

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2012

課題番号：21390436

研究課題名（和文）：痛み誘発負情動における疼痛受容性扁桃体の機能と意義の解明

研究課題名（英文）：Functional significance of nociceptive amygdala in pain-induced negative emotion

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

痛み入力と情動応答を媒介する扁桃体中心核内の神経回路が、慢性痛において示す可塑的变化とその成立機構の解明を目的として、脊髄神経結紮および有痛性高血糖モデルから脳スライスを作成し、腕傍核由来上行線維刺激によって誘発されるシナプス後電流を扁桃体中心核外側外包核ニューロンから記録し、その増強機構を解析した。その結果から、慢性痛によってシナプスの形態変化を含む放出機構および後シナプス応答機構の可塑的变化とその固定化が生じ、侵害受容情報による情動応答の亢進の基礎過程をなす事実を解明した。

研究成果の概要（英文）：

The majority of nociception-specific projecting neurons in the spinal dorsal horn project to the lateral parabrachial nucleus (LPB) that in turn project to the capsular part of the central amygdala (CeC), forming an anatomical basis for direct link between nociception and emotion. The aim of this study was to identify the mechanism and physiological significance of the potentiated LPB-CeC transmission in chronic pain models. We analyzed the LPB-CeC transmission as well as those within other amygdaloid subnuclei in acutely prepared brain slices prepared from neuropathic pain models by spinal nerve ligation and streptozocin-induced diabetics. Estimation of mono-vesicular content, single fiber release and amplitude fluctuation at different release probabilities unequivocally demonstrated an increased number of release sites allowing multiple vesicles to be released in synchrony from single fiber terminals in potentiated synapses. These results point to a specific structural plasticity and its consolidation in the amygdala synapses in the chronic neuropathic pain, which would provide basis for the enhanced link between nociception and negative emotion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3000,000	900,000	3900,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	4200,000	1260,000	5460,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、麻酔・蘇生学

キーワード：痛み、扁桃体、情動、神経障害性疼痛、シナプス伝達、神経科学、神経可塑性、慢性痛

1. 研究開始当初の背景

(1) 脊髄後角第 I 層侵害受容特異的投射ニューロンの大部分が、外側結合腕傍核 (lateral parabrachial nucleus; 以下 LPB) に投射し、さらに、LPB からは、扁桃体中心核外側外包部 (laterocapsular part of the central nucleus of amygdala; 以下 CeC) に投射する (脊髄-結合腕傍核-扁桃体路)。この経路の特徴は、視床-皮質系を介さずに、侵害受容ニューロンから負情動の中核である扁桃体に直接投射する点にある。その標的である CeC のニューロンの 80% が侵害刺激によって特異的に興奮するため、CeC は「疼痛受容性扁桃体」と呼称されており、痛み誘発情動行動の発現に関与している。

(2) 我々は、この経路の最終シナプスである LPB-CeC シナプスの興奮性シナプス伝達が、神経障害性疼痛モデルにおいて増強している事実をすでに報告している (Ikeda et al., 2007)。しかし、この増強の分子・シナプス機構、扁桃体ネットワークにおけるこの増強の意義、そして、慢性痛の成立と治療におけるこの増強の意義は未解明である。

2. 研究の目的

本研究の最終的なゴールは、この疼痛受容性扁桃体 CeC が疼痛誘発情動の形成において担う役割を解明することである。慢性痛モデルにおいて興奮性の亢進を示す疼痛受容性扁桃体 CeC ニューロンの形態および扁桃体ネットワークにおける機能的特性を解析することによって、慢性痛におけるこれらのニューロンの興奮性亢進の「意義」を解明することを当初の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 慢性疼痛モデルの作成

脊髄神経結紮モデル (SNL) および、ストレプトゾシン (STZ) 静脈投与高血糖モデルを作成した。前者では Wistar ラットを、後者では、ICR マウスを用いた。それぞれにおいて、触刺激誘発屈曲反射閾値および尾部熱刺激誘発回避反射潜時を計測し、痛覚過敏 (異痛症) の発症を定量的に確認した。

(2) 脳スライスの作成とシナプス伝達解析

常法に従い脳スライスを作成し、LPB-CeC シナプス伝達を記録した。扁桃体回路内における増強の特異性を同定するため、外包-扁桃体外側核、外側核-外側基底核、外側基底核-CeC の興奮性シナプス伝達、ならびに、も記録した。また、電気生理学的手法による NMDA 受容体成分 AMPA 受容体成分比、ペプチド CGRP の効果、および、ニューロン内 neurobiotin 注入による細胞形態同定を行った。さらに、非同期的放出による単小胞性シナプス後電流解析、 θ ピペットによる単線維

刺激、gDGG を用いたシナプス間隙伝達物質濃度変化推定を行い、シナプス伝達増大機構の解明を試みた。

(3) TRPV1 発現無髄線維脱落モデル

LPB-CeC 可塑性の発現に関与する末梢性入力を同定するために、新生期カプサイシン処置による TRPV1 発現線維脱落モデルを作成して、SNL モデルを作製、CeC-LPB シナプス伝達を計測した。

(4) 神経障害性疼痛治療モデル

神経障害性疼痛の治療が LPB-CeC シナプス伝達増強に及ぼす影響を評価するため、神経結紮減圧術 (SNL モデル) およびインスリン治療 (STZ モデル) を行いその影響を評価した。

4. 研究成果

(1) 慢性神経障害性疼痛患側対側 CeC で特異的に形成される興奮性シナプス伝達の増強は、単線維終末から 1 活動電位によって同期的に放出される小胞数の著明な増大に起因する事実を明らかにした。この時、シナプス後膜の NMDA/AMPA 比が増加した。一方、シナプス形態の電子顕微鏡解析の結果、慢性神経障害性疼痛患側対側 CeC におけるシナプス面積の増大、シナプス形状の複雑化、ならびにシナプス後膜 AMPA 受容体密度の軽度の増加が生じる事実を突き止めた (重本隆一および Dong Yu-Lin との共同研究)。

(2) 神経障害性疼痛モデル作成 6、24、36 および 48 時間後に脳スライスを作成し、シナプス伝達を評価したところ、術後 6 時間後にすでに CeC シナプス伝達増強が両側性に生じ、その後 2 日目以降に片側性のシナプス増強が成立する事実を明らかにした。

(3) SNL モデルにおいて神経障害を治療すると異痛症閾値は回復するものの、シナプス伝達は増強したままである事実を見出した。STZ モデルは異なる結果を示した (後述)。

(4) シナプス増強入力を示す CeC ニューロンは、spiny で、その多くが GABA 作動性であり、情動生成の gating に関与している可能性が示された。

(5) C 線維の選択的脱落モデルを用い、C 線維侵害受容器入力は異痛症成立には必要ないが、CeC シナプス増強の成立には促進的に働く可能性を見出した。これらのシナプス前・後の変化を伴う形態・機能変化が、慢性痛における痛み入力に対する情動応答の亢進の基盤機構である可能性を世界で初めて証明した。

(6) 慢性神経障害性疼痛によって CeC で特異的に形成される興奮性シナプス伝達の増強は、経路依存的に生じる。直接的な侵害受容性入力が、シナプス増強の直接的因子である事実が確認された。

(7) 新生仔 capsaicin 処置によって TRPV1 チャネル発現末梢神経の選択的不活性化を生じさせた動物において脊髄神経障害による CeC シナプス増強を評価した。新生仔 capsaicin 処置動物で作成された神経障害性疼痛モデルでは、非処置動物（溶媒投与）とほぼ同様の異痛症症状が発現したが、新生仔 capsaicin 処置動物の CeC では、非処置動物と異なり、シナプス伝達増強が生じなかった。C 線維の関与する疼痛症状の亢進がほとんど生じない神経障害性疼痛モデルで、C 線維性の入力、CeC シナプス増強に促進的な役割を担っている可能性が示された。

(8) CeC シナプス伝達の NMDA 受容体成分が、CGRP 急性投与によって増大する事実、および、この変化が Mg²⁺ ブロックの解除によるものではない事実を示した。

(9) 糖尿病性神経障害性疼痛モデルにおいてシナプス前性機構による EPSC の増加が認められた。痛みの種類、モダリティによって、異なる機構によるシナプス伝達増強が生じる事実が確認された。

(10) 脊髄神経一側性結紮を左右両側で行うことにより、SNL モデルでの腕傍核-扁桃体中心核シナプス増強が、投射経路依存的に生じる事実を証明した。

(11) 侵害受容性扁桃体に入力する腕傍核および外側基底核由来入力間で、放出確率にわずかな差異が見出される事実を明らかにした。

(12) 全身性疼痛過敏を示すストレプトゾシン誘発糖尿病性神経障害性疼痛 (STZ) モデルをマウスで作成した。SNL モデルと異なり、シナプス伝達増強が両側性に認められ、これは放出確率の増加を伴っていた。外側基底核路からの入力は増強を示さなかった。

(13) SNL モデルでは脊髄神経結紮解除に伴い疼痛行動が改善されてもシナプス増強は維持されたが、STZ モデルで insulin 投与により血糖値を改善させると疼痛行動・シナプス増強ともに改善した。

(14) STZ モデルは全般性疼痛過敏を示すため四肢への電気ショックによる恐怖条件付けに及ぼす影響を評価可能である。STZ モデルは恐怖条件付けの低閾値化と易獲得性を示した。これは STZ モデルの扁桃体シナプス増強が情動学習を強化する可能性を初めて示すものである。

これらのシナプス前・後の変化を伴う形態・機能変化が、慢性痛における痛み入力に対する情動応答の亢進の基盤機構である可能性を証明した。

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 17 件)

1 加藤総夫, 高橋由香里, 痛みと負情動 — 「有害事象に対する応答システムとしての痛み情動」 試論一, *Pain Clinic*, 33, 2012, 387-94

2 Ono K, Tsukamoto-Yasui M, Hara-Kimura Y, Inoue N, Nogusa Y, Okabe Y, Nagashima K, Kato F., Intragastric administration of capsiate, a transient receptor potential channel agonist, triggers thermogenic sympathetic responses, *J Appl Physiol*, 110 ; 2011, , 789-798

3 Aoyama R, Okada Y, Yokota S, Yasui Y, Fukuda K, Shinozaki Y, Yoshida H, Nakamura M, Chiba K, Yasui Y, Kato F., Toyama Y, Spatiotemporal and anatomical analyses of P2X receptor-mediated neuronal and glial processing of sensory signals in the rat dorsal horn, *Pain*, 152; 2011, 2085-9. doi:10.1016/j.pain.; 2011, .05.014

4 Yasui Y, Masaki E, Kato F., Esmolol modulates inhibitory neurotransmission in the substantia gelatinosa of the spinal trigeminal nucleus of the rat, *BMC Anesthesiol*, 11, ; 2011, Article 15. doi:10.1186/1471-2253-11-15

5 Yamamoto K, Noguchi J, Yamada C, Watabe AM, Kato F., Distinct target cell-dependent forms of short-term plasticity of the central visceral afferent synapses of the rat, *BMC Neuroscience*, 11, ; 2010, 134

6 Inoue K, Kato F., Tsuda M, The modulation of synaptic transmission by the glial purinergic system, *The Open Neuroscience Journal*, 4; 2010, , 84-92

7 加藤総夫, 痛み誘発負情動から考える“心”の起源, *医学のあゆみ*, 232; 2010, , 14-20

8 加藤総夫, シナプス伝達とアストロサイト, *Clinical Neuroscience*, 28; 2010, 876-881

9 荒田晶子, 加藤総夫, QOL に影響を及ぼす諸感覚情報を統合する NPB, *日本薬理学雑誌*, 有, 135; 2010, 261-262

10 加藤総夫, 高橋由香里, 痛みはなぜ苦痛なのか? —慢性痛による扁桃体シナプス可塑性から考える—, *J Neurosci Pain Res*, 13; 2011, 1-7.

11 Sumiyama K, Tajiri H, Kato F, Imura T, Ono K, Ikeda K, Imazu H, Gostout CJ, Pilot study for in vivo cellular imaging of the muscularis propria and ex vivo molecular imaging of myenteric neurons. *Gastrointestinal Endoscopy*, 69; 2009, 1129-34

12 高橋由香里, 池田 亮, 加藤総夫, 痛みモデル依存的扁桃体中心核シナプス増強機構の差異, *Pain Research*, 24; ; 2009, 137-46.

13 加藤総夫, 痛みの本質は何か? —慢性痛における痛み誘発負情動亢進メカニズムから考える—, *麻酔*, 58; 2009, S47-S58

14 加藤総夫, 痛みの生物学的意義と扁桃体の役割, *Brain Medical* 21; 2009, 243-9.

[学会発表] (計 34 件)

1 落合敏平、高橋由香里、朝戸めぐみ、渡部文子、大澤匡弘、亀井淳三、加藤総夫, 神経障害性疼痛を示す糖尿病マウスにおける扁桃体シナプス伝達増強, 第 85 回日本薬理学大会, 2012.3.16, 京都

2 加藤総夫, 侵害受容による有害性警告機構の生物学的基盤, 第 153 回日本獣医学大会 (招待シンポジスト), 2012.3.27, 大宮

3 高橋由香里、加藤総夫, 侵害受容性扁桃体における特異的シナプス増強機構, 第 88 回日本生理学会大会・第 112 回日本解剖学会総会, 2011.3.30, 誌上開催

4 落合敏平、高橋由香里、朝戸めぐみ、渡部文子、大澤匡弘、亀井淳三、加藤総夫, 神経障害性疼痛を伴う糖尿病マウスにおける侵害受容性扁桃体のシナプス伝達増強, 第 88 回日本生理学会大会・第 112 回日本解剖学会総会, 2011.3.28, 誌上開催

5 加藤総夫, 原始感覚と心をつなぐ扁桃体神経回路, 第 3 回日本不安障害学会学術大会, 2011.2.5, 東京

6 Kato, F, Morphofunctionally consolidated synaptic potentiation in the nociceptive amygdala in chronic neuropathic pain, The 4th Asian Pain Symposium (招待講演), 2011.5.11, 上海, 中華人民共和国

7 Kato F, Chronic pain-induced morphofunctional plasticity in the nociceptive amygdala, Gordon Research Conference: Amygdala in Health & Disease, 2011.7.31, Waterville, ME, USA

8 Okada Y, Aoyama R, Yokota S, Yasui Y, Fukuda K, Shinozaki Y, Yoshida H, Nakamura M, Chiba K, Yasui, Y, Kato, F, Toyama Y, Astrocytes and neurons together process sensory information via P2X receptors in the dorsal horn of the spinal cord: voltage imaging and immunohistological analyses, 10th European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, 2011.9.11, Prague, Czech.

9 加藤総夫, からだの痛みがこころの痛みを生み出す神経機構, 第 5 回日本緩和医療薬学会年会 (招待シンポジスト), 2011.9.24, 幕張

10 加藤総夫, 疼痛による不快情動と扁桃体, 第 34 回日本神経科学大会 (シンポジウム), 2011.9.17, 横浜

11 落合敏平、高橋由香里、朝戸めぐみ、渡部文子、大澤匡弘、亀井淳三、加藤総夫, 神経障害性疼痛を伴う糖尿病マウスにおける侵害受容性扁桃体のシナプス伝達増強, 第 34 回日本神経科学大会, 2011.9.16, 横浜

12 奥津裕也、池田亮、高橋由香里、丸毛啓史、加藤総夫, マウス侵害受容性扁桃体シナプス伝達NMDA受容体成分のCGRPによる増強, 第 34 回日本神経科学大会, 2011.9.17, 横浜

13 Ochiai T, Takahashi Y, Asato M, Watabe AM, Ohsawa M, Kamei J, Kato F, Presynaptic mechanisms underlie synaptic potentiation in the nociceptive amygdala in diabetes-linked neuropathic pain, Society for Neuroscience 2011, 2011.11.14, Washington, DC, USA

14 Okutsu Y, Takahashi Y, Ikeda R, Noguchi J, Marumo K, Kato F, Potentiation by calcitonin gene-related peptide of NMDA receptor-mediated components in the presence and absence of extracellular Mg²⁺ in the mouse nociceptive amygdala, Society for Neuroscience 2011, 2011.11.16, Washington, DC, USA

15 Nakao-Iwase A, Takahashi Y, Ikeda R, Kato F, Synchronous multivesicular release underlies potentiated postsynaptic currents in parabrachio-amygdaloid synapse in neuropathic rat, 36th International Congress of Physiological Sciences, 2010 年 7 月 31 日, 京都

16 高橋由香里, 中尾彩乃, 池田亮, 加藤総夫,

神経因性疼痛モデルラット腕傍核-扁桃体中心核シナプス増強の量子的放出解析, 第 32 回日本神経科学学会, 2010 年 9 月 16 日, 名古屋

17 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, 2010 年 11 月 5 日, 横浜

18 中尾 (岩瀬) 彩乃, 高橋由香里, 池田亮, 加藤総夫, 神経因性疼痛モデル脊髄および脳内神経回路の可塑的变化におけるC線維脱失の関与の検討, 日本ペインクリニック学会第 43 回大会, 2010 年 7 月 31 日, 名古屋

19 池田亮、高橋由香里、丸毛啓史、加藤総夫, 慢性痛における扁桃体内シナプス伝達連合性増強, 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2010.10.15, 京都

20 奥津裕也、池田亮、高橋由香里、丸毛啓史、加藤総夫, マウス侵害受容性扁桃体シナプス伝達に及ぼすCGRPの特異的増強作用, 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2010.10.15, 京都

21 加藤総夫, 痛みの生物学的役割から考える慢性痛の意味, 日本麻酔科学会 関東甲信越・東京支部, 第 50 回合同学術集会, 2010.9.11, 東京

22 加藤総夫, Morphofunctional synaptic plasticity in the central amygdala of rats with persistent neuropathic pain, 第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会 合同大会, 2010.09.9.3, 神戸

23 高橋由香里、三角香世、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におけるグルタミン酸受容体構成の変化, 第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会 合同大会, 2010.09.9.2, 神戸

24 高橋由香里、三角香世、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におけるNMDA受容体成分, 第 87 回日本生理学会大会, 2010.5.21, 盛岡

25 Takahashi Y, Nakao-Iwase A, Watabe AM, Kato F, Altered characteristics of vesicular release at the potentiated synapses in the nociceptive amygdala of neuropathic rats, The 7th Forum of European Neuroscience, 2010.7.4, Amsterdam,

26 Kato F, Chronic pain-triggered consolidation of synaptic potentiation in the nociceptive amygdala, NIPS Synapse Meeting - Synaptic plasticity as a basis of learning and memory, 2010.11.2, 岡崎

27 加藤総夫, 侵害受容性扁桃体におけるシナプス可塑性, 第 17 回 PharmaScienceフォーラム, 2010.5.24, 札幌

28 加藤総夫, 「情動、あるいは、有害性警告制御系」のボトムアップ的際理解を目指して - 慢性的侵害受容による扁桃体シナプス可塑性から考える -, 平成 22 年度生理学研究所研究会, 感覚刺激・薬物による快・不快情動生成機構とその破綻, 2010.9.30, 岡崎

29 中尾彩乃、高橋由香里、池田亮、加藤総夫, 神経因性疼痛モデル侵害受容性扁桃体シナプス伝達増強におけるカプサイシン感受性一次感覚神経入力の意義, 日本麻酔科学会第 57 回学術集会, 2010.6, 神戸

30 加藤総夫, 痛みはなぜ苦痛なのか? - 慢性痛による扁桃体シナプス可塑性から考える -, 第 15 回痛みの神経科学研究会, 2010.5.22, 東京

31 加藤総夫, 高橋由香里, 中尾彩乃, 池田亮, 痛み情動記憶固定化のシナプス機構, 日本ペインクリニック学会第 43 回大会 (シンポジウム招待講演), 2009 年 7 月 17 日, 名古屋

32 Takahashi 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, 36th International Congress of Physiological Sciences, 2009 年 7 月 31 日, 京都

33 加藤総夫, 痛みの本質は何か? - 慢性痛における痛み誘発不情動亢進メカニズムから考える, 麻酔科学会第 56 回 (招待講演), 2009 年 8 月 17 日, 神戸

34 Takahashi Y, Nakao-Iwase A, Dong YL, Ikeda R, Shigemoto R, Kato F, Morphofunctional evidence for consolidated synaptic potentiation in the nociceptive amygdala following neuropathic pain, Society for Neuroscience Annual Meeting 2009, 2009 年 10 月 18 日, Chicago, USA

〔図書〕 (計 1 件)

加藤総夫, 慢性痛と情動, 慢性疼痛における薬剤選定と治療薬開発, 科学技術協会・編, 2010.

〔その他〕

ホームページ等

研究室ホームページにおける情報公開

[http://lablog.neurophysiology-jikei.jp/
pain_amygdala.html](http://lablog.neurophysiology-jikei.jp/pain_amygdala.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 総夫 (KATO FUSAO)

研究者番号：20169519

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

河合 良訓 (KAWAI YOSHINORI)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：80211861

近藤 一郎 (KONDO ICHIRO)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50266623

藤ヶ崎 純子 (FUJIGASAKI JUNKO)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：60312021

(4)研究協力者

高橋 由香里 (YUKARI TAKAHASHI)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：20613764

渡部 文子 (WATABE M AYAKO)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：00334277

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

安井 豊 (YASUI YUTAKA)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：80459651