

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591674

研究課題名(和文)SSRIの抗不安作用における扁桃体5-HT神経系の役割

研究課題名(英文)SSRI exerts anxiolytic effect via amygdalar 5-HTergic neural system

研究代表者

泉剛(IZUMI, TAKESHI)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：60312360

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文):セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)は、抗不安薬として広く用いられている。SSRIであるシタロプラムの扁桃体基底核への局所投与は、不安の動物モデルであるラットの恐怖条件付けを抑制した。そして、5-HT_{1A}受容体阻害薬の同時局所投与は、その効果に拮抗した。一方、扁桃体スライスのパッチ・クランプで単一細胞PCRを行った。グルタミン酸作動性ニューロンの6.5%が5-HT_{1A}受容体mRNA陽性で、5-HT_{1A}受容体を有するニューロンは有意に静止膜電位が低かった。以上より、SSRIは扁桃体基底核で5-HT_{1A}受容体を介してグルタミン酸作動性ニューロンを抑制し、抗不安作用をもたらすことが示唆された。

研究成果の概要(英文):The amygdala is a crucial brain structure for anxiety, and it is speculated that the 5-HTergic neural system in this structure has an important role in regulating anxiety. In our previous study, we indicated that systemic administration of selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) had anxiolytic effect in fear-conditioned rats. In the present study, local injection of citalopram, a SSRI, into the bilateral basolateral nucleus of (BLA) attenuated conditioned fear-induced freezing behavior in rats, and this effect was blocked by local co-administration of WAY100635, a selective 5-HT_{1A} antagonist, into the bilateral BLA. Single cell PCR indicated that 6.5% of glutamatergic neurons in BLA had 5-HT_{1A} receptor mRNA, and the resting membrane potential of these neurons were lower than other glutamatergic neurons. From these results, it is suggested that 5-HT increased by SSRI inhibits the part of glutamatergic neurons in BLA, and as a result, SSRI exerts anxiolytic effect.

研究分野：精神薬理学

キーワード：不安 扁桃体 5-HT SSRI

1. 研究開始当初の背景

セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)は抗うつ薬であるが、抗不安薬としても広く用いられている。しかし、その作用機序の詳細は不明であった。扁桃体は不安・恐怖などの脳内中枢として知られている。fMRIなどの脳機能画像研究により、不安障害の患者で扁桃体の機能が亢進しており、SSRIの投与によって正常化することから、扁桃体のセロトニン神経系がSSRIの抗不安作用に関与していることが推測できる。それを確認するため、不安の動物モデルであるラットの恐怖条件付けを用い、SSRIの扁桃体への局所投与の効果を検討することとした。

また、セロトニン受容体は14種類以上のサブタイプが存在し、SSRIがどのサブタイプに主に作用して抗不安作用をもたらしているかも不明である。先行研究では、5-HT1Aおよび5-HT2A受容体作動薬の全身投与により抗不安作用がもたらされることが報告されているため、「扁桃体の5-HT1Aおよび5-HT2A受容体がSSRIの抗不安作用に関与している」という仮説をたて、それを検証するために、SSRI局所投与の効果が、5-HT1Aおよび5-HT2A受容体阻害薬の同時局所投与によって拮抗されるかどうかを検討することとした。

さらに、扁桃体における5-HT1Aおよび5-HT2A受容体の局在を確認し、両受容体の有無と神経細胞の機能との関係を知るため、扁桃体スライスのpatch clampを用いた単一細胞RT-PCRを行ない、5-HT1Aおよび5-HT2A受容体mRNAの存在と、受容体mRNAを有する細胞の電気生理学的特性を調べることとした。

2. 研究の目的

- (1) 扁桃体がSSRIの抗不安作用の作用部位であるかどうかを確認する。
- (2) 扁桃体の5-HT1Aおよび5-HT2A受容体がSSRIの抗不安作用に関与しているかどうかを検証する。

3. 研究の方法

(1) 9-14週齢のWistar/ST雄性ラットを用い、両側扁桃体基底核(BLA)の2mm上方にガイドカニューレを留置した(Bregmaより3mm後方、左右±5.7mm、脳表より深さ6mm)。手術の7日後および8日後にラットをshock boxに入れ、0.5mA、1秒間のfootshockを30秒毎に10回負荷した。9日後に、局所投与用のカニューレをガイドカニューレから先端が2mm出るように挿入し、シリンジポンプを用いて薬物投与を1分間行った(0.5µl/side/min)。10分後にラットをshock boxに入れ、恐怖条件付けの発現によるすくみ行動(freezing)を観察した。実験終了後に抜脳してカニューレの位置を確認した。局所投与に用いた薬物はcitalopram(SSRI、0.03、0.3および3µg/side)

