

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 28 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790245

研究課題名(和文) 痛みによる情動変化に対する側坐核内領域特異的ドパミン神経情報伝達の役割の解析

研究課題名(英文) The role of pain-induced dopamine release within the nucleus accumbens in pain-induced aversion

研究代表者

井手 聡一郎(Ide, Soichiro)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：30389118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、痛みによる情動変化に対する側坐核内領域特異的ドパミン神経情報伝達の役割を明らかにすることを目的とした検討を行った。痛み刺激負荷後の側坐核内ドパミン遊離量の変化を、*in vivo* microdialysis法により検討したところ、側坐核Shell領域では、吻側領域でのみ刺激後30分をピークとした有意なドパミン遊離量の増加が確認された。また、条件付け場所嫌悪性試験法を用いた解析により、側坐核shell吻側領域へのD2受容体拮抗薬の局所投与が、痛みによる負情動生起を阻害することを見出した。一方、本領域へのD2作動薬局所投与による負情動生起は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we examined the role of pain-induced dopamine release within the nucleus accumbens in pain-induced aversion. A significant increase in the dopamine level was observed after the formalin injection only within the rostral part of the nucleus accumbens shell but not within the caudal part. The conditioned place aversion (CPA) induced by the i.p.l. formalin injection was reversed by the microinjection of dopamine D2 antagonist into the rostral part of the nucleus accumbens shell. On the other hand, the microinjection of dopamine D2 agonist into the same region did not induce the CPA.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：痛み 情動 嫌悪 側坐核 ドパミン 不快情動

1. 研究開始当初の背景

がんをはじめとする多くの疾患に付随する過剰な痛みや慢性疼痛は、身体的・精神的に患者の生活の質 (QOL: Quality of life) を著しく低下させるため、現在では治療すべき疾患の一つとして認識されはじめています。これまでに、侵害刺激が加わった場所や強さの認知に関与する痛みの身体的・感覚的側面に関しては、精力的な研究がなされ、その調節機構も明らかにされてきている。一方、痛みに伴う不安、嫌悪、抑うつなどの精神的・情動的側面に関しては、未だ不明瞭な点が多いのが現状である。痛みより生成する不快情動は、精神疾患・情動障害の引き金ともなり、また、そのような精神状態が痛みをさらに悪化させるという悪循環を生じさせる。このことは、痛みの感覚的側面だけでなく情動的側面をも考慮した疼痛治療の必要性を示唆している。

側坐核は、中脳腹側被蓋野に起始細胞を持つドパミン神経路からの神経投射を受けており、快情動・正の強化・報酬系に深く関与し、快情動生成時には側坐核内でドパミン遊離が増加することが広く知られている。一方で、側坐核は extended amygdala 領域からの直接・間接的な神経投射による調節を受けていることや、ストレスや痛みなどの不快情動を生成する刺激によっても同様に、側坐核内でドパミン遊離が増加することも報告されている (Scott et al. (2006) J. Neurosci. 26:10789-95)。痛みによる側坐核内ドパミン遊離の亢進に関しては、痛みの感覚的側面に対して負のフィードバックをかけている内因性痛覚制御機構の一部であることを示唆する報告があるものの、痛みやストレス負荷による側坐核内ドパミン遊離変化のメカニズムや、痛みによる情動的側面の変化に対する側坐核内ドパミン神経情報伝達の役割は、未だ不明瞭な点が多く存在する。

2. 研究の目的

本研究では、側坐核領域に焦点をあて、痛み負荷による情動変化における側坐核内での領域特異的ドパミン神経情報伝達の役割を明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

実験には全て雄性 Sprague-Dawley 系ラット (体重: 190-290 g) (日本 SLC, 浜松) を使用した。動物は、室温が 23 ± 1 、明暗周期が 12 時間 (暗期: 7:00-19:00, 明期: 19:00-7:00) さらに摂食・飲水が自由に行える室内環境の下で飼育した。なお、実験は全て「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定 (平成 19 年 4 月 1 日)」および「動物実験に関する日本薬理学会指針」を遵守して行った。

(1) in vivo マイクロダイアリシス法

麻酔下、ラットを脳定位固定装置に固定し

て頭部を露出させ、マイクロダイアリシス用ガイドカニューレ (長さ 7.0 mm, 外径 0.5 mm) の先端が左側側坐核 shell の尾側 (bregma から吻側に 1.0 mm, 外側に 0.8 mm, 頭蓋表面から深さ 6.5 mm) あるいは吻側 (bregma から吻側に 2.5 mm, 外側に 0.8 mm, 頭蓋表面から深さ 6.5 mm) の位置に留まるように歯科用セメントで固定し、ダミーカニューレ (長さ 7.0 mm) を挿入した。

