Differential Expression of c-Fos Protein in the Rat Brain after Noxious and Itching Stimuli

Emiko Senba and Tomoyuki Takagi

Department of Anatomy and Neurobiology, Wakayama Medical College, Wakayama, Japan

(Received 5 April 1993)

Abstract

Activation of immediate early genes, such as c-Fos is linked to genomic events which control long-term changes in the nervous system. To identify which brain regions are activated by noxious or itching stimuli, we used an expression of c-Fos protein as a marker. Noxious stimulation was applied to Sprague Dawley rats by pinching the toe with a clip or by injecting 0.05 ml of 5 % formalin into the foot pad. Histamine (500 mg/ml saline) was applied to the shaved skin of lower limbs as an itchy stimulus. These animals were killed by perfusion after 1 or 2 hrs. An increased number of neurons expressing c-Fos-like immunoreactivity was observed in discrete brain regions, such as the cortex, especially in the perirhinal and piriform cortices, the lateral septum, midline nuclei of the thalamus, parvocellular region of the paraventricular hypothalamic nucleus (PVH), catecholaminergic and serotonergic neurons in the brain stem and the nucleus tractus solitarius, in response to pain or itch. These distribution patterns were very similar to those observed after immobilization stress, suggesting that both pain and itch serve as stressors. In addition to above described areas, application of histamine to the skin caused expression of c-Fos-like immunoreactivity in the bed nucleus of stria terminalis (BST), central amygdaloid nucleus (ACe), magnocellular neurons in the PVH and supraoptic nucleus, circumventricular organs, such as organum vasculosum of the lamina terminalis (OVLT), subfornical organ (SFO) and area postrema. Magnocellular neurons in the hypothalamus are shown to receive excitatory inputs from the BST, ACe and SFO. These findings indicate that histamine-caused itch may elicit a variety of reactions, which is not observed after noxious stimulation, by activating hypothalamic magnocellular neurons and related areas to them.

Key Words : pain, itch, c-Fos, brain, rat

c-Fos 発現よりみた痛みと痒みの違いについて

仙波恵美子 高木 伴幸

和歌山県立医科大学 第2解剖学教室

はじめに

生体に加えられる種々の刺激により神経系において proto-oncogene の一種である c-Fos 遺伝子が活性化され、産生された Fos 蛋白が標的遺伝子の転写を活性化して、種々の神経活性物質が産生される¹⁵⁾。それ故、c-Fos は刺激により賦活されるニューロン群のマーカーとして用いることができる。我々はこれまで、疼痛により、拘束ストレスを与えた時と同様の脳内の諸領域に C-Fos mRNA や Fos 蛋白が発現することを明らかにして、持続的な疼痛刺激が生体に対してストレスラーとして働いていることを示した¹⁴⁾。

慢性の疼痛も耐え難いものであるが、アトピー性皮膚炎や蕁麻疹などの皮膚疾患による痒みも生体にとってはかなりのストレスになっていると思われる。痒みも痛みと同様、細い線維によって感受され脊髄後角に伝えられるが、その詳細なメカニズムは不明である。痒みは痛みと同じ線維により伝えられ、nociceptor の低レベルの刺激が痒みであるとする説 (intensity theory) や、痒みにだけ応じるニューロン・システムがあるとする説 (specificity theory)、また selectivity theory や pattern theory などがあるが¹¹⁾、痛みと痒みの相似点と相違点を明確に説明し得る理論はない。

痛み刺激により刺激部位に応じたレベルの脊髄後角で Fos 蛋白を核に発現するニューロンが、刺激後一過性に出現し¹⁰⁾、その発現はオピエートにより抑制される¹³⁾。我々は最近、ヒスタミンによる痒み刺激によっても、脊髄後角において Fos 蛋白を発現する細胞が出現し、これもオピエートの前投与により抑制されることを明らかにした¹⁹⁾。ヒスタミンはもっともよく知られている痒み惹起物質 (pruritogen) であり⁹⁾、ヒスタミンを我々の皮膚に塗ると痒みが生じ、掻くことによりそれが増強する。ヒスタミンの皮下への microiontophoresis により、C-線維が興奮することが報告されている⁷⁾。また、サブスタンス P や CGRP を含有する小型の後根神経節細胞に対し、ヒスタミンは H1 レセプターを介して Ca^{++} イオン

