

令和 2 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03556

研究課題名(和文)慢性痛による抑うつ・不安の惹起に関わる負情動神経回路の可塑的变化の神経機構解明

研究課題名(英文)Elucidation of the neuronal mechanisms of plastic changes in the neural circuit for chronic pain-induced negative emotion such as depression and anxiety

研究代表者

南 雅文(MINAMI, Masabumi)

北海道大学・薬学研究院・教授

研究者番号：20243040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：慢性痛とうつ病の併存率が高いことから両者に共通の神経基盤の存在が推測される。本研究では、痛みによる抑うつ、不安、嫌悪などの負情動生成に関わる神経回路、特に、分界条床核に着目し研究を行った。慢性痛モデル動物では、背外側分界条床核内のCRF神経情報伝達が持続的に活性化し、腹側被蓋野に投射する神経細胞に対する抑制性入力を増加させることで、ドパミン神経機能を低下させ、うつ様症状を引き起こしていることを示唆する研究成果が得られた。本研究成果は、慢性痛やストレスにより誘発されるうつ病の脳内メカニズムの一端を明らかにし、新規治療法開発につながる有用な知見を提供するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性痛とうつ病は併発率が高いことが知られており、慢性痛による抑うつ状態とうつ病の間には共通の脳内メカニズムがあることが推測される。本研究成果は、慢性痛によるうつ病様症状に、脳内の分界条床核におけるCRF神経情報伝達活性化と、それによるドパミン神経活動抑制が関与することを明らかにしたものであり、慢性痛による抑うつや不安を改善するだけでなく、うつ病の治療にも役立つ新しい治療薬の開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The comorbidity of chronic pain and depression has long been recognized. Although dysfunction of the mesolimbic dopaminergic system has been implicated in both chronic pain and depression, the underlying mechanisms remain to be elucidated. In this study, we show that the inhibitory inputs to the neuronal pathway from the dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis (dIBNST) to the ventral tegmental area increase during chronic pain. This neuroplastic change is mediated by enhanced corticotropin-releasing factor signaling within the dIBNST that leads to tonic suppression of the mesolimbic dopaminergic system, which may be involved in the depression-like symptoms under the chronic pain condition. These findings provide useful insights that may lead to the development of new treatments for chronic pain and depression.

研究分野：神経薬理学

キーワード：薬理学 神経科学 薬学 慢性痛 抑うつ 不安 情動 分界条床核

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

うつ病や不安障害を患うために、抑うつ・不安情動を生成する神経機構を有しているとは考え難い。ヒトを含む哺乳類は、危険な時間帯や場所において、また、疾患や傷害を患った際に、自らの行動を抑制し周囲に対する警戒を高めることで身を守る生体防御システムとして、このような負情動生成機構を獲得・進化させてきたと考えられる。したがって、うつ病や不安障害のメカニズムを理解するためには、生体防御システムとしての抑うつ・不安の神経機構・神経回路を明らかにした上で、患者あるいは病態モデル動物においてその神経機構・神経回路がどのように変化しているかを解析することが必要である。

### 2. 研究の目的

慢性痛とうつ病の併存率が高いことから両者に共通の神経基盤の存在が推測される。本研究では、生体防御システムとしての痛みの役割に重要である抑うつ、不安、嫌悪などの負情動生成に関わる神経回路に着目し、慢性痛時の当該神経回路の可塑的变化の神経機構を明らかにすることにより、うつ病や不安障害のメカニズムに迫ることを目的とする。具体的には、申請者らの研究により痛みによる負情動生成での重要性が示された分界条床核を中心とした神経回路に焦点を当て、慢性痛による負情動神経回路の可塑的变化の神経機構を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 慢性痛モデル動物の作製と疼痛評価

実験には雄性 Sprague-Dawley ラットを用いた。慢性痛モデルとしてラット神経障害性疼痛モデルを用いた。脊髄神経を結紮・切断する手術 (spinal nerve ligation; SNL) を行った個体を SNL 群、神経の露出のみを行った個体を Sham 群とした。手術前と術後 1 週間ごとに von Frey ファイラメントを用いて疼痛閾値を算出した。SNL 群においては、疼痛閾値の低下が Sham 群と比べて 4 週間持続して観察された個体のみを電気生理実験および *in vivo* マイクロダイアリシスに用いた。背外側分界条床核 (dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis; dIBNST) から腹側被蓋野 (ventral tegmental area; VTA) に投射している神経細胞を蛍光標識するため、Sham 群および SNL 群の VTA に逆行性トレーサーである Green もしくは Red Retrobeads を注入した。

