

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 3 0 年 5 月 2 8 日現在

機関番号 : 3 2 6 5 1

研究種目 : 若手研究(B)

研究期間 : 2015 ~ 2017

課題番号 : 1 5 K 1 9 1 9 4

研究課題名 (和文) 痛みの慢性化形成過程における扁桃体ノルアドレナリン機構の解明と介入

研究課題名 (英文) Development and use of models to identify the role of endogenous noradrenalin in the amygdala in chronic pain establishment

研究代表者

高橋 由香里 (TAKAHASHI, YUKARI)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 2 0 6 1 3 7 6 4

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) : 慢性痛の本態は中枢神経系の可塑的变化にあることが臨床・基礎的な様々な知見から示唆されており、扁桃体は様々な疼痛モデル動物でシナプス伝達の増強が報告されている。本研究ではノルアドレナリンによる神経活動修飾作用が疼痛下での扁桃体の可塑的变化の一因となるという仮説を立てた。ノルアドレナリン神経特異的Cre発現ラットを作製し、ウイルスベクターによる光遺伝学ツールを適用することにより、扁桃体で光誘発内因性ノルアドレナリン放出を誘導しそれによる応答を電気生理学的に記録した。また、扁桃体ノルアドレナリン神経終末を特異的に神経毒で脱落させ、扁桃体ノルアドレナリンが疼痛関連行動の表出に関与する事実を見出した。

研究成果の概要 (英文) : Accumulated lines of evidence indicates pain chronification is characterized by plastic changes of central nervous system. The synaptic potentiation in the amygdala in various types of pain models are reported. This study was undertaken to examine a hypothesis that noradrenergic modulation of the amygdala is one of the key mechanisms of pain chronification. For this purpose, we produced DBH-tTA-2A-cre BAC Tg rats and we injected AAV vectors for the channelrhodopsin into noradrenergic receptors. In the brain slices, we could observe light-evoked release of noradrenalin, which evoked electrophysiological responses. The involvement of endogenous noradrenalin in the central was also confirmed by evaluating the pain-associated behavior after inactivating noradrenergic neurons with DBH-saporin. Altogether, we demonstrated that endogenous adrenaline play essential role during the establishment of chronic pain.

研究分野 : 神経科学

キーワード : 情動 疼痛 シナプス可塑性 扁桃体 パッチクランプ記録 モノアミン

1. 研究開始当初の背景

（１）痛みの本質的な臨床医学的問題は、その強い「苦痛」が、日常生活を著しく妨害し、人格や理性までも破綻させることにある。特に慢性痛では、一次的組織損傷や炎症の回復期を過ぎても痛みが持続し、その痛みは生物学的意義に乏しい。慢性痛成立の背景には、脳内の痛み関連諸領域から構成される「痛みのマトリクス」においてシナプス伝達が可塑的に変化し、固定化することにより、侵害受容-情動連関を亢進させる可能性がヒトおよび動物モデルでの研究から示されつつある。この可塑的変化の固定化の解除は慢性痛治療の重要な戦略となる可能性がある。

（２）侵害受容-情動連関亢進の責任部位として、扁桃体中心核外包部（CeC）が同定されている。CeCには、脊髄-腕傍核（LPB）-扁桃体（CeC）路を介して侵害受容情報の大部分が直接入力する。この経路の最終段 LPB-CeC シナプスでのシナプス伝達は、様々な疼痛モデル動物で増強する。一方、扁桃体は下行性疼痛制御系の最上流核として脳幹の神経核を介し脊髄レベルで疼痛閾値を制御すると考えられている。