の流入を起こす¹⁷⁾。

今回、我々はヒスタミンによる痒み刺激で脳内のどのような領域に Fos 陽性細胞が出現するかを明らかにし、疼痛刺激の場合と比較することにより、痛みと痒みの生体に与える影響の違いについて検討した。

研究材料・方法

動物は SD 系雄性ラット (体重 150~200 g) 12 匹を用いた。疼痛刺激として、(1)足指をクリップで挟む (n=3)、(2)5% フォルマリン液 0.05 ml を足底に注入する (n=3)、方法を用いた。痒み刺激としては、24 時間前に剃毛したラットの後肢皮膚にヒスタミン (500 mg/ml 生食) 0.5 ml を一定量の綿花に浸して塗布し、ピンセットの先で軽く掻いた (20 回) (n=4)。コントロールラットにおいては、同様に剃毛した後肢に同量の生食を塗布し、同様にピンセットにより掻いた (n=2)。これらの処置はすべて urethane (80 mg/100 g 体重) 麻酔下で行った。1 時間後あるいは 2 時間後、これらの動物を、エーテル深麻酔下に 4% paraformaldehyde 液にて灌流固定し、脳と脊髄を取り出し、1~2 日間後固定した後、30% sucrose を含む 0.1 M PB に 2 日間浸漬した。粉末状のドライアイスで急速に凍結した後、クリオスタットにて 20 μ m の凍結切片を作製した。これらの切片は、蛍光抗体法あるいは ABC 法にて、Fos 蛋白の検出に供した。まず、human Fos 蛋白の N 端 4~11 の 8 アミノ酸より成る合成ペプチドに対する polyclonal 抗体 (ラビット) (Oncogene Science, Ab-2) (500 倍希釈) と 4°C で 2 日間反応させた。PBS にて洗浄後、蛍光抗体法の場合には FITC-抗ラビット IgG 抗体 (Miles) (1000 倍希釈) と、4°C で 1 日反応させた。PBS にて洗浄後、スライドガラスに貼り付けグリセリンで封入した。ABC 法の場合は、biotin-抗ラビット IgG ヤギ抗体 (Vector) (250 倍希釈) と室温で 1 時間、さらに avidin-biotin peroxidase complex (ABC Complemen, Vector) (100 倍希釈) と室温で 1 時間反応させた後、0.05% diaminobenzidine と 0.2% nickel ammonium sulfate, 0.003%

Fig. 1 Fluorescent photomicrographs showing neurons with c-Fos-like immunoreactive (FLI) nuclei in the superficial dorsal horn of lumbar spinal cord ipsilateral to the application of histamine (A) or noxious mechanical stimulation (B). Scale bar: 50 μ m.

Fig. 2 Photomicrographs showing FLI neurons in the lateral septum (LS) (A), bed nucleus of stria terminalis (BST) (B), subfornical organ (SFO) (C) and amygdala centralis (ACe) (D) of animals subjected to histamine-caused itch. Scale bar: 200 μ m.

H₂O₂を含むTBS (0.1 M Tris-Buffer Saline, pH 7.5) 溶液にて発色させた。0.5%ゼラチン水にてスライドガラスに貼り付け、脱水透徹後、封入した。

結 果

脊髄においては、疼痛刺激でも痒み刺激でも刺激部位に一致したレベルの後角表層に Fos 陽性細胞

が多数出現した (Fig. 1)。対側の後角にも極少数の陽性細胞が認められた。生食を塗布したコントロールラットでは Fos 陽性細胞はほとんど認めなかった。

コントロールラットの上位脳では、嗅球・梨状葉皮質・視交叉上核・外側膝状体腹側核・上丘・下丘・脚傍核・背側蝸牛核などの嗅覚・視覚・聴覚・味覚系の核群において Fos 陽性細胞が認められたが、他

Fig. 3 Fluorescent photomicrographs showing FLI neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus (PVH) (**A, C, E**) and supraoptic nucleus (SON) (**B, D, F**) in controls (**A, B**) and in rats subjected to noxious mechanical stimulation (**C, D**) or histamine-caused itch (**E, F**). Note that numerous FLI neurons are distributed in both parvocellular (pv) and magnocellular (mg) regions of the PVH (**E**) and in both dorsal and ventral parts of the SON (**F**) in the case of itching stimulation. Scale bar: 50 μ m.

