

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591477

研究課題名（和文）不安と衝動性の脳内機構の研究

研究課題名（英文）Neural mechanism of anxiety and fear

研究代表者

泉 剛（IZUMI TAKESHI）

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：60312360

研究成果の概要（和文）：(1)不安の動物モデルである恐怖条件付けストレスの負荷により、扁桃体基底核（BLA）からの興奮性の出力と、扁桃体間核（ITC）からの抑制性の出力が、不安情動の出力を司る扁桃体中心核（CeA）に二重の調節を行っていることを示した。(2)衝動性の動物モデルである 3 選択連続反応課題において腹側内側前頭前野（IL）が衝動性を制御しており、脳内ノルアドレナリン増加によって衝動性が抑制され、IL の $\alpha 4\beta 2$ ニコチン受容体刺激で衝動性が亢進することを示した。

研究成果の概要（英文）：(1)We indicated that both excitatory output from the basolateral nucleus of amygdala (BLA) and inhibitory output from the intercalated nucleus of amygdala (ITC) dually regulated the central nucleus of amygdala (CeA) which performed the final output of anxiety response from the amygdala, using conditioned fear in rats, an animal model of anxiety. (2)We indicated that the infralimbic cortex (IL) regulates impulsivity, using 3 choice serial reaction time task, an animal model of impulsivity. Noradrenalin increase in the brain inhibited impulsivity, whereas stimulation of $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors in IL enhanced impulsivity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：精神薬理学、不安

1. 研究開始当初の背景

情動はヒトが環境に適応するために不可欠な心理機能である。例えば、重要な仕事を行う際には適度の不安や緊張が必要だが、それ

が過度となり、自宅に閉じこもった状態は病的である。情動は正常な機能であるが、素因や外的要因によって病的な症状へと変化する。疾患の病態を解明し、新たな治療手段

を開発するためには、適切な動物モデルが必要である。精神疾患の包括的な動物モデルの実現は困難であるが、モデル化が可能な「行動」を指標とし、精神疾患の病態を部分的に再現することは可能である。「不安」「喜び」「怒り」などの情動は動物とヒトで共通であり、典型的な行動として検出可能である。

2. 研究の目的

筆者らは今回の研究で、「不安」と「衝動性」を研究対象として取りあげる。病的な不安は、それ自体がパニック障害や心的外傷後ストレス障害 (PTSD) の中核症状であり、うつ病の主要症状でもある。以前から筆者らの研究室では、恐怖条件付けストレス

(conditioned fear stress, CFS) を用いて、不安の脳内機構を研究してきた。今回の研究はさらにその研究を進展させることを意図している。また、うつ病に伴う重要な問題に自殺がある。動物実験で自殺を再現することは不可能である。一方、自殺と衝動性の関係を示す研究が数多く存在する。近年、衝動性を実験的に定量する試みが、心理学や動物行動学の分野で行われている。筆者らは、それらの知見を利用して、衝動性の神経機構を研究することにより、自殺のメカニズムを解明する糸口をつかもうと考えている。

3. 研究の方法

(1) 不安について

恐怖条件付けストレス (conditioned fear stress, CFS) は、負強化古典的条件付けを用いた不安の動物モデルであり、ショック箱に入れたラットに対して、電撃ストレスを無条件刺激とし、光・音刺激 (感覚刺激) や箱に入れる操作 (文脈刺激) を条件刺激として古典的条件付けを成立させ、後日条件刺激のみの提示によって、不安反応を惹起するものである。筆者らは CFS を不安の動物モデルとして用い、不安に関する脳内神経回路、特に扁桃体基底核の役割について研究を進める。

扁桃体基底核には、ショック箱への再暴露による CFS の発現によって活性化される神経細胞が存在することが予想される。筆者らは、CFS 時に扁桃体基底核で活性化される細胞の性質を、細胞活性化の指標であるリン酸化 CREB や c-Fos などの転写因子のウェスタン・ブロッティングおよび免疫染色、さらに細胞特異的マーカーを用いた 2 重免疫染色法で同定することを計画している。

(2) 衝動性について

行動心理学や動物行動学の領域では、オペラント課題遂行中の行動抑制の失敗である premature response が、衝動性の指標となりうると考えられている。筆者らは、premature response を用いて衝動性の行動薬理学的モデルを確立しようと考えている。ヒトの衝動

