

平成21年5月15日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591333  
 研究課題名（和文）扁桃体を介した情動ストレスの神経化学的機序から気分障害の病態・発症機序を解明する  
 研究課題名（英文）A study to clarify the pathogenesis of mood disorders based on the neurochemical mechanism of emotional stress in the amygdala  
 研究代表者  
 井上 猛 (INOUE TAKESHI)  
 北海道大学・北海道大学病院・講師  
 研究者番号：70250438

研究成果の概要：情動ストレスの動物モデルを用いて、抗不安・抗うつ薬である選択的セロトニン(5-HT)再取り込み阻害薬(SSRI)の作用機序解明を行った。SSRIの効果は5-HT<sub>1A</sub>受容体のアゴニストとアンタゴニスト、新規抗うつ薬 mirtazapine の併用により増強することを見いだした。情動ストレスからの回復過程（消去）にラット脳扁桃体の一部（基底核と呼ばれる）が重要な役割をはたしていることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：気分障害、恐怖条件付け、神経科学、ストレス、扁桃体、セロトニン、選択的セロトニン再取り込み阻害剤(SSRI)

## 1. 研究開始当初の背景

気分障害の発症、病態、症状増悪において情動ストレスが重要な役割をはたしていることは臨床的に周知の事実であり、情動ストレスの脳への影響を研究することは気分障害の発症、病態、症状増悪の機序の解明につながると思われる。不安・恐怖などの情動ストレスに関する神経科学的研究が近年急速に進み、扁桃体-視床背内側核-前頭前野-扁桃体の神経回路 (Yakovlev 回路) と海馬、中隔が情動ストレスに関与し、とりわけ扁桃体が必須の役割をはたしていることが多くの脳局所破壊実験により明らかになった

(LeDoux JE)。さらに、これらの動物実験の結果から発展し、最近ヒトを対象とした functional MRI や PET 研究により扁桃体が不安・恐怖などの情動ストレスに深く関与していることが証明された。しかし、扁桃体内の様々な神経伝達物質や細胞内情報伝達系の情動ストレスにおける役割はまだ十分に解明されていない。

研究代表者はこれまで十数年以上にわたり、心理的ストレスである conditioned fear stress model (CFS、恐怖条件付けストレスモデル) を用いて、CFS の際の神経伝達物質、転写因子の変化を扁桃体で詳細に検討し、論

文として発表してきた。その結果、1)CFS による不安行動(すくみ行動)を選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)全身投与が減弱すること、2)CFS によって扁桃体のセロトニン及びドパミン神経伝達と転写因子である c-Fos 蛋白発現が亢進すること、3)扁桃体破壊と扁桃体への SSRI 局所投与が不安行動を抑制すること、4)SSRI は CFS による c-Fos 発現を抑制すること、を明らかにした。これらの結果から、SSRI の情動に対する効果が扁桃体の神経活動に対する抑制作用を介しているという結論を得た。米国の LeDoux JE、Fanselow M、Maren S、Davis M らの研究者らは CFS におけるグルタミン酸の役割を脳局所投与実験によって明らかにしてきたが、情動ストレスにおける扁桃体セロトニンの機能的役割についてはこれまで報告がなく、我々の報告が初めてのものであり、我々の研究はこの領域においては国際的にも先端的である。

一方、SSRI は気分障害の治療に広く用いられ、情動ストレスに拮抗する効果が想定されているにもかかわらず、その気分障害に対する臨床効果の作用機序はまだほとんど解明されていないのが現状である。上述したように、すでに CFS モデルにおいて SSRI の情動ストレスに対する作用機序が解明されてきていることから、本モデルを用いて SSRI の作用機序解明をすすめることは臨床的に非常に有意義なことである。さらに、上述したように不安などの情動発現に扁桃体が必須の役割をはたしていることが明らかになっており、扁桃体において解明された情動のメカニズムに基づいて、SSRI の情動に対する作用機序の解明を本研究では目指したい。

## 2. 研究の目的

以上の研究背景から、本研究では下記のテーマについて種々の行動薬理・神経化学的研究を行う。

(1)CFS に対する SSRI の抗不安作用が種々のセロトニン受容体アンタゴニストにより拮抗されるかどうかを検討し、SSRI の作用を介しているセロトニン受容体サブタイプを明らかにする。また、細胞内情報伝達系のうちセカンドメッセンジャー(cAMP)については、酵素阻害薬を全身投与して cAMP 濃度を増加させて、CFS による不安行動に対する効果および SSRI の抗 CFS 効果に対する影響について検討する。

(2)臨床における SSRI の効果増強の新たな可能性を探究する目的で、SSRI にセロトニン(5-HT)<sub>1A</sub> アゴニストや新規抗うつ薬の mirtazapine (NaSSA と呼ばれる)を併用し、SSRI の効果に及ぼす影響を検討する。

(3)扁桃体における転写因子の cAMP response element-binding protein (CREB)リン酸化を

指標としてラットの文脈的恐怖条件付けの消去過程における扁桃体の活動を検討する。

## 3. 研究の方法

(1)短時間(5分間)のフットショック・ストレス(床の金属グリッドに電流を流し、四肢に痛みを加えることにより負荷)をラットに負荷し、翌日ショック箱にフットショックを与えないで5分間再曝露することにより恐怖条件付けストレス(CFS)をラットに与える。フットショックを加えないでショック箱にラットを置く操作は痛み等の身体的刺激を含まないため、CFS は純粋な心理的ストレスあるいは情動ストレスとみなされる。通常探索行動が活発にみられる場面で、数分間以上にわたって、じっと身動きしない行動がすくみ行動と呼ばれる。すくみ行動を不安・恐怖の指標として用い、SSRI の抗不安作用を、種々のセロトニン受容体アンタゴニストや酵素阻害剤が抑制あるいは促進するかどうかを行動薬理的に検討する。

(2)(1)と同様に、CFS モデルを用いて、SSRI によるすくみ行動抑制効果に対して、tandospirone と mirtazapine の併用が及ぼす影響について行動薬理的に検討する。

(3)CFS において、フットショックの条件付け後、フットショックなしにショック箱にラットを繰り返し曝露していくと不安行動であるすくみ行動は徐々に出現しなくなる。この現象は心理学的には消去と呼ばれる。CFS によって扁桃体の様々な亜核で転写因子である CREB のリン酸化が亢進する。リン酸化 CREB の抗体を用いて、扁桃体を含む脳組織を免疫組織学的に染色し、CFS の消去過程における扁桃体亜核の活動性を比較検討する。

## 4. 研究成果

(1)SSRI の抗不安作用をセロトニン(5-HT)合成阻害剤の p-chlorophenylalanine (PCPA)は抑制し、5-HT<sub>1A</sub> 拮抗薬はむしろ増強した。その他の 5-HT 受容体サブタイプ(5-HT<sub>1B,1D,2A,2C,3,4,6,7</sub>)の拮抗薬は SSRI の抗不安作用を抑制しなかった。5-HT<sub>1A</sub> 拮抗薬による増強作用は 5-HT 作動性神経の起始核である縫線核 5-HT<sub>1A</sub> 受容体遮断による細胞外 5-HT 濃度増加作用に基づくものと解される。PCPA による抑制作用は SSRI の抗不安作用が細胞外 5-HT 濃度増加を介していることを示しているが、5-HT<sub>1A</sub> 受容体を含めた様々な 5-HT 受容体サブタイプのアンタゴニストの併用で SSRI の抗不安作用が阻害されなかったため、SSRI の抗不安作用がどの 5-HT 受容体サブタイプを介しているかは明らかとはならなかった。今後、今回検討していない 5-HT 受容体サブタイプの拮抗薬の効果、あるいは複数の受容体拮抗薬の併用の効果を検討し、SSRI の抗不安作用に關与する 5-HT 受容体

サブタイプを明らかにしていきたい。

SSRI の抗不安作用に關与する細胞内情報伝達系を明らかにする目的で、phosphodiesterase 阻害剤、5 $\alpha$ -reductase 阻害剤を SSRI に併用し、SSRI の抗不安作用に対する影響を検討した。両薬剤ともに SSRI の抗不安作用には影響を及ぼさなかった。したがって、cAMP の減少、neurosteroid 合成促進は SSRI の抗不安作用の作用機序の候補ではあるが、本研究の結果はこの可能性を支持する結果とはならなかった。

(2) SSRI である fluvoxamine と 5-HT<sub>1A</sub> アゴニストである tandospirone の併用は、CFS において相加的な抗不安作用を示した。Fluvoxamine による CytP450 阻害作用により tandospirone の血中濃度は併用時に増加した。新規抗うつ薬である mirtazapine は CFS で抗不安作用を示し、その作用は  $\alpha$ 2 受容体遮断作用を介している可能性が示唆された。また mirtazapine と SSRI との併用は相加的な抗不安作用を示した。

(3) ラットの文脈的恐怖条件付けの消去過程における、6つの扁桃体垂核の CREB リン酸化について免疫組織化学的に検討した。文脈的恐怖条件付けによる恐怖発現により6つの垂核のうち外側、基底、内側、皮質核の4つの垂核で CREB リン酸化の亢進がみられた。しかし、6つの垂核のうち基底核の CREB リン酸化のみが消去過程に伴い低下した。本研究の結果は扁桃体基底核の CREB リン酸化が文脈的恐怖条件付けの消去過程と密接な関連を有することを示唆している。

## 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 16 件)

- ① Boku S, Nakagawa S, Masuda T, Nishikawa H, Kato A, Kitaichi Y, Inoue T, Koyama T: Glucocorticoids and lithium reciprocally regulate the proliferation of adult dentate gyrus-derived neural precursor cells through GSK-3 $\beta$  and  $\beta$ -catenin/TCF pathway. *Neuropsychopharmacology* 34:805-815, 2009. 査読有
- ② Hashimoto S, Inoue T, Muraki I, Koyama T: Effects of acute citalopram on the expression of conditioned freezing in naive versus chronic citalopram-treated rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33:113-117, 2009. 査読有
- ③ Kakui N, Yokoyama F, Yamauchi M, Kitamura K, Imanishi T, Inoue T,

Koyama T: Anxiolytic-like profile of mirtazapine in rat conditioned fear stress model: Functional significance of 5-hydroxytryptamine 1A receptor and alpha1-adrenergic receptor. *Pharmacol Biochem Behav.* 92:393-8, 2009. 査読有

- ④ 井上 猛, 小山 司: 不安障害における扁桃体セロトニンの役割 (シンポジウム「脳科学による心身医学の解明」). *心身医学* 49: 291-297, 2009. 査読無
- ⑤ 井上 猛, 北市雄士, 小山 司: 難治性うつ病に対するドパミン作動薬の有用性. *臨床精神薬理* 12:831-838, 2009. 査読無
- ⑥ Muraki I, Inoue T, Koyama T: Effect of co-administration of the selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist WAY 100,635 and selective 5-HT<sub>1B/1D</sub> receptor antagonist GR 127,935 on anxiolytic effect of citalopram in conditioned fear stress in the rat. *Eur J Pharmacol.* 586:171-178, 2008. 査読有
- ⑦ Kitaichi Y, Inoue T, Izumi T, Nakagawa S, Tanaka T, Masui T, Koyama T: Effect of co-administration of a serotonin-noradrenaline reuptake inhibitor and a dopamine agonist on extracellular monoamine concentrations in rats. *Eur J Pharmacol.* 584:285-290, 2008. 査読有
- ⑧ Izumi T, Inoue T, Kato A, Kitaichi Y, Nakagawa S, Koyama T: Changes in amygdala neural activity that occur with the extinction of context-dependent conditioned fear stress. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 90: 297-304, 2008 査読有
- ⑨ Takahashi T, Oono H, Inoue T, Boku S, Kako Y, Kitaichi Y, Kusumi I, Masui T, Nakagawa S, Suzuki K, Tanaka T, Koyama T, Radford MH: Depressive patients are more impulsive and inconsistent in intertemporal choice behavior for monetary gain and loss than healthy subjects--an analysis based on Tsallis' statistics. *Neuro Endocrinol Lett.* 29:351-8, 2008. 査読有
- ⑩ Muraki I, Inoue T, Hashimoto S, Izumi T, Koyama T: Effect of different challenge doses after repeated citalopram treatment on extracellular serotonin level in the medial prefrontal cortex: In

vivo microdialysis study. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 62:568-574, 2008. 査読有

- ⑪ Nishikawa H, Inoue T, Masui T, Izumi T, Nakagawa S, Koyama T: Pharmacokinetic interaction between tandospirone and fluvoxamine in the rat contextual conditioned fear stress model and its functional consequence: Involvement of cytochrome P450 3A4. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 62: 591-596, 2008. 査読有
- ⑫ 新出泰士, 中島幸治, 北市雄士, 中川 伸、井上 猛、小山 司: SSRI・SNRI単剤にて寛解に至らなかった単極性うつ病患者における第二選択治療の有効性に関する調査研究. *臨床精神薬理* 11: 1887-1898, 2008. 査読有
- ⑬ 井上 猛、北市雄士、小山 司: SSRIの作用標的としての扁桃体. 特集「扁桃体—情動脳と社会脳」, *Clinical Neuroscience* 26: 422-424, 2008. 査読無
- ⑭ Nishikawa H, Inoue T, Masui T, Izumi T, Koyama T: Effects of cytochrome P450 (CYP) 3A4 inhibitors on the anxiolytic action of tandospirone in rat contextual conditioned fear. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31:926-31, 2007. 査読有
- ⑮ Nishikawa H, Inoue T, Izumi T, Koyama T: Synergistic effects of tandospirone and selective serotonin reuptake inhibitors on the contextual conditioned fear stress response in rats. *Eur Neuropsychopharmacol.* 17:643-650, 2007. 査読有
- ⑯ Kohno T, Shiga T, Toyomaki A, Kusumi I, Matsuyama T, Inoue T, Katoh C, Koyama T, Tamaki N: Effects of lithium on brain glucose metabolism in healthy men. *J Clin Psychopharmacol.* 27:698-702, 2007. 査読有

[学会発表] (計 24 件)

- ① 井上 猛: 不安障害における扁桃体セロトニンの役割 (シンポジウム). 第 49 回日本心身医学会総会 (2008.6.13, 札幌)
- ② 井上 猛: 恐怖条件付けにおける扁桃体セロトニンの役割 (シンポジウム). 第 29 回日本生物学的精神医学会、第 37 回日本神経精神薬理学会合同年会 (2007.7.11., 札幌)

[図書] (計 2 件)

- ① 井上 猛、小山 司: 難治性うつ病. 「気

分障害」(上島国利、樋口輝彦、野村総一郎、大野 裕、神庭重信、尾崎紀夫編集)、医学書院、東京、pp512-533, 2008.

- ② 井上 猛、小山 司: ドパミン・アゴニストと甲状腺剤の双極性障害治療への応用. 中山書店「専門医のための精神科臨床リユミエール: 双極性障害」、中山書店、東京、pp170-176、2008.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井上 猛 (INOUE TAKESHI)  
北海道大学・北海道大学病院・講師  
研究者番号: 70250438

### (2) 研究分担者

中川 伸 (NAKAGAWA SHIN)  
北海道大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号: 60360905

### (3) 連携研究者 なし