の領域においてはほとんど認められなかった。疼痛刺激あるいはヒスタミン刺激を与えたラットでは、上記の領域に加え、大脳皮質、外側中隔核(LS) (**Fig. 2A**)、視床室傍核 (PV)・中心外側核 (CL)・正中中心核 (CM)、視床下部室傍核 (PVH)・視索上核 (SON)、青斑核や橋・延髄腹外側部のカテコラミン産生細胞群、縫線核群、孤束核などにコントロールラットに比べて明らかに多数の Fos 陽性細胞が認

められた。ただし、PVH においては、疼痛刺激では小細胞性部のみ Fos 陽性細胞がみられたが、ヒスタミン刺激では小細胞性部と大細胞性部の両方に認められた (**Fig. 3A, C, E**)。また、SON においては、疼痛刺激では少数の Fos 陽性細胞が背部部にのみ分布しているのに対して、ヒスタミン刺激では腹側部も含め核全体に多数の陽性細胞が分布していた (**Fig. 3B, D, F**)。一方、ヒスタミン刺激では全例、

Fig. 4 Fluorescent photomicrographs showing FLI neurons in the area postrema (AP) and nucleus tractus solitarius (NTS) in controls (**A**) and in rats subjected to noxious mechanical stimulation (**B**) or histamine-caused itch (**C**). Scale bar: 50 μ m.

分界条床核 (BST)・扁桃体中心核 (ACe) (**Fig.2B, D**)・外側手綱核 (LHb) に多数の Fos 陽性細胞が認められ, また終板器官 (OVLT)・脳弓下器官 (SFO) (**Fig. 2C**)・最後野 (AP) (**Fig. 4**) などの脳室周囲器官群にも陽性細胞が認められた。クリップによる機械的疼痛刺激では, これらの核群には Fos 陽性細胞はまったく認められなかったが, フォルマリン注入

Table 1 Summary of differential FLI expression after mechanical/chemical noxious stimulation and histamine-caused itch

	Pinch	Formalin	Histamine
LS (外側中隔核)	+	+	+
BST (分界条床核)	—	—	+
PVH (視床下部室傍核)			
pv (小細胞性部)	+	+	+
mg (大細胞性部)	—	—	+
SON (視索上核)			
dorsal	+	+	+
ventral	—	—	+
PV (視床室傍核)	+	+	+
LHb (外側手綱核)	—	±	+
Amy (扁桃体)			
AMe (内側核)	+	+	+
ACe (中心核)	—	±	+
LC (青斑核)	+	+	+
PB (脚傍核)	+	+	+
NTS (孤束核)	+	+	+
脳室周囲器官			
OVLT (終板器官)	—	—	+
SFO (脳弓下器官)	—	±	+
AP (最後野)	—	±	+

による疼痛刺激の場合は, ACe・LHb・SFO・AP において, 少数の陽性細胞が認められた。以上の結果を **Table 1** にまとめて示す。

考 察

種々のストレスや疼痛刺激により, 脳内の特定の領域に Fos 蛋白陽性細胞が出現することはこれまでに明らかにされている^{2,4,14}。本研究により, ヒスタミンによる痒み刺激によっても, 拘束ストレスや疼痛刺激と共通の領域, 例えば PVH の小細胞性部や青斑核などに Fos 蛋白発現細胞が認められることがわかった。このことから, ヒスタミンによる痒みが生体にとってストレスとして作用していることが伺われる^{4,14}。一方, 拘束ストレスや疼痛刺激では Fos 発現がみられず, ヒスタミン刺激でのみ Fos 発現がみられる領域があることが本研究により明らかになった。これらの領域は, 分界条床核 (BST)・扁桃体中心核 (ACe)・PVH の大細胞性部・視索上核 (SON)・室周囲器官群などである。これらの領域は互いに密な線維連絡を有し, angiotensin II の陽性終