WAY100635(選択的5-HT1A受容体阻害薬、0.005、0.05および0.5µg/side)およびMDL11939(選択的5-HT2A受容体阻害薬、6、60および0.6µg/side)であり、citalopramとWAY100635は生理食塩水に溶解し、MDL11939はDMSOに溶解した後、生理食塩水で希釈した。

(2) 3-6週齢のWistar/ST雄性ラットを用い、扁桃体を含む300µmのスライスを作成した。Whole-cell patch clampを行い、current clampモードにて神経細胞の電気生理学的特性を測定した後、ガラス管電極を通じて細胞質を吸引し、RT-PCRを行い、アガロースゲル電気泳動にてmRNAの存在を調べた。調べたmRNAは、神経細胞のマーカーであるNSE、グルタミン酸作動性神経のマーカーであるVGLUT1、GABA作動性神経のマーカーであるGAD67、5-HT1Aおよび5-HT2A受容体である。

4. 研究成果

(1) Citalopramの両側扁桃体への局所投与は、恐怖条件付けの発現によるすくみ行動を用量依存的に抑制した(0.3および3µg/sideでそれぞれP<0.05およびP<0.01)(図1)。

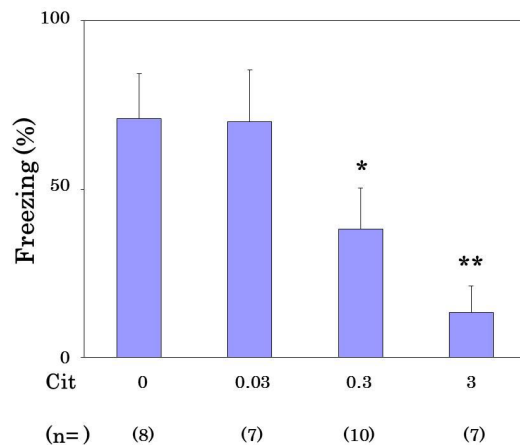


図1. すくみ行動に対する両側扁桃体へのcitalopram局所投与の効果。*P<0.05, **P<0.01, Cit, citalopram

(2) Citalopram 3µg/sideの両側扁桃体への局所投与に対して、選択的5-HT1A受容体阻害薬WAY100635 0.5µg/sideの同時局所投与を行ったところ、citalopramの効果はキャンセルされた(P<0.01)。WAY100635単独投与はすくみ行動に影響しなかった(図2)。

(3) Citalopram 3µg/sideの両側扁桃体への局所投与に対して、WAY100635 0.5µg/sideを0.005、0.05および0.5µg/sideで用量を展開して投与した。その結果、WAY100635のcitalopramに対する拮抗作用には用量依存性が認められた(図3)。なお、以上のcitalopramおよびWAY100635の両側扁桃体への局所投与は、高架式十字迷路試験で評価

した運動量には影響しなかった。

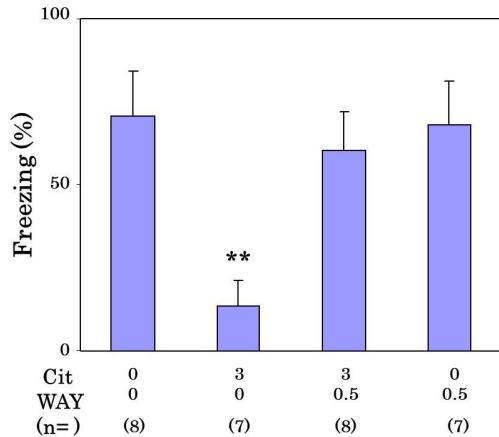


図 2. Citalopram 局所投与の効果に対する WAY100635 同時局所投与の効果。
**P < 0.01, Cit, citalopram, WAY, WAY100635

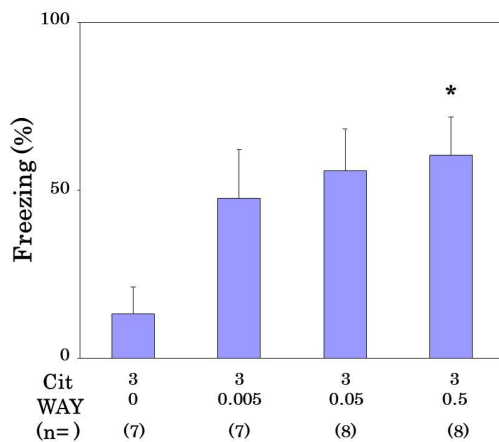


図 3. Citalopram の効果に対する WAY100635 投与効果の用量依存性。
*P < 0.05, Cit, citalopram, WAY, WAY100635

