

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K17992

研究課題名（和文）新生仔期NMDA受容体遮断がラットの時間知覚に及ぼす影響の神経メカニズム解明

研究課題名（英文）Effect of neonatal NMDA receptor chronically blockade on time perception and on its neural mechanism in rats

研究代表者

新倉 怜 (NIIKURA, Ryo)

横浜市立大学・医学研究科・特任助教

研究者番号：70760750

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）：本研究では、統合失調症モデル動物の秒単位の時間感覚の情報処理機能を定量的に評価し、その異常に寄与する神経メカニズムを同定することを目的とした。同動物は、長短の時間弁別において異常を示した一方で、一定時間の計測には異常を示さなかった。予想に反し、時間情報処理に重要と考えられるドーパミン神経系に変化は認められなかった一方で、課題遂行中の内側前頭前野における活動の増加傾向が認められた。これらの結果は、同動物の行動表現型が疾患モデル動物としての妥当性を高めたこと、同動物の時間情報処理異常がドーパミン神経活動を介さない注意機能の変化によって引き起こされた可能性を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

統合失調症は、原因や治療法など未解明な点が多い精神疾患である。この問題の解明のためには、妥当性の高いモデル動物の確立が必要とされる。近年、統合失調症患者の秒単位の時間情報処理（時間知覚）の異常が報告されているが、疾患モデル動物の時間知覚機能は今まで明らかにされていない。本研究は、統合失調症のモデル動物が統合失調症患者と類似した時間知覚機能の異常を示すことを明らかにし、同動物の疾患モデル動物としての有用性を高めた。一方、時間知覚課題遂行中の同動物にドーパミン神経系の異常は認められず、統合失調症の時間知覚異常がドーパミンに依存しないものである可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we evaluated the temporal information processing of neonatal N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) blockade rat, a model rats of schizophrenia, and aimed to identify the neural mechanisms that contribute to its abnormalities. This model rats exhibited abnormal temporal information processing similar to schizophrenia patients in the temporal bisection task, but not time reproduction task. Contrary to expectations, no changes were observed in the dopaminergic system in the animals, while an increment in neural activity in the medial prefrontal cortex during temporal perception was observed. These results suggest that neonatal NMDAR blockade rats were potential animal model of schizophrenia that involve abnormal temporal cognition. Furthermore, temporal information processing abnormalities in this animal, and even in schizophrenia, may be caused by alternation in attentional function, but mediated by something other than the dopaminergic system.

研究分野：行動科学

キーワード：時間知覚 統合失調症 疾患モデル動物 行動実験

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自分や他者の行動、あるいは周囲の環境に対する時間的な予測とその誤差修正は、生体が生存する上で必須の機能である。この機能の中核をなす秒・分単位の比較的短い時間感覚の情報処理を、時間知覚と呼ぶ。

近年、標準化された精神物理学的方法を用いた精神疾患や発達障害の時間知覚機能に関する体系的な調査が盛んに実施されており、これらの患者の時間知覚の異常を示唆する報告が蓄積され始めている。特に統合失調症においては、患者のみならず遺伝的高リスク者における時間知覚の異常が報告されており、時間知覚の異常が疾患の根底をなしている可能性が示唆される。しかしながら、その神経メカニズムは明らかにされていない。

疾患モデル動物は、精神疾患の発症メカニズムや症状の背景となる神経メカニズムを解明する上で有用である。発症率が全人口の約1%でありながら原因や治療法など未解明な点が多い統合失調症においても、様々な疾患モデル動物が開発されている。時間知覚は、ヒトと動物の両方において、よく似た、標準化された精神物理学的手法によって定量的に評価することができる。しかしながら、今まで統合失調症モデル動物の時間知覚機能は評価されておらず、したがって、統合失調症における時間知覚異常の神経メカニズムを解明するための実証データが不足している。

2. 研究の目的

以上のことから、本研究は、統合失調症のモデル動物である新生仔期 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体遮断ラットにおける時間知覚機能を精神物理学的手法によって定量的に評価し、時間知覚異常が認められた場合にはそれに関与する神経回路を同定することを目的とした。新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットの時間知覚異常とそのメカニズムが解明されれば、同動物の疾患モデルとしての妥当性が高まると同時に、統合失調症の治療法開発、発症に対する予防的介入や発症前スクリーニングの一助となると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 新生仔期 NMDA 受容体遮断ラット

被験体にはオスの Wistar ラットを用いた。生後7日から20日までの14日間、1日2回、8時間以上の間隔を開けて NMDA 受容体非競合的遮断薬 MK-801 (0.4 mg/kg) を頸部皮下に投与することで、新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットを作成した。統制群には同量の生理食塩水を投与した。生後28日に離乳し、13週齢になるまで集団飼育した。13週齢以降、餌を報酬としたオペラント条件づけに基づく時間知覚課題を実施するため個別飼育と摂食制限を行った。

(2) 間隔二等分課題

間隔二等分課題は、オペラント条件づけを用いた長短2種類の時間間隔の弁別に基づく時間弁別課題である。本課題においてラットは、まず長短2種類の長さ(4秒・16秒)の音刺激の弁別を学習した。例えば、4秒の音刺激の場合は右のレバーを、16秒の場合は左のレバーを押すと報酬が得られる。学習成立後、プローブ試行が実施される。プローブ試行では、ランダムに提示される4秒と16秒の刺激に混ざって、その中間のプローブ刺激(5.0、6.4、8.0、10.0、12.8秒)がまれに提示される。各プローブ刺激に対してラットが16秒の刺激と対応したレバーを押した確率、すなわち、「長い」刺激と判断した確率を算出することで、ラットの時間知覚機能を推定した。ラットが「長い・短い」を判断する境界点である主観的二等分点(PSE)、上下弁別閾(UT・LT)、判断の敏感さ(変動性)の指標である差閾(DL)、ウェーバー比を評価した。

(3) ピークインターバル課題

ピークインターバル課題は、刺激提示開始から一定時間の経過を計り取る時間産出課題である。本課題では、音刺激提示開始から16秒経過したあとの最初のレバー押し反応に対して報酬が提示され、音刺激が停止する。これを繰り返すことによってラットのレバー押し反応は、16秒付近で頻発ようになる。学習成立後、16秒後に報酬が得られる試行に混ざって、レバーを押しても報酬が得られず刺激も48秒間停止しないプローブ試行がまれに提示される。プローブ試行におけるラットのレバー押し反応をプロットし、反応数のピークを算出することでラットの内的時間と物理的経過時間の一致度を、その分布のばらつきを算出することで変動性を評価した。

(4) 免疫組織化学的検索

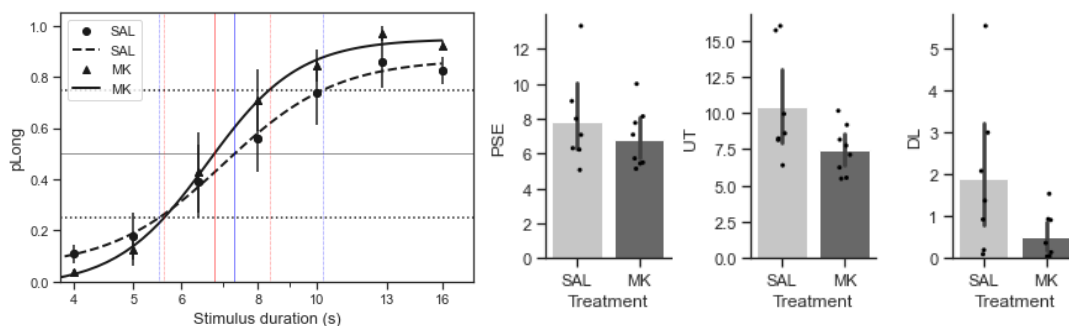
新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットの時間知覚異常の根底にある神経メカニズムを解明するため、時間知覚課題直後のラットの脳を灌流固定後に薄切し、免疫組織化学染色を実施した。時間知覚には線条体における正常なドーパミン(DA)活動が重要だと考えられることから、線条体および

線条体に投射する DA 神経の投射元である黒質における DA 生合成の律速酵素であるチロシンヒドロキシラーゼ (TH) および DA 輸送体 (DAT) の評価を行った。また、もうひとつの主要な DA 起始核である腹側被蓋野 (VTA) とその投射先である内側前頭前野 (mPFC) の TH と DAT も評価した。さらに、時間知覚課題中の神経細胞の活性化を、抗 pCREB 抗体を用いて検出した。

4. 研究成果

(1) 間隔二等分課題

間隔二等分課題において、新生仔期 NMDA 受容体遮断ラット (MK 群) MK 群の平均 PSE は 6.847 秒で、統制群は 7.861 秒であった。精神物理学の理論的 PSE である 8 秒と各群の PSE との 1 サンプルの t-検定を行ったところ、MK 群のみ有意傾向が認められた [$t(7) = -1.904, p = 0.098$]。また、MK 群は統制群よりもより短い時間で確信的に「長い」と判断する傾向にあること [UT: $F(1, 13) = 3.959, p = 0.068$]、判断がより急峻に変化する傾向にあること [DL: $F(1, 13) = 3.865, p = 0.071$] が認められた。

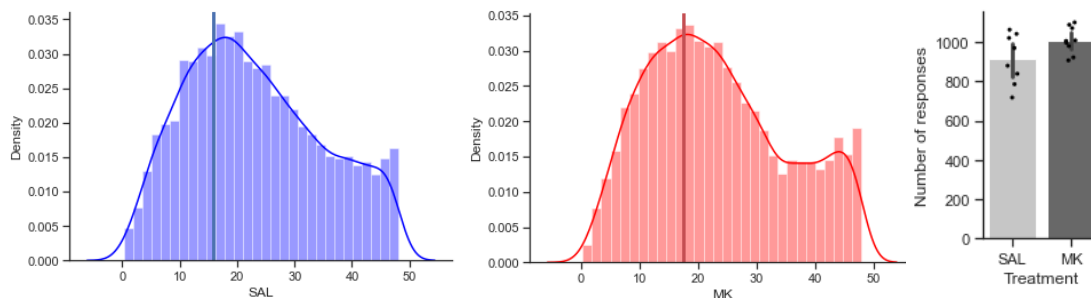


考察：

MK 群は、短めの時間刺激の判別は統制群と変わらない一方、長めの時間刺激を統制群よりも過大評価する傾向、また変動性が変化する傾向が認められた。これらの結果は、統合失調症患者で認められる時間知覚の異常と一致している。以上により、同動物の疾患モデルとしての妥当性がさらに高まった。

(2) ピークインターバル課題

ピークインターバル課題において、MK 群は統制群と変わらないパフォーマンスを示した。MK 群のピークタイム [$F(1, 15) = 0.511, p = 0.486$]、および分布の分散 [$F(1, 15) = 0.464, p = 0.506$] に群間差は認められなかった。標準刺激である 16 秒と両群のピークタイムにも差は認められなかった。一方、レバー押し反応回数は、MK 群においてやや多くなる傾向が認められた [$F(1, 15) = 3.681, p = 0.074$]。



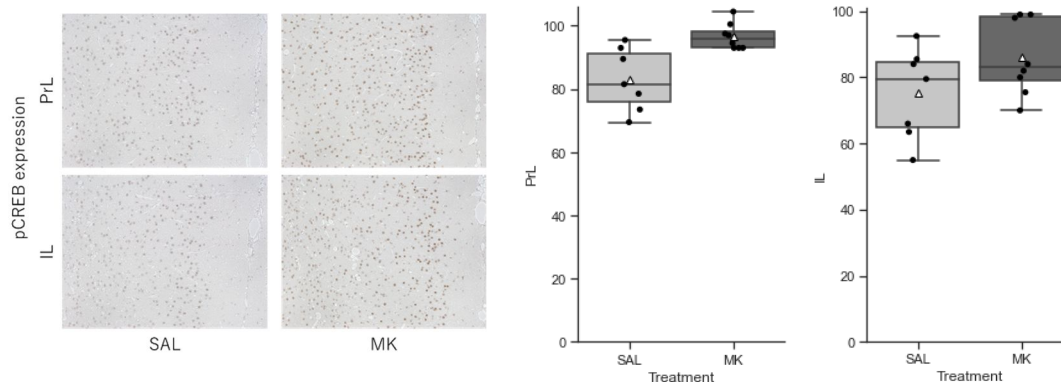
考察：

間隔二等分課題と同様の結果であれば MK 群は統制群よりも短いピークタイムを示すこと、分布のばらつきが小さくなることが予想されたが、予想に反し MK 群はピークインターバル課題において統制群と変わらない時間知覚機能を示した。レバー押し反応回数の多さは、MK 群の過活動傾向を示唆する。間隔二等分課題のような葛藤状態での選択行動はピークインターバル課題のような比較的単純な課題よりも認知的負荷が高い可能性がある。認知的負荷が高くなると時間知覚に異常が認められることは、統合失調症患者の傾向と一致している。

(3) 免疫組織化学的検索

時間知覚には、線条体における正常な DA 活動が重要だと考えられることから、線条体および線条体に投射する DA 神経の投射元である黒質、DA 神経のもう一つの主要な起始核である VTA とその投射先である mPFC における DA 生合成の律速酵素 TH および DA の再取り込みを担う DAT の評価を行った。しかし、予想に反して線条体、黒質、VTA、mPFC のいずれの TH および DAT の発現量にも群間差は認められなかった [$ps > 0.10$]。

MK 群は、間隔二等分課題において統制群よりも時間を過大評価する傾向が認められた。そのため、間隔二等分課題遂行中の神経細胞の活性化を評価する目的で、課題直後のラットの脳を灌流固定後に薄切し、上述の部位における pCREB 発現を評価した。その結果、mPFC を構成する 2 部位の MK 群の pCREB 発現量が、統制群よりも増加している傾向が認められた [PrL: $F(1, 13) = 10.739$, $p = 0.003$; IL: $F(1, 13) = 4.000$, $p = 0.058$]。



考察：

時間知覚パフォーマンスに異常が認められたにも関わらず、MK 群の DA 神経系の TH および DAT の発現量は統制群と差が認められなかった。これらの結果から、本研究で認められる時間知覚の異常は、DA 神経系の変化の結果ではないことが示唆された。時間情報処理の神経生物学的モデルにおいて、DA 系の変化は定期的な神経発火とその同期性の検出を司る時計部におけるペースメーカーの加減速によって説明される。この場合、典型的には、間隔二等分課題の結果として示される S 字曲線は、平行に左右どちらかにシフトする。その一方、変動性の指標は変化しないことが想定される。本研究の間隔二等分課題において認められたような変動性の変化は、計時開始から現在までの経過時間を一時的に管理する累積器、また、累積器の情報と参照すべき時間記憶とを比較する比較器における異常によって引き起こされると考えられる。これらのモジュールは、注意機能や短期・長期記憶の変化の影響を受ける。本研究において pCREB 発現の増加が認められた mPFC は注意機能に重要な役割を果たしていることが知られており、mPFC において DA を介さず、例えばノルアドレナリンやアセチルコリンによって調節される注意機能の変化が間隔二等分課題における時間知覚異常を引き起こした可能性が示唆された。

本研究において、統合失調症の疾患モデル動物である新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットは、課題依存的に時間知覚機能の異常を示した。すなわち、認知的負荷の低いピークインターバル課題においては異常を示さず、認知的負荷が高い間隔二等分課題において異常を示した。当初の予想に反し、同動物の DA 神経系に変化は認められなかった一方、注意機能に重要な役割を果たす mPFC において課題遂行中の活動量増加傾向が認められた。これらの結果から、新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットの行動表現型が疾患モデル動物として表面的妥当性を高めるものであること、同動物における時間知覚異常が DA 神経活動を介さない注意機能の変化によって引き起こされた可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 新倉 怜
2. 発表タイトル 幼若期の麻酔暴露は時間の情報処理に影響を及ぼすのか - 実験動物を用いた時計機能の精神物理学的評価 -
3. 学会等名 麻酔メカニズム研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------