

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860994

研究課題名(和文)側坐核機能の個体差による大うつ病発症脆弱性および治療薬反応性の予測

研究課題名(英文)Pre-stress performance in an operant learning predicts post-stress behavioral alterations in chronically stressed rats

研究代表者

井口 善生(Iguchi, Yoshio)

金沢大学・医学系・博士研究員

研究者番号：20452097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：慢性ストレスはうつ病の主要なリスクファクタであるが、ストレスが誘導するうつ病(様)表現型の個体差とストレス負荷前に既に存在していた認知機能における個体差の関係については検討が少ない。本研究では、Progressive ratio (PR)スケジュールで訓練されたラットの欲求性オペラント行動における個体差に着目し、この指標が意欲の高さや意思決定スタイルの個体差を反映することを確認した。さらに、PR成績により分類された4つの亜群は、慢性ストレスに対してそれぞれ異なった反応性を短期的あるいは長期的に示した。これらの結果はストレス前の個体差からストレス反応性/脆弱性の個体差が予測できることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：Although chronic stress has been widely used to induce depression-like phenotypes in preclinical studies, a few models have been developed to study causal relationship between the individual differences in the depression-like phenotypes and the pre-existing individual differences prior to stress exposure, which might genetically/epigenetically determine the fate of each animal after stress. We focused on a large inter-individual variability of a group of outbred rats in performance of an appetitive operant (leverpress) trained on a progressive ratio (PR) schedule. Based on the PR performance, we classified animals into 4 subgroups, which were found to show distinctive cognitive/behavioral characteristics. Moreover, the 4 subgroups revealed different behavioral responses to a chronic unpredictable stress (CUS) on short- and long-term bases. These results suggest that the individual differences in the pre-CUS PR performance can predict the distinctive post-CUS behavioral phenotypes.

研究分野：精神薬理学

キーワード：うつ病 慢性ストレス ストレス反応性 個体差 意欲 柔軟な意思決定 欲求性オペラント学習 側坐核

### 1. 研究開始当初の背景

本邦において、うつ病を含む気分障害の総患者数は100万人に迫ると言われており、15人に1人が一生のうち一度はうつ病にかかる(2002年度調べ)。年間約3万人と言われる自殺者の約4割はうつ病あるいはうつ状態であったと推測される。自殺・休職/離職・医療費などによる経済的損失は年間2.7兆円(2009年度調べ)と考えられ、うつ病の病態解明と効果的な治療法開発は緊急性の高い国家的課題である。

米国精神医学会が定めたDSM-5において、うつ病(major depressive disorder)は、抑うつ気分や興味/喜びの喪失といった9つの症状のうち5つを満たすことで診断される。したがって個人間で症状に違いがある。その発症においては、他の精神疾患に比べても、環境要因の影響が相対的に強いことが知られている。つまり、健康な状態にある人が環境ストレス(例:職場や学校における人間関係のトラブル)や身体的ストレス(例:慢性的な疲労や妊娠・出産に伴う内分泌系の変化)を経験することで発症に至ると考えられている(ここでいうストレスとは、比較的長期間持続する、いわゆる慢性ストレスのことである)。しかし、同じストレスを経験してもうつ病を発症しない個人も多く、ストレス耐性をレジリエンスと呼ぶ。ここで重要な点は、うつ病の症状やストレス脆弱性に大きな個人差が存在することである。このことは、均質な母集団を仮定した病態モデルが成立しないことを意味し、その結果、病態解明と効果的な治療法の開発が困難になっている。

動物のうつ病モデルでも同様の問題がある。たとえば、一群のナイーブな動物(被験体)を用意しこれらに社会的敗北ストレスを数日間与える。その後被験体を同種他個体と対面させ、社会的インタラクションを行う時間を測定する。一部の被験体は他個体を回避するようになる(動物のうつ病様表現型の一つ)ため、インタラクションの時間が短縮するが、インタラクションの時間がほとんど短縮しない被験体も多い(Krishnan et al., 2007, *Cell*)。しかし、仮に、すべての被験体について振り返りにストレス前の認知・行動・脳機能を検討できるのであれば、そしてうつ病様表現型を示すようになった個体に特異的な性質が明らかになれば、ストレス前の個体差を用いてうつ病様表現型の発現パターンを予測可能であることを意味し、将来的にはうつ病の予防に繋がる。しかし、実際にはそのような研究は少なく、現在の動物モデル研究の問題点の一つである。

