

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460330

研究課題名(和文) 痛みによる情動生成における側坐核内領域特異的ドパミン神経伝達の生理的役割の解析

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

研究代表者

井手 聡一郎 (IDE, Soichiro)

公益財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・主席研究員

研究者番号：30389118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000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生理的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は、側坐核Shell吻側領域で引き起こされ、痛み刺激負荷により当該領域の神経細胞が活性化することが確認された。また、条件付け場所嫌悪性試験法を用いた解析により、ドパミントランスポーター欠損マウスにおいては、痛みによる負情動生起が阻害されていることを見出した。さらに、抑うつ状態を併発していると考えられる慢性疼痛モデル動物においては、報酬刺激によるドパミン遊離亢進が抑制されていることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we examined the physiological role of pain-induced dopamine release within the nucleus accumbens in pain-induced aversion. A significant increase in the dopamine level and increased neuronal activity within the rostral part of the nucleus accumbens shell were caused by the acetic acid intraperitoneal injection. The conditioned place aversion (CPA) induced by the acetic acid intraperitoneal injection was abolished in dopamine transporter knockout mice. Further, reward-induced dopamine release in the nucleus accumbens of neuropathic pain rats were investigated. Pain relief and sucrose solution were given to the neuropathic pain rats as rewards. Rewards increased dopamine release in the early, but not late, phase of pain. Dysfunction of the mesolimbic dopamine reward circuit might be a common neuronal mechanism underlying chronic pain and depression and a potential target to develop novel analgesic and antidepressant medications.

研究分野：精神薬理学

キーワード：側坐核 ドパミン 痛み 報酬 うつ 負情動 嫌悪

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る。これまでに、侵害刺激が加わった場所や強さの認知に関する痛みの身体的・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 Sprague-Dawley 系ラット (日本 SLC, 浜松) ならびに C57BL/6J マウスを遺伝背景にしたドパミントランスポーター (DAT) 欠損マウス (自家繁殖) を使用した。動物は、室温が 23 ± 1 、明暗周期が 12 時間、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)」ならびに「公益財団法人東京都医学総合研究所動物実験指針」に即して立案した研究計画について、各機関の動物実験倫理委員会の承認を得て研究を進め、「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

麻醉下、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 (bregma から吻側に 1.0 - 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 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-デカンス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、その後薬物投与あるいはスクロース水提示を行って、細胞外ドパミン遊離量を測定した。

(2) 慢性疼痛モデル動物作成

慢性疼痛モデルとして、神経障害性疼痛モデルの一種である脊髄神経切結紮モデル (SNL model) を作製した。ペントバルビタールナトリウム (東京化成, 東京) $50 \text{ mg}/\text{kg}$, i.p.) 麻醉下、ラットの左側第 5 腰部 (L5) 脊髄神経を 6-0 滅菌済ブレードシルク (秋山製作所, 東京) で結紮し、さらに末梢側を切断することにより作製した。なお、神経の露出まで行う手術を sham 手術とした。SNL 群では、次に示す 50% 閾値の低下がみられなか

った個体、sham 群に関しては 50% 閾値の低下がみられた個体を手術失敗とし、統計処理から除外した。

疼痛評価には機械的アロディニアを評価する試験系である von Frey test を実施した。本研究においては、SNL 手術の前日、および術後 7 日間ごとに 28 日後までの計 5 回行った。金網の上に乗せたボックスの中にラットを入れて蓋をし、30 分静置して馴化させた後、0.4、0.6、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、15.0 g の von Frey filament (室町機械、東京) をラットの後肢足底に垂直に曲がるまで押しつけて逃避反応を観察した。まず 2.0 g のフィラメントから刺激を始め、逃避反応が認められた場合 (×) 1 つ下の重さのフィラメント、反応が認められない場合 () は 1 つ上の重さのフィラメントに換え、最初に刺激に対する反応が交叉した後、さらに 4 回同様に刺激を行い、得られた結果から以下の式を用いて 50% 閾値を求めた。

$$50\% \text{ 閾値} = (10[Xf + k]) / 10,000$$

Xf = 最後に用いたフィラメント
k = / × の配列によって決まる値
= フィラメントの偏差 (= 0.224)

(3) 条件付け場所嫌悪性試験(CPA test)

