

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08052

研究課題名(和文)統合失調症モデル動物におけるセロトニン5-HT2A受容体イメージング

研究課題名(英文)Serotonin 5-HT2A receptors imaging in a rat model of schizophrenia

研究代表者

浄土 英一 (Jodo, Eiichi)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50211975

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)：18F-altanserinを放射性マーカーとするPET測定を用いて、ヒトに統合失調症様の症状を引き起こす麻薬であるphencyclidine (PCP)をラットに対して亜慢性投与(15回、10 mg/kg/day)することにより、セロトニン5-HT2A受容体の結合能が内側前頭前皮質(mPFC)領域で増加し、この増加の程度とPCP投与後の社会的接触時間との間に有意な負の相関があることを明らかにした。この結果から、mPFCにおける5-HT2A受容体を介したセロトニン伝達の過活性が陰性症状の惹起ないしは増悪に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は統合失調症様の症状をヒトに引き起こす麻薬であるフェンサイクリジン(PCP)慢性投与することにより、脳の前頭前皮質でセロトニン受容体のサブタイプである5-HT2A受容体の密度ないしセロトニンに対する親和性が亢進すること、またこの亢進が陰性症状の指標となっている見知らぬ個体に対する社会的接触時間の低下と関連があることを明らかにした。このことから、統合失調症における陰性症状の発症においても5-HT2A受容体を介した過剰なセロトニン伝達の関与が示唆される。

研究成果の概要(英文)：Phencyclidine (PCP) is a psychotomimetic drug that can induce schizophrenia-like symptoms in healthy individuals. In this study we demonstrated that subchronic administration of PCP (15 times, 10 mg/kg/day) increased 5-HT2A receptor density or affinity in the medial prefrontal cortex using positron emission tomography with a radioactive marker of serotonin 5-HT2A receptors, 18F-altanserin. We further showed that PCP-induced upregulation of 5-HT2A receptors was correlated with decreased social interaction. The current study suggests that hyper-serotonergic transmission via 5-HT2A receptors may contribute to pathogenesis of negative symptoms in schizophrenia.

研究分野：神経生理学

キーワード：5-HT2A受容体 セロトニン受容体 phencyclidine PET 18F-altanserin schizophrenia social interaction rats

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

現在、統合失調症治療薬として臨床で使用されることの多い risperidone や olanzapine はドーパミン受容体だけでなく、セロトニン受容体 (特に 5-HT_{2A}) に対しても比較的高い親和性を有している。一般にドーパミン受容体だけでなくセロトニン受容体にも作用する薬剤 (SDA) の方が抗精神病薬として高い治療効果を有している。しかし、なぜセロトニン受容体機能を調節することにより統合失調症の症状改善が生じるのかについては、ほとんど解明されていない。5-HT_{2A} 受容体はシナプス後部だけでなくシナプス前部にも存在し、グルタミン酸作動性ニューロンの神経終末部からのグルタミン酸放出を促進性に制御していることが知られている^[1]。統合失調症患者においても、過剰なグルタミン酸放出等のグルタミン酸投射系の異常^[2]が報告されている。したがって、統合失調症におけるセロトニン伝達の異常はグルタミン酸伝達の異常と密接に関連している可能性がある。phencyclidine (PCP) は主に NMDA 型グルタミン酸受容体拮抗薬としての薬理作用を有し、統合失調症に極めて類似した症状を引き起こす麻薬として知られているが、我々のこれまでの研究で、海馬から前頭前皮質への AMPA 型グルタミン酸受容体を介した過剰なグルタミン酸入力が PCP による行動異常発現に重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。

2. 研究の目的

本研究ではセロトニン投射系、特に 5-HT_{2A} 受容体を介したセロトニン伝達の異常と統合失調症モデル動物における行動異常発現との関連性を全脳レベルで探索するため、5-HT_{2A} 受容体の選択的放射性マーカーである ¹⁸F-altanserin を使用した positron emission tomography (PET) 計測を実施する。統合失調症の疾患モデルとして PCP を亜慢性的に投与されたラットを用い、PCP 投与ラットにおける 5-HT_{2A} 受容体結合能 (binding potential) 変化と行動異常との関連を検討する。