(4) Citalopram 3 µg/side の両側扁桃体への局所投与に対して、選択的 5-HT_{2A} 受容体阻害薬 MDL11939 0.6 µg/side の同時局所投与を行ったところ、citalopram の効果はキャンセルされた (P < 0.01)。MDL11939 単独投与はすくみ行動に影響しなかった (図 4)。しかし、現時点で MDL11939 の citalopram に対する拮抗作用の用量依存性を確認するには至らず、実験を継続中である。

(5) ラット扁桃体パッチ・クランプを用いた単一細胞 PCR 法では、扁桃体基底核のグルタミン酸作動性ニューロン 77 個、GABA 酸作動性ニューロン 11 個から記録を取った。グルタミン酸作動性ニューロンのうち、6.5% が 5-HT_{1A} 受容体 mRNA 陽性、11.7% が 5-HT_{2A} 受容体 mRNA 陽性であった。5-HT_{1A} 受容体を有するグルタミン酸作動性ニューロンは、他のニューロンより有意に静止膜電位が低かった (P < 0.05)。

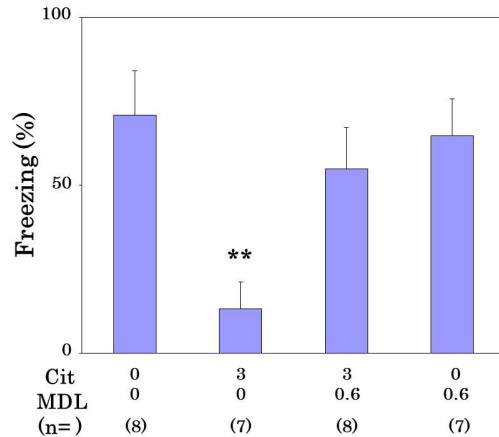


図 4. Citalopram 局所投与の効果に対する MDL11939 同時局所投与の効果。
**P < 0.01, Cit, citalopram, MDL, MDL11939

薬物脳内局所投与の結果より、SSRI の抗不安効果は、扁桃体基底核の 5-HT_{1A} 受容体を介していることが明らかとなった。また、5-HT_{2A} 受容体も SSRI の抗不安作用に関与していることが推測される。今後、5-HT_{2A} 受容体阻害薬の用量依存性を確認することにより、結論を出したい。

SSRI が 5-HT_{1A} 受容体を介して抗不安作用をもたらす機序について考察する。単一細胞 PCR の結果より、5-HT_{1A} 受容体を有するグルタミン酸作動性ニューロンが他のニューロンより有意に静止膜電位が低いことが判明した。これより、SSRI によって扁桃体基底核で増加したシナプス間隙の 5-HT が 5-HT_{1A} 受容体を介して、5-HT_{1A} 受容体を有するグルタミン酸作動性ニューロンの発火を抑制していることが推測される。扁桃体基底核のグルタミン酸作動性ニューロンのうち、5-HT_{1A} 受容体 mRNA を有するものは 6.5% しかないため、SSRI は特定のグルタミン酸作動性ニューロン群を抑制することになる。研究の次の段階として、扁桃体基底核で 5-HT_{1A} 受容体を有するニューロンがどこに局在し、どの脳部位へ投射しているかが問題となるが、現時点では 5-HT_{1A} 受容体の特異的な抗体が存在しないため、検討は困難である。今後、5-HT_{1A} 受容体 mRNA の in situ hybridization とトレーサー実験を組み合わせた実験を行うことを検討したい。

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 10 件)

Tsutsui-Kimura I, Ohmura Y, Izumi T, Kumamoto H, Yamaguchi T, Yoshida T, Yoshioka M: Milnacipran enhances the control of impulsive action by activating

D(1)-like receptors in the infralimbic cortex. *Psychopharmacology* 225 (2), 495-504, 2013 (査読有) doi: 10.1093/ijnp/pyu083

Song N, Nakagawa S, Izumi T, Toda H, Kato A, Boku S, Inoue T, Sakagami H, Li X, Koyama T : Involvement of CaMKIV in neurogenic effect with chronic fluoxetine treatment. *Int J Neuropsychopharmacol* 16 (4), 803-812, 2013 (査読有) doi: 10.1017/S1461145712000570

Ohmura Y, Kumamoto H, Tsutsui-Kimura I, Minami M, Izumi T, Yoshida T, Yoshioka M : Tansospirone suppresses impulsive action by possible blockade of the 5-HT_{1A} receptor. *J Pharmacol Sci* 122(2), 84-92, 2013 (査読有) doi: 10.1254/jphs.12264FP

An Y, Inoue T, Kitaichi Y, Izumi T, Nakagawa S, Song N, Chen C, Li X, Koyama T, Kusumi I : Anxiolytic-like effect of mirtazapine mediates its effect in the median raphe nucleus. *Eur J Pharmacol* 720 (1-3), 192-197, 2013 (査読有) doi: 10.1016/j.ejphar

Hiroi N, Takahashi T, Hishimoto A, Izumi T, Boku S, Hiramoto T : Copy number variation at 22q11.2: from rare variants to common mechanisms of developmental neuropsychiatric disorders. *Mol Psychiatry* 18 (11), 1153-1165, 2013 (査読有) doi: 10.1038/mp.2013.92

Ohmura Y, Tsutsui-Kimura I, Kumamoto H, Minami M, Izumi T, Yamaguchi T, Yoshida T, Yoshioka M : Lithium, but not valproic acid or cabamazepine, suppresses impulsive-like action in rats. *Psychopharmacology* 219, 421-432, 2012 (査読有) doi: 10.1007/s00213-011-2496-9

Matsunami S, Ogura Y, Amita H, Izumi T, Yoshioka M, Matsushima T : Behavioural and pharmacological effects of fluvoxamine on decision-making in food patches and the inter-temporal choices of domestic chicks. *Behav Brain Res* 233, 577-586, 2012 (査読有) doi: 10.1016/j.bbr.2012.05.045

Yamaguchi T, Tsujimatsu A, Kumamoto H, Izumi T, Ohmura Y, Yoshida T, Yoshioka M : Anxiolytic effects of yokukansan, a traditional Japanese medicine, via serotonin 5-HT_{1A} receptors on anxiety-related behaviors in rats experienced aversive stress. *J*

Ethnopharmacol 143, 533-539, 2012 (査読有) doi: 10.1016/j.jep.2012.07.007

Shikanai H, Yoshida T, Konno K, Yamasaki M, Izumi T, Ohmura Y, Watanabe M, Yoshioka M : Distinct Neurochemical and Functional Properties of GAD67-Containing 5-HT Neurons in the Rat Dorsal Raphe Nucleus. *J Neurosci* 32 (41), 14415-26, 2012 (査読有) doi: 10.1523/JNEUROSCI

Izumi T, Ohmura Y, Futami Y, Matsuzaki H, Kubo Y, Yoshida T, Yoshioka M : Effects of serotonergic terminal lesion in the amygdala on conditioned fear and innate fear in rats. *Eur J Pharmacol* 696 (1-3), 89-95, 2012 (査読有) doi: 10.1016/j.ejphar.2012.09.028

(学会発表) (計 4 件)

Izumi T, Ghebream R, Wang C, Ohmura Y, Yoshida T, Yoshioka M : The role of amygdalar glucocorticoid receptor system in depression, 第 88 回日本薬理学会総会, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市), 2015.3.18-20

Izumi T, Ohmura Y, Yoshida T, Yoshioka M : The role of amygdalar serotonergic neural system in fear memory, 44th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Washington DC (USA), 2014.11.15-19

Izumi T, Yoshida T, Shikanai H, Ohmura Y, Yoshioka M : SSRI attenuated the expression of conditioned fear via 5-HT_{1A} receptors in the basolateral nucleus of amygdala, 42nd Annual Meeting of the Society for Neuroscience, New Orleans(USA), 2012.10.13-17

Izumi T, Yoshida T, Shikanai H, Ohmura Y, Yoshioka M : Difference of the electrophysiological characteristics between glutamatergic and GABAergic neurons in the amygdala, 第 85 回日本薬理学会総会, 国立京都国際会館, グランドプリンスホテル京都 (京都府・京都市), 2012.3.14-16

(図書) (計 1 件)

① Izumi T, Yoshida T, Watanabe M, Yoshioka M : Role of the amygdalar serotonergic system in emotional regulation and disorders. In Yilmazer-Hanke D, editor. *Insights into the Amygdala: Structure, Function and Implications for Disorders*. Nova Science Publishers, New York, Nova Science

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・講師
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