性に影響するとされる各種の薬物を用いてモデルの妥当性を検証すると共に、電気生理学的実験によって衝動性の神経機構を解明したい。

① 選択連続反応課題の衝動性評価系としての妥当性を検討する

既に予備的検討で、ヒトで衝動性を亢進させることが知られているニコチンの全身投与によって、本課題の premature response が増加する所見を得ているが、さらにこの所見を確認し、臨床的に衝動性を改善するとされている SSRI および NRI の効果も検討する。これらの検討により、本課題の衝動性評価系としての妥当性を確立する。

② 内側前頭前野で衝動性に関与しているニューロンを同定する

破壊実験により衝動性への関与が推測されている内側前頭前野に電極を慢性留置し、3 選択連続反応課題遂行中の単一細胞記録を行い、衝動性に関与しているニューロンを同定する。これにより、内側前頭前野と衝動性の関係を、電気生理学的に証明する。

4. 研究成果

(1) 恐怖条件付けストレス負荷の 30 分および 2 時間後に、扁桃体基底核 (BLA) において、細胞活性化の指標であるリン酸化 CREB (pCREB) および転写因子 c-Fos の発現増加が認められた。CREB の発現量自体は変化なく、他の CREB/CREM family の転写因子である CREM や ATF-1 の発現量にも変化はなかった。恐怖条件付けストレス負荷の 2 時間後には pCREB の増加の程度は減少していた。扁桃体間在核 (ITC) においても、恐怖条件付けストレス負荷の 30 分および 2 時間後に pCREB の増加が認められたが、c-Fos の発現は変化なかった。二重染色法で検討したところ、BLA の c-Fos 陽性細胞はすべてグルタミン酸ニューロンのマーカーである glutaminase 共陽性であり、GABA ニューロンのマーカーである GAD67 は 2% のみ共陽性であった。BLA の pCREB 陽性細胞のうち、78% が glutaminase 共陽性であり、13% が GAD67 共陽性であった。ITC には、GAD67 陽性の細胞が密集して存在し、glutaminase 陽性の細胞は存在せず、またほとんどの細胞は pCREB 陽性で、少数の細胞が c-Fos 陽性であった。以上より、条件付け恐怖で活性化される BLA の c-Fos 陽性細胞はほとんどがグルタミン酸ニューロンであり、pCREB 陽性細胞はグルタミン酸および GABA ニューロンであることが示唆された。また ITC の細胞はほとんどが GABA ニューロンであり、条件付け恐怖で活性化されることが示唆された。これより、恐怖条件付けストレス負荷により扁桃体間在核が活性化されるが、間在核の神経細胞は活性化の際に、pCREB の下流において c-Fos 発現の増加を伴わない細胞内

情報伝達経路をとっていることが明らかとなった。また、扁桃体基底核の GABA ニューロンにおいても、恐怖条件付けストレス負荷による c-Fos 発現を伴わない CREB のリン酸化が認められたため、これは脳内の GABA ニューロンに共通したストレス負荷時の細胞内情報伝達様式であることが推測された。以上より、不安の動物モデルである恐怖条件付けストレスの負荷により、BLA からの興奮性の出力と、ITC からの抑制性の出力が、不安情動の出力を司る扁桃体中心核に二重の調節を行っていることが示された。

(2) 衝動性の動物モデルである 3 選択連続反応課題 (3-CSRTT) 遂行時に、腹側内側前頭前野 (IL) に留置した記録電極より、単一細胞外神経記録を行った。記録した 56 ユニットのうち、25 ユニットが衝動性制御に関連し、4 ユニットが注意機能に関連していた。また、13 ユニットはその両方に関連していた。これにより、IL には衝動性の制御に関わっている細胞が存在することが示された。3-CSRTT に対して、選択的ノルアドレナリン再取り込み阻害薬 (NRI) である atomoxetine、セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬 (SNRI) である milnacipran および選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) である fluvoxamine を投与し、atomoxetine と milnacipran が衝動性を抑制することを見出した。Fluvoxamine が無効であったことから、atomoxetine および milnacipran の効果は、ノルアドレナリン増加作用によるものと考えられた。また、mPFC ではノルアドレナリン再取り込み阻害作用を有する薬物が、ドーパミントランスポーターに結合することにより、ドーパミン遊離も増加させることが知られている。従って、atomoxetine および milnacipran の本課題に対する効果は、(1) mPFC、側坐核、眼窩前頭皮質のいずれかにおけるノルアドレナリン増加作用、または (2) mPFC における選択的なドーパミン増加作用によると考えられた。さらに、3-CSRTT に対して、ニコチン受容体の $\alpha 4\beta 2$ antagonist である dihydro- β -erythroidine を 3、10、30 μg の用量で脳室内投与したところ、30 μg の用量で premature response が有意に減少した。 $\alpha 7$ antagonist である methyllylcaconitine の投与は効果なかった。さらに 3-choice に対するニコチン 0.2 mg / kg 皮下投与の効果は、 $\alpha 4\beta 2$ antagonist dihydro- β -erythroidine の腹側内側前頭前野 (IL) への 6 または 18 μg / side の局所投与によって拮抗されるかどうか調べたところ、18 μg / side の用量により、ニコチンによる premature response 減少が拮抗された。以上より、衝動性の動物モデルである 3-CSRTT において、IL が衝動性を制御しており、脳内ノルアドレナリン増加によって衝動