3. 研究の方法

被検体: 雄の Sprague Dawley (SD)ラット 40匹 (300-400g)。実験期間中、動物は温度・湿度が一定に保たれた福島県立医科大学先端臨床研究センター前臨床研究施設の実験動物飼育室内で、12時間明暗サイクル、餌および水が自由摂取可能な環境で飼育された。本実験計画は福島県立医科大学実験動物委員会で承認を受けている。

実験手続き:

1) 薬物投与

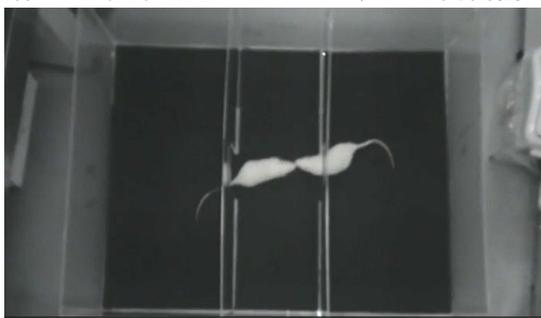
実験開始前にラットは PCP を投与される群 (PCP 群) と生理食塩水を投与される群 (SAL 群) の2群に分けられた。PCP 群のラットは1日1回、イソフルラン麻酔下で 10 mg/kg の PCP を、SAL 群は 1 ml/kg の生理食塩水を 15 回腹腔内投与された。PCP は生理食塩水に溶解させたものを使用 (10 mg/ml)。

2) PET 測定

薬物投与の前日と薬物投与最終日から3日後の計2回、イソフルラン麻酔下で PET 測定を実施。PET 測定の前に X 線 CT (computer tomography) 撮影を実施。PET 測定の直前にセロトニン 5-HT_{2A} 受容体の選択的放射性マーカーである ¹⁸F-altanserin (25MBq/0.4ml) を尾静脈から急速注入し、それと同時に 70 分間にわたりダイナミック PET 計測を実施した。

3) 行動学的検査課題

PET 測定の約4時間前に社会性評価課題 (sociability test: SBT) と社会的相互関係性評価課題 (social interaction test: SIT) を実施。SBT 課題および SIT 課題はいずれも出入り口を有する3つの領域に仕切られたアクリル製実験箱 (80 × 120 × 40 cm; 図1参照) 内にラットを入れて、薄暗く照明された部屋で実施された。SBT 課題では最初に、3つに仕切られた領域の両端 (左右) いずれかに側面が格子になっている円筒形のカゴ (内径 15.5cm、高さ 25 cm) を置き、その反対側の端の領域に測定対象のラット (測定ラット) を入れ、10 分間実験箱内を自由に探索させ実験環境に馴致させた。次に一旦測定ラットを実験箱外へ出した後、円筒カゴに測定対象のラットにとって新規なラットを入れ、再度、測定ラットを円筒カゴと反対側の領域に入れ、10 分間自由に探索させる。SIT 課題では最初にかごが取り除かれた実験箱の左右端いずれかの領域に測定ラットを入れ、環境馴致のため 10 分間実験箱内を自由に探索させた。次に測定ラットにとって新規なラットを測定ラットが入れられた反対側の領域に入れ、環境順地のため実験箱内を 10 分間自由に探索させた。測定ラットを最初に入れられた領域に戻し、その反対側の領域に新規なラットを入れ、10 分間自由に行動させた。いずれの課題においてもラットを実験箱



内に入れる前に 70% エタノールを含浸させた紙タオルで実験箱内の床および側面を拭いた。課題中のラットの行動はデジタルビデオカメラで撮影され、コンピュータを介して外部記憶装置 (SSD) に保存された。

図 1. 実験箱を真上から撮影した写真

出入り口のある2つの敷居により3つの領域にしきられている。

4) PET データ画像解析

PET 画像データは SPM12 の Small animal molecular imaging toolbox (samit) を用いて、ラットの標準 MRI 脳画像 (Schwarz et al., 2006) 上に affine 写像した。binding potential (BPND) の算出は 2 分ごとの PET 画像データを使用した。Reference-tissue model (Lammertsma and Hume, 1996) 法にしたがって、比較的 5-HT_{2A} 受容体密度が小さい小脳を参照領域として BPND を求めようとしたが、小脳の PET 測定値の time activity curve (TAC) と皮質等の他部位 TAC との違いが顕著ではなかった。そこで小脳の各 pixel における TAC に対して移動平均処理をした後、独立成分分析 (10 成分) をかけ、18F-altanserin を投与後 15 分以内にピークに達する成分を参照領域の TAC として Reference-tissue model 法にしたがい、非線形最小二乗法により BPND を pixel 単位 (0.398 × 0.398 × 0.796 mm) で求めた。の PET 画像データの数値解析はすべて MATLAB (2021a) を用いて計算した。特定の脳領域ごとの平均 BPND 値は samit (Small animal molecular imaging toolbox) を使用して算出した。

5) 行動データの解析

SBT 課題の録画データは python を用いたカスタムスクリプトにより自動解析され、測定ラットの鼻先の移動軌跡・移動距離、特定領域の滞在時間等の値を算出した。特定領域の滞在時間は測定ラットが最初に入れられた領域 (始発領域)、新規ラットが入れられたカゴが置かれている領域 (新規ラット領域)、前 2 領域に挟まれた真ん中の領域 (中央領域)、新規ラットが入れられたカゴから 3 cm 以内の領域 (接触領域) の 4 つの領域に対して測定した。

SIT 課題の録画データはコンピュータディスプレイ上で再生され、データと被検体との対応関係を知らない者により目視で測定ラットが新規ラットの身体に鼻先を接触させている時間を social interaction time (SI 時間) として測定した。

なお、統計学的解析においては $p < 0.05$ を統計学的有意とした。数値データは平均値 ± 標準誤差の形式で記載した。複数のデータ対を比較する場合は Bonferroni 法により p 値を修正した。

4. 研究成果

PCP 群 12 匹、SAL 群 12 匹に対して PET 測定を実施したが、PCP 群で 1 匹、SAL 群で 2 匹が測定中に死亡し、PCP 群で 1 匹、SAL 群で 1 匹に対して 18F-altanserin の尾静脈急速投与が失敗したためデータ処理対象から除外した。また、PCP 群の 2 匹で PCP 投与後の PET 測定が正常に実施されなかったため、これらもデータ処理対象から除外した。よって、PCP 群 8 匹、SAL 群 9 匹のデータを以下の統計学的分析対象とした。

(1) PCP の亜慢性投与が社会行動におよぼす効果

SDT 課題では PCP 群と SAL 群との間に薬物投与前・後のいずれにおいても、始発領域、中央領域、新規ラット領域、接触領域においても統計学的に有意な滞在時間の差異は認められなかった。10 分間の移動距離は薬物投与前に両群間に有意な差異はなかったが、15 回の薬物投与後に PCP 群で SAL 群に比較して有意に長くなっていた (投与前 PCP 群 36129 ± 3999 cm, SAL 群 30235 ± 2219 cm, 投与後 PCP 群 37837 ± 2147 cm, SAL 群 26958 ± 2825 cm; $t = -4.596$, $d.f. = 15$, $p < 0.02$)。SAL 群で薬物投与後に移動距離の低下傾向が認められることから、PCP 群で薬物投与後に移動距離が増加したというよりは PCP 群は実験環境への順応が SAL 群に比較して弱く、このため新規ラットが入れられたカゴ周辺領域外への探索行動が多くなったためと考えられる (図 2 参照)。

SIT 課題においては PCP 群の SI 時間が PCP 投与後、SAL 群と比較して有意に短くなっていた (投与前 PCP 群 99 ± 18 秒, SAL 群 122 ± 11 秒, 投与後 PCP 群 51 ± 5 秒, SAL 群 98 ± 9 秒; $t = -4.595$, $d.f. = 15$, $p < 0.001$)。

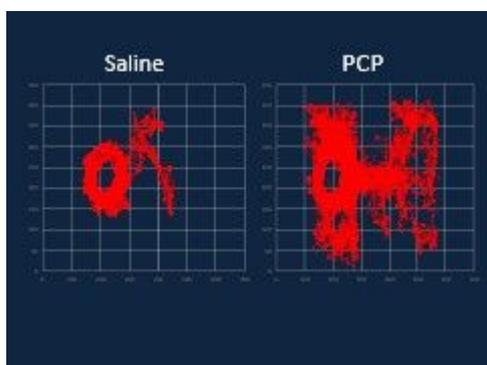


図 2. 薬物投与後の SBT 課題における移動軌跡の典型例 Saline は生理食塩水投与群のラット、PCP は PCP 投与群のラット。

(2) PCP の亜慢性投与が 5-HT_{2A} 受容体 BPND 値におよぼす効果

脳全体の BPND 値分布の全データ総加算平均したものを図 3 に示す。脳全体の平均 BPND 値は PCP 群と SAL 群で薬物投与前後のいずれにおいても有意な変化は認められなかった。

内側前頭前皮質 (mPFC) では薬物の亜慢性投与の効果に群により有意に異なり ($F(1,15) = 4.69$, $p < 0.047$)、SAL 群では投与前後で BPND 値に有意な変化が認められないのに対して、PCP 群では投与後に BPND 値が有意に大きくなっていた (投与前 PCP 群 1.45 ± 0.56 , SAL 群 4.70 ± 1.48 , 投与後 PCP 群 6.34 ± 1.57 , SAL 群 4.04 ± 1.39)。内嗅皮質、眼窩前頭皮質、帯状皮質、尾状核、側坐核、海馬、扁桃核、視床背内側核においても薬物投与前、投与後のいずれにおいても有意な群間差は認められなかった。

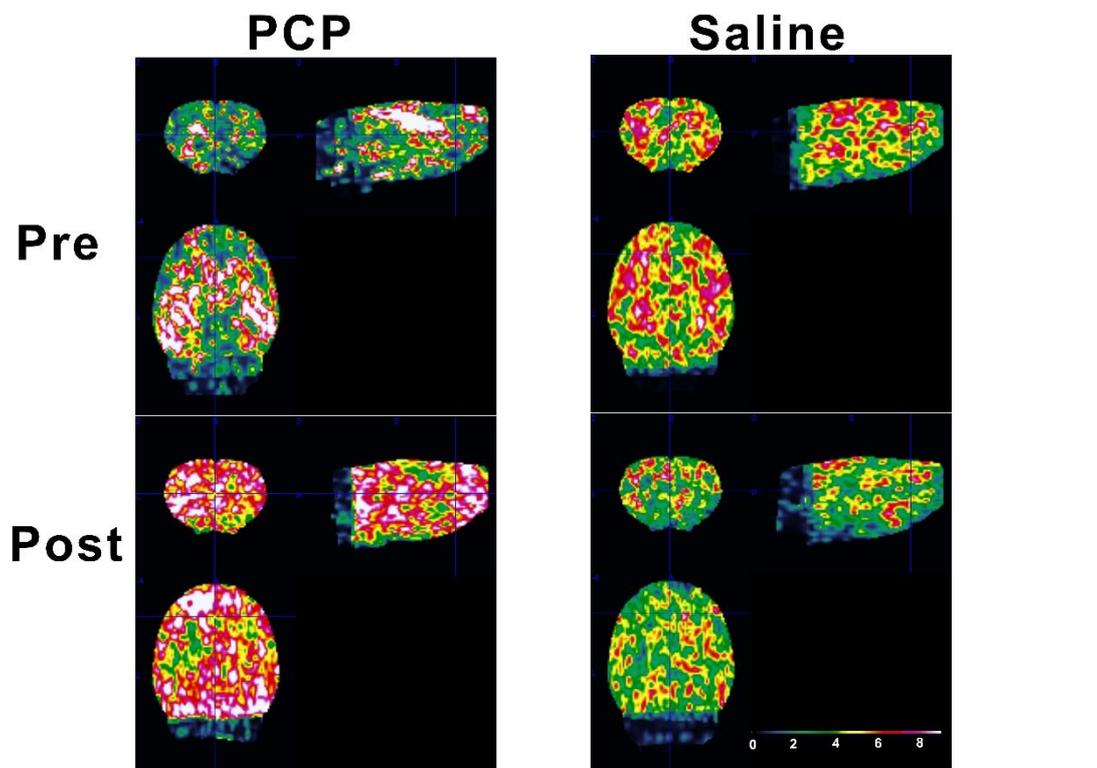


図3. BPND 値の総加算平均脳内分布 PCP 投与群(PCP)の薬物投与前後、生理食塩水投与群(Saline)の生食投与前後でのmPFCを含む冠状断面(各図の左上)、矢状断面、水平断面。

(3)mPFCの5-HT_{2A}受容体BPND値と社会的行動との関連

SBT課題における移動距離とmPFC領域における5-HT_{2A}受容体のBPND値との関連を検討するため、BPND値および移動距離それぞれの薬物投与前に対する薬物投与後の比率をもとめ、両者のPearsonの積率相関係数を計算した。その結果、薬物投与によるBPND値の変化率と移動距離の変化率との間に有意な相関は認められなかった($r = -0.14$)。

SIT課題においては、薬物投与前の社会的接触(SI)時間が0のラットがいて投与前に対する投与後の比率を計算できないので、SI時間の投与前後での差分(投与後SI時間 - 投与前SI時間)を求め、これとmPFCの5-HT_{2A}受容体BPND値とのPearson積率相関係数を計算した。mPFCの5-HT_{2A}受容体BPND値とSI時間の投与前後差分との間に有意な負の相関が認められた($r = -0.637, p > 0.006$)。

【考察】

本研究ではヒトに統合失調症様の症状を引き起こすPCPをラットに対して亜慢性的に投与し、脳内5-HT_{2A}受容体結合能変化の有無および結合能変化と行動異常発現との関連について検討した。実験結果から、mPFC領域でPCPの亜慢性投与後にBPND値が有意に増加し、その増加の程度とSIT課題におけるSI時間のPCP投与前後での差分に有意な負の相関が認められた。

(1)PCPの亜慢性投与による5-HT_{2A}受容体BPND値の増加

これまでPCPの亜慢性投与により脳内5-HT_{2A}受容体のBPND値が変化することを報告した先行研究はなく、逆にPCPの亜慢性投与により5-HT_{2A}受容体BPND値に有意な変化が生じないという報告がなされている[3]。しかし、この報告はラットではなくマウスを被検体としており、また、PCPの投与回数(10回)も異なっている。PCP亜慢性投与による行動異常の発現も確認されていないため、本研究と直接的な比較は困難である。従来の研究では、PCPの投与回数はそのほとんどが10回以下であり、本研究で実施した15回投与を採用している先行研究は極めて少ない。PCPの投与回数を15回にしたことが、本研究でmPFCにおける5-HT_{2A}受容体結合能変化を検知できた要因と考えられる。もう一つ考えられる要因として、BPND値を計算する際に参照される小脳SUV(standardized uptake value)値のTAC計算法の違いがある。従来18F-altanserinを放射性マーカーとしたPET研究では小脳が脳内の他領域より5-HT_{2A}受容体分布密度が低いことから[4]、小脳におけるTACをそのまま参照してBPND値を計算していた。しかし小脳のPurkinje細胞やGolgi細胞に5-HT_{2A}受容体が存在することが報告[5]されており、本研究でも小脳でのTACと他領域のTACとの差異が顕著ではなかった。そこで本研究では独立成分解析を用いて小脳のTACデータから非特異的結合に関連する成分を抽出し、これを参照してBPND値を計算した。この計算方法の違いが本研究結果と従来研究結果との間に矛盾を生じさせる要因となっている可能性がある。

PCPの亜慢性投与でmPFCの5-HT_{2A}受容体の結合能が増加するという事は、5-HT_{2A}受容体密度の増加とリガンドに対する受容体親和性の亢進のいずれかあるいはその両方が生じている可能性を示唆する。5-HT_{2A}受容体は前頭前皮質では前シナプス部にも後シナプス部にも存在することが知られており、いずれもシナプス後部のニューロンに対して興奮性を高める作用がある。したがって、5-

HT2A 受容体の結合能が増加するという事は、ニューロンの興奮性を過剰に亢進し自発発火頻度を上昇させ、結果として他ニューロンからの興奮性入力に対する SN 比を低下させ、認知行動異常を生じさせる可能性がある。また、このような興奮状態の持続は樹状突起棘部脱落等の細胞構造変化を引き起こす要因にもなりうる。統合失調症患者の死後脳の組織学的研究においても、前頭前皮質における 5-HT2A 受容体の up-regulation が報告されており[6]、統合失調症においても前頭前皮質における 5-HT2A 受容体結合能の亢進は病態の形成ないし進行に重要な役割を果たしている可能性を示唆する。

(2) mPFC の 5-HT2A 受容体 BPND 値と社会的行動異常との関連

本研究で PCP 亜慢性投与が行動におよぼす影響として、SBT 課題における移動距離の増大、SIT 課題における SI 時間の短縮の 2 つが検出された。これらの行動変化と mPFC の 5-HT2A 受容体結合能変化との関連を検討するため、両者の相関を計算した。SBT 課題の移動距離変化と 5-HT2A 受容体 BPND 値変化との間に有意な相関は認められなかったが、SIT 課題の SI 時間変化と BPND 値変化との間に有意な負の相関が認められた。この負相関は mPFC の 5-HT2A 受容体結合能が大きくなるほど SI 時間が短縮する、つまり他ラットとの社会的交流が少なくなることを示唆する。移動距離は主に陽性症状を反映し、SI 時間は主に陰性症状を反映する[7]と考えられているので、mPFC のセロトニン 5-HT2A 受容体結合能の増加は陰性症状の発現ないし増悪に関与している可能性がある。5-HT2A 受容体を介したセロトニン伝達の異常が陰性症状発現に関与する具体的なメカニズムに関しては今後の研究で明らかにしたい。

【結論】

18F-altanserin を放射性マーカーとする PET 測定を用いて、ヒトに統合失調症様の症状を引き起こす PCP の亜慢性投与によりセロトニン 5-HT2A 受容体の結合能が mPFC 領域で増加し、この増加の程度と PCP 投与後の社会的接触時間との間に有意な負の相関があることを明らかにした。この結果から、mPFC における 5-HT2A 受容体を介したセロトニン伝達の過活性が陰性症状の惹起ないしは増悪に関与している可能性が示唆された。

【参考文献】

- [1] Martin-Ruiz, R., et al., Journal of Neuroscience, 2001, 24: 9856-9866.
- [2] Nagai, T., et al., Scientific reports, 2017, 7: 2258.
- [3] Santini et al., Journal of Neuroscience Research, 2013, 91: 634-641.
- [4] Brunet et al., Brain Research, 1995, 676: 157-168.
- [5] Oostland et al., Cerebellum, 2014, 13: 491-500.
- [6] Muguruza et al., 2013, European Neuropsychopharmacology, 23: 852-864.
- [7] Castellani and Adams, Neuropharmacology, 1981, 20: 371-374.

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 Eiichi Jodo, Tomoaki Nakazono, Kazumi Takahashi, Yoshiaki Suzuki, Kenyo Hoshino, Naoyuki Ukon, Songji Zhao, Satoshi Eifuku |
| 2. 発表標題 Imaging of 5-HT2A receptors in rats with semi-chronic administration of phencyclidine |
| 3. 学会等名 Neuro2022（第45回日本神経科学学会） |
| 4. 発表年 2022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 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 鈴木 喜明 (Suzuki Yoshiaki) (80423797) | 福島県立医科大学・医学部・博士研究員 (21601) | |

| | 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 | 中園 智晶 (Nakazono Tomoaki) | | |
| 研究協力者 | 高橋 和巳 (Takahashi Kazumi) | | |
| 研究協力者 | 右近 直之 (Ukon Naoyuki) | | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 | 趙 松吉 (Zhao Songji) | | |

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 |
|---------|---------|
| | |