In vivo マイクロダイアリシスには、マイクロダイアリシス分析システム (株式会社エイコム) を用いた。ガイドカニューレ埋め込み手術から 1-2 日後、ラットのダミーカニューレを抜き取り、マイクロダイアリシス用透析プローブ (長さ 8.0 mm, うち膜長 1.0 mm, 膜外径 0.22 mm, シャフト部外径 0.3 mm) を挿入し、リンゲル液をマイクロシリンジポンプにより流速 1.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ で灌流した。なお、灌流路にはフリームービングチューブおよび可動式アームに装着したシーベルを用い、実験中、ラットが自由にチャンバー (30 \times 35 cm) 内を行動できる状態で行った。ドパミンの分離には、分離カラム Eicompak PP-ODS (4.6 \times 30 mm) を装着した HTEC-500 型マイクロダイアリシス分析システムを用いた。分離カラムはカラム恒温槽により 25 $^{\circ}\text{C}$ に保った。移動相として 50 mg/L エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物、500 mg/L L-デカンシルホン酸ナトリウム、1% メタノールを含有する 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 6.0) を用い、流速 0.5 ml/min で送液した。ドパミンはグラファイト電極 (WE-3G) を装着した電気化学検出器 (+450 mV vs. Ag/AgCl 参照電極) により検出した。透析液はオートインジェクタ (EAS-20) により 5 分毎に自動的に注入し、クロマトグラムピークは解析ソフトウェアにより解析を行った。この条件下におけるドパミン、セロトニンの保持時間はそれぞれ 1.8 分、4.5 分であり、これら 2 種類のモノアミンのピークは完全に分離していた。灌流を開始してから 2 時間以上経過後、細胞外ドパミン量が安定してから基礎遊離量 (basal level) を測定し、その後酢酸の腹腔内投与を行って、75 分後まで細胞外ドパミン遊離量を測定した。

(2) 条件付け場所嫌悪性試験 (CPA テスト)

側坐核内薬物投与には、事前にガイドカニューレ埋込手術を行ったラットを用いた。ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) 麻酔下、側坐核内薬物投与用 25G ガイドカニューレを両側に挿入し、歯科用セメントにて固定した。ガイドカニューレ挿入位置は側坐核 shell 吻側内投与については (bregma より吻側に 2.5 mm, 外側に $\pm 0.9\text{mm}$ 、頭蓋表面から深さ; 7.5 mm) 側坐核 shell 尾側内投与については、(bregma より吻側に 1.0 mm, 外側に $\pm 0.9\text{mm}$ 、頭蓋表面から深さ; 7.5 mm) (Paxinos and Watson, 1998 に準拠) になるようにした。ラットは手術後 5 日目以降に実験に使用した。側坐核内薬物投与は、侵

害刺激を与える 10 分前に 33G インジェクションカニューレをガイドカニューレに刺入し、マイクロインジェクションポンプを用いて、頭蓋表面から深さ 6.5 mm の位置に 0.5 μ l の容量を流速 0.5 μ l /min で投与した。実験終了後、投与部位の確認を行い、両側側坐核内への薬物投与が確認された個体のみデータ解析に用いた。