（３）ノルアドレナリンは、下行性疼痛制御系の主要な神経伝達物質である。末梢組織損傷時、ノルアドレナリンは主に青斑核ニューロンから脊髄に放出され、 $\alpha 1$ および $\alpha 2$ 受容体を介し、一次感覚神経から二次ニューロンへのシナプス伝達を下行性に抑制する。脳幹ノルアドレナリン神経は、脳内にも多くの部位に投射しており、海馬や扁桃体などではシナプス可塑性を修飾する。我々は扁桃体において LPB-CeC シナプス伝達や、CeC ニューロンの投射先である扁桃体中心核内側部（CeM）の自発的抑制性シナプス伝達が外因性ノルアドレナリンによって修飾されることを見出している。その一方で、このようにノルアドレナリンによってシナプス伝達修飾を受けうる扁桃体中心核ニューロンは、脳幹ノルアドレナリン神経核に投射している。

2. 研究の目的

（１）以上の背景により、扁桃体と脳幹ノルアドレナリン神経核は痛み関連神経回路ループを作っている可能性がある。そこで、研究代表者らは、この扁桃体-ノルアドレナリン神経核ループが痛みの慢性化形成に寄与するという仮説を立てた。その検証のために、扁桃体シナプスでのノルアドレナリンシナプス伝達修飾メカニズム、および、疼痛存在下におけるその変化を解明し、さらに疼痛存在下における扁桃体での内因性ノルアドレナリンの役割を明らかにすることを目的とした。この目的を果たすために、光遺伝学、疼痛モデル作製、脳スライス標本でのシナプス伝達解析を組み合わせアプローチした。

3. 研究の方法

（１）ノルアドレナリン合成酵素 DBH プロモーター下に Cre リコンビナーゼが発現している、ドパミン β ハイドロキシラーゼ（DBH）DBH-tTA-2A-cre BAC Tg ラット（C.B.S.N リソース・技術支援により作出され非営利的譲渡を受けた）の脳幹ノルアドレナリン神経核（青斑核、孤束核等）に、Cre 依存的チャネルロドプシン（ChR2）発現用アデノ随伴ウイルスベクターを微量注入する。数週間後、ウイルスベクター注入部位であるノルアドレナリン神経核、または、扁桃体を含む急性脳スライスを作製し、ホールセルパッチクランプ法によりニューロンから記録を行う。青色 LED で、ChR2 発現ノルアドレナリン神経細胞の細胞体、または、扁桃体の ChR2 発現軸索終末を刺激し、その応答を記録する。

（２）扁桃体中心核での内因性ノルアドレナリンの疼痛関連行動への影響を解析するため、扁桃体中心核に抗 DBH サポリンを微量注入する。数週間後、扁桃体中心核のノルアドレナリン神経終末が脱落する。この動物を用い、疼痛関連行動を評価し、扁桃体での内因性ノルアドレナリンの疼痛行動における役割を明らかにする。

4. 研究成果

（１）本研究計画の根幹となる DBH-tTA-2A-cre BAC Tg ラットの作製と評価：包括型脳科学研究推進支援ネットワークリソース・技術支援により作製された DBH-tTA-2A-cre BAC Tg ラット 9 系統中 3 系統について Cre 依存的蛍光タンパク（tdTomato）発現レポーターラットとの交配および抗 DBH 抗体での免疫染色を行い Cre リコンビナーゼ発現の評価を行った。ノルアドレナリン作動性神経において選択的な tdTomato 発現を確認した。A6 である青斑核では青斑核ニューロンの密な細胞集団で（図 1）、A1/2 である孤束核ではやや腹側にまばらに（図 2）tdTomato が発現していた。ラットの系統により導入された cre 遺伝子のコピー数が異なり、それに応じて DBH 免疫染色陽性細胞中の tdTomato 発現細胞の割合が異なったが、発現細胞の分布には系統間での著しい違いは認められなかった。これらの結果から、この動物が光遺伝学や化学遺伝学などに応用できる可能性を確認した。また、本研究計画では痛みの慢性化における内因性ノルアドレナリンの影響の評価を目的としてこの動物を作製したが、他のノルアドレナリンが関与するさまざまな生理機能における内因性ノルアドレナリンの意義を解明する研究に用いることができるため、京都大学ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」に W-Tg(Dbh-tTA/cre)***Fusa (***部分；2_7, 5_4, 5_9 の 3 系統、それぞれ NBRP No. 0856, 0878, 0879) を寄託し、公開することとした。本研究計画の重要な社会的成果

