

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860429

研究課題名(和文)ノルアドレナリン作動性神経による疼痛誘発扁桃体シナプス可塑性修飾機構の解明

研究課題名(英文)Mechanisms of noradrenaline-mediated modulation of synaptic plasticity in the nociceptive amygdala

## 研究代表者

高橋 由香里(Takahashi, Yukari)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：20613764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：侵害受容性扁桃体シナプス伝達におけるノルアドレナリンの役割の解明を目的に研究を推進し、以下の成果を上げた。(1)外因性ノルアドレナリンが侵害受容性扁桃体においてシナプス伝達を修飾する事実を明らかにした。(2)抗ドパミン水酸化酵素サボリンによる扁桃体中心核ノルアドレナリン線維破壊により、ホルマリン誘発炎症性疼痛モデル動物において1)自発行動の二相目の疼痛応答行動の減少、2)モデル作製24時間後までの温度嗜好性行動の変化を明らかにした。(3)光遺伝学的手法による内因性ノルアドレナリン放出を可能とする標本として、ノルアドレナリン神経におけるCre依存的チャンネルロドプシン発現系を確立した。

研究成果の概要(英文)：I have found the followings: first, noradrenaline applied to the acute brain slices containing the central amygdala potently modulated the synaptic transmission. Second, injection of anti-dopamine beta-hydroxylase-saporin into the central amygdala, which resulted in destroying of the noradrenergic fibers in the amygdala, changed in spontaneous pain-related behaviors and the thermal preference. Finally, I have established a system for Cre recombinase-dependent expression of channelrhodopsin in the noradrenergic neurons that would enable light-triggered release of intrinsic noradrenaline in vivo and ex vivo preparations.

研究分野：神経科学

キーワード：情動 慢性痛 シナプス可塑性 扁桃体 電気生理学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 疼痛の臨床医学的な問題はその苦痛 (= 「痛みの負情動」) である。侵害受容と負情動を直接結ぶ脊髄 - 腕傍核 - 扁桃体路の終止核である扁桃体中心核は「侵害受容扁桃体」と呼ばれる。様々な疼痛モデルにおいて、扁桃体の活性化が報告されており、我々は脊髄神経結紮およびストレプトゾトシン誘発神経障害性疼痛モデルにおいて腕傍核 - 扁桃体興奮性シナプス伝達の増強を証明してきた。

(2) 扁桃体にはノルアドレナリン含有線維が豊富に終始し、また、外因性ノルアドレナリンは同核内シナプス伝達を薬理的に修飾する。しかし、扁桃体シナプス伝達を修飾するノルアドレナリン放出線維の起源となる神経核はどこか、痛みはこのシナプス伝達修飾機構をどのように変化させるか、また、扁桃体におけるノルアドレナリン放出機構の活性化あるいは抑制が痛み関連情動行動にどのような影響を及ぼすか、については情報が無い。

## 2. 研究の目的

本研究では、光遺伝学技術を用いて神経核特異的な内因性ノルアドレナリン放出を *in vitro* および *in vivo* で誘発し、侵害受容扁桃体での疼痛情動処理における内因性ノルアドレナリンの役割を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

以下のアプローチにより、疼痛におけるノルアドレナリン神経の役割の解明を試みた。

- ・チャンネルロドプシンによる経路依存的内因性ノルアドレナリン放出下における侵害受容扁桃体シナプス伝達記録
- ・疼痛モデルにおけるノルアドレナリン作用の解析
- ・チャンネルロドプシンによる *in vivo* 扁桃体中心核ノルアドレナリン放出が痛み関連情動行動に及ぼす影響の解析
- ・イムノトキシンによる特異的ノルアドレナリン神経核破壊による侵害受容性シナプス伝達および情動行動への影響の解析