条件付け場所嫌悪性試験(CPA test)では、大きさの等しい(30 x 30 x 30 cm)2つのボックス(一方が白色、もう一方が黒色)からなるシャトルボックスを使用し、照度は常に一定に保った(25 \pm 5 lux)。さらに、多くの CPA テストにおいて、動物がボックスの床面の材質の違いで各ボックスを認識できるように工夫がなされていることから、本実験系でも黒色のボックスには、アクリル製で黒色、厚さ 5mm で直径 13 mm の穴が開いた(穴と穴との中心間距離 19 mm)床板を使用し、白色のボックスにはステンレス製の格子でできた床板(周囲の金属の太さ 4 mm、網目部分の金属の太さ 1 mm)を使用した。酢酸条件付けによる CPA test は、連続 4 日間の実験プロトコルを組んで進めた。まず 1 日目(habituation session)および 2 日目(preconditioning session)は、ラットを 15 分間(900 秒間)装置内で自由に探索させ、各ボックスにおける滞在時間を計測し、2 日目により長く滞在したボックスを pain-paired compartment と決定した。なお、滞在時間の計測はコンピュータにより自動で行った。2 日目に一方のボックスに 80%以上(720 秒以上)滞在した個体、および 1 日目と 2 日目の間で滞在時間の差が 200 秒以上見られた個体は、この段階で除外した。続いて 3 日目(conditioning session)は、ボックス間の往来が出来ない状態にし、まず control session として saline 100 μ l を腹腔内投与し、直ちに 2 日目に決定した pain-paired compartment と反対側のボックスに 60 分間閉じ込めた。4 時間後、saline あるいは SCH23390 (0.3 μ g/side) Raclopride (1.0 μ g/side) を局所投与した。続いて pain-conditioning session として、薬物投与の 10 分後に 2% 酢酸 1 ml を腹腔内投与し、直ちに 2 日目に決定した pain-paired compartment に 60 分間閉じ込めた。4 日目(test session)は再びラットを 15 分間自由に探索させ、各ボックスにおける滞在時間を計測した。なお、2 日目の pain-paired compartment 滞在時間から 4 日目の pain-paired compartment 滞在時間を引いた値を CPA score と定義し、この値が正に大きいほど痛みによる不快情動が惹起されたものとして評価を行った。

また、侵害刺激を負荷せず、ドパミン受容体作用薬局所投与による条件付けによって惹起される不快情動の評価は、連続 6 日間の実験プロトコルを組んで行った。1, 2 日目は同様であるが、test session を 6 日目とし、

3 日目から 5 日目を conditioning session とした。なお、2 日目により長く滞在したボックスを drug-paired compartment とした。3 日目から 5 日目は、午前(8:00-12:00)あるいは午後(14:00-18:00)の 30 分間、何れかを control session および drug-conditioning session とし、drug-conditioning session では薬物投与後直ちに drug-paired compartment に閉じ込めることで条件付けを行った。薬物は saline あるいは SKF38393 (1.0 μ g/side) Quinpirole (1.0, 3.0 μ g/side) を局所投与した。さらに、CPA score も同様に算出した。

4. 研究成果

酢酸刺激が側坐核内ドパミン遊離に及ぼす効果について、in vivo マイクロダイアリシス法を用いて検討した。その結果、側坐核 shell 領域の吻側(Bregma + 2.1 mm より吻側)において、2%酢酸 1 ml 腹腔内投与後約 10 分後からドパミン遊離量は徐々に上昇し、15 分から 45 分にかけて、basal level と比較して有意な増加が見られた。尾側(Bregma + 2.1 mm より尾側)においては、酢酸投与後からドパミン遊離量に減少傾向が見られ、40 分-45 分の間および 55 分以降有意に減少した(Fig.1)。

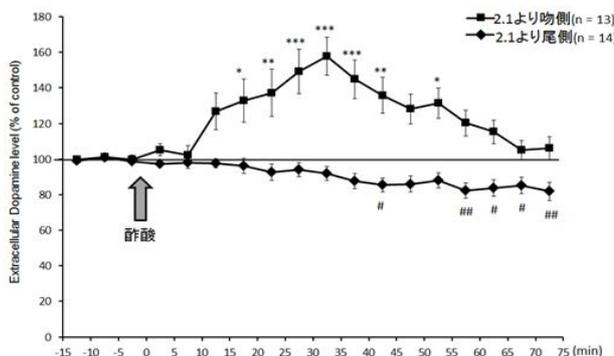


Fig.1 酢酸腹腔内投与による側坐核内ドパミン遊離量変化

#p<0.05, ##p<0.01, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs basal level

痛みの情動的側面における側坐核内ドパミン神経情報伝達亢進の役割について、CPA テストを用いて検討した。酢酸腹腔内投与、側坐核内 saline 投与群では、条件付け後における pain-paired compartment 滞在時間が有意に減少し、不快情動の惹起が確認された。一方で、酢酸腹腔内投与に加え、選択的ドパミン D1 受容体遮断薬である SCH23390 (0.3 μ g/side) あるいは選択的ドパミン D2 受容体遮断薬である Raclopride (1.0 μ g/side) を側坐核 shell 吻側に投与した群では、条件付け前後での pain-paired compartment 滞在時間に有意な変化は見られず、酢酸処置による CPA が抑制されていた。さらに CPA score を算出した結果、側坐核内 saline 投与群に比べ Raclopride 投与群では有意に CPA score

が減少した。また、SCH23390 投与では減少傾向が見られた (Fig.2)。さらに、これらの薬物により痛み感覚的側面が抑制されるか否かを明らかにするために、酢酸投与による侵害受容反応に対する影響について検討した。結果、酢酸により惹起されるライジング行動に側坐核内 Raclopride 投与による有意な影響は認められなかった (Fig.3)。

続いて、ドパミン受容体の刺激そのものが嫌悪あるいは嗜好を惹起するか否かを明らかにするために、痛み刺激が存在しない環境下で、不快情動に対する側坐核 shell 吻側内ドパミン受容体作用薬局所投与の効果について、CPA テストを用いて検討した。選択的ドパミン D2 受容体作用薬の Quinpirole 投与群、ドパミン D1 受容体作用薬の SKF38393 投与群、さらに両薬物を同時投与した群いずれにおいても、条件付け後における drug-paired compartment 滞在時間に有意な変化は見られなかった。CPA score を算出した結果、saline 投与群に比べ Quinpirole 投与群では、高濃度 (3.0 $\mu\text{g}/\text{side}$) で score の上昇傾向は見られたものの、有意な CPA の惹起はみられなかった。また、SKF38393 投与

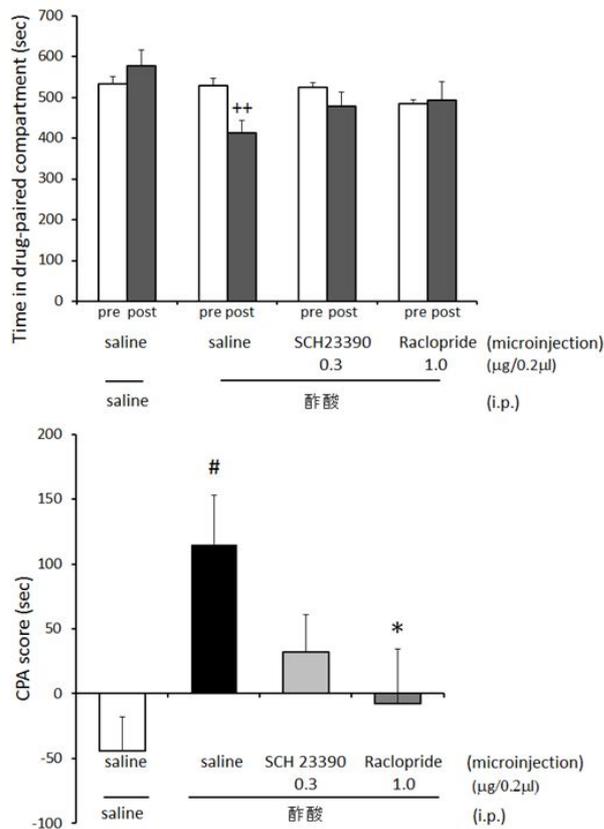


Fig.2 酢酸誘発 CPA に対する側坐核内ドパミン受容体拮抗薬局所投与の効果

(A) CPA テストにおける pain-paired compartment 滞在時間の変化

(B) CPA テストにおける CPA score

**p < 0.01 vs. pre, #p < 0.05 vs. saline-saline, *p < 0.05 vs. saline-酢酸 (micro injection)-(i.p.) (n = 7-10)

群、両薬物同時投与群でも同様に CPA の惹起はみられなかった (Fig.4)。

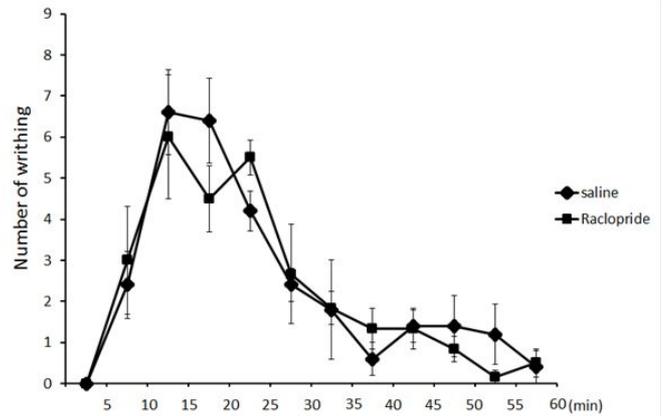


Fig.3 酢酸腹腔内投与誘発の侵害受容行動に対する腹腔内 Raclopride 局所投与の影響 (n = 5-6)