条件付け場所嫌悪性試験(CPA test)では、大きさの等しい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(480 ± 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ステンレス製の Stripe でできた床板(周囲の金属の太さ 4 mm、Line の金属の太さ 3 mm、間隔 5 mm)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 5 日間の実験プロトコルを組んで進めた。まず 1, 2 日目(habituation session) および 3 日目(preconditioning session) は、マウスを 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、3 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。3 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 2 日目と 3 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 4 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 μl を腹腔内投与し、直ちに 3 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、pain-conditioning session として、2% 酢酸 0.2 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。5 日目(test session) は再びマウスを 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、3 日目の pain-paired compartment 滞在時間から 5 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。

4. 研究成果

急性の痛み刺激が与える影響に関して検討するため、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 - 45 分の間および 55 分以降有意に減少した(Fig.1)。

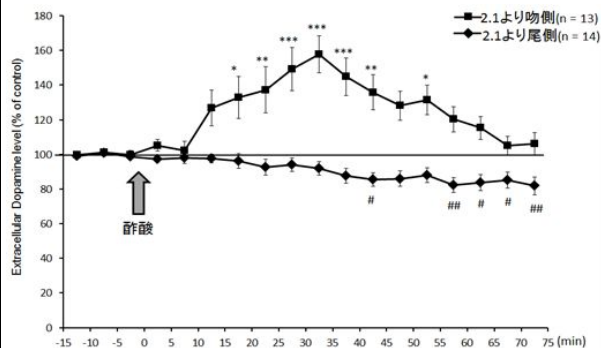


Fig.1 酢酸腹腔内投与による側坐核内ドパミン遊離量変化

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

また、メタンフェタミン(4 mg/kg)を腹腔内投与することによる快情動生成下での側坐核内神経興奮の領域特異性を、c-fos タンパク発現変化を指標として、投与 2 時間後の脳サンプルを用いて免疫組織化学的に検討したところ、快情動存在下では、吻側と比較し尾側の方が、活性化している神経細胞の比率が高いことを示す結果が得られた。

次に、抑うつ状態を併発していると考えられる慢性疼痛下での報酬刺激誘発側坐核内ドパミン遊離量変化に関して検討を行った。まず、髄腔内 pregabalin 投与による痛みの緩和を報酬効果として検討を行ったところ、神経障害性疼痛の早期においては、痛みの緩和は SNL モデルラットの側坐核内ドパミン遊離を有意に増加させ、一方で髄腔内 pregabalin 投与は Sham 群の側坐核内ドパミン遊離には影響を及ぼさなかった(Fig.2A)。

AUCの値もまた、Sham群に比べてSNL群の側坐核内ドパミン遊離の有意な上昇を示す結果であった(Fig.2C)。髄腔内 vehicle 投与(PBS, 10 μ l)は、SNLモデルラットの側坐核内ドパミン遊離には影響を与えず、側坐核内ドパミン遊離の上昇は pregabalin の効果によって誘発されたことを示唆している。

神経障害性疼痛の早期とは対照的に、慢性期においては、髄腔内 pregabalin 投与による痛みの緩和は、SNL群の側坐核内ドパミン遊離には影響を及ぼさなかった(Fig.2B)。また、Sham群においても同様に側坐核内ドパミン遊離は髄腔内 pregabalin 投与による影響を受けなかった。この時AUCの値は、両群で有意な差は見られなかった(Fig.2C)。

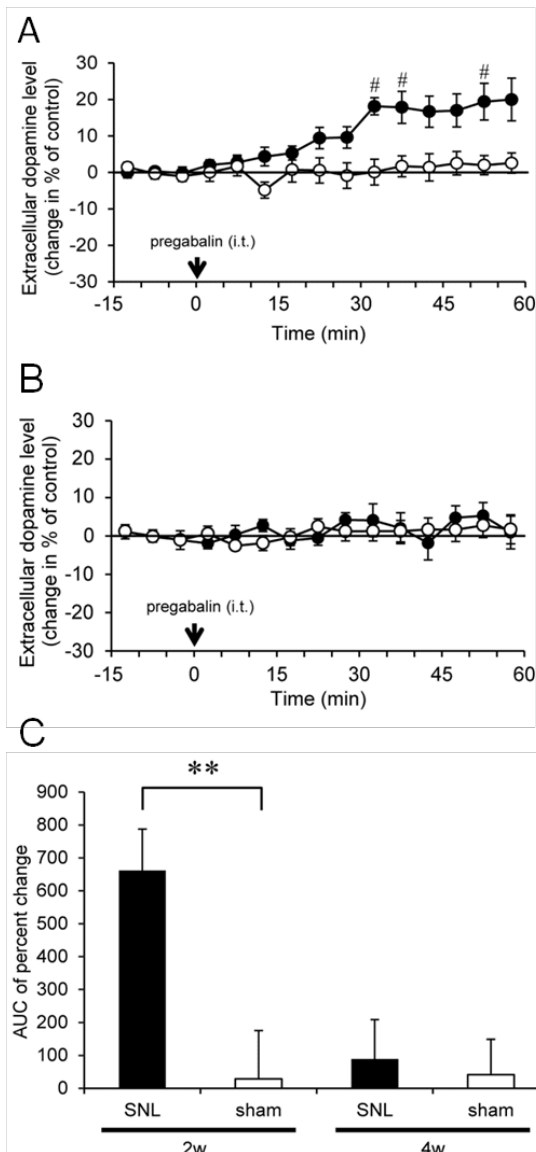


Fig.2 慢性疼痛時期依存的な痛み緩和報酬誘発性の側坐核内ドパミン遊離の変化

(A: 早期 / B: 慢性期, C: AUC)

[#] $P < 0.05$ vs. last baseline sample (-5 to 0 min) (A: SNL n=8, sham n=10 / B: SNL n=9, sham n=11), ^{**} $P < 0.01$ vs. sham

次に、異なる種類の報酬刺激、30%スクロース水を用いて、神経障害性疼痛の早期及び慢性期における報酬誘発性の側坐核内ドパミン遊離に対する更なる検討を行なった。早期及び慢性期どちらにおいてもSNL群とSham群の間でスクロース水摂取量に有意な差は見られなかった。神経障害性疼痛の早期においては30%スクロース水の摂取は、SNL群、Sham群ともに側坐核内ドパミン遊離を上昇させた(Fig.3A)。AUCの値で比較しても、SNL群とSham群で有意な差は見られなかった(Fig.3C)。神経障害性疼痛の慢性期においては、30%スクロース溶液の摂取はSNL群では側坐核内ドパミン遊離に影響を及ぼさず、一方でSham群においては側坐核内ドパミン遊離を増加させた(Fig.3B)。AUCの値で比較しても、SNL群とSham群で有意な差が認められた(Fig.3C)。

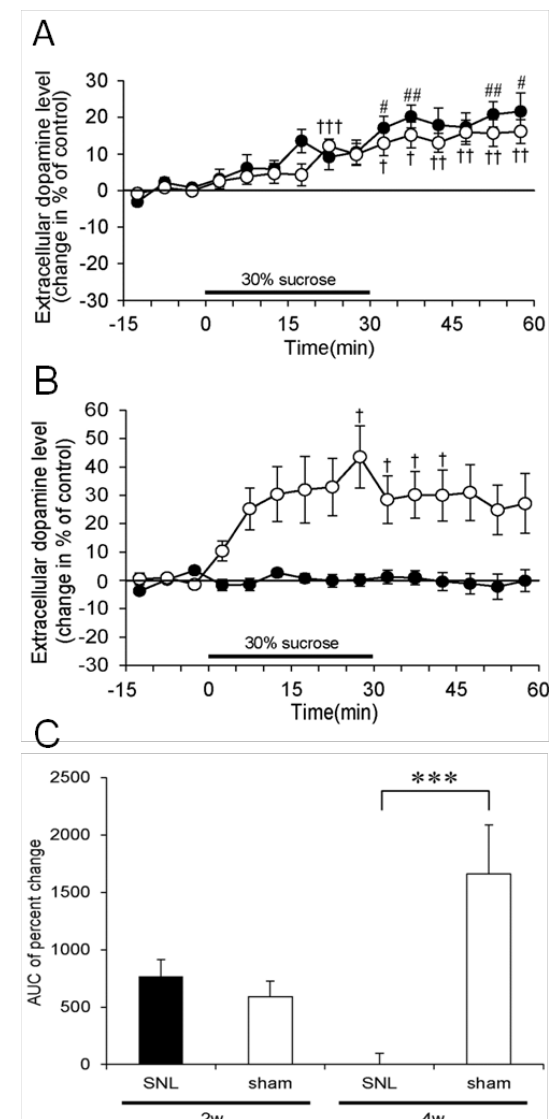


Fig.3 慢性疼痛時期依存的なスクロース報酬誘発性の側坐核内ドパミン遊離の変化

(A: 早期 / B: 慢性期, C: AUC)

