する B6.Cg-Tg(Drd1a-tdTomato)6Calak/J マウスを用いて、DopamineD1 受容体発現細胞が CRH ニューロンである可能性を考え免疫組織化学法にて観察することにした。B6.Cg-Tg(Drd1a-tdTomato)6Calak/J マウス生後6週齢でスライスを作成し tdTomato の蛍光を顕微鏡下で観察すると、分界条床核外側部、室傍核、扁桃体中心核に局限していることを確認した。そこで、tdTomato 陽性細胞が CRH ニューロンであることを免疫組織化学法にて観察した。しかし、CRH 抗体により免疫染色されている CRH ニューロン部位と tdTomato 陽性細胞が全く一致せず、使用できない事が判明した(写真2)。

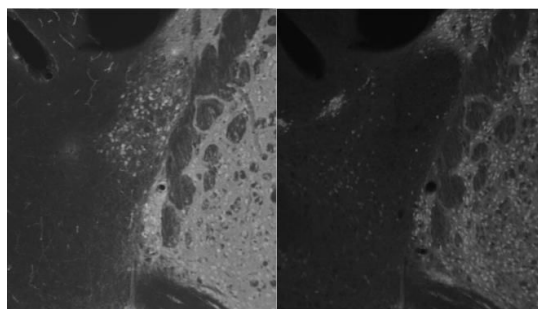
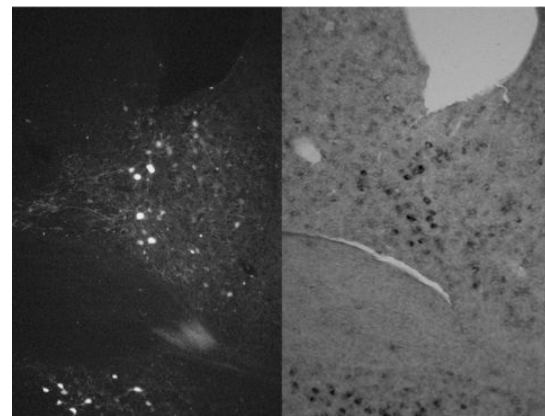


写真2

3) 東北大学井樋先生らによって発表された C57BL/6N-Crh<tml(venus)Ksak>マウス(CRF 遺伝子の Venus ノックインマウス(エクソン2の開始コドン ATG に Venus-frt-flanked-PKG-neo カセットが挿入されているマウス))の改変型、CRF-Venus Neo マウスが発表された。本マウスは蛍光強

度がより強い改変型マウスであり、視床下部室傍核の CRH 発現細胞にて Venus 由来の強い蛍光を示す事が報告されている。生後6週齢でスライスを作成し Venus の蛍光を顕微鏡下で観察し、分界条床核外側部、室傍核、扁桃体中心核に局限していることを確認した。そこで、Venus 陽性細胞が CRH ニューロンであることを免疫組織化学法にて観察した。CRH 抗体で免疫染色したところ、分界条床核における Venus 陽性細胞は CRH ニューロンと一致した。さらに、CRH のプローブを用いた in situ hybridization 法でも CRH の mRNA と Venus 陽性細胞とが完全に一致していた(写真3)。すなわち、本マウスを用いることにより電気生理学的な実験が可能となった。



ΔNeo

CRH

写真3

4) CRF-Venus Neo マウスの分界条床核外側部 CRH ニューロンを特定し、電気生理学的な解析を行った。急性スライスを用いて、パッチクランプモードによるスライスパッチクランプ法を行った。電気刺激に应答する電気活動が記録できたことから、パッチクランプ法自体は確立していると考えられ(Date not show)。現在実験を継続している。

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 2件)

1) Fukushima A, Hagiwara H, Fujioka H, Kimura F, Funabashi T, Akema T. (2015) Sex differences in feeding behavior in rats: the relationship with neuronal activation in the hypothalamus. Front Neurosci 9: 88. doi: 10.3389/fnins.2015.00088.査読有り

2) Fukushima A, Hagiwara H, Yoshioka N, Kimura F, Akema T, Funabashi T. (2014) Expression of phosphorylated cyclic AMP response element-binding protein in melanin-concentrating hormone neurons and orexin neurons in male and female rats during ad libitum feeding. Neuroreport 25: 766-770.査読有り

〔学会発表〕(計 6 件)

1) Hagiwara H, Fukushima A, Akema T, Funabashi T (2016) Platelet-derived growth factor receptor alpha(PDGFR) expression are involved in the male mouse hypothalamus. 93rd Ann Meet Physiol Soc Japan.札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

2) Fukushima A, Hagiwara H, Akema T, Funabashi T (2016) Phosphorylation of signal transduction and activator of transcription 5 (STAT5) in the mouse liver involves high-fat diet (HFD)- induced obesity and glucose intolerance via platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFR). 93rd Ann Meet Physiol Soc Japan. 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

3) 萩原裕子, 福島篤, 船橋利也, 明間立雄 (2015) エストロゲンによる摂食調節は視床下部のオリゴデンドロサイト前駆細胞の PDGFR を介する. 第42回日本神経内分泌学会.仙台市戦災復興記念館(宮城県・仙台市)

4) 福島篤, 萩原裕子, 船橋利也, 明間立雄 (2015) 絶食によりマウス視床下部のオリゴデンドロサイト前駆細胞のPDGFR を介したシグナルは刺激されるが、高脂肪食によりこの調節系が障害される. 第42回日本神経内分泌学会・第23回日本行動神経内分泌研究会合同学会. (宮城県・仙台市)

5) Hagiwara H, Fukushima A, Funabashi T, Akema T. (2015) Estrogen increases the expression of platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFRa) in NG2-positive oligodendrocyte precursor cells of the hypothalamus in rats. 92nd Ann Meet Physiol Soc Japan. 神戸国際会議場・展示場(兵庫県・神戸市)

6) Fukushima A, Hagiwara H, Moya M, Funabashi T, Akema T. (2015) High-fat diet feeding impaired platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFRa)-mediated up-regulation induced by fasting in NG2-positive oligodendrocyte precursor cells of the hypothalamus in mice. 92nd Ann Meet Physiol Soc Japan.神戸国際会議場・展示場(兵庫県・神戸市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織
(1)研究代表者

萩原 裕子 (HAGIWARA, Hiroko)
聖マリアンナ医科大学・医学部・助教
研究者番号：90468207