

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300130

研究課題名(和文) 光操作法と神経路特異的破壊法を活用した新しい行動薬理学による負情動生成機構の解明

研究課題名(英文) Study on neuronal mechanisms for negative emotion using behavioral and optogenetical analyses

研究代表者

南 雅文(MINAMI, Masabumi)

北海道大学・薬学研究科(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) 15,400,000円、(間接経費) 4,620,000円

研究成果の概要(和文)：脳内分界条床核において、神経ペプチドであるCRFとNPYによる神経情報伝達が、痛みによる不快情動生成において相反的な役割を果たすことを明らかにした。また、これら神経ペプチドが分界条床核型神経細胞に選択的に作用し、その活動をCRFは促進し、NPYは抑制することを示した。さらに、組織学的解析により、分界条床核型神経細胞の活動亢進が、腹側被蓋野ドパミン神経の活動を抑制することにより不快情動を惹起する可能性を示し、痛みによる不快情動生成の神経機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Behavioral studies revealed the opposing roles of corticotropin-releasing factor (CRF) and neuropeptide Y (NPY) within the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) in the negative affective component of pain in rats. Electrophysiological studies demonstrated that CRF and NPY selectively act on BNST type II neurons, and activates and suppresses these neurons, respectively. Histochemical analyses showed that most of BNST output neurons projecting to the VTA are GABAergic neurons, which synapse onto VTA GABAergic neurons, suggesting the excitatory drive from the BNST to the VTA dopaminergic neurons via a disinhibition mechanism. Pain-induced release of CRF within the BNST may activate BNST type II neurons, which could suppress VTA-projecting BNST output neurons, thereby attenuating the excitatory drive to the VTA dopaminergic neurons. Pain-induced negative emotion may be due to the suppression of VTA dopaminergic neurons via the processing of pain information in the BNST.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経化学・神経薬理学

キーワード：情動 疼痛 抑うつ 不安 神経ペプチド 行動薬理 神経路特異的 オプトジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

痛みにより惹起される不安、抑うつ、嫌悪などの負情動は、生体警告系としての痛みの生理的役割にとって非常に重要である。しかしながら、これら負情動は、患者の QOL を著しく低下させるだけでなく、特に慢性疼痛では精神疾患・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、加えて、その基盤となる負情動生成機構解明の必要性を示唆しており、痛みの情動的側面の研究推進が不可欠である。

2. 研究の目的

我々の研究により痛みによる負情動生成への関与が示された分界条床核に焦点を当て、受容体作動薬・拮抗薬を用いた従来の薬理学的手法と、チャンネルロドプシンやハロロドプシン遺伝子導入による神経活動の光操作法などを用いた「神経路特異的な行動薬理学研究」により、痛みによる負情動生成にかかわる神経回路とそこで機能する神経伝達物質を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 行動薬理学的解析：雄性 Sprague-Dawley 系ラットを使用した。痛み刺激にはホルマリンの後肢足底内投与を用いた。白と黒の2つの部屋が隣り合う装置を使用し、不快情動を惹起する刺激を与えられた場所を忌避する動物の習性を利用し、刺激を与えた部屋での滞在時間の減少を不快情動生成の指標とする条件付け場所嫌悪性試験 (Conditioned place aversion test ; CPA test) により、痛みの情動的側面における背外側分界条床核 (dIBNST) 内 CRF および NPY 神経情報伝達の役割を検討した。一方、痛みの感覚的側面における役割は、各種侵害受容行動を数値化し評価した。

(2) 電気生理学的解析：雄性 Sprague-Dawley 系ラット (20-50 日齢) から dIBNST を含む脳スライスを作成し、95% O₂ / 5% CO₂ で通気した ACSF で 1 時間以上インキュベーションした後、dIBNST 神経細胞から whole-cell 記録を行った。脱分極性または過分極性の電流を細胞に注入することによって誘導される膜電位応答に基づき、dIBNST 神経細胞を - 型に分類した。膜電位と電流-電位 (I-V) 曲線に対する薬物の影響を調べる実験では TTX (0.5-1 μM) の存在下で、また、発火活動に対する影響を調べる実験ではキヌレン酸 (グルタミン酸受容体アンタゴニスト; 1 μM) と SR95531 (GABA_A 受容体アンタゴニスト; 1 μM) の存在下で記録を行うことで、細胞に対する薬物の直接的な作用を検討した。

(3) 組織学的解析：C57BL/6J マウスを用いた。VTA に投射する BNST 神経細胞がグルタミン酸作動性なのか、あるいは GABA 作動性なのかを検討するために、逆行性神経トレーサーであるコレラ毒素サブユニット B (Cholera toxin subunit B; CTb) を VTA に注入し、2 日後に BNST において in situ ハイブリダイゼーションを行った。次に、BNST に順行性神経トレーサーであるビオチン化デキストランアミン (Biotinylated dextran amine; BDA) を注入し、VTA において順行性に標識された神経終末を検出するとともに、小胞 GABA トランスポーター (Vesicular GABA transporter; VGAT)、チロシン水酸化酵素、あるいは遺伝子導入により発現させた外来性の GABA 神経マーカータンパク質に対する免疫電子顕微鏡観察を行った。

