

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09042

研究課題名(和文)慢性痛痛み-情動連関亢進における内因性ノルアドレナリンの役割の解明

研究課題名(英文) Identification of the role of noradrenaline system in the enhanced nociception-emotion link in chronic pain

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：慢性痛で生じる扁桃体における可塑的变化に対する内因性ノルアドレナリンの意義を解明することを目的とし、DBH-tTA-2A-Cre BAC Tg rat 孤束核ニューロンにCre依存的にチャンネルロドプシンを発現させ、光刺激により内因性ノルアドレナリンの放出を誘導し、腕傍核-扁桃体中心核シナプス伝達、および、扁桃体ニューロン興奮性への影響を評価した。腕傍核-扁桃体中心核間興奮性シナプス後電流振幅の微増または微弱化、細胞外ノルアドレナリン再取り込み阻害薬duloxetine存在下での作用増強、および、過分極活性化非時間依存的不活性化型カチオンチャンネル電流の振幅の微小変化を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ノルアドレナリン神経特異的Creリコンビナーゼ発現ラットと光遺伝学技術を組み合わせ、内因性ノルアドレナリン放出を誘発し、ノルアドレナリンのvolume transmissionを示唆するシナプス伝達修飾作用を捉えることに成功した。また、ペインマトリクス全体の痛みの慢性化過程での脳活動の可視化、および、それに対する経路特異的活動介入評価が可能な小動物MRIの実験系を得ることができ、痛みの慢性化におけるノルアドレナリン神経やその他の特異的な経路の役割解明の技術基盤を得た。これらの実験事実、実験手法に基づき今後研究を進展させることで、慢性痛治療における新たな治療標的の提示が期待される。

研究成果の概要(英文)：Chronic pain is characterized by plastic changes in the brain networks. This study was undertaken to reveal the mechanism of pain chronification focusing on noradrenaline as an enhancer of plastic changes in pain network. We used a transgenic rat line, DBH-tTA-2A-Cre BAC Tg rat, to induce intrinsic noradrenaline release and analyze the effect of noradrenaline release on a pivotal synapse in pain pathway, the synapse between lateral parabrachial nucleus and central nucleus of the amygdala capsular part (LPB-CeC synapse). We injected AAV vector into a noradrenergic nucleus, nucleus solitary of tract, to express channelrhodopsin with cre-dependent manner. In acute brain slices, we induced intrinsic noradrenaline release by blue light and recorded light-evoked EPSCs in LPB-CeC synapse. We could observe slight synaptic modulation of noradrenaline and the effect of noradrenaline was enhanced by duloxetine, suggesting that the intrinsic noradrenaline release might be volume transmission.

研究分野：神経科学

キーワード：扁桃体 腕傍核 シナプス可塑性 モノアミン 神経生理

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

痛みの本質的な臨床医学的問題は、その強い「苦痛」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の苦しみが持続し、日常生活を著しく損なうため、医療経済や高齢者の社会福祉の面からも重要な問題である。近年ヒトおよび動物モデルでの研究から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広義の「ペインマトリクス」においてシナプス伝達の可塑的变化とその固定化があり、その結果侵害受容-情動連関が亢進する可能性が示されつつある。この可塑的变化のメカニズムの解明と固定化回復法の開発は喫緊の課題である。

侵害受容-情動連関亢進のキーとなる脳部位として扁桃体中心核(CeA)が同定されている。CeAには、脊髄-外側腕傍核(LPB)-扁桃体中心核(CeA)路を介し侵害受容情報が視床を経由せずに直接的に入力する。我々を含む複数の研究チームが様々な疼痛モデル動物でLPB-CeC(CeC:扁桃体中心核外包部)興奮性シナプス伝達が増強することを報告してきた。この事実からCeAは侵害受容性扁桃体と呼ばれている。さらにCeAは下行性疼痛制御系を介し脊髄レベルでの疼痛閾値制御に関与すると考えられている。