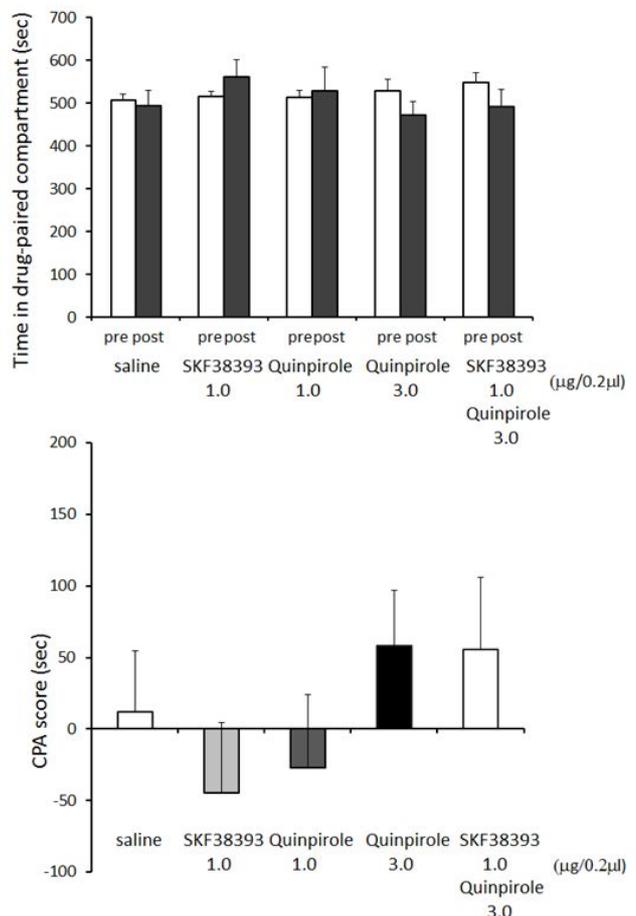


Fig.4 側坐核内ドパミン作用薬局所投与による場所嫌悪/嗜好性の検討 (n = 6-8)

(A) CPA テストにおける drug-paired compartment 滞在時間の変化

(B) CPA テストにおける CPA score

本研究において、行動薬理学的手法を用いた検討により、以下の知見を得た。

1) 酢酸腹腔内投与による痛み刺激により、側坐核 shell 領域の吻側でドパミン遊離量が

有意に増加した。一方で shell 領域尾側では遊離量は減少した。

2) 酢酸腹腔内投与により惹起された CPA が、側坐核 shell 吻側へのドパミン D2 受容体拮抗薬 Raclopride 投与により有意に抑制された。また、側坐核 shell 吻側へのドパミン D1 受容体拮抗薬 SCH23390 投与では CPA が抑制される傾向が見られた。

3) 側坐核 shell 吻側へのドパミン D2 受容体拮抗薬 Raclopride 投与は痛みの感覚的側面に影響を及ぼさなかった。

4) 側坐核 shell 吻側へのドパミン D2 受容体作用薬 Quinpirole、ドパミン D1 受容体作用薬 SKF38393 いずれの局所投与でも、CPA は惹起されなかった。また両薬物を同時投与した場合も CPA は惹起されなかった。

本研究結果より、痛みによって引き起こされる側坐核 shell 吻側におけるドパミン神経情報伝達の亢進が果たす役割として考えられる可能性は主に、痛みによる不快情動の生成に部分的に関与している、もしくは痛みによる不快情動の生成には関与していないことが挙げられる。前者の場合は、本領域のドパミン受容体の刺激のみでは不快情動を生成するには不十分であり、他の神経伝達物質や他領域を介した神経伝達も同時に必要であることが考えられ、後者の場合は侵害刺激により惹起される不快情動と、周囲の環境との間の連合学習に役割を果たしていること等が考えられるため、今後さらなる検討を行うことで可能性について検証していくことが必要である。

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7件)

全て査読有り

1. Shinohara F, Kihara Y, Ide S, Minami M, Kaneda K. Critical role of cholinergic transmission from the laterodorsal tegmental nucleus to the ventral tegmental area in cocaine-induced place preference. *Neuropharmacology*. 79:573-9. (2014)
DOI:10.1016/j.neuropharm.2014.01.019
2. Ishihara K, Takahashi N, Komoto N, Yoshikawa C, Fukumoto S, Ide S, Kimura T, Ozawa K. Serotonergic modulation of neuronal activity in the nucleus accumbens following repeated methamphetamine administration. *J Pharmacol Sci*. 123(2):140-6. (2013)
DOI:10.1254/jphs.13100FP
3. Ide S*, Nishizawa D*, Fukuda K, Kasai S, Hasegawa J, Hayashida M, Minami M, Ikeda K. (*equally contribution) Association between genetic

polymorphisms in Cav2.3 (R-type) Ca²⁺ channels and fentanyl sensitivity in patients undergoing painful cosmetic surgery.