である。導入遺伝子のコピー数が最も多い W-Tg(Dbh-tTA/cre)2.7Fusa 系統を維持し研究に用いることとした。

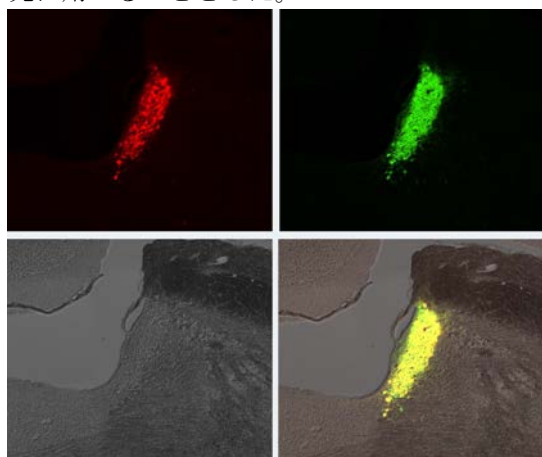


図1：青斑核における Cre 依存的 tdTomato 発現（左上：Cre 依存的 tdTomato、右上：抗 DBH 抗体での免疫染色、左下：微分干渉画像、右下：以上3つの重ね合わせ画像）

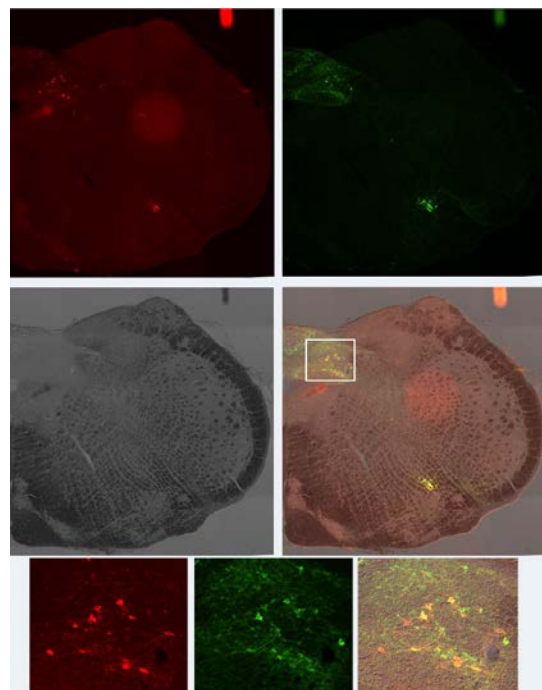


図2：孤束核における Cre 依存的 tdTomato 発現（上段4パネル…左上：Cre 依存的 tdTomato、右上：抗 DBH 抗体での免疫染色、左下：微分干渉画像、右下：以上3つの重ね合わせ画像、下段3パネル…左から tdTomato、DBH 免疫染色、微分干渉画像、tdTomato、抗 DBH 免疫染色の重ね合わせ（上段右下の白い枠で囲まれた領域））

（2）DBH-tTA-2A-cre BAC Tg ラットへのウイルスベクターによる遺伝子発現系を用いたノルアドレナリン神経の形態評価と光操作：上記のレポーターラットとの交配による Cre 発現の確認実験により、青斑核、および、孤束核において、明瞭な tdTomato 発現が確認された。この動物のノルアドレナリン神経核に Cre 依存的チャンネルロドプシン発現用ウ