ノルアドレナリンは、下行性疼痛制御系の代表的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(LC)ニューロンから脊髄に放出され、 $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ 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抑制する。また、脊髄だけではなく、中脳水道周囲灰白質や吻側延髄腹内側部に投射する脳幹ノルアドレナリン神経は、これらの下行性疼痛制御系としての活動を修飾する。それらに加え、侵害受容情報が上行性に入力するCeAでもノルアドレナリンによる $\alpha_2$ 受容体を介したシナプス伝達修飾が報告されている。我々の研究チームは、LPB-CeCシナプス伝達、および、扁桃体中心核内側部(CeM)の自発的抑制性シナプス伝達のアドレナリン受容体を介した修飾、および、炎症性疼痛モデルで亜急性期のわずか数時間にCeMシナプス伝達に対するアドレナリン作動性の修飾作用が、継時的に変化する事実を見出している(Yamamoto et al., 北米麻酔科学学会 2015 で発表)。さらに、CeAニューロンはノルアドレナリン神経核にも投射しており、神経核間の双方向性連絡によるノルアドレナリン制御の最適化も示唆されている。扁桃体の機能としてよく知られる恐怖記憶学習ではノルアドレナリンがシナプス可塑性を制御するが、痛みの慢性化における侵害受容性扁桃体シナプス可塑性へのノルアドレナリンの役割についてはほとんど情報が無い。

### 2. 研究の目的

本研究は、「扁桃体とノルアドレナリン神経核が相互に作用し、慢性化プロセスの進行に関与する」という仮説を立て、以下の4つの側面に着目して検証することを目的として計画した。

- (1) 扁桃体シナプス伝達におけるノルアドレナリンによる修飾機構
- (2) 扁桃体-青斑核(LC)、扁桃体-孤束核(NTS)シナプス伝達の様式
- (3) 急性~慢性痛におけるこれらの可塑的变化とその機構
- (4) 慢性痛形成過程におけるこれらの双方向性制御への介入が痛み情報処理機構に及ぼす影響

### 3. 研究の方法

上記の目的のために、光遺伝学・化学遺伝学技術、疼痛モデル作製、脳スライス標本でのシナプス伝達解析、および、小動物高磁場MRI解析を組み合わせ、以下の課題の解明に取り組む計画を立案した。

- (1) 侵害受容扁桃体(扁桃体中心核)シナプス伝達において内因性ノルアドレナリン放出を誘発しその作用機構を解析する。
- (2) 急性~慢性痛モデルで(1)を解析し、痛みの慢性化過程での可塑的变化を解析する。
- (3) 痛みの慢性化過程での痛みの情報処理回路への介入が、ペインマトリクス全体の可塑的变化を破綻しうるかを調べるために、疼痛モデル慢性化過程で内因性ノルアドレナリン神経を活動介入し扁桃体シナプス伝達解析、および、MRIによるペインネットワーク解析を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) 光遺伝学技術による内因性ノルアドレナリン放出誘導

ドパミン ヒドロキシラーゼプロモーター制御下に Cre リコンビナーゼを発現する DBH-tTA-2A-Cre BAC Tg rat の主要なノルアドレナリン神経核である孤束核に Cre 依存的チャネルロドプシン発現用アデノ随伴ウイルスベクターを微量注入した。8週間後に急性脳スライス標本を作製し、扁桃体中心核におけるウイルスベクター由来蛍光タンパク陽性ノルアドレナリン神経終末を観察した。その後、扁桃体中心核ニューロンよりパッチクランプ記録を行い、光刺激の影響を解析し、以下の結果を得た。

- ・孤束核にウイルスベクターを局所注入した動物では扁桃体中心核に豊富な蛍光シグナル陽性終末が認められた。青斑核でのウイルスベクター導入は実施例が少なく、今後の引き続きの検討が必要である。
- ・連続光刺激によって、いくつかのニューロンにおいて腕傍核-扁桃体中心核間興奮性シナプス後電流振幅の微増または微弱化が確認できた。
- ・細胞外ノルアドレナリン再取り込み阻害薬 duloxetine 存在下では、シナプス後電流振幅変化が亢進する例があった。

