

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：30110

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861027

研究課題名(和文) 不安障害における情動制御機能異常の神経基盤解析

研究課題名(英文) The neurobiological basis of anxiety disorder focusing on emotional regulation

研究代表者

鹿内 浩樹 (SHIKANAI, Hiroki)

北海道医療大学・薬学部・助教

研究者番号：00632556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、不安障害、特に社交性不安障害の根底に存在する生物学的な神経基盤を明らかにすることを目的として、行動薬理学的ならびに電気生理学的な解析を試みた。社会的敗北ストレスを負荷することにより、社交性不安障害モデル動物の作製に成功した。このモデル動物が示す社会性不安に関連した行動異常は、選択的セロトニン再取り込み阻害薬 fluoxetine の慢性投与により改善された。さらに電気生理学的解析により、内側前頭前野(mPFC)における5-HT1A受容体の機能低下が認められた。すなわち、社交性不安障害が発症する機序には、mPFCの5-HT1A受容体の機能異常の関与が考えられた。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we attempted to determine the neurobiological basis of anxiety disorder. First, we revealed that chronic social defeat stress impaired social anxiety of mice. Moreover, serotonin 5-HT1A receptor agonist, 8-OH DPAT, did not produce anxiolytic action in social defeated mice. However, chronic administration of serotonin reuptake inhibitor, fluoxetine, improved social anxiety induced by chronic social defeat stress. In the electrophysiological experiments, pyramidal cells in layer V of the medial prefrontal cortex (mPFC) did not show the hyperpolarization elicited by 5-HT1A receptor stimulation, indicating that chronic social defeat stress induced 5-HT1A receptor dysfunction in the mPFC. In future experiment, we need to reveal which the change pattern of 5-HT1A receptor dysfunction is quantitative and/or qualitative dysfunction.

研究分野：神経薬理学

キーワード：社交性不安障害 神経科学 内側前頭前野 セロトニン 5-HT1A受容体 行動薬理学 電気生理学

1. 研究開始当初の背景

昨今の若年層に見られる現代日本の社会的問題として、「対人関係をうまく構築することができない」という事例が挙げられる。これは、人間社会の集団の中で孤立を生み出し、ひいては「引きこもり」や「自閉症」の引き金となりうる。精神医学的には、対人関係に由来するストレスに長時間曝露されることで生じる「社交性不安障害」という精神疾患が相当すると考えることができる。

この疾患の発症要因としては、双生児の研究から遺伝的因子の関与が示されているが、詳細は明らかではない。しかし前述のように、非遺伝的要因、すなわち環境要因によって引き起こされる可能性については明らかになりつつある。例えば、ストレスと不安障害の発症に関しては、ヒトを対象とした疫学的調査がされており、長期の精神的なストレスは不安障害発症のリスクを高める (Heim et al., 2001)。また、幼児期のストレス (育児放棄や虐待など) は、成長後の情動関連精神疾患の発症率を高める (Endo et al., 2005)。このようにストレス曝露と不安障害発症の因果関係が論じられているが、その発症メカニズムや脳神経の機能異常などの疾患病態生理に関しては未だ不明な点が多く、更なる研究が望まれている。

報告者はこれまでの実験で「正常動物を用いて行った実験」により、不安情動の表出という生理学的機能の解明に寄与してきた。しかし不安障害を患った状況下では、脳内の正常な情動制御機構が破綻している可能性が高く、疾患の発症メカニズムの解釈・考察に対してこれまでの研究結果を直接外挿することには問題がある。そこで報告者は、「不安障害モデル動物を確立・使用する」ことで、不安障害の病態生理・脳内神経回路機能異常を高い妥当性をもって解明し、将来的にはヒトの社交性不安障害の神経基盤解明を想定して、本研究を実施した。

2. 研究の目的

本研究では、まず行動薬理的解析による不安障害モデル動物の確立を目指して実施した。疾患モデルとしての妥当性が確認された後、情動調節機能と密接な関与が示唆されている皮質辺縁系の機能異常を、脳内神経細胞の受容体・イオンチャネルなどの機能異常など、細胞レベルで電気生理学的に解析した。