[#] $P, \dagger P < 0.05$, ^{##} $P, \dagger\dagger P < 0.01$, ^{†††} $P < 0.001$ vs. last baseline sample (-5 to 0 min) (A: SNL n=11, sham n=13 / B: SNL n=16, sham n=15), ^{***} $P < 0.001$ vs. sham

次に、痛み負荷による情動変化におけるドパミン遊離変化に關与する分子として、ドパミントランスポーター (DAT) に着目し、DAT 欠損マウスを用いて CPA test を行った。酢酸腹腔内投与による炎症性の内臓痛を負荷することで条件付けを行ったところ、野生型では痛みによる条件付けを行った部屋での滞在時間が有意に減少し、CPA score の増加が確認されたが、ホモ型の DAT 欠損マウスにおいては、CPA score に有意な変化は見られなかった (Fig 4)。この結果は、痛みによる不快情動生成において、DAT が重要な役割を担っていることを示唆している。

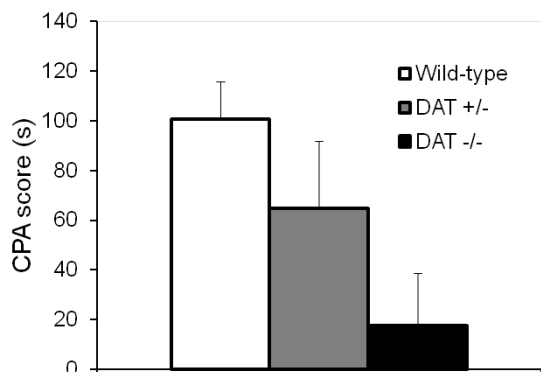


Fig.4 酢酸誘発CPAにおけるドパミントランスポーターの役割の検討 (n = 4-12)

本研究では、髄腔内 pregabalin 投与による痛みの緩和とスクロース溶液という2種類の報酬が神経障害性疼痛の早期に側坐核内ドパミン遊離を誘発することを明らかとした。対照的に、どちらの報酬を用いても神経障害性疼痛の慢性期には側坐核内ドパミン遊離を誘発しなかった。これらの結果は、痛みの慢性化が中脳辺縁報酬回路の機能障害を引き起こすことを示唆している。根底にあるメカニズムの解明のために更なる研究が望まれるが、腹側被蓋野のドパミンニューロンの活動性の減少は慢性疼痛モデルと抑うつモデルで観察される共通の神経可塑的变化であり、新奇の鎮痛及び抗うつ治療のための有望なターゲットとなり得る。

また、痛みによって引き起こされる側坐核 shell 物側におけるドパミン神経情報伝達の亢進は、DAT を介していることが示唆され、痛みによる不快情動の生成に關与している可能性が考えられる。一方、痛みによる不快情動の生成には、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、さらに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って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 10 件)

Ide S., Takahashi T, Takamatsu Y, Uhl GR, Niki H, Sora I, Ikeda K. Distinct roles of opioid and dopamine systems in lateral hypothalamic intracranial self-stimulation.

Int. J. Neuropsychopharmacol., 20: 403-409. (2017) (査読有)

doi: 10.1093/ijnp/pyw113.

Yamamoto H., Kamegaya E., Hagino Y., Takamatsu Y., Sawada W., Matsuzawa M., Ide S., Yamamoto T., Mishina M., Ikeda K. Loss of GluN2D subunit results in social recognition deficit, social stress, 5-HT_{2C} receptor dysfunction, and anhedonia in mice.

Neuropharmacology, 112:188-197 (2017) (査読有)

doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.07.036.

Kato T., Ide S., Minami M. Pain relief induces dopamine release in the rat nucleus accumbens during the early but not late phase of neuropathic pain.

Neurosci. Lett., 629: 73-78 (2016) (査読有)

doi: 10.1016/j.neulet.2016.06.060.