・同様に duloxetine 存在下、光刺激による過分極活性化非時間依存的不活性化型カチオンチャネル電流の振幅の変化がわずかに認められる例があった。この結果から、ノルアドレナリンが、興奮性シナプス近傍ではなく細胞外に拡散的に遊離される volume transmission 様式で放出されている可能性が示唆された。ノルアドレナリン神経線維ヴァリコシティの分布と腕傍核-扁桃体中心核のシナプスの局在の解析が必要である。

以上の実験的試行を通して、内因性ノルアドレナリンの放出誘導の最適条件の検討が困難であったため、光遺伝学技術により腕傍核ニューロン終末を特異的に刺激して腕傍核-扁桃体中心核シナプス伝達を選択的に記録し、外因性ノルアドレナリンの作用とその受容体を解析した。

#### (2)腕傍核-扁桃体中心核興奮性シナプス伝達への外因性ノルアドレナリン作用

腕傍核ニューロンのマーカー分子であるカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) のプロモーター制御下に Cre リコンビナーゼを発現する CGRP-cre マウス腕傍核に Cre 依存的チャンネルロドプシン発現ウイルスベクターを局所投与し、腕傍核ニューロン神経終末にチャンネルロドプシンを発現させることにより、腕傍核-扁桃体中心核シナプス伝達を特異的に記録した。これまでに報告されてきた腕傍核-扁桃体中心核シナプス伝達におけるノルアドレナリンの作用は、プレシナプスにおける  $\alpha_2$  受容体によるシナプス伝達抑制であり、本研究でも実際に  $\alpha_2$  受容体を介したその作用を確認することができたが、それ以外にノルアドレナリンによって外向き膜電流が生じる例があった。外向き電流の責任アドレナリン受容体は  $\alpha_2$  受容体以外であることが示唆されたが詳細は解析中であり、今後扁桃体中心核ニューロン発現アドレナリン受容体分布を局所ネットワーク内の役割と合わせて解析していく予定である。

#### (3)内因性ノルアドレナリン放出実験系の評価方法の検討

内因性ノルアドレナリンを光遺伝学的手法により放出させるにあたり、繰返し光刺激への伝達物質放出の追従性などのノルアドレナリン放出の性質を評価する必要が生じた。ノルアドレナリンセンサー分子 (GPCR activation-based NE (GRABNE sensor) を扁桃体ニューロンに発現させ、ノルアドレナリンの放出を可視化し評価するために、現在センサーを扁桃体ニューロンに発現させるためのウイルスベクターを作製している最中である。今後、ウイルスベクターを扁桃体に発現させ、光刺激によるノルアドレナリンの最適条件を検討する予定である。

#### (4)ペインマトリクス全体の活動に対するノルアドレナリン放出の影響の評価系の確立

内因性ノルアドレナリンの痛み関連脳内ネットワーク全体への影響を評価する方法として小動物用 MRI による評価系を確立した。扁桃体中心核の神経活動を化学遺伝学技術で抑制することにより、炎症性疼痛モデル動物における脳内痛みネットワーク活動の一部が抑制される事実を、マンガン造影 MRI 法により確認することができた (Arimura et al., *Frontiers in Neural Circuits* 2019)。今後、痛みの慢性化の過程で特異的ノルアドレナリン神経核-扁桃体シナプス伝達の活動を化学遺伝学的に操作することにより、痛みネットワーク全体の可塑的变化にどのような影響を与えるか解析を進める。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Daigo Arimura, Kei Shinohara, Yukari Takahashi, Yae K Sugimura, Mariko Sugimoto, Tomokazu Tsurugizawa, Keishi Marumo, Fusao Kato.	4. 巻 13
2. 論文標題 Primary Role of the Amygdala in Spontaneous Inflammatory Pain- Associated Activation of Pain Networks - A Chemogenetic Manganese-Enhanced MRI Approach	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Neural Circuits	6. 最初と最後の頁 58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncir.2019.00058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yukari Takahashi, Yuta Miyazawa, Daigo Arimura, Yae K Sugimura, Fusao Kato.	4. 巻 35
2. 論文標題 Right-side predominance of the central amygdala activation in trigeminal inflammatory pain model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PAIN RESEARCH	6. 最初と最後の頁 10~16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.11154/pain.35.10">https://doi.org/10.11154/pain.35.10</a>	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yuta Miyazawa, Yukari Takahashi, Ayako M Watabe, Fusao Kato.	4. 巻 14
2. 論文標題 Predominant synaptic potentiation and activation in the right central amygdala are independent of bilateral parabrachial activation in the hemilateral trigeminal inflammatory pain model of rats.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Pain.	6. 最初と最後の頁 1-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1744806918807102.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Fusao Kato, Yae K Sugimura, Yukari Takahashi.	4. 巻 1099
2. 論文標題 Pain-associated neural plasticity in the parabrachial to central amygdala circuit -Pain changes the Brain, the Brain changes the Pain.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Adv Exp Med Biol.	6. 最初と最後の頁 157-166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-13-1756-9_14.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuya Okutsu, Yukari Takahashi, Masashi Nagase, Kei Shinohara, Ryo Ikeda, Fusao Kato.	4. 巻 13
2. 論文標題 Potentiation of NMDA receptor-mediated synaptic transmission at the parabrachial-central amygdala synapses by CGRP in mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Pain	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1744806917709201	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 高橋由香里、加藤総夫	4. 巻 38
2. 論文標題 【痛みに関する脳機能研究アーカイブズ】 扁桃体と痛み	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ペインクリニック	6. 最初と最後の頁 965-972
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件(うち招待講演 0件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 高橋由香里
2. 発表標題 三叉神経支配領域炎症性疼痛モデルにおける扁桃体疼痛制御機構
3. 学会等名 第41回日本疼痛学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋由香里
2. 発表標題 Neuropathic pain-associated plasticity in the nociceptive amygdala
3. 学会等名 第48回内藤コンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukari Takahashi, Takeru Onozato, Tsuyoshi Tokita, Yae K Sugimura, Fusao Kato.
2. 発表標題 The impact of the potentiated parabrachioamygdaloid synaptic transmission on the central amygdala network signaling in the rats with neuropathic pain.
3. 学会等名 The 11th FENS Forum of Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masouneh Ghaemi-Jandabi, Zahra Ghasemi, Yukari Takahashi, Yae K Sugimura, Fusao Kato.
2. 発表標題 Optogenetically activated monosynaptic transmission from the central amygdala to the periaqueductal gray in rats with inflammatory pain.
3. 学会等名 The 11th FENS Forum of Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yukari Takahashi, Takeru Onozato, Yae K Sugimura, Fusao Kato.
2. 発表標題 Effect of neuropathic pain on the optogenetically activated feedforward inhibition.
3. 学会等名 Neuroscience 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yukari Takahashi, Yuta Miyazawa, Yae K Sugimura, Fusao Kato.
2. 発表標題 Lateralized amygdala plasticity independent of bilateral parabrachial activity in inflammatory pain.
3. 学会等名 The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukari Takahashi.
2. 発表標題 The active role of the amygdala in the expression of the allodynia.
3. 学会等名 1st Pain and cortex summer meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高橋由香里, 加藤総夫.
2. 発表標題 辺縁系 ~ 脳幹機能コネクトミクスのための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.
3. 学会等名 第45回自律神経生理研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 加藤 総夫, 高橋由香里, 杉村 弥恵.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 7
3. 書名 Annual Review 神経 2019	

〔産業財産権〕

〔その他〕

Jikei Neuroscience 東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター 神経科学研究部 <a href="http://www.jikei-neuroscience.com/website/publications/index.html">http://www.jikei-neuroscience.com/website/publications/index.html</a>
---

## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	加藤 総夫  (Kato Fusao)  (20169519)	東京慈恵会医科大学・神経科学研究部・教授    (32651)	
研究協力者	ガエミ ジャンダビ マスメ  (Ghaemi-Jandabi Masoumeh)		
研究協力者	有村 大吾  (Arimura Daigo)	東京慈恵会医科大学・神経科学研究部・大学院生    (32651)	