3. 研究の方法

(1) 不安障害モデル動物の確立

BALB/c マウス あるいは C57/B6N マウスを用いて疾患モデル動物の確立を試みた。これらのマウスに対して、個別飼育により攻撃性を高めた ICR マウスからの社会的敗北ストレス (social defeat ストレス) を 10 日間反復負荷した。2 匹のマウスを同一ケージに入れることで互いの物理的接触を可能にし、BALB/c マウスは ICR マウスからかみつ

撃を受けるなどの身体的ストレスに曝露した。5 分後、ケージ内に透明で通気性のよい敷居を設置し、両マウスを 24 時間物理的に隔離して飼育した。このとき、マウス同士の身体的接触はないものの、攻撃を仕掛けてきた ICR マウスの姿や匂いを受け、BALB/c マウスは精神的ストレスに曝露される。この一連のストレス負荷を 10 日間連続で行い、不安障害モデル動物としての妥当性を行動薬理的に追究した。

精神疾患モデル動物としての表面妥当性の検証には、以下の行動薬理的試験系を実施する。うつ様症状の評価系である sucrose preference 試験、不安情動の評価系である social approach avoidance 試験をそれぞれ実施した。

(2) 精神疾患治療薬投与による社交性不安行動への効果

モデル動物作成後に、抗不安薬が確認されている薬物、今回はセロトニン 5-HT_{1A} 受容体作動薬である 8-OH DPAT の急性投与を行う。また、情動に関連した精神疾患治療薬である imipramine ならびに fluoxetine の慢性投与を行い、social approach avoidance 試験における行動異常への影響を確認した。

(3) 皮質辺縁系における不安障害の病態生理の解明

先の行動薬理的検討において確立された不安障害モデル動物を用いて、情動制御に重要な脳部位、特に皮質辺縁系における機能的な異常を、電気生理学的検討により解析した。疾患モデル動物の脳から内側前頭前野 (medial prefrontal cortex: mPFC) を含む急性冠状断スライスを作製しスライスパッチクランプ法を用いて不安障害によって生じる神経細胞の機能変化を電気生理学的に追究した。

4. 研究成果

(1) 疾患モデル動物の作製・評価

BALB/c マウスに対し、ICR マウスからの social defeat ストレス (5 日間 × 3 セット) を負荷したが、先行研究 (Uchida et al., 2011) が再現されなかった。これは aggressor となる ICR マウスの攻撃性が飼育環境により微妙に異なることに起因すると考えられる。そのため、今後遺伝子改変動物を導入することも視野に入れて、defeat を受けるマウスを BALB/c マウスから C57/B6N マウスに変更して実験を行った。

抑うつ状態を評価する sucrose preference 試験を行ったところ、対照群と defeat 群の sucrose 摂取量の間には有意な差は認められなかった。すなわち、本研究で作製された疾患モデル動物は、うつ様行動を示さない動物であることが示された。

マウスは新奇環境ならびに新奇物質 (あるいは個体) に対しては一定の好奇心を抱き、探

索行動や積極的な接触を試みる。しかし同時に、新奇のものに対する不安が好奇心との間でせめぎ合う (Krishnan et al., 2007)。この性質を利用して社会的な不安状態を評価する social approach avoidance 試験では、defeat 群の新奇個体への接触時間 (contact time) を対照群と比較すると、有意に低い値を示した。この行動異常は、defeat 負荷 4 週間後においても維持されていた。すなわち、本研究で作製された疾患モデル動物は、対個体に対する社会的な不安が増強されていることが示された。これは、マウスのもつ社会性が破綻していることを示唆する結果であり、報告者は今回の作製された疾患モデル動物が「社交性不安障害」モデル動物として高い妥当性を有すると解釈した。

(2) 精神疾患治療薬投与による不安行動への効果

脳内セロトニン 5-HT_{1A} 受容体に作用する薬物は抗不安効果を示すことが古くから知られている (Tanaka et al., 1995)。すなわち、不安情動の制御には 5-HT_{1A} 受容体が重要であると考えられる。そこで本研究では、5-HT_{1A} 受容体に対する full agonist 試薬である 8-OH DPAT (1, 10, 100 μg/kg, i.p.) を急性投与した。その結果、対照群には用量依存的に抗不安効果が認められた。しかし defeat 群ではいずれの用量においても抗不安効果が認められなかった (図 1)。すなわち、defeat 群の脳内では 5-HT_{1A} 受容体の機能異常が生じている可能性が示された。