末やりセプターが分布することが明らかにされており^{1,3)}、飲水行動や体内の浸透圧の調節に関与すると考えられている¹⁸⁾。また、脳室内への angiotensin II の注入によりこれらの領域に Fos 蛋白陽性細胞が多数出現することが報告されている⁹⁾。今回我々は、末梢でのヒスタミン刺激により同様の領域に Fos の発現を認めたが、この Fos 発現にヒスタミンが直接関与しているか、あるいは angiotensin II が関与しているかどうかはそれぞれのリセプターのブロッカーを用いて検討しなければならないが、いずれにしてもこれらの領域は飲水行動や浸透圧の調節以外にも多彩な機能に関与している可能性を示唆するものである。

PVH や SON の magnocellular neuron には vasopressin (AVP) と oxytocin (OT) を含むものがあり、それぞれの neuron 群は混在するのではなく核内において局在を示す⁹⁾。例えば、PVH の大細胞性部においては AVP を含むものは中核部分に、OT 陽性細胞は周辺部に分布する。また、SON においては AVP 陽性細胞は腹側部に、OT 陽性細胞は背内側部に局在する傾向がある。それぞれの部位により、脳幹からの入力機構も異なっている^{8,16)}。今回の実験で、疼痛刺激では SON の背側部にのみ Fos 陽性細胞がみられ、ヒスタミン刺激では SON 全体に認められたことから、疼痛刺激では OT 細胞の一部のみが、ヒスタミン刺激では AVP 細胞・OT 細胞ともに賦活されたことを強く示唆している。これらの magnocellular neuron からの AVP や OT の放出が、浸透圧の上昇や Ag II の増加のみならず、種々のストレスや疼痛によっても増加することが示されている⁹⁾。痛みと痒みが生体に与える影響の違いを考えるうえでも、また magnocellular neuron のより広汎な機能を考えるうえでも、興味深い現象である。

疼痛刺激やヒスタミン刺激により、上位脳で Fos が発現するメカニズムは明らかでないが、末梢での受容体の興奮が脊髄を介して上行性に伝わることによるものと、それ以外の経路 (extraspinal pathway) によるものの2種類が考えられる。後者には、不安・恐怖などのように中枢神経系に起因するもの (情

動)、末梢での炎症などにより生成される化学的 mediator (例えば、サイトカインなど) によるものなどが含まれるであろう。最近、フォルマリン注入による持続的な疼痛刺激で外側手綱核に出現する Fos 陽性細胞が、脊髄を切断しても同様に出現することが報告されている¹²⁾。フォルマリン注入による刺激は、初期のフォルマリンそのものによるものと、二次的な局所の炎症反応によるものの2種類があるといわれている。単純な機械的刺激と炎症反応を伴う刺激では、中枢での Fos 発現に対する影響が異なっていると考えられる。今回、我々が行った疼痛刺激でも、フォルマリン刺激では ACe, LHb, SFO, AP にも Fos 発現がみられたが、クリップによる機械的刺激ではこれらの領域に Fos 発現は認められなかった。もちろん、ヒスタミン刺激ではより強い発現がみられた。局所の炎症に伴って産生される何等かの化学的 mediator が、これらの領域での Fos 発現の引き金になっているのではないだろうか。以上、疼痛や痒みに伴う生体反応のメカニズムを解明していくうえで、Fos などの immediate early genes の発現が有用なマーカーになり得ることを示した。今後の研究の展開が期待される。