イルスベクターを導入し、特異的ノルアドレナリン神経核から扁桃体への投射を光遺伝学的に操作することに取り組んだ。まず、孤束核へアデノ随伴ウイルスベクター AAV5. EF1a. DIO. EYFP を微量局所注入し、孤束核ノルアドレナリン神経から扁桃体への投射の形態を観察した。扁桃体中心核内の腹側に主に投射が認められ、終末の形態はブトン様の構造が多い傾向にあり、腕傍核から扁桃体中心核に投射するグルタミン酸作動性ニューロンの軸索終末とは異なる形態を示していた。次にチャンネルロドプシン発現ベクター AAV5. EF1a. DIO. hChR2 (H134R) -EYFP を孤束核に導入し、導入部位での発現とチャンネルロドプシン機能の確認を目的とした急性脳スライス標本でのノルアドレナリンニューロンからのパッチクランプ記録を行った。ウイルスベクター投与部位の EYFP 陽性細胞からの記録において、光刺激に応じ光誘発脱分極が認められた。この動物において、扁桃体を含む急性脳スライス標本作製し光刺激を行い内因性ノルアドレナリン放出を誘発した。h 電流への影響を解析したところ、わずかなではあるが光刺激による振幅変化が確認された。以上の実験により、扁桃体ニューロンへの「内因性」ノルアドレナリンの役割を解明するのに必要な実験系を確立することができた。

（3）ノルアドレナリン神経がどのような痛み行動に影響するのかを解析するために、扁桃体中心核に抗 DBH サポリンを微量注入し DBH 発現神経終末の選択的脱落を誘導し疼痛関連行動解析を行った。扁桃体中心核ノルアドレナリン神経終末の脱落によって炎症性疼痛モデル動物における温度嗜好性に変容する事実が明らかになった。扁桃体において内因性ノルアドレナリンが疼痛関連行動調節に関わることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計6件）

- ① 高橋 由香里、加藤 総夫、【痛みと情動 - 基礎研究の最前線研究と臨床への応用 - 】痛みと情動 基礎医学 扁桃体と痛み、ペインクリニック、査読無、37巻、2016年、723-730頁
http://www.sshinko.com/magazine/?page_id=4
- ② Sugimura YK, Takahashi Y, Watabe AM, Kato F. Synaptic and network consequences of monosynaptic nociceptive inputs of parabrachial nucleus origin in the central amygdala. J Neurophysiol. (2016) 115: 2721-2739. 査読有
DOI: 10.1152/jn.00946.2015

〔学会発表〕（計6件）

- ① 高橋 由香里、加藤 総夫、辺縁系～脳幹機能コネクティクスのためのCreリコンビナーゼ発現ラットを用いたシナプス伝達解析、第45回自律神経生理研究会、東京、2017年12月
- ② Yukari Takahashi, Mariko Sugimoto, Yuta Miyazawa, Yae K Sugimura, Kei Shinohara, Ayako M Watabe, Fusao Kato. From nociception to emotion and vice versa - Role of the amygdala in pain chronification. 第94回日本生理学会大会、浜松、2017年3月
- ③ 高橋 由香里、Zahra Ghasemi、杉村 弥恵、篠原 恵、加藤 総夫、炎症性疼痛モデルラットにおける扁桃体 - 中脳水道周囲灰白質シナプス伝達、第36回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム、札幌、2016年8月
- ④ Yukari Takahashi, Yuta Miyazawa, Yae K Sugimura, Mariko Sugimoto, Kei Shinohara, Ghasemi Zahra, Ayako M Watabe, Fusao Kato. Role of the amygdala in early phase of the central pain chronification. 第39回日本神経科学大会、横浜、2016年7月
- ⑤ 加藤 総夫、高橋 由香里、渡部 文子、抑制性ニューロンおよびノルアドレナリン作動性ニューロン特異的Creリコンビナーゼ発現ラットの開発、包括型脳科学研究推進支援ネットワーク冬のシンポジウム、東京、2015年12月

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.jikei-neuroscience.com/webseite/publications/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 由香里 (TAKAHASHI, Yukari)
東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号：20613764

(2) 研究協力者

加藤 総夫 (KATO, Fusao)
東京慈恵会医科大学・医学部・教授
研究者番号：20169519

山本 純偉 (YAMAMOTO, Sumii)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：50402376

杉本 真理子 (SUGIMOTO, Mariko)