(4) 光遺伝学的解析：改変型チャンネルロドプシン遺伝子を有するウイルスベクターを BNST に局所注入したマウスから VTA を含む脳スライスを作成し、光刺激に対する応答を電気生理学的に解析した。

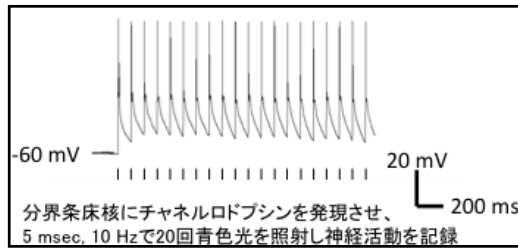
4. 研究成果

(1) 行動薬理学的解析：dIBNST 内 CRF 受容体アンタゴニスト局所投与により、痛みにより惹起される不快情動が抑制された。dIBNST 内 NPY 局所投与により、痛みにより惹起される不快情動が抑制された。dIBNST 内 CRF 局所投与により、痛み刺激非存在下においても不快情動が惹起され、この不快情動惹起は NPY 同時投与により抑制された。dIBNST 内 CRF 誘発不快情動生成に対する NPY の抑制作用は NPY1 および NPY5 受容体選択的アンタゴニスト同時投与により有意に抑制された。以上より、痛みによる不快情動生成において dIBNST 内 CRF 神経情報伝達亢進が重要な役割を果たしていること、および dIBNST 内 NPY 神経情報伝達が不快情動生成を抑制的に調節していることが示唆された。また、dIBNST 内 CRF 誘発不快情動に対する NPY の抑制作用には、NPY1 および NPY 5 受容体サブタイプが重要な役割を果たしていることが示された。

(2) 電気生理学的解析：CRF は、- 型に分類される dIBNST 神経細胞のうち 型神経細胞を選択的に脱分極させ、その発火活動を亢進させた。この作用には、カリウムコンダクタンス減少と非選択的陽イオンコンダクタンス増加が関係していることが示唆された。NPY は、- 型に分類される dIBNST 神経細胞のうち 型神経細胞に選択的に作用し、主に I_h チャンネルを閉じることで過分極させた。NPY 存在下では、CRF による 型神経細胞の脱分極と発火亢進が抑制された。以上の結果は、CRF と NPY が 型 dIBNST 神経細胞の活動を拮抗的に制御することを示しており、これにより痛みによる不快情動を拮抗的に制御している可能性を強く示唆している。

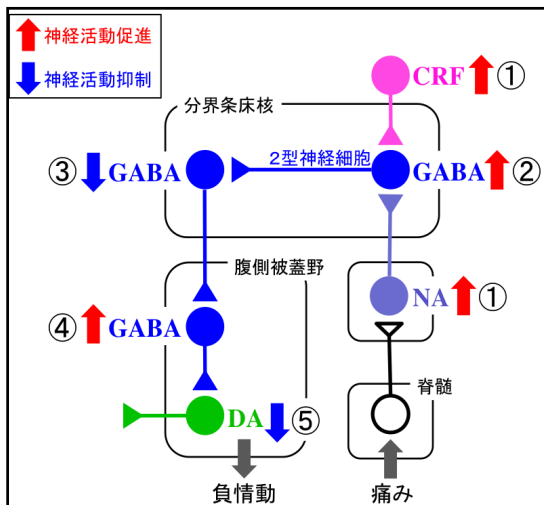
(3) 組織学的解析：VTA に投射する BNST 神経細胞は主に GABA 作動性神経細胞であること、VTA において、BNST 出力線維は主に GABA 作動性神経細胞を標的としていることが示された。これらの結果より、VTA に投射する BNST 神経細胞の活性化により、VTA の GABA 作動性神経細胞が抑制され、ドパミン作動性神経細胞への抑制が解除されるという脱抑制経路によりドパミン神経活動が亢進する可能性が示された。

(4) 光遺伝学的解析：組織学的解析により明らかにされた BNST から VTA に投射する GABA 神経の機能的役割を明らかにするため、改変型チャネルロドプシン遺伝子を有するウイルスベクターを BNST に局所注入したマウスから VTA を含む脳スライスを作成し、光刺激に対する応答の電気生理学的解析に着手していた(下図)。しかしながら、光遺伝



学的解析に関しては、米国の Stuber のグループにより、この GABA 神経活動を光遺伝学的に制御することで場所嫌悪反応や場所嗜好反応を惹起できることが報告された(Nature 2013)ため、以後、本研究では、上記(1)から(3)の行動薬理的、電気生理学的、および組織学的解析に注力した。

(5) 研究成果のまとめ：以上の行動薬理的、電気生理学的、組織学的解析、および我々のこれまでの研究成果、さらには、他の研究グループによる報告などを総合すると、痛みによる不快情動、特に、嫌悪情動生成機構として下図のような神経機構が考えられる。すなわち、痛み刺激により、分界条床核内で CRF