Kaneko T., Kaneda K., Ohno A., Takahashi D., Hara T., Amano T, Ide S., Yoshioka M., Minami M. Activation of adenylate cyclase-cyclic AMP-protein kinase A signaling by corticotropin-releasing factor within the dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis is involved in pain-induced aversion.

Eur. J. Neurosci., 44(11):2914-2924 (2016) (査読有)

doi: 10.1111/ejn.13419.

Ide S., Satoyoshi H., Minami M., Satoh M. Amelioration of the reduced antinociceptive effect of morphine in the unpredictable chronic mild stress model mice by noradrenalin but not serotonin reuptake inhibitors.

Mol. Pain, 11: 47 (2015) (査読有)

doi: 10.1186/s12990-015-0051-0.

Nagano Y., Kaneda K., Maruyama C., Ide S., Kato F., Minami M. Corticotropin-releasing factor enhances inhibitory synaptic transmission to type III neurons in the bed nucleus of the stria terminalis.

Neurosci. Lett., 600: 56-61 (2015) (査読有)

doi: 10.1016/j.neulet.2015.05.059.

Minami M., Ide S. How does pain induce

negative emotion? Role of the bed nucleus of the stria terminalis in pain-induced place aversion. *Curr. Mol. Med.*, 15: 184-190 (2015) (査読有)
<http://www.eurekaselect.com/129013/article>
Ide S., Nishizawa D., Fukuda K., Kasai S., Hasegawa J., Hayashida M., Minami M., Ikeda K. Haplotypes of P2RX7 gene polymorphisms are associated with both cold pain sensitivity and analgesic effect of fentanyl. *Mol. Pain*, 10: 75 (2014) (査読有)
doi: 10.1186/1744-8069-10-75.
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: 573-579 (2014) (査読有)
doi:
10.1016/j.neuropharm.2014.01.019.
Kobayashi T., Suemasa A., Igawa A., Ide S., Fukuda H., Abe H., Arisawa M., Minami M., Shuto S. Conformationally restricted GABA with bicyclo[3.1.0]hexane backbone as the first highly selective BGT-1 inhibitor. *ACS Med. Chem. Lett.*, 5: 889-893 (2014) (査読有)
doi: 10.1021/ml500134k.

[学会発表](計 7 件)

Ikeda K, Ide S, Takahashi T, Takamatsu Y, Uhl GR, Niki H, Sora I
Distinct roles of opioid and dopamine systems in lateral hypothalamic intracranial self-stimulation.
The 55th Annual Meeting of the American College of Neuropsychopharmacology (ACNP 55th Annual Meeting), Hollywood, USA [2016/12/05].
井手聡一郎, 池田和隆
脳内自己刺激法を用いた薬物依存性解析および報酬系神経回路の解析
第 51 回日本アルコール・アディクション医学会学術総会, タワーホール船堀(東京都・江戸川区) [2016/10/07].
Ide S, Takamatsu Y, Ikekubo Y, Takeda TC, Nagasawa S, Hua J, Ikeda K
The abolished rewarding effect of methylphenidate in dopamine transporter knockout mice, a model for attention deficit/hyperactivity disorder.
30th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology, Seoul, Korea

[2016/07/04].

井門愛理, 加藤貴大, 井手聡一郎, 南雅文
神経障害性疼痛モデルラットにおける報酬誘発性側坐核内ドパミン遊離の時期依存的変調
第 46 回日本神経精神薬理学会年会(JSNP), Seoul, Korea [2016/07/03]
井手聡一郎, 高松幸雄, 池窪結子, 武田大志クラーク, 長澤セーラ, Hua J, 池田和隆
注意欠如/多動性障害モデルマウスにおけるメチルフェニデートの報酬効果の変化.
第 46 回日本神経精神薬理学会年会(JSNP), Seoul, Korea [2016/07/03]
加藤貴大, 井手聡一郎, 南雅文
神経障害性疼痛モデルラットにおける報酬誘発性側坐核内ドパミン遊離の時期依存的変調
第 89 回日本薬理学会年会, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市) [2016/3/10].
加藤貴大, 井手聡一郎, 南雅文
慢性疼痛による側坐核内ドパミン遊離変化
第 35 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム, 和歌山県立情報交流センター Big- \cup 和歌山県・田辺市 [2015/10/17-18]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井手 聡一郎 (IDE, Soichiro)

公益財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・主席研究員

研究者番号: 30389118