REFERENCES

- 1) Brownfield, M. S., Reid, I. A., Ganten, D. and Ganong, W. F., Differential distribution of immunoreactive angiotensin and angiotensin-converting enzyme in rat brain, *Neuroscience*, **7** (1982) 1759-1769.
- 2) Bullitt, E., Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat, *J. Comp. Neurol.* **296** (1990) 517-530.
- 3) Bunnemann, B., Iwai, N., Metzger, R., Fuxe, K., Inagami, T. and Ganten, D., The distribution of angiotensin II AT₁ receptor subtype mRNA in the rat brain, *Neurosci. Lett.*, **142** (1992) 155-158.
- 4) Ceccatelli, S., Villar, M. J., Goldstein, M., Hokfelt, T., Expression of c-Fos immunoreactivity in transmitter-characterized neurons after stress, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **86** (1989) 9569-9573.

- 5) Cunningham, E. Jr. and Sawchenko, P. E., Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus, *J. Comp. Neurol.* **274** (1988) 60-76.
- 6) Cunningham, E. Jr. and Sawchenko, P. E., Reflex control of magnocellular vasopressin and oxytocin secretion, *TINS* **14** (1991) 406-411.
- 7) Handwerker, H. O., Forster, C. and Kirchhof, C., Discharge patterns of Human c-fibers induced by itching and burning stimuli, *J. Neurophysiol.*, **66** (1991) 307-315.
- 8) Herbert, J., Forsling, M. L., Howes, S. R., Stacey, P. M. and Shiers, H. M., Regional expression of *c-fos* antigen in the basal forebrain following intraventricular infusions of angiotensin and its modulation by drinking either water or saline, *Neuroscience*, **51** (1992) 867-882.
- 9) Herndon, J. H. Jr., Itching: the pathophysiology of pruritus, *Int. J. Dermatol.*, **14** (1975) 465-484.
- 10) Hunt, S. P., Pini, A. and Evan, G., Induction of *c-fos*-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation, *Nature*, **328** (1987) 632-634.
- 11) McMahon, S. B. and Koltzenburg, M., Itching for an explanation, *TINS*, **15** (1992) 497-501.
- 12) Nagao, M., Kamo, H., Akiguchi, I. and Kimura, J., Induction of c-Fos-like protein in the lateral habenular nucleus by persistent noxious peripheral stimulation, *Neurosci. Lett.*, **151** (1993) 37-40.
- 13) Presly, R. W., Menétrey, D., Levine, J. D. and Basbaum, A. I., Morphine suppresses noxious stimulus-evoked Fos protein-like immunoreactivity in the rat spinal cord, *J. Neurosci.*, **10** (1990) 323-335.
- 14) Senba, E., Matsunaga, K., Tohyama, M. and Noguchi, K., Stress-induced *c-Fos* expression in the rat brain: Activation mechanism of sympathetic pathway, *Brain Research Bull.*, **30** (1993) in press.
- 15) Sheng, M. and Greenberg, M. E., The regulation and function of *c-fos* and other immediate early genes in the nervous system, *Neuron*, **4** (1990) 477-485.
- 16) Shioda, S., Shimoda, Y. and Nakai, Y., Ultrastructural studies of medullary synaptic inputs to vasopressin-immunoreactive neurons in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus, *Neurosci. Lett.*, **148** (1992) 155-158.
- 17) Tani, E., Shiosaka, S., Sato, M., Ishikawa, T. and Tohyama, M., Histamine acts directly on calcitonin gene-related peptide- and substance P-containing trigeminal ganglion neurons as assessed by calcium influx and immunocytochemistry, *Neurosci. Lett.*, **114** (1990) 171-176.
- 18) Wright, J. W. and Harding, J. W., Regulatory role of brain angiotensins in the control of physiological and behavioral responses, *Brain Res. Rev.*, **17** (1992) 227-262.
- 19) Yao, G. L., Tohyama, M. and Senba, E., Histamine-caused itch induces Fos-like immunoreactivity in dorsal horn neurons: effect of morphine pretreatment, *Brain Res.*, **599** (1992) 333-337.

Address for correspondence: Emiko Senba, M.D., Department of Anatomy and Neurobiology, Wakayama Medical College, 27 Kyuban-cho, Wakayama 640, Japan.
Telephone: 0734-26-8323