およびノルアドレナリン遊離が増大し、GABA 作動性の分界条床核 型神経細胞が活動亢進すると、分界条床核から腹側被蓋野に投射する GABA 作動性投射神経の活動が抑制され、脱抑制により腹側被蓋野内 GABA 作動性神経が活性化され、その結果、腹側被蓋野ドパミン神経活動が抑制されることで、嫌悪情動が惹起されるものと考えられる。

5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Kudo, T., Konno, K., Uchigashima, M., Yanagawa, Y., Sora, I., Minami, M., Watanabe, M. GABAergic neurons in the ventral tegmental area receive dual GABA/enkephalin-mediated inhibitory inputs from the bed nucleus of the stria terminalis. **Eur. J. Neurosci., in press.** 査読有, DOI: 10.1111/ejn.12503.
2. Naka, T., Ide, S., Nakako, T., Hirata, M., Majima, Y., Deyama, S., Takeda, H., Yoshioka, M., Minami, M. Activation of β -adrenoceptors in the bed nucleus of the stria terminalis induces food intake reduction and anxiety-like behaviors. **Neuropharmacology, 67,** 326-330 (2013) 査読有, DOI: 10.1016/j.neuropharm.2012.11.021.
3. 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,** 5881-5894 (2013) 査読有, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4278-12.2013.
4. 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. **J. Neurosci., 32,** 18035-18046 (2012) 査読有, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4057-12.2012.

〔学会発表〕(計 24 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. 兼子朋之、原大樹、井手聡一郎、金田勝幸、南雅文. 背外側分界条床核における神経ペプチドを介した情報伝達の電気生理学的解析. 第 87 回日本薬理学会年会. 2014/3/19-21. 仙台
3. 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
4. Deyama S, Ide S, Ohno A, Tamano R, Koseki K, Naka T, Maruyama C, 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. Neuroscience2013 (SfN 43rd Annual Meeting). 2013/11/9-13. San Diego
 5. 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
 6. 小関加奈、井手聡一郎、大野篤志、玉野竜太、圓山智嘉史、中誠則、出山諭司、吉岡充弘、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内コルチコトロピン放出因子とニューロペプチド Y 情報伝達の役割. 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
 7. 圓山智嘉史、井手聡一郎、原大樹、大野篤志、玉野竜太、小関加奈、中誠則、出山諭司、金田勝幸、吉岡充弘、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内コルチコトロピン放出因子とニューロペプチド Y 神経情報伝達の相反的役割. 次世代を担う創薬・医療薬理 シンポジウム 2013. 2013/8/31. 熊本
 8. 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 回日本神経化学学会大会・第 23 回日本神経回路学会大会). 2013/6/20-23. 京都
 9. 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
 10. 圓山智嘉史、井手聡一郎、大野篤志、玉野竜太、小関加奈、中誠則、出山諭司、吉岡充弘、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内神経ペプチド作動性情報伝達の役割. 第 86 回日本薬理学会年会. 2013/3/21-23. 福岡
 11. 原大樹、井手聡一郎、大野篤志、玉野竜太、小関加奈、圓山智嘉史、中誠則、金田勝幸、吉岡充弘、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内コルチコトロピン放出因子の役割. 第 22 回日本臨床精神神経薬理学会・第 42 回日本神経精神薬理学会 合同年会. 2012/10/18-20. 宇都宮
 12. 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 (SfN 42nd Annual Meeting). 2012/10/13-17. New Orleans.
 13. 原大樹、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、金田勝幸、吉岡充弘、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内コルチコトロピン放出因子の関与. 第 35 回日本神経科学大会. 2012/9/18-21. 名古屋
 14. 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
 15. 小関加奈、原大樹、井手聡一郎、大野篤志、玉野竜太、圓山智嘉史、中誠則、出山諭司、金田勝幸、吉岡充弘、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内コルチコトロピン放出因子の関与役割. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム. 2012/9/1. 神戸
 16. 小関加奈、中誠則、仲子友和、平田美紀枝、井手聡一郎、吉岡充弘、南雅文. 分界条床核内ノルアドレナリン情報伝達による摂食および不安行動の調節. 第 85 回日本薬理学会年会. 2012/3/14-16. 京都
 17. Ide S, Ohno A, Tamano R, Naka T, Deyama S, Yoshioka M, Minami M. Involvement of corticotropin-releasing factor within the dorsolateral part of the bed nucleus of the stria terminalis in pain-induced aversion. 2nd Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology. 2011/9/23-24. Seoul
 18. 中誠則、井手聡一郎、南雅文. 痛みによる不快情動生成における分界条床核内 CRF 神経情報伝達系の役割. 第 33 回日本疼痛学会. 2011/7/22-23. 松山
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)
- 〔その他〕

ホームページ

<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/yakuri/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南 雅文 (MINAMI, Masabumi)
北海道大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号：20243040

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

金田 勝幸 (KANEDA, Katsuyuki)
北海道大学・大学院薬学研究院・准教授
研究者番号：30421366

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