#### (2) 電気生理学的解析

ペントバルビタールで麻酔したラットを断頭後、素早く脳を取り出し、dIBNST を含む厚さ 250  $\mu$ m の冠状断スライスを作製した。スライス作製後、記録バッファを灌流させたチャンバー内で記録を行った。Cell-attached mode により、dIBNST 神経細胞から 3 分間の発火頻度を計測した。その後、細胞膜に穴を開け、電流を注入することにより細胞のタイプ分けを行った。蛍光標識トレーサーにより VTA に投射している dIBNST 神経細胞を識別後、whole-cell 記録を行い、電流注入により細胞のタイプ分けを行った。興奮性入力を阻害するためキヌレン酸存在下で抑制性シナプス後電流 (sIPSC) の測定を行い、CRF および CRF1 受容体拮抗薬である NBI27914 の効果を検討した。

#### (3) *In vivo* マイクロダイアリシス

脊髄神経結紮手術の 24-27 日後に、両側 dIBNST に薬液投与用ガイドカニューレを埋め込み、左側の側坐核 (nucleus accumbens; NAc) にダイアリシス用ガイドカニューレを埋め込んだ。脊髄神経結紮手術の 30-33 日後、dIBNST に NBI27914 を投与し、*in vivo* マイクロダイアリシスにより NAc 内の細胞外ドパミンレベルを測定した。*in vivo* マイクロダイアリシスでは、半透膜を介して得られた透析液中の物質を HPLC により分離し電気化学検出器にて検出・定量することで、脳内神経伝達物質遊離量を測定できる。本実験では、5 分間隔で、NBI27914 投与前後に、それぞれ、3 および 18 サンプルの透析液を回収しドパミン量を測定した。

#### (4) うつ病モデル動物を用いた解析

実験には雄性 Sprague-Dawley ラットを用いた。うつ病モデルには慢性軽度ストレス (chronic mild stress; CMS) モデルを用いた。本うつ病モデルでは、数週間に渡ってラットに予測できない種々の軽度ストレスを与えることにより、抑うつ・アンヘドニアを誘発することが知られている。4 週齢時にストレス負荷を開始し、表 1 に示す 8 種類のストレスを 4 週間連続で負荷した動物を CMS 群とした。4 週間ストレスを負荷せずに単独飼育したラット

1	絶水食	17時間
2	絶水	7時間
3	ケージを45度傾ける	15時間
4	ストロボライト照射	12時間
5	ペア飼育	A: 9時間 B: 8時間
6	絶食	15時間
7	エサの制限 (45 mg)	1時間
8	床敷きを250 mlの水で濡らす	25時間
9	ストレス負荷を行わない	

Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
1	2→3	4	5A→6	7→5B→8	4	9

表 1 CMS のスケジュール

を対照 (no stress; NS) 群とした。(2)に述べた方法により、VTA に投射している dIBNST 神経細胞を識別後、whole-cell 記録を行い、電流注入により細胞のタイプ分けを行った。興奮性入力を阻害するためキヌレン酸存在下で抑制性シナプス後電流 (sIPSC) の測定を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) dIBNST 内 型神経細胞の興奮性の可塑的变化

当研究室のこれまでの研究から、dIBNST 型神経細胞の活動が痛みによる不快情動生成に重要であることが明らかになっており、4週間の慢性痛下においてその活動がどのように変化しているかを調べるために発火頻度を測定した。その結果、SNL 群において dIBNST 型神経細胞の発火頻度が Sham 群と比べて有意に増加していた (図 1A,B)。これにより、慢性痛下では、dIBNST 型神経細胞の興奮性が増加していることが示された。

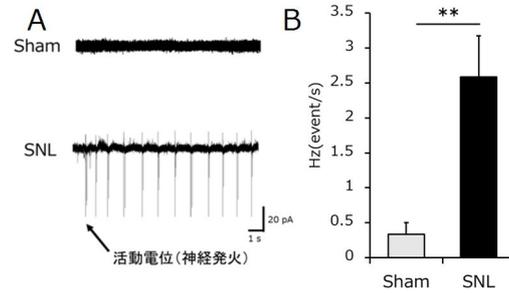


図 1 dIBNST の 型神経細胞の発火頻度

##### (2) VTA に投射する dIBNST 型神経細胞に対する抑制性入力の可塑的变化

4週間の慢性痛下において、VTA に投射する 型神経細胞への抑制性入力がどのように変化しているかを調べるため、逆行性トレーサーを用いて VTA 投射神経を標識し、抑制性シナプス電流 (sIPSC) を記録した (図 2A)。sIPSC は、プレシナプス側神経細胞から自発的に GABA が放出された際に、ポストシナプス側の神経細胞で記録される抑制性電流であり、sIPSC の発生頻度が高いほど、プレシナプスからの自発的な GABA 放出確率が増加していることを示している。VTA に投射する 型神経細胞に対する抑制性入力を Sham 群と SNL 群の間で比較すると、SNL 群において basal の sIPSC の発生頻度が増加していた (図 2B,C)。また、Sham 群において CRF を処置すると、CRF 処置の前後で (pre vs CRF) sIPSC の頻度が増加したが、SNL 群では変化しなかった (図 2D)。CRF1 受容体拮抗薬 NBI27914 の効果を調べたところ、CRF 処置の前後で (pre vs NBI) SNL 群において増加していた sIPSC の発生頻度が Sham 群と同程度まで減弱した (図 2E)。Sham 群の sIPSC 発生頻度は NBI27914 処置により変化しなかった。

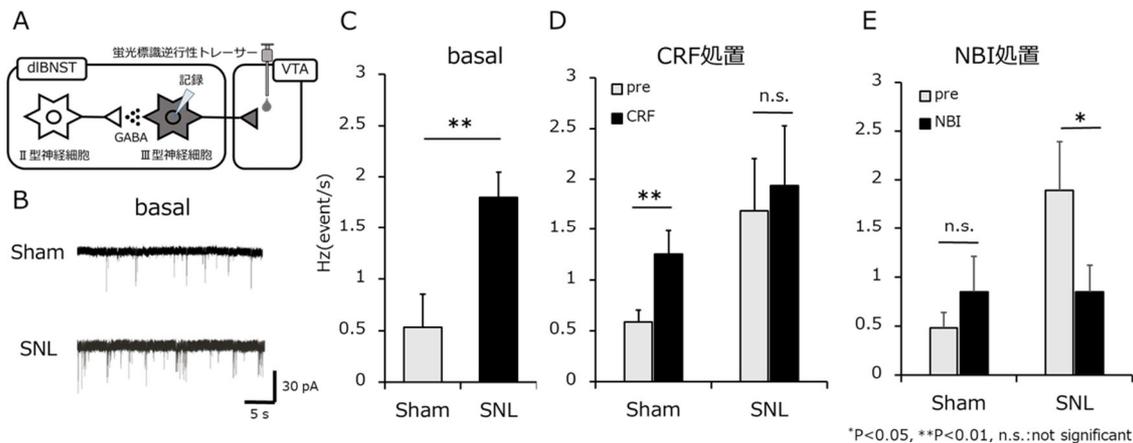


図 2 VTA に投射する dIBNST 型神経細胞における sIPSC 発生頻度

##### (3) dIBNST 内 CRF1 受容体拮抗薬投与による NAc 内ドパミン遊離量増加

NBI27914 投与前の 3 サンプルの平均をコントロール (pre = 100%) とし、NBI27914 投与によるドパミン遊離量の経時変化とその曲線下面積 (AUC) を図 3 に示した。NBI27914 投与により慢性痛群においてドパミン遊離量が有意に上昇した (図 3A)。一方、Sham 群では有意な増加は見られなかった。曲線下面積 (AUC) についても、対照群と比較して慢性痛群で有意に大きいことが示された (図 3B)。

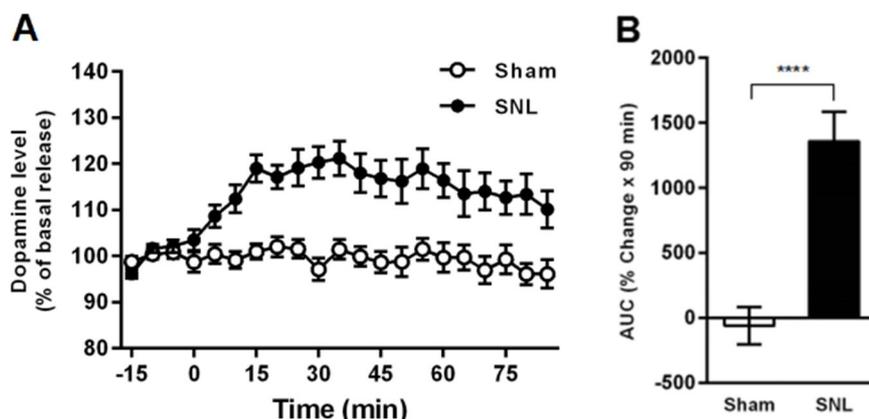


図 3 dIBNST への NBI27914 投与が NAc 内ドパミン遊離に及ぼす影響

#### (4) うつ病モデル動物における VTA に投射する dIBNST 型神経細胞での sIPSC の変化

VTA に投射する dIBNST 型神経細胞における sIPSC の頻度が、NS 群と比較して、CMS 群において有意に増加していた(図 4A)。振幅については有意な差はみられなかった(図 4B)。

#### (5) 考察

我々はこれまでに、報酬を与えた際の NAc 内ドパミン遊離量が、慢性痛モデル動物やうつ病モデル動物では減少することを報告しており<sup>1, 2)</sup>、これら病態モデル動物では、脳内報酬系において重要な役割を果たしているドパミン神経機能の低下により、うつ様症状が惹起されていることが考えられる<sup>3)</sup>。このドパミン神経機能低下の脳内メカニズムを明らかにするために、本研究では、痛みによる嫌悪情動惹起に重要な役割を果たしており<sup>4-6)</sup>、腹側被蓋野への神経投射も報告されている<sup>7)</sup>分界条床核に着目した。電気生理学的解析により、慢性痛モデル動物の dIBNST 内型神経細胞の興奮性が増大していることが明らかとなった。CRF が、GABA 作動性型神経細胞の発火頻度を増加させることや<sup>5)</sup>、型神経細胞に入力する抑制性入力を増加させることから<sup>8)</sup>、VTA に投射する型神経細胞への抑制性入力を調べたところ、慢性痛モデル動物において sIPSC 発生頻度が増加していた。さらに、CRF 処置により対照群では sIPSC 発生頻度が増加するのに対し慢性痛群では変化がないこと、一方、CRF1 受容体拮抗薬処置では慢性痛群では sIPSC 発生頻度が減少するのに対し対象群では変化しないことが明らかとなった。これらの結果から、慢性痛モデル動物では、dIBNST 内 CRF 神経情報伝達が持続的に活性化し、VTA に投射する型神経細胞に対する抑制性入力が増加していることが考えられた。この抑制性入力増加がドパミン神経機能に及ぼす影響を検討するため、慢性痛モデル動物の dIBNST に CRF1 受容体拮抗薬を投与し NAc 内ドパミン遊離量を計測したところ、CRF1 受容体拮抗薬投与によりドパミン遊離量が上昇した。以上をまとめると、慢性痛モデル動物では、dIBNST 内の CRF 神経情報伝達が持続的に活性化し、VTA に投射する型神経細胞に対する抑制性入力を増加させることで、ドパミン神経機能を低下させ、うつ様症状を引き起こしている可能性が示された<sup>9)</sup>。本研究成果は、慢性痛やストレスにより誘発されるうつ病の脳内メカニズムの一端を明らかにし、新規治療法開発につながる有用な知見を提供するものである。

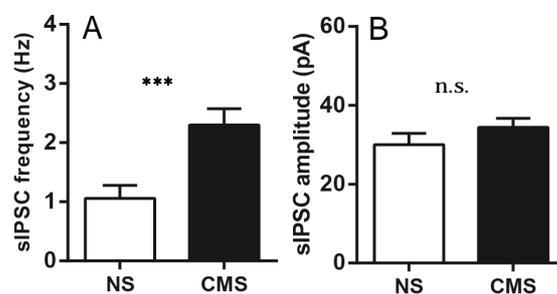


図 4 うつ病モデル動物における VTA に投射する dIBNST 型神経細胞における sIPSC 頻度

#### <引用文献>

- 1) 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. *Neuroscience Letters*, 629, 2016, 73-78
- 2) Minami, S., Satoyoshi, H., Ide, S., Inoue, T., Yoshioka M., Minami, M., Suppression of reward-induced dopamine release in the nucleus accumbens in animal models of depression: Differential responses to drug treatment. *Neuroscience Letters*, 650, 2017, 72-76
- 3) Minami, M., The role of the bed nucleus of the stria terminalis in pain-induced aversive motivation. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 26, 2019, 46-53
- 4) Deyama, S., Katayama, T., Ohno, A., Nakagawa, T., Kaneko, S., Yamaguchi, T., Yoshioka, M. and Minami M., Activation of the beta-adrenoceptor-protein kinase A signaling pathway within the ventral bed nucleus of the stria terminalis mediates the negative affective component of pain in rats. *Journal of Neuroscience*, 28, 2008, 7728-7736
- 5) 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. *Journal of Neuroscience*, 33, 2013, 5881-5894
- 6) Maruyama, C., Deyama, S., Nagano, Y., Ide, S., Kaneda, K., Yoshioka, M., Minami, M., Suppressive effects of morphine injected into the ventral bed nucleus of the stria terminalis on the affective, but not sensory, component of pain in rats. *European Journal of Neuroscience*, 47, 2018, 40-47
- 7) Kudo, T., Uchigashima, M., Miyazaki, T., Konno, K., Yamasaki, M., Yanagawa, Y., Minami, M., Watanabe, M., Three types of neurochemical projection from the bed nucleus of the stria terminalis to the ventral tegmental area in adult mice. *Journal of Neuroscience*, 32, 2012, 18035-18046
- 8) 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. *Neuroscience Letters*, 600, 2015, 56-61
- 9) Takahashi, D., Asaoka, Y., Kimura, K., Hara, R., Arakaki, S., Sakasai, K., Suzuki, H., Yamauchi, N., Nomura, H., Amano, T., Minami, M., Tonic suppression of the mesolimbic dopaminergic system by enhanced corticotropin-releasing factor signaling within the bed nucleus of the stria terminalis in chronic pain model rats. *Journal of Neuroscience*, 39, 2019, 8376-8385

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Daiki Takahashi, Yuta Asaoka, Keisuke Kimura, Ryuto Hara, Saya Arakaki, Keisuke Sakasai, Hiroe Suzuki, Naoki Yamauchi, Hiroshi Nomura, Taiju Amano, Masabumi Minami	4. 巻 39
2. 論文標題 Tonic suppression of the mesolimbic dopaminergic system by enhanced corticotropin-releasing factor signaling within the bed nucleus of the stria terminalis in chronic pain model rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 8376-8385
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.3047-18.2019	査読の有無 有
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 Masabumi Minami	4. 巻 26
2. 論文標題 The role of the bed nucleus of the stria terminalis in pain-induced aversive motivation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Opinion in Behavioral Sciences	6. 最初と最後の頁 46-53
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cobeha.2018.10.003	査読の有無 有
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14件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 南 雅文
2. 発表標題 慢性痛による抑うつ様行動の神経機構 - 慢性痛とうつ病をつなぐもの -
3. 学会等名 第41回 日本疼痛学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道大学 大学院薬学研究院 医療薬学部門 医療薬学分野 薬理学研究室  
<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/yakuri/index.html>

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	天野 大樹  (AMANO Taiju)		
研究協力者	野村 洋  (NOMURA Hiroshi)		
研究協力者	山内 直紀  (YAMAUCHI Naoki)		
研究協力者	高橋 大樹  (TAKAHASHI Daiki)		
研究協力者	朝岡 勇太  (ASAOKA Yuta)		

## 6. 研究組織（つづき）

	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	木村 佳祐  (KIMURA Keisuke)		
研究協力者	原 隆人  (HARA Ryuto)		
研究協力者	逆井 佳祐  (SAKASAI Keisuke)		
研究協力者	鈴木 博恵  (SUZUKI Hiroe)		
研究協力者	新垣 紗也  (ARAKAKI Saya)		