さらに、現在の多くのモデル研究が抱えるもう一つの問題点についても指摘する。それは、ストレスが引き起こす行動や脳機能の変化を長期的にモニタした研究が少ないことである。多くの研究では、ラットやマウスに少なくとも5日間、長いと2か月程度のストレス(強制水泳や身体的拘束,社会的敗北など、

様々なストレスが用いられる)を負荷する。しかし、このようなストレス負荷が誘導するうつ病様表現型の評価は、多くの研究においてはストレス負荷期間中あるいはストレス負荷終了直後に限られている。これでは、ヒトにおいてはうつ病とは呼べないような一過的な抑うつ気分などの短期的な効果を測定しているのか、真のうつ病と関連する効果を測定しているのか、判断できない。ストレス終了の数週間後までうつ病様表現型のモニタリングを延長し、ストレスの長期的な効果やストレス負荷終了から一定の時間を経て初めて発現する遅発性の効果についても検討する必要がある。

### 2. 研究の目的

1で述べた2つ問題点、ストレス負荷前の行動や脳機能の個体差と、ストレス負荷後のうつ病様表現型との間の因果的関係が未検討、ストレス負荷後のうつ病様表現型や脳機能の変化を長期的に検討していない、を解決したラットモデル研究を成立させることが本研究の目的である。これらの問題を解決したモデル研究が今後広まっていくことで、ヒト臨床にこれまで以上に大きな貢献ができる動物モデル研究を進めていくことができるであろう。ところで、この問題に関しては、長期間動物を飼育しつつ行動観察と脳機能測定を行えばよいので、具体的な解決法は単純である。困難なのは、ストレス負荷前の動物の個体差といっても、測定項目数は無限大となってしまうので、ストレス後に顕在化するであろううつ病様表現型に関連する行動や脳機能に限定して個体差を測定しておく必要がある。

本研究が目指したのは「意欲」と「柔軟にものごとを考える機能」の個体差である。その理由として、意欲は、うつ病の中核症状の一つである「興味/喜びの喪失」と関連が深いこと、柔軟な意思決定も、しばしばうつ病で障害されること、前頭前野からのグルタミン酸と腹側被蓋野からのドーパミンが合流する側坐核は、両機能と関連することが知られており、また側坐核はうつ病様表現型の発現と関連することが報告されているため、両機能とも、ラットの行動として測定が可能であること、などが挙げられる。

以上を踏まえた本研究の目的は、まず、ナイーブなラットにおいて、意欲と意思決定の個体差を反映する行動指標を確立し、次にその指標を用いて測定した個体差とストレス反応性の個体差の関連を検討することである。

### 3. 研究の方法

動物の飼育や実験の手続きは、金沢大学実験動物委員会に実験計画を提出、許可を受けた上で実施した。ナイーブ(ストレスを負荷していない)Sprague-Dawleyラット(ホームケージにおいて、餌や水の摂取に制限をかけな

った)に課したタスクは、Progressive ratio (PR) 強化スケジュールのオペラント学習である (Figure 1)。このタスクでは、ラットが報酬(サッカリン溶液)を得るために必要なレバー押し回数を試行間で指数関数的に増加させた。したがって、セッションのどこかの時点でラットはそれ以上のレバー押しをあきらめる。ラットがレバーを押さずに5分間が経過した時点をもってラットがあきらめた、と判断した。1セッションは35分としたが、これはほぼすべてのラットが“あきらめる”ために十分な時間であった。したがって、あるセッションで記録されたレバー押しの数は、ラットがサッカリン報酬を得るための意欲の高さを反映すると考えられた。

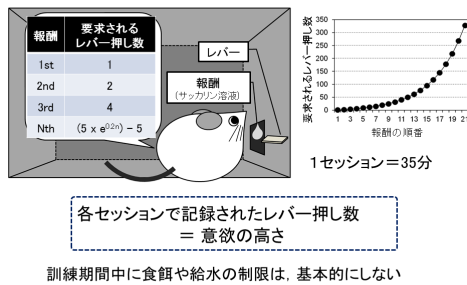


Figure 1

この PR オペラント学習を数セッション連続して訓練したところ、セッション間のレバー押しの変化には大きな個体差が認められた。この個体差が、意欲の高低や意思決定スタイルの個体差を反映していることを、他の行動指標を用いて確認した。最終的に、PR オペラント学習の成績に基づき、意欲や意思決定に違いをもつ4つの亜群が分類されることを示した(実験1)。

次に、別のナイブなラットを準備し、PR オペラント学習を3セッション連続して訓練した。実験1で確立した方法により4亜群に分類した後、それぞれの亜群の約半数に慢性予測不可能ストレスを4週間負荷した(Figure 2)。その後、さらに4週間動物を飼育し、1週間に一度のペースで行動を測定、ストレス誘導性の行動変化を追跡した(実験2)。

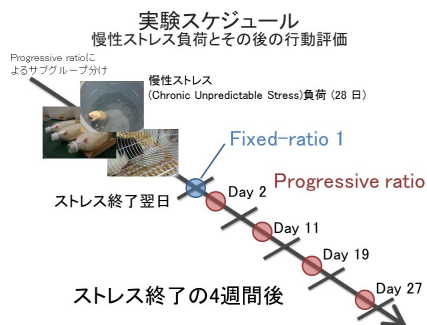


Figure 2

#### 4. 研究成果

実験1: PR オペラント学習の成績に基づいて意欲の高低と意思決定スタイルが異なる4亜

群を分類した

3セッションのPRオペラント訓練では第1セッションのレバー押し回数に大きな個体差が認められた。また、レバー押し回数の平均値はセッションの進行とともに低下したが、この低下の程度には個体差が認められた (Figure 3A)。そこで、第1セッションのレバー押し数(正規分布に近づけるために、自然対数変換を施した)を横軸、第1から3セッションにかけてのレバー押しの変化率(変化なしがゼロ、負の値は低下を意味する)を縦軸とした2次元平面上に個体データをプロットし、データ間のユークリッド平方距離に基づく階層的クラスタ分析をおこなったところ (Figure 3B)、同2次元平面上の個体データは4つの亜群に分類された (Figure 3C、群名の横に示した数字は動物数を意味する)。

PRパフォーマンスに基づいたサブグループ分類

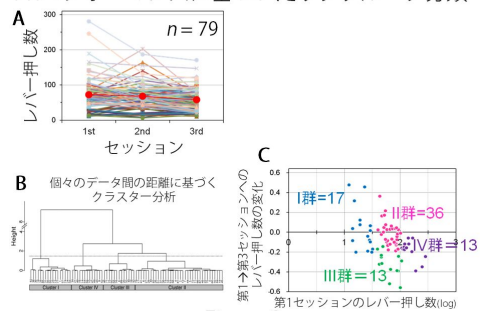


Figure 3

4亜群のPRパフォーマンスの特徴を Figure 4 に示した。PR 第1セッションにおけるレバー押し回数 (Figure 4A) については、I群は他の3群より有意に少なく、逆にIV群は他の3群よりも有意に多かった。したがって、I・IV群はそれぞれ低意欲・高意欲を特徴とする群と言える。しかし、II群とIII群のレバー押し回数の間には有意な差は認められなかった。また、第1セッションから第3セッションにかけてのレバー押し回数の変化率 (Figure 4B) については、III群はこの変化率がII群よりも有意に小さく、III群のレバー押しが第1セッションから第3セッションにかけて顕著に低下したことを意味した。この群間差が意味するところについては、III群動物の「行動の変化しやすさ (= 意思決定の柔軟性)」を反映しているのではないかと推測された。

PRパフォーマンスに基づいたサブグループ分類

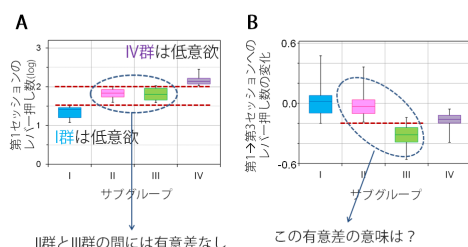
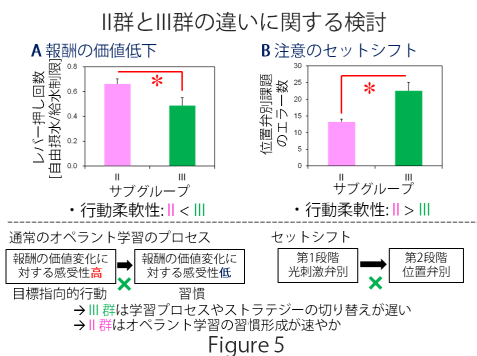


Figure 4

そこで、II 群と III 群が意思決定の柔軟性において異なっていることを確認するための実験をおこなった。II 群と III 群それぞれの動物に給水制限を施し(1 日の摂水時間を 30 分に制限)、レバー押しを再訓練した。このときのレバー押しの頻度(回数/分)をベースラインとし、翌日給水制限を解除して同様の訓練をおこなった。(自由摂水時のレバー押し回数)/(給水制限下のレバー押し回数)は、液体報酬の価値低下に伴ってオペラント行動の強度を柔軟に変化させることができるかどうかの指標である(Balleine, 1992, *JEP: Anim Behav Proc*)。この指標では、III 群は II 群よりも有意に低く(Figure 5A)、III 群の行動柔軟性は相対的に高いことが明らかになった。さらに、注意のセットシフトにおける 2 群の違いを検討した。このタスクではまず、光刺激を手がかりに正レバーを選択する弁別をラットに訓練した(2 本のレバーのそれぞれの上方にランプを設置し、点灯したランプの下の方のレバーを押すとサッカー報酬が得られる、というルール)。ラットがこの弁別を獲得した翌日に、今度は視覚刺激を無視して常に左側(あるいは右側、動物間でカウンターバランス)のレバーを押すと報酬が得られる、という位置弁別にルールを変更した。古い視覚弁別のルールを棄て新しく導入された位置弁別を獲得するスピードを、位置弁別課題におけるエラー数として測定し、II 群と III 群の違いがあるかどうか検討した。その結果(Figure 5B)、II 群はより速やかに新しいルールを獲得することが明らかになった。これらの結果から、III 群は学習プロセスや行動ストラテジーの切り替えが相対的にゆっくりと起こる亜群であり、逆に II 群はオペラント行動の習慣的な遂行がより速やかな動物であることが示唆された(Figure 5 下)。



以上の結果を受けて、I~IV 群のそれぞれを以下のように命名した。I 群 = 低意欲(low motivation)群, II 群 = 習慣(habit)群, III 群 = 低速切り替え(slow-switch)群, IV 群 = 高意欲(hyper motivation)群, とした。以下の記述ではこの命名を用いる。

実験 2: 意欲の高低と意思決定スタイルが異なる 4 亜群のオペラント行動はストレスに対して異なる反応性を示した

実験 1 で同定された 4 亜群が異なるスト

レス反応性を示すならば、ストレス前の意欲や意思決定スタイルの個体差からストレス脆弱性やストレス反応性の個体差を予測できることになる。そこで実験 1 とは別の個体群を準備し、実験 1 と同様の PR オペラント学習(3 セッション)を訓練した。実験 1 で確立された分類法に基づき、4 亜群に分類した。それぞれの亜群の約半数に慢性予測不可能ストレス(chronic unpredictable stress: CUS, Figure 6)を 4 週間にわたって負荷した。それぞれの亜群の残り半数の個体に対しては、対照操作としてハンドリングを毎日供した。

