

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06128・19K21244

研究課題名（和文）腹側線条体の活性酸素シグナルを介した強迫性障害の病態メカニズムの解明

研究課題名（英文）Pathophysiological roles of ventral striatal ROS signaling in obsessive compulsive disorder

研究代表者

浅岡 希美（Asaoka, Nozomi）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：90826091

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：強迫性障害（OCD）は繰り返す強迫観念と強迫行為を主徴とする精神疾患である。OCDの薬物治療は第一選択薬の選択的セロトニン再取り込み阻害薬（SSRI）が主に用いられるが、治療奏効率はOCD症状の種類により異なることが臨床上報告されている。本研究では新規のOCDモデルマウスを作製し、妥当性を評価した上で、そのモデルを用いてSSRI抵抗性の症状にも改善作用を示す治療標的を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

OCDの創薬研究は、アンメットニーズの存在は認識されているものの、アプローチの方策に乏しいために難航している。本研究では、治療薬探索に適した簡便で妥当性を備えた新規のモデル動物の作製・評価を行ったのみならず、既存の治療薬であるSSRIに抵抗性の強迫性障害様行動に対しても改善作用を示す、新規の治療標的を見出すことに成功した。この成果はOCDや強迫性が問題となる類似精神疾患の新規治療法開発に繋がることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Obsessive-compulsive disorder (OCD) is a neuropsychiatric disorder characterized by the repeated rise of concerns (obsessions) and repetitive unwanted behavior (compulsions). Although selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) is the first-choice drug, response rates to SSRI treatment vary between symptom dimensions. In this study, we found a novel therapeutic target for SSRI-resistant OCD symptoms by using a newly validated OCD model mice.

研究分野：神経薬理学

キーワード：強迫性障害 線条体 眼窩前頭皮質

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

強迫性障害は強迫観念と強迫行為を主徴とする精神疾患であり、抗うつ薬である選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)の長期・高用量投与が一般的な薬物治療である。しかし、有効性を示さない場合も多いため、強迫性障害の病態に立脚した治療法の開発は喫緊の課題である。

臨床知見の蓄積により、強迫性障害は気分障害とは異なる疾患として再認識されつつある。この新たな病態理解を支える病態生理学的基盤として、意思決定に關与する眼窩前頭皮質(OFC)やその投射先である線条体の機能異常が提唱されている。一方、ドパミンやグルタミン酸といった神経伝達物質の異常は以前より報告されているものの、OFC や線条体の機能異常との関連性は不明であった。こうした断片的な知見を裏付け、関連性を検証することは病態の統合的理解につながり、新規治療法開発にも重要となる。しかし、強迫性障害の基礎研究は臨床研究と比較して進んでおらず、「強迫性障害の病態・治療に關与する詳細な神経科学的メカニズム」は未解明であった。

### 2. 研究の目的

強迫性障害の基礎研究において、臨床所見との相関性のある、「妥当性の高い」モデル動物の作製ははまだ道半ばであり、特に薬効評価に使用可能な予測妥当性を備えたモデルは数少ない状態であった。そこで、本研究では第一に、薬効評価可能な新規強迫性障害モデル動物の作製とその妥当性の評価を行うこととした。

次に、作製したモデル動物を用い、強迫性障害様の行動変容に關与する神経メカニズムの解明を行った。強迫性障害の患者の脳画像解析では詳細な病態メカニズムの検証は難しい。しかし、患者で活動亢進が認められる線条体には、皮質からの情報を「正」に伝達する直接路と「負」に伝達する間接路という異なる経路に属する神経細胞種が混在するため、これらの細胞種選択的な機能変化の検討が必須である。そこで本研究では、線条体の神経細胞種特異的な機能変化に着目した強迫性障害の病態形成メカニズムの解明を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 強迫性障害モデルマウスの作製

モデル作製には、6-12 週齢の雄性 C57BL6/J 系マウスを使用した。ドパミン D<sub>2/3</sub> 受容体アゴニストである quinpirole (QNP; 1 mg/kg)を 1 日 1 回、腹腔内投与し、8 回以上投与したものを強迫性障害モデルマウスとみなした。

#### (2) 強迫性障害様行動の評価

強迫性障害様の行動は、以下の 2 点について評価を行った。

##### 自発的反復行動の評価

マウスは 1-2 匹ごとにケージに入れて飼育を行い、飼育中のケージをホームケージとして十分に馴化を行った。QNP を腹腔内投与したのち、ホームケージに戻し、投与 20 分から 30 分後の自発的な行動をビデオ記録した。本モデルマウスにおいては特徴的な反復行動に chewing 行動が観察されたため、解析には 10 分間の解析中に chewing 行動を行った時間を用いた。また、chewing 行動は以下の定義に従って判別した。

- 前足や口でケージ内の床材や同居マウスの毛をつかみ、繰り返し引き延ばしたり梳いたりするような動作。
- 巣づくりや同居マウスへの攻撃のような明らかな目的を持った行動ではない。
- 穴掘り行動 (digging) や毛づくろい行動 (grooming) は chewing とは区別し、別個に評価を行った

##### 思考柔軟性の評価

マウスは集団で飼育し、試験開始の 1 週間以上前から正常体重の 80-90%の体重を維持するよう接触制限を行った。実験には T 字型迷路を使用し、報酬提示による左右弁別学習を行った。最初の 6-7 日間は、QNP の投与を行わず左右弁別を学習させ、一定以上の正答率に達したマウスのみを次のステップに使用した。次のステップでは、同様の左右弁別学習を続けるが、試験の開始 20 分前に QNP の投与を行った。この試験を 8 日間続け、なお一定値以上の正答率を維持したマウスを最終のステップへと用いた。最終ステップでは、報酬の位置を左右反転させる逆転学習課題を 4 日間かけて行った。本ステップでも試験の開始 20 分前に QNP の投与を行った。解析には各ステップにおける正答率の変動を用い、逆転学習試験時の正答率の上昇抑制を思考柔軟性の低下として評価した。

#### (3) 電気生理学的検討

Quinpirole または溶媒(生理食塩水)の 8 回目の投与が終了した翌日に記録を行った、マ

ウスはイソフルランによる深麻酔下で断頭し、脳を摘出した。ビブラトームを用いて、OFC または線条体を含む厚さ 200  $\mu\text{m}$  の冠状切片を作製し、酸素ガスを通気した人工脳脊髄液 (ACSF)中に安置した。切片は作製後、1 - 4 時間以内に使用した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 新規強迫性障害モデルマウスの作製・評価

まず、ドパミン  $D_{2/3}$  受容体アゴニスト(Quinpirole (QNP), 1 mg/kg)の連投による強迫性障害様の行動異常の評価を行った。既存の強迫性障害モデル動物の多くは、自発的な反復行動を指標としている。本モデルマウスにおいても、QNP の投与回数が増加に伴いホームケージにおける chewing 行動の増加が認められた。また、強迫性障害における強迫行動への固執は、思考柔軟性の低下を反映しているとも考えられている。そこで思考柔軟性の評価のため、T 字迷路を用いた左右弁別試験を行った。具体的には、左右弁別学習の成立後、逆転学習効率の変化を評価したところ、モデルマウスにおいて逆転学習の著しい障害が認められた。こうした反復行動の増加と、思考柔軟性の低下を強迫性障害様の行動異常として評価することとした。

また、症状の類似性だけでなく、患者で報告されている神経機能異常がモデルにおいても再現されていることを確認するため、患者において活動性の亢進が認められている眼窩前頭皮質における電気生理学的検討も行った。神経活動性の評価として、current injection 法による発火数の評価を行ったところ、モデルマウス由来の眼窩前頭皮質神経では有意な発火頻度の増加が認められた。また、この現象は、眼窩前頭皮質の錐体神経への興奮性入力増加に起因することが明らかとなり、神経機能上の類似性、つまり、構成妥当性が確認された。

SSRI は临床上、強迫性障害に適応のある唯一の治療薬であるが、奏効率は患者の症状の種類によって異なることが知られている。そこで、本モデルマウスの 2 つの強迫性障害様の行動異常、および眼窩前頭皮質の活動性亢進に対する SSRI 長期投与(citalopram, 24 mg/kg/day, 28 days)の効果を検討したところ、逆転学習の障害と眼窩前頭皮質の活動性亢進に対しては改善が認められたが、繰り返し行動に対しては改善作用が認められなかった。こうした、症状による SSRI の治療効率の差は臨床でも報告されていることから、このモデルマウスは治療薬への応答性も臨床上の知見と類似したものであると考えられた。

##### (2) 強迫性障害モデルマウスを用いた新規治療標的探索

上記(1)の検討より、quinpirole の反復投与によるモデルマウスは、症状、神経機能異常、治療応答性の 3 つの面で臨床治験との類似性を確認できたため、続いて、本モデルマウスを用いて SSRI 抵抗性の症状に対しても効果的な治療標的の探索を行った。上記(1)の検討から、モデルマウスの強迫性障害様行動異常のうち、思考柔軟性の障害は SSRI の長期投与によって改善したが、繰り返し行動に対しては無効であった。そこで、繰り返し行動を SSRI 抵抗性の強迫性障害様行動とみなし、その発現メカニズム・治療標的を検討した。眼窩前頭皮質の活動性亢進は SSRI 投与によって改善するため、眼窩前頭皮質神経の投射先であり、临床上、眼窩前頭皮質との機能的結合性が亢進している線条体に着目し解析を行った。線条体は、様々な皮質領域から投射を受けているが、皮質の領域ごとに、投射する線条体内の亜領域がことなることが知られている。そこで、OFC が投射する線条体内の領域を明らかとするため、蛍光タンパク質を発現するアデノ随伴ウイルスベクターにより OFC 神経細胞を標識したところ、線条体の亜領域の中でも、中央線条体(CS)において強い投射関係が確認できた。そこで、CS における  $D_2$  受容体刺激やその下流のシグナルがモデルマウスの繰り返し行動に関与するか否かを検討するため、これらの阻害薬を CS に局所投与した条件で繰り返し行動の評価を行った。すると、 $D_2$  受容体の遮断(Raclopride, 1  $\mu\text{g}$ )や PKA の阻害(PD98059, 1  $\mu\text{g}$ )によって、繰り返し行動が消失することを見出した。

また、線条体において、 $D_2$  受容体は間接路に投射する中型有棘細胞(iMSN)に発現している。繰り返し行動が PKA の阻害によって抑制されたことを受け、同じく iMSN の PKA 活性化に関与するアデノシン  $A_{2A}$  受容体の刺激薬(CGS21680A, 0.3 ng)を CS 内に投与したところ、モデルマウスの繰り返し行動が悪化することが明らかとなった。

以上の結果を踏まえると、 $A_{2A}$  受容体の遮断薬はモデルマウスの繰り返し行動を抑制しうると考えられる。そこで、 $A_{2A}$  受容体の遮断薬であるイストラデフィリン(3 mg/kg)をモデルマウスの腹腔内に投与し、強迫性障害様を評価したところ、繰り返し行動と逆転学習障害の両方に対して改善作用が認められた。さらに、モデルマウスの線条体では、iMSN 選択的に興奮性シナプスの増強が起こっていたが、イストラデフィリンはこうした神経機能上の異常に対しても改善作用を示した。イストラデフィリンは、本邦において、パーキンソン病患者へ臨床使用されていることから、今回得られた知見は、イストラデフィリンが強迫性障害治療への応用可能性を示唆するものであると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Asaoka Nozomi, Nishitani Naoya, Kinoshita Haruko, Nagai Yuma, Hatakama Hikari, Nagayasu Kazuki, Shirakawa Hisashi, Nakagawa Takayuki, Kaneko Shuji	4. 巻 6
2. 論文標題 An Adenosine A2A Receptor Antagonist Improves Multiple Symptoms of Repeated Quinpirole-Induced Psychosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eneuro	6. 最初と最後の頁 0366 ~ 18. 2019
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/ENEURO.0366-18.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Nozomi Asaoka, Naoya Nishitani, Haruko Kinoshita, Yuma Nagai, Kazuki Nagayasu, Hisashi Shirakawa, Takayuki Nakagawa, Shuji Kaneko
2. 発表標題 An adenosine A2A receptor antagonist, istradefylline, improves multiple symptoms reflecting obsessive-compulsive disorder in a novel murine model
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nozomi Asaoka, Naoya Nishitani, Haruko Kinoshita, Yuma Nagai, Hikari Hatakama, Kazuki Nagayasu, Hisashi Shirakawa, Takayuki Nakagawa, Chihiro Yabe-Nishimura, Shuji Kaneko
2. 発表標題 An adenosine A2A receptor antagonist improves multiple symptoms reflecting obsessive-compulsive disorder
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nozomi Asaoka, Naoya Nishitani, Haruko Kinoshita, Yuma Nagai, Hikari Hatakama, Kazuki Nagayasu, Hisashi Shirakawa, Takayuki Nakagawa, Chihiro Yabe-Nishimura, Shuji Kaneko
2. 発表標題 Blockade of adenosine A2A receptor improves repeated dopamine D2 receptor stimulation-induced multiple abnormalities reflecting obsessive-compulsive disorder
3. 学会等名 Neuro2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nozomi Asaoka, Chihiro Yabe-Nishimura, Shuji Kaneko
2. 発表標題 Developing novel treatment strategies for OCD by utilizing rodent models: a therapeutic potential of adenosine A2A receptor antagonism
3. 学会等名 The 6th Asian College of Neuropsychopharmacology ( 国際学会 )
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nozomi Asaoka, Naoya Nishitani, Haruko Kinoshita, Yuma Nagai, Hikari Hatakama, Kazuki Nagayasu, Hisashi Shirakawa, Takayuki Nakagawa, Chihiro Yabe-Nishimura, Shuji Kaneko
2. 発表標題 An adenosine A2A receptor antagonist, istradefylline, improves multiple symptoms reflecting obsessive-compulsive disorder in mice
3. 学会等名 The 6th Asian College of Neuropsychopharmacology ( 国際学会 )
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nozomi Asaoka, Naoya Nishitani, Haruko Kinoshita, Yuma Nagai, Hikari Hatakama, Kazuki Nagayasu, Hisashi Shirakawa, Takayuki Nakagawa, Chihiro Yabe-Nishimura, Shuji Kaneko
2. 発表標題 An adenosine A2A receptor antagonist, istradefylline, improves multiple symptoms reflecting obsessive-compulsive disorder in mice
3. 学会等名 第10回武田科学振興財団薬科学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nozomi Asaoka, Shuji Kaneko, Chihiro Yabe-Nishimura
2. 発表標題 Nox1 deficiency alleviated behavioral abnormalities in obsessive-compulsive disorder model mice via inhibition of D2 receptor/ -arrestin pathway-mediated synaptic facilitation
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----