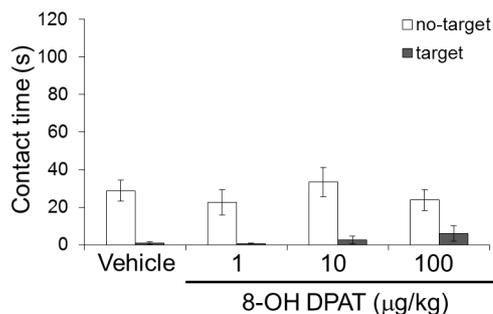


図 1: Social defeat ストレス負荷により表出するマウス社交性不安行動に対する 8-OH DPAT 急性投与の影響。

また、臨床ではうつ病や不安障害など情動制御機能の異常に起因する精神疾患に対して、抗うつ薬の慢性投与が行われている。本研究では、三環型抗うつ薬である imipramine (20 mg/kg, i.p.) および選択的セロトニン再取り込み阻害薬である fluoxetine (10 mg/kg, i.p.) の 2 週間連続投与を行い、social defeat ストレス負荷によるマウス社交性不安行動への影響を解析した。その結果、imipramine (20 mg/kg, i.p.) の慢性投与では、社交性不安行動の改善は認められなかった。一方、fluoxetine (10 mg/kg, i.p.) の慢性投与

により social approach avoidance 試験における contact time の増加が認められた (図 2)。この結果は、fluoxetine の慢性投与が社交性不安障害の治療薬となり得ることを示唆するものであった。

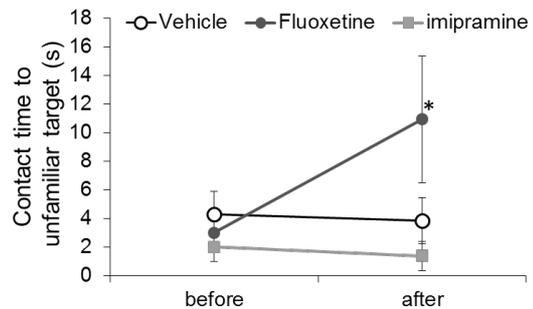


図 2: Social defeat ストレス負荷により表出するマウス社交性不安行動に対する fluoxetine ならびに imipramine 慢性投与の影響。*P<0.05 compared to “before fluoxetine” group.

(3) 皮質辺縁系における不安障害の病態生理の解明

先の行動薬理学的実験では、social defeat ストレスの負荷によりマウス脳内 5-HT_{1A} 受容体に異常が生じている可能性が示された。そこで defeat 群の 5-HT_{1A} 受容体機能異常を解析するために、whole cell patch clamp 法を用いた電気生理学的実験を行った。

5-HT_{1A} 受容体は Gi タンパク質に共役している。そのためリガンドが結合すると、K⁺ チャンネルが開閉し、細胞膜電位が過分極することが知られている (Béïque et al., 2004)。そこで、mPFC 第 V 層錐体細胞にガラスパッチ電極を当て、5-HT_{1A} 受容体刺激による膜電位変化を解析した。その結果、対照群の脳から得られた錐体細胞膜電位は、8-OH DPAT (10 μM) の灌流投与により約 -3 mV 過分極した。一方で、defeat 群から得られた錐体細胞の膜電位はほとんど過分極せず、細胞膜電位変化の有意な減弱が認められた (図 3)。すなわち、social defeat ストレスの負荷により mPFC 錐体細胞上に存在する 5-HT_{1A} 受容体に機能的な異常が生じていることが電気生理学的に明らかとなった。

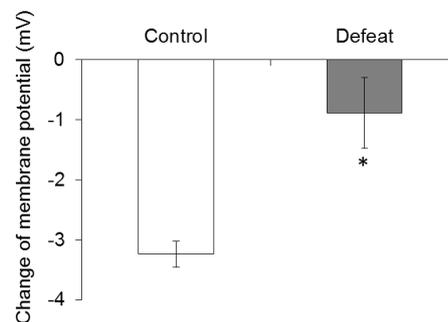


図 3: 5-HT_{1A} 受容体作動薬灌流投与による mPFC 第 V 層錐体細胞膜電位の変化。*P<0.05 compared to control group.

以上の実験を総合的に解釈すると、社会的敗北ストレスは、マウスにおける社交性不安障害様の行動を誘発させ、またその神経メカニズムとして mPFC 第 V 層錐体細胞における 5-HT_{1A} 受容体の機能異常が関与していることが推察された。

今後は、この錐体細胞における 5-HT_{1A} 受容体の機能異常が、受容体数減少による「量的」な異常であるのか、受容体機能低下による「質的」な異常であるのか、を解明する必要がある。

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 3 件)

- 1) Inoue S, Shikanai H*, Matsumoto M, Hiraide S, Saito Y, Yanagawa Y, Yoshioka M, Shimamura K, Togashi H. Metaplastic regulation of the median raphe nucleus via serotonin 5-HT_{1A} receptor on hippocampal synaptic plasticity is associated with gender-specific emotional expression in rats. *J Pharmacol Sci*. 査読あり, 124(3):394-407 (2014) *corresponding author
DOI: 10.1254/jphs.13237FP
- 2) Shikanai H, Hiraide S, Kamiyama H, Kiya T, Oda K, Goto Y, Yanagawa Y, Shimamura K, Goda Y, Togashi H. Subanalgesic ketamine enhances morphine-induced antinociceptive activity without cortical dysfunction in rats. *J Anesth*. 査読あり, 28(3):390-398 (2013)
DOI: 10.1007/s00540-013-1722-5.
- 3) Shikanai H, Kimura S, Togashi H. Early life stress affects the serotonergic system underlying emotional regulation. *Biol Pharm Bull*. 査読あり, 36(9):1392-1395 (2013)
DOI: 10.1248/bpb.b13-00337

[学会発表](計 13 件)

- 1) 根深真央、鹿内浩樹、大橋敦子、島村佳一、内側前頭前野第 V 層錐体細胞の分類と 5-HT_{1A} 受容体の性差の検討、第 62 回北海道薬学大会、2015 年 5 月 16 日~17 日、札幌コンベンションセンター(札幌)
- 2) 山崎あや、鹿内浩樹、平出幸子、富樫廣子、島村佳一、発達臨界期の性ホルモン擾乱は成熟後皮質辺縁系セロトニン神経の異常を引き起こす、第 62 回北海道薬学大会、2015 年 5 月 16 日~17 日、札幌コンベンションセンター(札幌)
- 3) 平田智子、鹿内浩樹、大橋敦子、島村佳一、社交性不安障害の神経基盤解明に向

けた行動薬理的検討、第 62 回北海道薬学大会、2015 年 5 月 16 日~17 日、札幌コンベンションセンター(札幌)

- 4) 鹿内浩樹、井上純孝、山崎あや、根深真央、平田智子、平出幸子、富樫廣子、島村佳一、発達臨界期の性ホルモン擾乱が引き起こす成熟後皮質辺縁系モノアミン神経の異常、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 25 日~28 日、神戸サンボ-ホール(神戸)
- 5) 鹿内浩樹、松崎広和、井上純孝、平出幸子、柳川芳毅、吉岡充弘、島村佳一、富樫廣子、情動応答における性差に及ぼす発達臨界期の情動ストレスと性ホルモンの影響、第 44 回日本神経精神薬理学会、2014 年 11 月 20 日~22 日、名古屋国際会議場(名古屋)
- 6) 井上純孝、松本真知子、鹿内浩樹、柳川芳毅、平出幸子、齋藤靖弘、島村佳一、富樫廣子、情動ストレス応答における性差の神経科学的基盤、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 27 日~30 日、熊本市総合体育館(熊本)
- 7) 井上純孝、松本真知子、鹿内浩樹、平出幸子、齋藤靖弘、柳川芳毅、島村佳一、富樫廣子、情動調節における性差と海馬シナプス可塑性、第 43 回日本神経精神薬理学会、2013 年 10 月 24 日~26 日、沖縄コンベンションセンター(沖縄)
- 8) 井上純孝、松本真知子、鹿内浩樹、平出幸子、齋藤靖弘、柳川芳毅、島村佳一、富樫廣子、情動ストレス応答における性差と正中縫線核-海馬セロトニン神経系、第 64 回日本薬理学会北部会、2013 年 9 月 13 日、大雪クリスタルホール(旭川)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(なし)

取得状況(なし)

[その他]

ホームページ

<http://www3.hokui-ryou-u.ac.jp/courses/1/013/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鹿内 浩樹 (SHIKANAI, Hiroki)

北海道医療大学・薬学部・助教

研究者番号：00632556

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし