

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460304

研究課題名(和文)統合失調症の発現過程にオキシトシンはどのように関与するのか

研究課題名(英文)How does oxytocin participate in an onset of schizophrenia process?

研究代表者

村井 恵良 (MURAI, Yoshinaka)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：40322820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症発現に関与する前頭前野、腹側被蓋野、扁桃体ニューロンからホールセル記録を行い、自発性の興奮性及び抑制性シナプス後電流(mEPSCs/mIPSCs)を記録して各電流の振幅と発火頻度に対するオキシトシン(OXT)の作用を検討した。前頭前野ニューロンでは、OXT投与によりmEPSCsの発火頻度のみが促進され、振幅及びmIPSCsに対する影響はなかった。腹側被蓋野と扁桃体ニューロンでは、OXT投与でmIPSCsの発火頻度のみが促進され、振幅とmEPSCsに対する影響はなかった。本研究結果より、統合失調症の陰性症状と陽性症状に対するOXTの改善効果が期待できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Prefrontal cortex (PFC), ventral tegmental area (VTA), and amygdala (AMG) neurons participate in an onset of schizophrenia process. We recorded miniature- excitability and inhibitory postsynaptic currents (mEPSCs/mIPSCs) from these neurons by whole cell patch-clamp recording, and examined the effect of oxytocin (OXT) on the amplitude and the frequency of each PSCs. On the recordings from PFC neurons, only the frequency of mEPSCs was increased by the OXT treatment, but there were no effect both on the amplitude of mEPSCs and the mIPSCs. On the recordings from VTA and AMG neurons, only the frequency of mIPSCs was increased by the OXT treatment, but there were no effect both on the amplitude of mIPSCs and the mEPSCs. It was suggested that the improvement effect of OXT on a negative and a positive symptom of schizophrenia was expected in this experiment.

研究分野：神経生理学

キーワード：統合失調症 オキシトシン シナプス パッチクランプ法

1. 研究開始当初の背景

(1) 精神機能障害と呼ばれているものは多種多様あり、特に代表的なものとして統合失調症や躁うつ病などがある。統合失調症は陽性症状(精神運動興奮、幻覚、妄想など)と陰性症状(感情鈍麻、意欲欠如、摂食障害など)に分けられ、特に腹側被蓋野(VTA)ドーパミン(D2)作働性ニューロンの過活動が陽性症状の原因と考えられている(ドーパミン仮説)。また、VTAから扁桃体(AMG)に投射するドーパミン作働性ニューロンの出力経路が陽性症状と関係し(Fibiger, 1991)、前頭前野(PFC)の活動低下がVTAドーパミンニューロンの過活動に関与していると考えられている(Jackson et al., 2001)。一方、陰性症状はPFCの活動低下により生じると考えられている(Hill K. et al., 2004)。このように、ドーパミンと統合失調症の相関性は高く、統合失調症の発生機序を説明する上で、「ドーパミン仮説」が現在最も有力であるが、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体拮抗薬であるフェンサイクリジンが統合失調症様の精神症状(陽性症状、陰性症状、認知障害)を示すことから、NMDA受容体機能低下による「グルタミン酸作働性神経系機能低下仮説(NMDA受容体機能低下仮説)」も提唱されている(Krystal et al., 2002) [図1参照]。以上のように統合失調症の症状と神経活動を完全に対応づけることは難しく、統合失調症がどのような脳内メカニズムで引き起こされているのか未だ不明な点が多い。

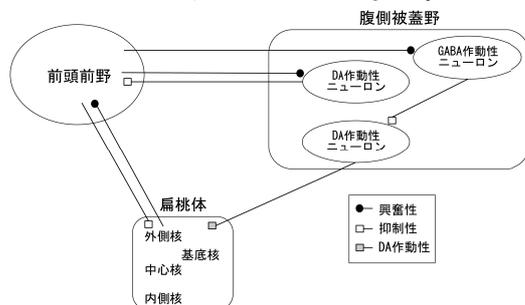


図1 統合失調症発生のメカニズム

(2) オキシトシン(OXT)を放出するニューロンは脳内のあらゆる箇所へ直接投射しており、特にVTAやAMGにOXT受容体が豊富にあることが報告されている(Yoshimura et al., 1993; Freundmercier et al., 1994) [図2参照]。

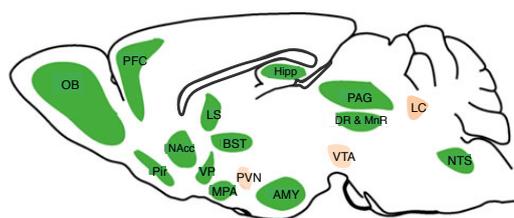


図2 ラット脳におけるオキシトシン(OXT)受容体発現部位

(3) OXTがPFCにおける神経伝達物質放出過程に関与するとの報告(Ninan, 2011)、OXTがAMGに作用すると信頼感が上昇して恐怖感が減少するという報告(Viviani et al., 2011)やOXT点鼻薬が統合失調症患者の社会認知障害を改善するとの報告(Davis MC. et al., 2013)もあり、OXTが統合失調症、うつ病、及び自閉症などの発生機序に関与する可能性が示唆されているが、これらの作用機序に関しては未だ不明な点が多い。以上より、統合失調症発現過程の一つとして考えられるPFCでのグルタミン酸作働性神経系機能低下によって引き起こされる過程(VTAのドーパミン作働性ニューロンの活動低下及びGABA作働性ニューロンの活動低下が生じることで統合失調症症状が発生する過程)にOXTがどのように作用するのかを検討することで、OXTによる統合失調症症状改善のメカニズムが明らかになると考え本研究計画の着想に至った。

2. 研究の目的

統合失調症は、PFC、VTA、及びAMGにおけるニューロンの活動及びモノアミン(ドーパミンやセロトニン)分泌が正常時と異なるために発現すると考えられている。また、有病率1%と非常に高い頻度で生じ、進行・慢性化も起こり易いため、より副作用の少ない治療薬開発が望まれている精神疾患の一つでもある。近年、ラットにOXT投与すると信頼感が上昇して恐怖感が減少するという報告(Viviani et al., 2011)や、統合失調症患者にOXT点鼻薬を持続投与すると患者の社会認知障害が改善される可能性が示唆され(Davis MC. et al., 2013)、OXTが統合失調症新規治療薬の一つとして注目されている。しかしながら、これらの報告においてOXTの作用機序は未だ不明な点が多い。本研究は、ラットPFC、VTA、及びAMGにおけるニューロン活動及びモノアミン分泌に対するOXT作用を検討し、OXT及びその関連物質の統合失調症新規治療薬及び治療補助薬としての可能性を探ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 成熟ウィスター系ラット、及び統合失調症モデルラット(アンフェタミン逆耐性ラット、あるいはフェンサイクリジン慢性投与ラット)のPFC、VTA、及びAMGを含むスライス標本(厚さ250~350µm)を主な対象とする。麻酔下に対象動物の脳を摘出し、冷却した人工脳脊髄液(4~8°C)中で、ピプラトーム(Campden 7000smz)を用いてスライス標本を作製する。

(2) 薄切スライス標本の目的領域(PFC、VTA、及びAMG)から機械的細胞単離装置を用いて単一ニューロンを機械的に単離することにより、それぞれの単一ニューロン細胞体に微小神経終末が付着したシナプスブトン標本

を作製する。この標本を用いることにより、細胞体レベルでのシナプスブトンからの自発性シナプス後電位・電流[sPSP・sPSC]が記録できる。また、細胞外液で満たしたシーターガラス電極を単一シナプスブトンに近接させて電気刺激することで、誘起シナプス後電位・電流[ePSP(C)]の記録ができる。

(3) 機械的単離ニューロン及びスライス組織内のニューロンより whole-cell パッチクランプ法または微小ガラス電極法を用いて細胞内記録を行う。記録ニューロンにおいて、静的・動的膜特性、OXT の直接作用 [OXT 灌流投与で発生する膜電位 (電流) 変化]、及び OXT のシナプス電位 (電流) に及ぼす作用 [誘起性あるいは自発性興奮性/抑制性シナプス後電位 (電流) に対する効果] を検討する。ePSP (C) 記録は、記録細胞近傍の入力線維を局所電気刺激して行う。

(4) 細胞内記録電極内液の 2M K-acetate (K-gluconate) に 2% (0.2%) biocytin を溶解したものを用いて、電位・電流記録中に記録細胞内に biocytin を注入し、実験終了後にスライス標本を固定・染色して記録細胞の形態を組織科学的に検討する。

4. 研究成果

(1) PFC を含むスライス (350 μm) を作製後、機械的単離法を用いて PFC 第 II ~ III 層ニューロンの単離ニューロンを作製し、whole-cell パッチクランプ法を用いて OXT の膜電位 (電流) に対する直接作用を検討した。OXT 投与による膜電位変化はほとんど観察されなかったことより、PFC ニューロンの静的な膜電位に対する OXT の直接作用はないことが示唆された。次に、シナプス電位 (電流) に対する OXT 作用を検討した。単離ニューロンからは自発性のシナプス後電流 (mPSCs) が記録されたが、この電流は GABA 受容体アンタゴニスト (Bicuculline) 感受性の抑制性シナプス後電流 (mIPSCs) であり、グルタミン酸 (AMPA/KA, NMDA) 受容体アンタゴニスト (CNQX, AP5) 感受性の自発性の興奮性シナプス後電流 (mEPSCs) はほとんど記録されなかった。OXT 投与により mIPSCs の振幅 (Amplitude) と発火頻度 (Frequency) はほとんど影響を受けなかった。mEPSCs がほとんど記録されなかった理由は、細胞体近傍には抑制性ニューロンの神経終末が多く存在し、一方、興奮性ニューロンの神経終末は細胞体近傍には少なく、樹状突起に多く存在することが知られており、おそらく単離ニューロンの樹状突起が物理的に短かったことが影響したのかもしれない。

(2) PFC 第 II ~ III 層ニューロンから whole-cell スライスパッチクランプ法を用いて OXT 灌流投与で発生する膜電位 (電流) 変化を記録した結果、膜電位はほとんど変化

しなかった。PFC スライスニューロンからは mEPSCs と mIPSCs の両方の電流が記録された。OXT の mEPSCs に対する効果を検討した結果、OXT 投与で mEPSCs の Amplitude はほとんど変化しなかったが、Frequency が有意に促進された ($p < 0.05$)。この OXT による mEPSCs の Frequency 促進作用は OXT の選択的阻害薬 (L-368,899) を前投与すると消失した (図 3 参照, $n = 5$)。以上より、PFC ニューロンに入力するグルタミン酸作動性ニューロンの神経終末からのグルタミン酸放出頻度は前シナプス性に OXT により促進されることが示唆された。

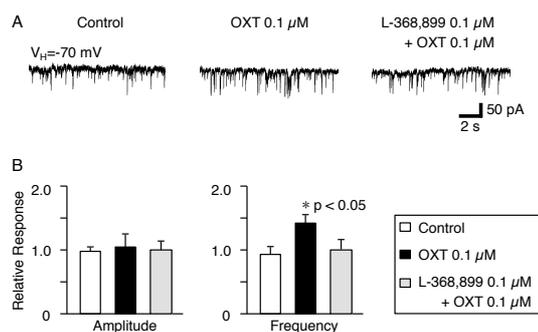


図 3 前頭前野における mEPSCs に対する OXT の作用

OXT の mIPSCs に対する効果を検討した結果、OXT 投与で mIPSCs の Amplitude 及び Frequency はほとんど変化しなかった (図 4 参照, $n = 5$)。よって、PFC ニューロンに入力する GABA 作動性ニューロンには OXT は作用しないことが示唆された。

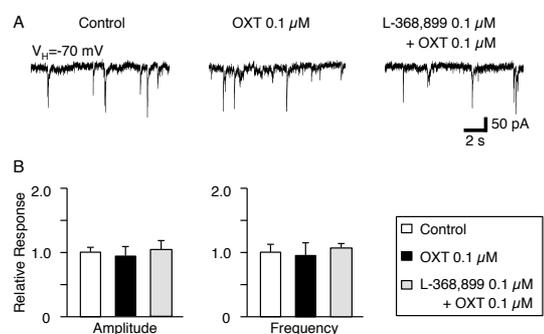


図 4 前頭前野における mIPSCs に対する OXT の作用

(3) VTA を含むスライス (350 μm) を作製後、機械的単離法を用いて単離ニューロンを作製し、whole-cell パッチクランプ法を用いて OXT の直接作用を検討した結果、OXT の膜電位 (電流) に対する作用はほとんど観察されなかった。VTA ニューロンの静的な膜電位に対する OXT の直接作用はないことが示唆された。シナプス電位 (電流) が記録されたが、mIPSCs のみで mEPSCs はほとんど記録されなかった。mIPSCs に及ぼす OXT の作用を検討した結果、Amplitude はほぼ変化しなかったが、Frequency の促進作用が観察された。

(4) VTA ニューロンから whole-cell スライスパッチクランプ法を用いて OXT 灌流投与で発

生ずる膜電位（電流）変化を記録した結果、膜電位はほとんど変化しなかった。次に、VTA スライスニューロンから記録される mEPSCs と mIPSCs に対する OXT の作用を検討した。OXT 投与により mEPSCs の Amplitude と Frequency はほとんど変化しなかったが、mIPSCs の Frequency は有意に促進され ($p < 0.05$)、Amplitude はほとんど変化しなかった。この OXT による mIPSCs の Frequency 促進作用は L-368,899 を前投与すると消失した (図 5 参照, $n = 5$)。以上より、VTA ニューロンに入力する GABA 作動性ニューロンの神経終末からの GABA 放出頻度は前シナプス性に OXT により促進されるが、グルタミン酸作動性ニューロンに OXT は作用しないことが示唆された。

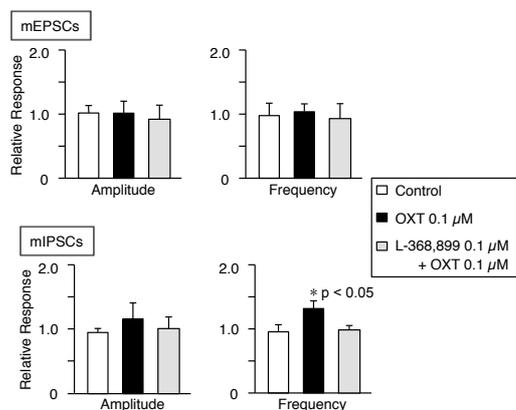


図 5 腹側被蓋野におけるシナプス応答に対する OXT の作用

(5) AMG を含むスライス (350 μm) を作製後、機械的単離法を用いて単離ニューロンを作製し、whole-cell パッチクランプ法を用いて OXT の直接作用を検討した。OXT の膜電位（電流）に対する作用は観察されなかった。AMG ニューロンの静的な膜電位に対する OXT の直接作用はないことが示唆された。シナプス電位（電流）が記録されたが、mIPSCs のみで mEPSCs はほとんど記録されなかった。mIPSCs に及ぼす OXT の作用を検討した結果、Amplitude はほぼ変化しなかったが、Frequency の促進作用が観察された。

(6) AMG ニューロンから whole-cell スライスパッチクランプ法を用いて OXT 灌流投与で発生する膜電位（電流）変化を記録した結果、膜電位はほとんど変化しなかった。AMG スライスニューロンから記録された mEPSCs と mIPSCs に対する OXT の作用を検討した結果、OXT 投与により mEPSCs の Amplitude と Frequency はほとんど変化しなかった。一方、mIPSCs の Frequency が OXT 投与で有意に促進され ($p < 0.05$)、Amplitude はほとんど変化しなかった。この OXT による mIPSCs の Frequency 促進作用は L-368,899 を前投与すると消失した (図 6 参照, $n = 5$)。以上より、AMG ニューロンに入力する GABA 作動性ニュー

ロンの神経終末からの GABA 放出頻度は前シナプス性に OXT により促進されるが、グルタミン酸作動性ニューロンに OXT は作用しないことが示唆された。

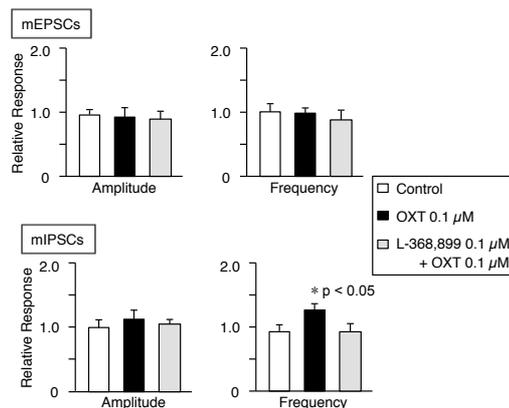


図 6 扁桃体におけるシナプス応答に対する OXT の作用

(6) 本研究結果より、統合失調症発現の原因として考えられている PFC におけるグルタミン酸作動性ニューロンの機能低下により生じる陰性症状が OXT 投与で改善する可能性、さらには VTA の GABA 作動性ニューロンの活動低下により AMG ニューロンが過興奮するために発現する陽性症状に対しても OXT 投与による改善効果が期待できることが示唆された。さらなる研究が必要ではあるが、OXT 及び OXT 関連物質が統合失調症新規治療薬や治療補助薬として将来的に臨床的使用が可能かどうかを探るといふ本研究の目的は一部達成できたと思われる。今後は引き続き、統合失調症モデルラットを用いた病態モデルにおける OXT 作用の解明、OXT 受容体サブタイプ (OX₁R, OX₂R) の特定や細胞内情報伝達系 (cAMP 調節系、PLC-IP₃-PKC 経路など) の解明を行っていきたいと考えている。

<引用文献>

- ① Fibiger H. C. Dopaminergic-cholinergic interactions in the striatum. *Jpn. Psychiatry Neurol.* 1991, 45(2): 512
- ② Jackson M. E., Frost A. S., and Moghaddam B. Stimulation of prefrontal cortex at physiologically relevant frequencies inhibits dopamine release in the nucleus accumbens. *J. Neurochem.* 2001, 78(4): 920-923
- ③ Hill K., Mann L., Laws K. R., Stephenson C. M., Nimmo-Smith I., and McKenna P. J. Hypofrontality in schizophrenia: a meta-analysis of functional imaging studies. 2004, 110(4): 243-256
- ④ Krystal J. H., Anand A., and Moghaddam B. Effects of NMDA receptor antagonists: implications for the pathophysiology of schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry.* 2002, 59(7): 663-664

- ⑤ Yoshimura R., Kiyama H., Kimura T., Araki T., Maeno H., Tanizawa O., and Tohyama M. Localization of oxytocin receptor messenger ribonucleic acid in the rat brain. *Endocrinol.* 1993, 133(3): 1239-1246
- ⑥ Freundmercier M. J., Stoeckel M. E., and Klein M. J. Oxytocin receptors on oxytocin neurons: histoautoradiographic detection in the lactating rat. *J. Physiol.* 1994, 480(Pt 1): 155-161
- ⑦ Ninan I. Oxytocin suppresses basal glutamatergic transmission but facilitates activity-dependent synaptic potentiation in the medial prefrontal cortex. *J. Neurochem.* 2011, 119(2): 324-331
- ⑧ Viviani D., Charlet A., van den Burg E., Robinet C., Humi N., Abatis M., Magara F., and Stoop R. Oxytocin selectively gates fear responses through distinct outputs from the central amygdala. *Science* 2011, 333(6038): 104-107
- ⑨ Davis M. C., Lee J., Horan W. P., Clarke A. D., McGee M. R., Green M. F., and Marder S. R. Effects of single dose intranasal oxytocin on social cognition in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 2013, 147(2-3): 393-397

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：

国内外の別：

[その他]
 ホームページ等
<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/physiol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村井 恵良 (MURAI, Yoshinaka)
 久留米大学・医学部・准教授
 研究者番号：40322820

(2) 研究分担者

田中 永一郎 (TANAKA, Eiichirou)
 久留米大学・医学部・教授
 研究者番号：80188284

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()