性が抑制され、IL の $\alpha 4\beta 2$ ニコチン受容体刺激で衝動性が亢進することが示された。

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 7 件)

①Matsuzaki H, Izumi T, Matsumoto M, Togashi H, Yamaguchi T, Yoshida T, Watanabe M, Yoshioka M: Early postnatal stress affects 5-HT1A receptor function in the medial prefrontal cortex in adult rats. Eur J Pharmacol (査読有) 615, 76-82, 2009⑤③

②Tsutsui-Kimura I, Ohmura Y, Izumi T, Yamaguchi T, Yoshida T, Yoshioka M: The effects of serotonin and/or noradrenaline reuptake inhibitors on impulsive-like action assessed by the three-choice serial reaction time task: a simple and valid model of impulsive action using rats. Behav Pharmacol (査読有) 20, 474-83, 2009

③Tsutsui-Kimura I, Ohmura Y, Izumi T, Yamaguchi T, Yoshida T, Yoshioka M: Endogenous acetylcholine modulates impulsive action via $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors in rats. Eur J Pharmacol (査読有) 641, 148-153, 2010

④Tsutsui-Kimura I, Ohmura Y, Izumi T, Yamaguchi T, Yoshida T, Yoshioka M: Nicotine provokes impulsive-like action by stimulating $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors in the infralimbic, but not in the prelimbic cortex. Psychopharmacology (査読有) 209, 351-359, 2010

⑤Shikanai H, Izumi T, Matsumoto M, Togashi H, Yamaguchi T, Yoshida T, Yoshioka M: Diazepam-induced increases of synaptic efficacy in the hippocampal-mPFC pathway are associated with its anxiolytic-like effect of rat. J Pharmacol Sci (査読有) 114, 341-346, 2010

⑥Matsuzaki H, Izumi T, Horinouchi T, Boku S, Inoue T, Yamaguchi T, Yoshida T, Matsumoto M, Togashi H, Miwa S, Koyama T, Yoshioka M: Juvenile stress attenuates the dorsal hippocampus postsynaptic 5-HT1A receptor function in adult rats. Psychopharmacology (査読有) 214(1), 329-337, 2011

⑦Izumi T, Boku S, Shinmin W, Inoue T, Konno K, Yamaguchi T, Yoshida T, Matsumoto M, Watanabe M, Koyama T, Yoshioka M: Retrieval of conditioned fear activates the basolateral and intercalated nucleus

of amygdala. J Neurosci Res (査読有) 89(5), 773-790, 2011

〔学会発表〕(計3件)

①泉 剛、Effect of bilateral lesion of the amygdala 5-HT terminals on the anxiety-related behaviors in rats. 第83回日本薬理学会、2009/3/17、大阪国際会議場

②泉 剛、両側扁桃体 5-HT 神経終末破壊が不安関連行動に及ぼす効果、第20回日本神経精神薬理学、2010/9/17、仙台国際センター

③泉 剛、扁桃体における不安発現に対する 5-HT 作動性神経の調節メカニズム、第41回神経精神薬理学、2011/10/27、東京、京王プラザホテル

6. 研究組織

(1) 研究代表者

泉 剛 (IZUMI TAKESHI)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：60312360

(2) 研究分担者

吉田 隆行 (YOSHIDA TAKAYUKI)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：60374229

吉岡 充弘 (YOSHIOKA MITSUHIRO)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：40182729

山口 拓 (YAMAGUCHI TAKU)

長崎国際大学・薬学部・准教授

研究者番号：80325563