## 4. 研究成果

疼痛誘発扁桃体シナプス伝達可塑的变化における内因性ノルアドレナリンの役割の解明を目指し研究を推進し、以下の成果を得た。  
(1) 扁桃体中心核における外因性ノルアドレナリン作用に及ぼす疼痛の影響：急性脳スライス標本の扁桃体中心核外包部および内側部において、外因性ノルアドレナリンがシナプス伝達に与える影響を検討した。ノルアドレナリンが扁桃体中心核内側部において抑制性シナプス伝達を増強すること、そして、その増強作用が疼痛モデルにおいて経過時間依存的に変化することを共同研究者とともに見出した。

(2) 扁桃体中心核ノルアドレナリン線維脱落の疼痛行動への影響：抗ドパミン 水酸化酵素 (DBH) サポリンを扁桃体中心核に微量注入し、ノルアドレナリン線維を脱落させ、ホルマリン誘発炎症性疼痛モデルの二相性自発行動、温度嗜好性、および、機械性疼痛閾値を評価した。ノルアドレナリン線維脱落により 自発行動の二相目の疼痛応答行動の減少、モデル作製 24 時間後までの温度嗜好性行動の変化が認められた。その一方、機械性疼痛閾値は影響を受けなかった。

(3) 光遺伝学的手法による内因性ノルアドレナリン放出を可能とする標本の作製：ノルアドレナリン作動性神経からの内因性ノルアドレナリン放出を効率的かつ確実に誘導するために、以下のような遺伝子改変動物を用いたアプローチで標本開発を進めた。

共同研究者よりノルアドレナリン神経特異的チャンネルロドプシン発現トランスジェニックマウスを譲受し扁桃体を含む脳スライス標本作製した。しかし、扁桃体中心核においてノルアドレナリン放出を可能とするチャンネルロドプシン-蛍光タンパク発現は認められなかった。

DBH プロモーター制御下で Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックラットを作製した。現在系統確立中で近日中に Cre 依存的にチャンネルロドプシンを発現させることが可能な状態に到達した。

## 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 3 件)

1. Sato M, Ito M, Nagase M, Sugimura YK, Takahashi Y, Watabe AM, Kato F. The lateral parabrachial nucleus is actively involved in the acquisition of fear memory in mice. *Molecular Brain*, 査読有, 8 巻, 2015 年, 22.  
DOI: 10.1186/s13041-015-0108-z.

2. Ohkawa N, Saitoh Y, Suzuki A, Tsujimura S, Murayama E, Kosugi S, Nishizono H, Matsuo M, Takahashi Y, Nagase M, Sugimura YK, Watabe AM, Kato F. Artificial association of pre-stored information to generate a qualitatively new memory. *Cell Reports*, 査読有, 11 巻, 2015 年, 261-269.  
DOI: 10.1016/j.celrep.2015.03.017.

3. Kinoshita J, Takahashi Y, Watabe AM, Utsunomiya K, Kato F. Impaired noradrenaline homeostasis in rats with painful diabetic neuropathy as a target of duloxetine analgesia. *Molecular pain*, 査読有, 9 巻, 2013 年, 59.  
DOI: 10.1186/1744-8069-9-59.

〔学会発表〕(計 18 件)

1. Sugimoto M, Takahashi Y, Watabe AM, Kato F. Effects of neurotoxic destruction of noradrenergic fibers of the central nucleus of amygdala on rat inflammatory orofacial pain. 第 92 回日本生理学会大会, 2015 年 3 月 21-23 日, 神戸.

2. Sugimura YK, Takahashi Y, Watabe AM, Kato F. Optogenetic demonstration of direct input from the lateral parabrachial nucleus to the nociceptive amygdala. 第 92 回日本生理学会大会, 2015 年 3 月 21-23 日, 神戸.

3. Miyazawa Y, Takahashi Y, Watabe AM, Kato F. Synaptic potentiation in the central amygdala in trigeminal inflammatory pain model of rats. 第 92 回日本生理学会大会, 2015 年 3 月 21-23 日, 神戸.

4. 篠原 恵, 奥津 裕也, 池田 亮, 高橋 由香里, 栗原 裕基, 加藤 総夫, 丸毛 啓史. 痛みの慢性化における CGRP の役割 遺伝子欠損マウスを用いた扁桃体興奮性シナプス伝達の解析. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2014 年 10 月 9-10 日, 鹿児島.