PLoS One. 8: e70694. (2013)

DOI:10.1371/journal.pone.0070694

4. Ide S, Hara T, Ohno A, Tamano R, Koseki K, Naka T, Maruyama C, Kaneda K, Yoshioka M, Minami M. Opposing roles of corticotropin releasing factor and neuropeptide Y within the dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis in the negative affective component of pain in rats. *J Neurosci*. 33(14):5881-94. (2013)
DOI:10.1523/JNEUROSCI.4278-12.2013
5. Naka T, Ide S, Nakako T, Hirata M, Majima Y, Deyama S, Takeda H, Yoshioka M, Minami M. Activation of α -adrenoceptors in the bed nucleus of the stria terminalis induces food intake reduction and anxiety-like behaviors. *Neuropharmacology*. 67:326-30. (2013)
DOI:10.1016/j.neuropharm.2012.11.021
6. Saito N, Nakamura KI, Shibano S, Ide S, Minami M, Sato Y. Addition of Cyclic Ureas and 1-Methyl-2-oxazolidone to Pyridines: A New Approach to Pyridodiazepines, Pyridodiazocines, and Pyridooxazepines. *Org Lett*. 15(2):386-389. (2013)
DOI:10.1021/ol303352q.
7. Okuyama K*, Ide S*, Sakurada S, Sasaki K, Sora I, Tamura G, Ohkawara Y, Takayanagi M, Ohno I. (*equally contribution) μ -opioid receptor mediated alterations of allergen-induced immune responses of bronchial lymph node cells in a murine model of stress asthma. *Allergol Int*. 61:245-258. (2012)
DOI:10.2332/allergolint.11-0A-0304.

[学会発表](計26件)

1. 井手聡一郎、金田勝幸、南雅文。痛みによる不快情動生成における背外側分界条床核の役割。日本薬学会 第134年会。2014/3/28-30。熊本
2. Minami M, Hara T, Ide S, Kaneda K. Opposing effects of corticotropin-releasing factor and neuropeptide Y on neuronal excitability in the dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis. *Neuroscience2013 (SfN 43rd Annual Meeting)*. 2013/11/9-13. San Diego
3. 井手聡一郎、原大樹、金田勝幸、南雅文。背外側分界条床核におけるコルチコトロピン放出因子とニューロペプチド Y 神経

情報伝達の電気生理学的解析. 第 23 回
日本臨床精神薬理学会・第 43 回日本神経
精神薬理学会合同学会. 2013/10/24-26.
沖縄

4. 木原由佳理、里吉寛、井手聡一郎、南雅文. 慢性疼痛による情動変化と分界条床核内情動関連遺伝子発現変化の検討. 第 64 回日本薬理学会北部会. 2013/9/13. 旭川
5. 出山諭司、中誠則、井手聡一郎、仲子友和、平田美紀枝、眞嶋悠幾、武田宏司、吉岡充弘、南雅文. 腹側分界条床核内アドレナリン受容体の活性化は摂食量減少と不安様行動を惹起する. Neuro2013 (第 36 回日本神経科学大会・第 56 回日本神経化学会大会・第 23 回日本神経回路学会大会). 2013/6/20-23. 京都
6. 井手聡一郎、大野篤志、玉野竜太、小関加奈、中誠則、圓山智嘉史、出山諭司、吉岡充弘、南雅文. 分界条床核内神経ペプチド作動性情報伝達の痛み誘発不快情動生成における役割. 日本薬学会第 133 年会. 2013/3/28-30. 横浜
7. Deyama S, Naka T, Ide S, Nakako T, Hirata M, Majima Y, Takeda H, Yoshioka M, Minami M. Effects of β -adrenoceptor activation within the bed nucleus of the stria terminalis on food intake and anxiety-like behaviors. Neuroscience 2012. 2012/10/13-17. New Orleans.
8. 眞嶋悠幾、中誠則、里吉寛、井手聡一郎、南雅文. 不安様行動および疼痛感受性における分界条床核内ノルアドレナリン神経伝達の役割. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム. 2012/9/1. 神戸

6. 研究組織

(1)研究代表者

井手 聡一郎 (IDE, Soichiro)

北海道大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：30389118