慢性予測不可能ストレスのプロトコル

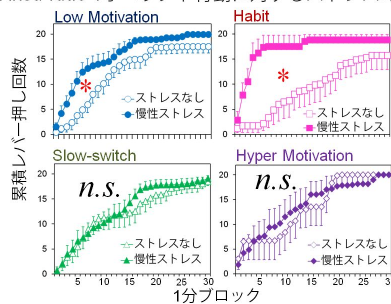
|       | 拘束<br>(心理ストレス)             | 強制水泳<br>(身体ストレス) | 敗北<br>(社会ストレス)             |
|-------|----------------------------|------------------|----------------------------|
| 1週目   | 30分                        | 10分              | 10分間の直接対決                  |
| 2週目   | 45分<br>+200W照明<br>+5分間の揺動  | 15分              | 10分間の直接対決<br>+30分間の金網越しの対面 |
| 3-4週目 | 60分<br>+200W照明<br>+20分間の揺動 | 20分              | 10分間の直接対決<br>+60分間の金網越しの対面 |



Figure 6

CUS 負荷の翌日、すべてのラットのオペラント行動をしらべた(Figure 2 の実験タイムラインも参照のこと)。このテストでは、レバー押し回数:報酬数は、常に 1:1 (固定比率スケジュール 1, fixed-ratio 1 スケジュール)とし、20 報酬を得るか、30 分間経過した後にテストセッションを終了した。動物に給水制限は施さなかった。Figure 7 はその結果であり、縦軸に累積レバー押し回数を示した。低意欲群と習慣群ではストレスによるオペラント行動の遂行促進が認められたが、低速切り替え群と高意欲群ではストレスの効果は認められなかった。

Fixed-ratio 1 オペラント行動に対するストレスの効果



さらに、ストレス終了の 2 日後、11 日後、19 日後、27 日後に、ストレス負荷前と同様の手続きで PR スケジュールのオペラント行動をテストした(Figure 2 の実験タイムラインも参照のこと)。Figure 8 はその結果であり、縦軸は各セッションの累積レバー押し回数である。低意欲群では、ストレス負荷終了直後(2 日後)から約 3 週間後(19 日後)まではストレスの効果は認められなかったが、約 4 週間後(27 日後)には、ストレスを経験した動物の



レバー押しは対照群よりも有意に増加した。習慣群では、ストレス負荷終了直後ではストレスの効果は認められなかったが、11日後にはストレスによるレバー押しの抑制(動機づけレベルの無快感症, Treadway & Zald, 2011, *Neurosci Biobehav Rev*)が認められた。しかしながらこの遅発的な効果は一過的なものであり、19日後にはストレスの有意な効果は検出できなかった。低速切り替え群では、少なくとも本研究が行動モニタリングした期間内(約4週間)では、有意なストレスの効果は発見できなかった。最後に、高意欲群ではストレス負荷終了直後から約4週間後のすべての期間で、ストレスによるレバー押しの有意な抑制が認められ、長期的な動機づけレベルの無快感症の証拠を得た。

Progressive ratioオペラント行動に対するストレスの効果

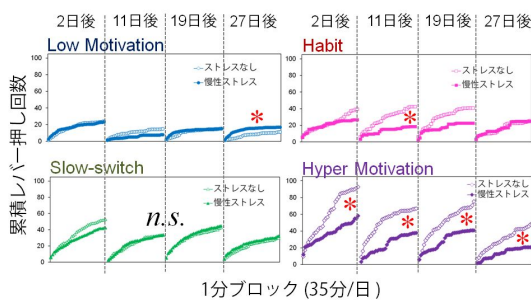


Figure 8

本研究の成果のまとめと今後の課題

4 亜群のストレス反応性について、短期的な効果(ストレス負荷終了の翌日から2日後程度)、長期的な効果、遅発的な効果に分けて、Figure 9 にまとめた。低意欲群は、ストレス負荷以前に、サッカリン報酬を得るためのオペラント行動の遂行が他群よりも著しく低く、意欲の低さを示した。その意味では定常状態ではもっとも強いうつ状態を示す個体群であった。この群の動物は、逆説的ではあるが、ストレス負荷によってPRオペラント行動の促進が認められた。ストレスはオペラント行動の習慣的な遂行を促進することが知られている(Dias-Ferreira et al., 2009, *Science*)。ストレスによる非目標指向的なオペラント学習の促進が認められる個体は、意欲が低い個体に限定される可能性が示唆された。習慣群は、オペラント行動の速やかな習慣化や迅速な行動ストラテジーの切り替え

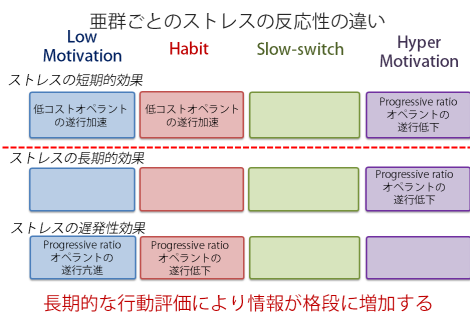
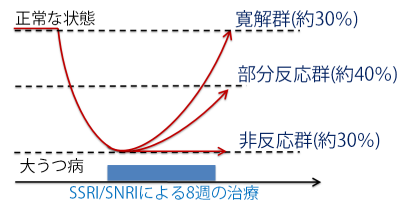


Figure 9

を定常状態の特徴としてもつ個体群である。この群の動物は、遅発的かつ一過的な無快感症を示した。低速切り替え群の動物は、学習過程の進行や行動ストラテジーの切り替えがゆっくりと起こるという定常状態の特徴を持ち、ストレスに対して反応性が低い、つまり(少なくとも本研究が用いた評価系においては)レジリエンスの特徴を示した。最後に高意欲群は定常状態でサッカリン溶液を報酬としたオペラント学習において過剰とも言える高反応を示し、この報酬の誘因価がそれほど高くないことを考慮すると、さほど重要ではない報酬に対しても気分高揚を示す個体群と言える。この亜群にストレスを負荷すると、もっとも即時的かつ長期的な無快感症が示されることが明らかになった。

本研究の主要な目的は、ストレス負荷前の行動や脳機能の個体差と、ストレス負荷後のうつ病様表現型との因果的な関係を明らかにすること、ストレス負荷後のうつ病様表現型や脳機能の変化を長期的に検討することで、これまでの研究で見逃されてきたストレス反応性を発見すること、の2つであった。については興味深い結果が得られたが、同時に今後の検討課題がいくつか残された。まず、ストレス前の定常状態の個体差がどのように発生してくるのか、という問題である。遺伝的に決定されるのか、それとも、集団内の地位や栄養状態のような環境的な因子が重要な役割を果たしているのか(エピジェネティック)、検討が必要である。また、4 亜群の認知/行動機能の差を作り出す脳機能(タスクに關与する回路や分子の機能的な差異、特に、側坐核における分子機構)はまったく不明であり、今後の検討が待たれる。さらに、うつ病においては病態やストレス脆弱性だけでなく、うつ病患者の治療薬反応性にも大きな個体差があることが知られている(Figure 10)。本研究で同定された4 亜群が、うつ病様表現型を示した個体の治療薬反応性と関連するかどうか、検討が必要である。



Stahl, Essential Psychopharmacology, 2000より

4つのサブグループは、ストレス負荷後に変化した行動の治療薬反応性を予測するだろうか？

Figure 10

目的 に関しては、Figure 9 に示したように、短期的な効果だけを検討した場合には見逃されてしまう、しかし4 亜群の違いを明らかにする上で重要な、ストレスの長期的あるいは遅発的な効果を、本研究は明らかにすることができた。今後の前臨床研究(ラットやマウスのうつ病モデル研究)では、本研究のよう