5. 高橋 由香里. 炎症性疼痛における扁桃体シナプス伝達可塑性機構. 平成 26 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』2014 年 10 月 7-8 日, 岡崎.

6. Yamamoto S, Takahashi Y, Watabe AM, Kato F. Two Distinct Types of Adrenoceptors Modulate Network Activity in The Central Nucleus of Amygdala. 第 37 回日本神経科学大会, 2014 年 9 月 11-13 日, 横浜.

7. Tsurugizawa T, Kitamura A, Takahashi Y, Shinohara K, Uneyama H, Kato F. Sevoflurane modulates the hemodynamic responses in rat primary somatosensory cortex. 第 37 回日本神経科学大会, 2014 年 9 月 11-13 日, 横浜.

8. Shinohara K, Ikeda R, Takahashi Y, Kurihara H, Marumo K, Kato F. Role of CGRP in inflammatory pain-induced potentiation in the central amygdala. 第 37 回日本神経科学大会, 2014 年 9 月 11-13 日, 横浜.

9. Takahashi Y, Ochiai T, Asato M, Watabe AM, Ohsawa M, Kamei J, Kato F. Insulin attenuates synaptic potentiation in the nociceptive amygdala in a rodent model of

painful diabetic neuropathy. 9th FENS Forum of Neuroscience, 2014 年 7 月 5-9 日, Milan.

10. Yamamoto S, Takahashi Y, Watabe AM, Kato F. Independent roles of distinct types of adrenoceptors in synaptic modulation of network activity in the central nucleus of amygdala. 9th FENS Forum of Neuroscience, 2014 年 7 月 5-9 日, Milan.

11. Sugimura Y, Takahashi Y, Watabe AM, Kato F. Optogenetic stimulation of parabrachio-amygdaloid pathway modulates excitability of the nociceptive amygdala. 9th FENS Forum of Neuroscience, 2014 年 7 月 5-9 日, Milan.

12. Sugimura YK, Takahashi Y, Watabe AM, Kato F. Optogenetic activation of parabrachio-amygdaloid pathway in the nociceptive amygdala. 第 91 回日本生理学会大会, 2014 年 3 月 16-18 日, 鹿児島.

13. Sugimoto M, Miyazawa Y, Takahashi Y, Kato F. Thermal preference test in rat orofacial formalin model. 第 91 回日本生理学会大会, 2014 年 3 月 16-18 日, 鹿児島.

14. Miyazawa Y, Takahashi Y, Watabe AM, Kato F. Synaptic potentiation in the nociceptive amygdala in orofacial inflammatory pain model of rats. 第 91 回日本生理学会大会, 2014 年 3 月 16-18 日, 鹿児島.

15. Yamamoto S, Takahashi Y, Watabe AM, Tanaka M, Kato F. Noradrenaline dramatically increases GABAergic inputs through beta adrenoceptor activation in medial division of the central nucleus of amygdala. Neuroscience 2013, 2013 年 11 月 9-13 日, San Diego.

16. Kinoshita J, Takahashi Y, Watabe AM, Utsunomiya K, Kato F. Dysfunction of the noradrenergic descending nociception regulatory system in rats with painful diabetic neuropathy. 第 36 回日本神経科学大会, 2013 年 6 月 20-23 日, 京都.

17. Yamamoto S, Takahashi Y, Watabe AM, Tanaka M, Kato F. Noradrenaline Dramatically Increases GABAergic Inputs Through Beta Adrenoceptor Activation in Medial Division of the Central Nucleus of Amygdala. 第 36 回日本神経科学大会, 2013 年 6 月 20-23 日, 京都.

18. Miyazawa Y, Sugimoto M, Takahashi Y,

Kato F. Mechanism underlying synaptic potentiation of nociceptive amygdala in formalin-induced inflammatory pain model of rats. 第36回日本神経科学大会, 2013年6月20-23日, 京都.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：