様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成　22 年　5 月　24 日現在

研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2007～2009
課題番号：１９５９１７３６
研究課題名（和文）　神経因性慢性疼痛の形成に関与する情動関連神経機構の意義の解明

研究課題名（英文）　Synaptic mechanism in emotional nervous system under establishment of chronic pain

研究代表者
池田　亮　（IKEDA RYO）
東京慈恵会医科大学　医学部　助教
研究者番号：２０４３９７７２

研究成果の概要（和文）：正常の状態から神経因性疼痛が成立すると、急性痛とは異なる新しい様式の可塑性が、脳内疼痛関連情動神経機構の一端を担う扁桃体内シナプスで生じることを認めた。また疼痛依存的に増大するこのシナプス伝達は、シナプスそのものの構造的変化によって生じている事実が明らかとなった。本実験結果は、痛みに対する新たな治療法（ターゲット、時間）を確立する上で重要な基盤となると考えた。

研究成果の概要（英文）：New modalities of synaptic plasticity distinct from acute pain occurred in the amygdala under establishment of neuropathic pain. Moreover, this potentiation was dependent on the structural changes of synapse in the amygdala. It was thought that this result became important for establishing a new treatment method to relief chronic pain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2007 年度	700,000	210,000	910,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総　計	1700,000	510,000	2210,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学
キーワード：筋・神経病学

１．研究開始当初の背景

(1) 疼痛は生態防御のための有用な警告機構であるが、慢性化し持続的になると、それ自体が有害な病態となる。2006年には本邦初の大規模調査で、約13.4%・推定1700万人の人が慢性疼痛を保有していることが報告されており、疼痛治療の早期充実が重要とされている。
(2) 難治性慢性疼痛の一つである神経因性疼痛は灼熱痛、発汗異常、血管運動障害とともに、侵害性刺激に対する閾値低下からなる痛覚過敏反応や触覚刺激で引き起こされる allodynia を生じ、患者の quality of life を著しく低下させる。このような疼痛に対しては、侵害性あるいは炎症性疼痛と異なり従来の鎮痛薬が有効でないのが現状である。
(3) これまでに脊髄後角において、神経損傷の慢性化にともない、可塑的変化が誘導されると報告されているが、国

際疼痛学会でも定義されているように、疼痛は、「実際に存在する、または、潜在的、あるいはそれらに関連して表現される組織損傷に関連した、不快な感覚的、および、情動的な経験」であり、体性感覚成分だけでなく「負の情動成分」についても分子・細胞レベルの解明が必要となっている。
(4) この感情成分の成立には、末梢組織からの疼痛情報が脊髄を通じてより高位中枢にある脳内情動関連神経機構に伝播され認識される必要がある。2007年、その中心的役割をになう扁桃体中心核(CeA) において、神経因性疼痛成立時にシナプス伝達可塑的変化が生じることを、モデルラットを用いて発見し国際的一流誌で公表した。
(5) しかしながら成立したシナプス伝達可塑的変化が CeA 内で固定化され、原発性の外傷や炎症が治癒した後も持続する特異的な不快感や恐怖といった患者の主観的な「痛み」を生じるのかどうか、更なる検討が必要である。

２．研究の目的

国際疼痛学会によれば、「痛み」は体性感覚成分だけでなく、負の情動と結びついた「情動的体験」と定義されている。特に慢性痛は、急性痛と異なり、組織損傷や強い侵害受容なしに生じる負の情動が主体となるため治療が困難になることが多い。疼痛経路として一般的に認識されているのは外側脊髄視床路であるが、近年になり選択的に侵害受容性情報を投射する経路として脊髄―橋腕傍核(PB)－扁桃体経路が提唱された。2007年、この新たな疼痛経路に注目した研究で、上位中枢内情動関連神経機構の中心的役割を担うCeAにおいて経路およびside specificなシナプス伝達可塑性が生じることを発見した。しかしながらこのシナプス伝達増強が組織損傷改善後も持続しCeA内で「固定化」され、“不快感や恐怖”といった患者の主観的な「痛み」をもたらすのか更なる詳細な検討が必要である。そこで神経因性疼痛成立時のCeAニューロンシナプス伝達に分子細胞レベルで注目し、電気生理学的検討を行うことで、「痛み」に対する情動関連神経機構の意義を解明することが本研究の目的である。

３．研究の方法

一度認識された疼痛情報が組織損傷にかかわらず持続的に固定化されうるという仮説を、現在までに確立した神経因性疼痛モデルを用いて、以下の(1)(2)(3)に細分し実験的に検証する。

(1)実験計画1　慢性痛成立過程で生じている病態生理を解明するために神経因性疼痛成立時に生じるシナプス伝達増強の経時的変化を検討する

①Chungらの方法に従いWistar rats (P21~P24) の左側L5脊髄神経を結紮して神経因性疼痛モデルを作製する。結紮しないsham手術群・手術を施行しない群をコントロール群とする。
②術後0.25日目、1日目、1.5日目、2日目、7日目に足底の機械刺激によるvon Frey testでallodynia評価を行う。評価直後に麻酔下に断頭し、CeAを含む脳スライス標本（厚さ400 μm）を作製する。
③潅流する人工脳脊髄液にpicrotoxin 100 μMとstrychnine 1 μMを加え抑制性入力を遮断し、脊髄由来の侵害受容性情報を選択的に伝達するPBからの入力線維刺激誘発興奮性シナプス後電流（誘発EPSC）を、whole cell patch-clamp法を用いてCeAニューロンから記録し、シナプス伝達の経時的変化を検討する。

(2)実験計画2　CeAニューロンから記録した誘発EPSC増強機構のシナプスレベルでの検討

①先の実験同様、神経因性疼痛モデル作製後、whole cell patch-clamp法にてCeAニューロンから記録する。過去に報告したように、左側結紮モデルでは多線維・多小胞性EPSC振幅が左側に対し結紮対側の右側CeAで有意に増大する。そこで微小双極刺激電極を作製し、PB由来求心路を微弱電流で刺激するminimal stimulation法をもちいることで、単線維刺激による単線維由来伝達物質放出に対するEPSCを記録する。
②またwhole cell patch-clamp法で脳スライスを還流する人工脳脊髄液の組成を2 mM Ca^{2+}から5 mM Sr^{2+}に置換して、asynchronous releaseを誘発し、単小胞放出に対するEPSCを両側CeAで比較した。

(3)実験計画3　神経因性疼痛および疼痛改善モデルの作製

①モデルラットのallodynia 応答閾値は術後1日目より最大幅の閾値低下を認めることから、この日時を標的とした外科的処置による疼痛改善を試み、術後7日目の最終疼痛評価値をコントロール群と比較検討する。
②疼痛改善が確認された場合、神経因性疼痛モデル・疼痛改善モデル・コントロール群の脊髄神経を術前・術後7日目に愛護的に摘出し実体顕微鏡、近赤外線顕微鏡あるいは病理学的手法を用いて評価する。

４．研究成果

上記実験計画に基づき得られた成果について述べる。

(1) 実験計画１
0.25日後、1日後、1.5日後、2日後、7日

後で経時的にプロットし比較検討を行った。異痛症応答は術後1日目には安定した値を示し7日後までほぼ一定であった。一方PB-CeAシナプス伝達は術後1.5日目を境に片側優位の可塑性を示した。またこのシナプス増強に関与しているnon-NMDA受容体の割合は7日間を通じて一定であった。過去に報告された関節炎モデル同様、術後6-8時間という急性期には両側性のシナプス伝達増強が扁桃体内で生じたが、術後約1.5日を境に障害部位対側のみとなる新しい様式の可塑性を認めた。

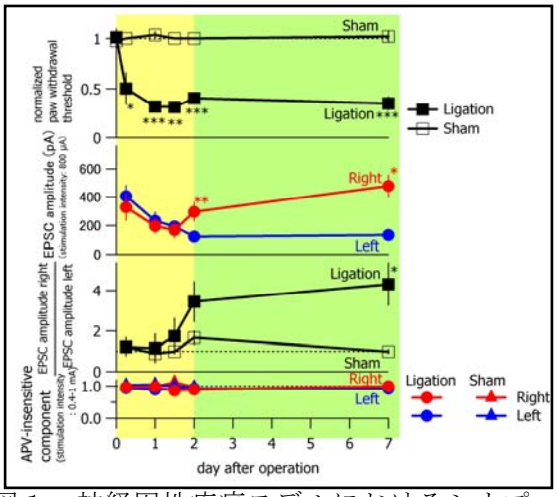

図１　神経因性疼痛モデルにおけるシナプス伝達の経時的様式変化

(2) 実験計画2
これまでの研究より、allodyniaを生じる術後１週（D7）の神経因性疼痛モデルラットから記録したPB－CeAシナプス伝達が、疼痛依存的に増強する事実が明らかとなった。しかしながらこのシナプス伝達増強が生じるメカニズムは解明できておらず、さらなる詳細な検討が必要と考えた。シナプス伝達増強機構としては、放出確率の増大、シナプス小胞内伝達物質量の増大、シナプス内での放出小胞や受容体の数の増加が基盤となる。これまでの報告で、放出確率には依存しない増強であることから、残りの二つの事象に関し検討を行った。

①Theta-pipetteという特殊な刺激電極を用いて、単線維のみを刺激し得られた右側単線維性EPSC振幅は左側に比し有意に増大していた。これよりシナプス伝達増強はシナプスの増加ではなく単線維シナプス内の放出小胞数およびそれに呼応した受容体の増加から生じていることがわかった。

②whole cell patch-clamp法で脳スライスを還流する人工脳脊髄液の組成を2 mM Ca^{2+}から5 mM Sr^{2+}に置換して、これまでの多小胞性EPSCではなく単小胞性EPSCを記録した。結果、右側単小胞性EPSC振幅は左側に比しわずかに高値を示すのみで、多小胞性EPSC振幅を単小胞性EPSC振幅で標準化し得られた放出小胞数の数が有意に増加していた。これより1活動電位によってシナプスより放出される小胞数が正常の状態よりも増加していることがわかった。

③以上の結果より、正常の状態から神経因性疼痛が成立すると、脳内疼痛関連情動神経機構のシナプスでは、1活動電位で放出される小胞数の増加と受け手側の受容体数の増加という構造的変化が生じていることがわかった。

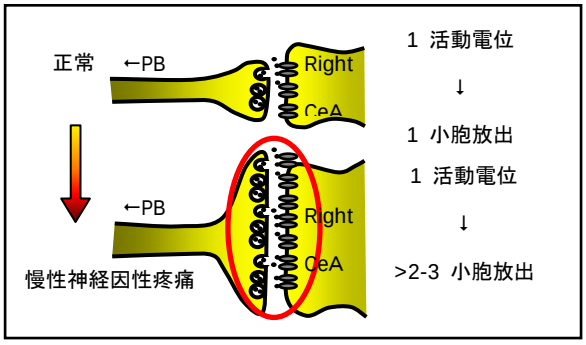

図２　PB-CeAシナプス伝達増強機構

(3) 実験計画3
最大幅のallodynia応答閾値低下を認める術後1日目に、外科的処置による疼痛改善を試み、術後7日目の最終評価直後、他モデル群と比較検討を行った。結果、神経因性疼痛モデルのallodyniaは処置後時間依存的に改善されることがわかった。

以上から、1週間以上にわたる長期持続痛入力によって、痛みと情動を結ぶ神経回路の一つである橋腕傍核-扁桃体シナプス伝達が増強し経時的様式変化をへて固定化されるという現象は、急性痛とは異なる慢性痛成立時の負情動記憶固定化の一端を担っていると推察された。
生物学的意義のない慢性痛を成立させないために、この経路での経時的シナプス伝達可塑的変化を詳細に検討した本実験結果は、痛みに対する新たな治療法（ターゲット、時間）を確立する上で重要な基盤となると考えた。

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　件）

①　高橋由香里、池田亮、加藤総夫
Synaptic potentiation in the central amygdala involves different mechanisms depending on pain model
Pain Research、査読有、24巻、2009、137-146

② 加藤総夫、高橋由香里、池田亮
痛みの記憶と扁桃体シナプス可塑性
Clinical Neuroscience、査読無、26 巻、2008、398-401

〔学会発表〕（計 16 件）
①池田亮、高橋由香里、岩瀬中尾綾乃
加藤総夫、丸毛啓史
慢性痛における扁桃体内シナプス伝達増強機構の解明
第24回日本整形外科学会基礎学術集会
2009/11/5、横浜

②Takahashi Y, Nakao-Iwase A, Dong Y, Ikeda R, Shigemoto R, Kato F.
Morphofunctional evidence for consolidated synaptic potentiation in the nociceptive amygdala following neuropathic pain
The 39th Annual Meeting of the Society for Neuroscience.
2009/10/17～21、Chicago

③高橋由香里, 中尾(岩瀬)彩乃, Dong Yulin, 池田亮, 重本隆一, 加藤総夫.
Properties of quantal excitatory events in the central amygdala in neuropathic rats.
第32 回日本神経科学大会
2009/9/16～18、名古屋

④Takahashi Y, Hara M, Nakao-Iwase A, Ikeda R, Kato F.
Pre- and postsynaptic characteristics of the potentiated synaptic transmission in nociceptive amygdala in neuropathic rat.
The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS2009).
2009/7/27～8/1、京都

⑤Fusao Kato, Yukari Takahashi, Ayano Nakao-Iwase, Ryo Ikeda
Chronic pain as consolidated synaptic potentiation between networks underlying pain sensation and negative emotion
Neuro 2008
2008/7/9-11、東京

⑥Fusao Kato, Yukari Takahashi, Ayano Nakao-Iwase, Ryo Ikeda
Amygdala synaptic plasticity in neuropathic pain
The 3rd asian pain symposium
2008/7/18-19、福岡

⑦池田亮、高橋由香里、加藤総夫、丸毛啓史
慢性痛の形成に関与する経時的扁桃体内シナプス伝達可塑的変化
第23回日本整形外科学会基礎学術集会
2008/10/24、京都

⑧Takahashi Y, Ikeda R, Kato F
Biphasic potentiation of central amygdala synapse in rat neuropathic pain model.
The 6th Forum of European Neuroscience
2008/7/12-16、Geneva

⑨中尾(岩瀬)彩乃、高橋由香里、池田亮、加藤総夫
神経因性疼痛ラット扁桃体中心核シナプス増強のシナプス機構
第 31 回日本神経科学学会
2008/7/9-11、東京

⑩中尾(岩瀬)彩乃、高橋由香里、池田亮、加藤総夫
痛みの情動成分を担う脚傍核-扁桃体中心核シナプス伝達増強の分子基盤
第 30 回日本疼痛学会
2008/7/19-20、福岡

⑪高橋由香里、中尾(岩瀬)彩乃、池田亮、加藤総夫
ラット神経因性疼痛モデルにおける扁桃体中心核シナプス伝達の可塑的変化
第 30 回日本疼痛学会
2008/7/19-20、福岡

⑫高橋由香里、岩瀬彩乃、池田 亮、加藤総夫
ラット神経因性疼痛モデル扁桃体中心核シナプス伝達増強の二相性成立過程
第 85 回日本生理学会大会
2008/3/25-27、東京

⑬高橋由香里、岩瀬彩乃、池田 亮、加藤総夫
ラット神経因性疼痛モデル扁桃体中心核シナプス伝達増強に及ぼす NMDA 受容体遮断の影響

第 81 回日本薬理学会総会
2008/3/17-19、横浜
⑭Takahashi, Y., Ikeda, R. & Kato, F.
Early establishment of synaptic potentiation in the central amygdala in the rat model of Neuropathic pain.
37th Annual meeting of the Society for Neuroscience
2007/11/3-7、San Diego, USA

⑮池田 亮、加藤総夫、丸毛啓史
扁桃体における疼痛情報処理機構
-神経因性慢性疼痛モデルを用いた電気生理学的検討-
第 22 回日本整形外科学会基礎学術集会
2007/10/25、浜松

⑯高橋由香里、池田 亮、井村泰子、加藤総夫
神経因性疼痛ラット扁桃体中心核におけるシナプス可塑的変化形成過程
第 30 回日本神経科学大会、第 50 回日本神経化学会、第17回日本神経回路学会大会合同大会
2007/9/10-12、横浜

6. 研究組織
(1)研究代表者
池田 亮(IKEDA RYO)
東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号:20439772

(2)連携研究者
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