な長期的な行動モニタリングは必ず必要となるだろう。そしてそれが真にトランスレショナルな価値を有した研究に近づく王道である、と言える。

#### 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2件)

1. Iguchi, Y., Kosugi, S., Lin, Z., Nishikawa, H., Minabe, Y., & Toda, S. (2015) Pre-stress performance in an instrumental training predicts post-stress behavioral alterations in chronically stressed rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9 (119), 1-13. (査読有)

2. Iguchi, Y., Kosugi, S., Nishikawa, H., Lin, Z., Minabe, Y., & Toda, S. (2014). Repeated exposure of adult rats to transient oxidative stress induces various long-lasting alterations in cognitive and behavioral functions. *PLoS ONE*, 9(12): e114024. (査読有)

[学会発表](計10件)

1. Iguchi, Y., Lin, Z., Nishikawa, H., Minabe, Y., & Toda, S. (2014). Facilitated or delayed habit formation of appetitive instrumental learning in each subject of Sprague-Dawley rats. *The 8th research area meeting Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas: Elucidation of the Neural Computation for Prediction and Decision Making*, December 11, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan.

2. Iguchi, Y., Lin, A., Nishikawa, H., Kosugi, S., Minabe, Y., & Toda, S. (2014). Repeated mild oxidative stress favors habits over goal-directed action in instrumental learning: Effects of 2-cyclohexne-1-one on behaviors associated with the dopaminergic system in rats. *The 74th annual meeting of Japanese society for animal psychology*, July 19-21, Aichi (Inuyama), Japan.

3. Iguchi, Y., Kosugi, S., Minabe, Y., & Toda, S. (2014). Individual differences in pre-stress state predict distinct responses to chronic unpredictable stress in rats. *The 7th research area meeting Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas: Elucidation of the Neural Computation for Prediction and Decision Making*, June 6-8, Media Center & Kyushu Institute of Technology, Fukuoka, Japan.

4. 井口善生・戸田重誠. (2014). コカイン行動感作形成における酸化ストレスの役割. 新学術領域「マイクロ精神病態」若手交流研究会. 2月13-14日, 磯部ガーデン, 群馬.

5. Iguchi, Y., Kosugi, S., Minabe, Y., & Toda, S.

(2013). Individual differences in pre-stress state predict distinct responses to chronic unpredictable stress in rats. *43th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience 2013)*, November 9-13, San Diego, CA, USA.

6. Iguchi, Y., Kosugi, S., Minabe, Y., & Toda, S. (2013). Individual differences in pre-stress state predict distinct responses to chronic unpredictable stress in rats. *12th Annual MCCS Meeting*, November 7-8, San Diego, CA, USA.

7. 井口善生・小杉桜子・三邊義雄・戸田重誠. (2013). 道具的行動の遂行パタンの個体差は短期的/長期的な慢性ストレス反応性の違いを予測する. 第22回海馬と高次脳機能学会. 10月12-13日, 湯涌創作の森, 石川.

8. Iguchi, Y. (2013). Individual differences in instrumental performance in naïve rats predicts distinctive responses to chronic stress. 新学術領域「マイクロ精神病態」班会議. 8月28-30日, ホテル名古屋ガーデンパレス, 愛知.

9. Iguchi, Y., Kosugi, S., Minabe, Y., & Toda, S. (2013). Individual differences in instrumental performance in naïve rats predict distinctive responses to chronic unpredictable stress. *Neuro2013 (The 36th annual meeting of the Japan neuroscience society)*, June 20-23, Kyoto, Japan.

10. Iguchi, Y., Kosugi, S., Minabe, Y., & Toda, S. (2013). Individual differences in instrumental performance in naïve rats predict distinctive response to chronic unpredictable stress. *The 6th MCCS (Molecular Cellular Cognition Society) Asia Symposium*. June 19, Kyoto, Japan.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

特記事項なし

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

井口 善生 (IGUCHI, Yoshio)  
金沢大学・医学系・博士研究員  
研究者番号: 20452097

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし