

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591372

研究課題名（和文） 衝動行為を見せる遺伝子改変マウスの薬物療法に関する研究

研究課題名（英文） Pharmacotherapy for impulsive behavior of SNAP-25 knock in mouse

研究代表者

鈴木 映二（SUZUKI EIJI）

国際医療福祉大学病院・大学病院・教授

研究者番号：60226496

研究成果の概要：SNAP-25 はシナプス前神経末端からの神経伝達物質の放出に、不可欠の蛋白質である。連携研究者の高橋らは SNAP-25 のリン酸化部位である Ser187 を Ala に置換したノックインマウスを作成した。このマウスは高所から飛び降りるなどの衝動行動や外傷性白内障をきたすまで自分の目を引っ掻いてしまうなどの自傷行為を示した。このマウスの衝動性を抑える目的で、胃の中にチューブを観血的に留置し各種向精神薬を急性投与あるいは慢性投与異常行動が抑制されるかどうかを調査した。しかし、現時点では、いずれの薬物も急性もしくは慢性投与において、マウスの行動に明らかな変化をもたらすことはなかった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：SNAP25、ノックインマウス、神経伝達物質、向精神薬、明暗テスト、キンドリング、蕨波

## 1. 研究開始当初の背景

近年、うつ病の薬物療法は大幅に進歩してきたと言えるが、その一方で、自殺による死亡者が年々増加し、国内総生産の損失額は1兆円と試算されるに至っている（国立人口問題研）。自殺の薬理生化学的研究あるいは行

動薬理学的研究などが進まなかった理由の一つとして、これまで自傷行為のモデル動物が存在しなかったことが挙げられる。

われわれは、SNAP-25というシナプス前神経末端からの神経伝達物質放出に関与している蛋白質のSer187をAlaに置換したノック

インマウス (SNAP-25遺伝子改変マウス) を作成した。大変興味深いことに、このマウスは高所から飛び降りるなどの衝動行動や外傷性白内障をきたすまで自分の目を引っ掻いてしまうなどの自傷行為を示した。

さらなる行動薬理学的な分析の結果、ホモマウスがオープンフィールド内で壁に沿って移動し、行動量が不安定であることや、明暗実験では暗部に閉じこもること、あるいは新奇刺激に対して過剰にすくみ行動を見せることなどがわかった。これらの結果から、この遺伝子改変マウスはストレスに対する防御機構に欠陥があることが示唆された。一方で、このマウスには他のマウスを攻撃するなどの行動は見られない。

これまで、衝動行為のモデル動物として攻撃性の高まる物はいくつか開発されてきた。しかし、自傷行為を見せる動物はこのマウスが初めてである。

過去の動物実験では、セロトニン神経の破壊や機能低下は攻撃性の亢進を引き起こすことが確認されている [Ueda S et al : Int J Neuropsychopharmacol 2 : 255-261, 1999]。また、セロトニン 1B 受容体のノックアウトマウスは居住者・侵入者モデルにおいて、侵入者に対する攻撃性が野生型と比較し有意に増加する。自然発症高血圧ラットは多動で衝動的であるため、発達初期は注意欠陥多動性障害 (ADHD) のモデルとされている。自然発症高血圧ラットは、前頭前野、側坐核、尾状核・被核 (線状体) でのドパミン分泌量が減少し、チロシン水酸化酵素遺伝子の発現がコントロール群と比較して減少し、ドパミントランスポーター遺伝子の発現がコントロール群と比較して減少している [Leo D et al Neurosci Biobehav Rev 27 : 661-669, 2003]。このように、攻撃性においてはドパミンやセロトニンが関連していることが示唆されている。

また、情動攻撃に関連する脳部位としては、扁桃体→分界上床核→視床下部腹内側核→背側縦束→中脳中心灰白質系の回路が想定されている。最近、視床下部腹内側核やそれに隣接する視床下部前野、中脳中心灰白質吻束部を電気刺激しても攻撃行動が現れることが証明された [Bear MF et al: Neuroscience. Exploring the brain. Lippincott Williams & Wilkins, pp. 580-605, 2001]。

## 2. 研究の目的

今回の研究の目的は、初めての自傷行為モ

デル動物と言えるSNAP-25遺伝子改変マウスを用いて、情動攻撃に関して中心的役割を果たしている脳部位である扁桃体と視床下部で、攻撃性の神経伝達物質であるドパミンとセロトニン放出量がストレスによって、どのように変化するかを調査することである。そのために、今回は、身体的ストレスである拘束ストレスと、より心理的ストレスである恐怖条件付けストレスを用いて、扁桃体や視床下部における細胞間のドパミンとセロトニンをマイクロダイアライシス法によって回収し、その濃度を経時的に測定する。

また、このマウスの社会性について調査するために、ソーシャルインタラクション測定システムを用いて複数のマウスの接触時間、生活上の距離などに関する詳細なデータを集める。

以上のデータから、このマウスが自傷行為のみならず、自傷行為を伴ううつ病のモデルとなりうるかを検討する。また、以前から正常マウスに強制的に水泳を繰り返すことで動物が努力をしても報われないことを学習する (学習性無力) ことでうつ病のモデルとされてきたが、そのベース動物としてこのマウスを用いることによって、さらに実際のうつ病に近いモデルを作れるのではないかという予想の元に、強制水泳を行う。遺伝子改変マウスの水泳を諦めて動かなくなる行動 (無動) のパターンを解析し、さらに同時にマイクロダイアライシスを行って扁桃体や視床下部におけるドパミンやセロトニンの放出量について検討する。

さらに、自傷やうつ病のモデルとしての妥当性を検討する意味で、臨床的に自傷、うつ病、攻撃性それぞれに有効とされる薬物を投与して、行動の異常が改善されるかどうかを調べる。同時に脳マイクロダイアライシス法によって、扁桃体や視床下部におけるドパミンやセロトニンの放出量が正常に近づくかどうかを調査する

また、これらの衝動行為がてんかんせいの精神病と関連している可能性について調べる目的で、脳波検査や扁桃体キンドリングの形成について検討する。

## 3. 研究の方法

### SNAP 遺伝子改変マウスの作成 (高橋正身)

- 1) この実験は技術員 1 名 (山森氏)、大学院生 1 名 (予定) が補助する。
- 2) ヘテロ同士を交配させる。
- 3) 妊娠マウスは出産前に分離する。
- 4) 生後 2 週齢の時に Tail cut してゲノムをチェックし、ホモ、ヘテロ、野生型に分類する。

- 5) 生後 4 週齢で離乳する。(以上の実験は北里大学医学部実験センターにて行う)
- 6) ホモと野生型を北里大学東病院実験系に実験担当者が輸送し、同実験系の飼育室にて、十分にハンドリングを行い人になれさせる。

#### マイクロダイアライシス (鈴木映二)

- 1) この実験は北里大学東病院実験系の防音室にて行い、技術職員 2 名 (渡辺氏、土門氏) が補助する。
- 2) 拘束ストレス、強制水泳、ソーシャルインターラクション、恐怖条件付けの各テストの間、脳内のドーパミン、セロトニンの放出量の変化をこの方法 (以下) にて調査する。
- 3) マウスにフェノバルビタールで全身麻酔する。
- 4) 脳図譜 (Paxinos and Franklin, 1997) をもとに、脳定位固定手術法も用いてマウス (7 週齢) の脳内にガイドカニューラを挿入し、固定する。
- 5) 1 週間後にガイドカニューラを通してマイクロダイアライシス用のプローブ (膜長 2.0mm、外径 0.22mm) を扁桃体あるいは視床下部に挿入する。
- 6) リンゲル緩衝液を毎分 2 $\mu$ l の流速で還流し、20 分毎に分画採取する。
- 7) 脳マイクロダイアライシスにより回収した還流液中のドーパミンとセロトニンの濃度を HPLC-ECD を用いて測定する。(下記参照)
- 8) 実験終了後ラットの脳をホルマリン固定した後、脳組織切片を作成しプローブ先端が扁桃体内に挿入されていることを肉眼的に確認する。

#### ドーパミンとセロトニンの測定 (鈴木映二)

- 1) この実験は北里大学東病院実験系の生化学研究室 2 にて行い、技術職員 2 名 (渡辺氏、土門氏) が補助する。
- 2) HPLC-ECD により測定する。
- 3) 各物質の分離には固定相として逆相カラム (MCM カラム C18、4.6 $\times$ 150mm) を用い、移動相にはリン酸バッファー (pH3.0、リン酸二ナトリウム、0.05M クエン酸、800mg/1SHS、37.2 mg/1EDTA $\cdot$ 2Na) を使用する。
- 4) 物質の濃度は、直列 2 チャンネル式電気化学検出器を使用する。

#### 薬物投与実験 (鈴木映二、宮岡等)

- 1) この実験は北里大学東病院実験系の防音室にて行い、技術職員 2 名 (渡辺氏、土門氏) が補助する。
- 2) マウスの腹腔にゾンデを手術的に留置する。

- 3) ゾンデから生食に溶解した各種向精神薬を急性 (1 回) あるいは慢性 (1 日 1 回、7 日間) に投与する。コントロールには生食のみを投与する。
- 4) 薬物投与のみによる視床下部や扁桃体におけるドーパミンやセロトニンに対する影響をマイクロダイアライシスにて検討する。
- 5) 薬物投与を受けたマウスとコントロールマウスに対し、拘束ストレス、恐怖条件付け、強制水泳、ソーシャルインターラクション試験を行う。
- 6) 薬物が各行動実験における、遺伝子改変マウスの異常に対し、どのような効果をもたらすかを測定する。
- 7) 薬物は、パロキセチン、イミプラミン、ハロペリドール、クロザピン、ジアゼパム、リチウム、バルプロ酸、アンフェタミン、リタリンを用いる。

#### 拘束ストレス (鈴木映二・宮岡等)

- 1) この実験は北里大学東病院実験系の防音室にて行い、技術職員 2 名 (渡辺氏、土門氏) が補助する。
- 2) マウスにマイクロダイアライシス用のプローブを挿入する。
- 3) ベースラインの値が安定して一時間後、マウスを 20 分間、拘束用器具に固定した後リリースする。  
ホモ、ヘテロ、野生型各群の視床下部におけるドーパミンやセロトニンの変化について検討する。

#### ソーシャルインターラクションテスト (鈴木映二、宮岡等)

- 1) この実験は北里大学東病院実験系の防音室にて行い、技術職員 2 名 (渡辺氏、土門氏) が補助する。
- 2) マウスにマイクロダイアライシス用のプローブを挿入する。
- 3) 四角形状の広場状の箱 (灰色塩化ビニール、高さ 30cm、縦 50cm、横 50cm) にマウスを入れる。
- 4) ベースラインの値が十分安定してから 1 時間後に他のマウスを同じ箱の中に入れる。
- 5) 箱の中に入れた複数のマウスの行動量、速度、常同行動、動物のヘッド・テール距離などを、(今回申請するソーシャルインターラクション測定システムを用いて) 解析する。記録カメラなどはすでにオープンフィールドテストなどに用いている物を利用する。
- 6) ホモ、ヘテロ、野生型同士、あるいはそれぞれの組み合わせによるインターラクションのパターンと扁桃体におけるドーパ

ミンやセロトニンの放出量について調査する。

#### 強制水泳 (鈴木映二・宮岡等)

- 1) この実験は北里大学東病院実験系の防音室にて行い、技術職員2名(渡辺氏、土門氏)が補助する。
- 2) 第1日目に、マウスに15分間の水泳を行い水に慣れさせる。
- 3) 第2日目に、マウスにマイクロダイアライシス用のプローブを挿入する。
- 4) ベースラインの値が安定して一時間後、20分間強制水泳を行わせ、無動時間を測定する。
- 5) ホモ、ヘテロ、野生型の各群における無動時間の長さや行動パターンの違いと視床下部や扁桃体におけるドパミンやセロトニンの放出量の変化の違いについて解析する。

#### 脳波記録 (鈴木映二、宮岡等)

- 1) この実験は北里大学東病院実験系の防音室にて行い、技術職員2名(渡辺氏、土門氏)が補助する。
- 2) ペントバルビタール 50mg/kg 腹腔内投与し、麻酔下自発呼吸の状態で定位脳手術(電極の植え込み)を行う。
- 3) David Kopf 社製脳定位固定装置を使用し、前頭部(運動野皮質、F:2.0,L:2.0)および頭頂部(体性感覚野皮質、F:-1.0,L:2.0)に硬膜外皮質電極を植え込む。
- 4) 嗅球と前頭部の中間部(F:3.4,L:0.5)と後頭部のラムダ縫合部に不感電極としてネジ電極を植え込む。
- 5) 深部電極としては先端を除きカシュウで絶縁した直径0.2mm、電極間0.5mmのステンレススチール双極貼り合わせ電極を背側海馬(F:2.2,L:1.5,L:-1.8(脳表から))に挿入する。
- 6) 電極は即時重合樹脂で頭骨に固定し、リード線をマイクロコネクタに接続して、樹脂で固定する。

脳波は10Pのスリップリングを用い、動物を無拘束に近い状態で、前頭部皮質、頭頂部皮質は単極誘導にて、海馬は双極および単極誘導にて記録する。

#### 4. 研究成果

SNAP-25はシナプス前神経末端からの神経伝達物質の放出に、不可欠の蛋白質である。研究協力者の高橋らにより神経伝達物質放出の際にSNAP-25のSer187がプロテインキナーゼC(PKC)の活性化によって特異的にリン酸化されること、PKCによるリン酸化依存的に細胞膜への分泌小胞の移行が促進されることなどが明らかにされた。また、高橋らはSNAP-25

のリン酸化部位であるSer187をAlaに置換したノックインマウスを作成した。このマウスは高所から飛び降りるなどの衝動行動や外傷性白内障をきたすまで自分の目を引っ掻いてしまうなどの自傷行為を示した。

本年度は、このマウスの衝動性を抑える目的で、胃の中にチューブを観血的に留置し、十分体力が回復した後に各種向精神薬(ジアゼパム、パロキセチン、フルボキサミン、ハロペリドール、メタンフェタミン、カルバマゼピンなど)を急性投与(1回)あるいは慢性投与(1日1回、14日連続)して、オープンフィールド、明暗テストなどで見られる異常行動が抑制されるかどうかを調査した。しかし、現時点では、いずれの薬物も急性もしくは慢性投与において、マウスの行動に明らかな変化をもたらすことはなかった。現在は、投与量などを検討しているところである。

次に、実験中にけいれん発作を起こすことが頻回に観察されたことから、脳定位固定装置を使用し、前頭部(運動野皮質、F:2.0,L:2.0)および頭頂部(体性感覚野皮質、F:-1.0,L:2.0)に硬膜外皮質電極を植え込み、脳波を測定したところ、棘波が頻回に観察されることがわかった。また、異常脳波の出現は日によって違いがあることも分かった。さらにキンドリングも容易に起きることがわかった。現在のところ、棘波の出現と行動異常の関連は見いだせていないが、脳波異常が行動異常に影響を与えている可能性があるため、今後詳細に検討していく予定である。

#### 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 鈴木映二、うつ病の発症におけるサイトカインの役割、Brain Medical、20・2、65-71、2008、無
- ② 鈴木映二、こころの薬の飲み合わせ、こころの臨床アラカルト、27・3、473-478、2008、無
- ③ 鈴木映二、うつ病の併用療法・増強療法における薬物相互作用について、臨床精神薬理、12・2、245-253、2008、無
- ④ Pozzi D, Condliffe S, Bozzi Y, Chikhladze M, Grumelli C, Proux-Gillardeaux V, Takahashi M, Franceschetti S, Verderio C, Matteoli M. (2008) Activity-dependent phosphorylation of Ser<sup>187</sup> is required for SNAP-25-negative modulation of neuronal voltage-gated calcium

channels. Proc Natl Acad Sci U S A, 105: 323-328.

- ⑤ Shu Y, Liu X, Yang Y, Takahashi M, Gillis KD (2008) Phosphorylation of SNAP-25 at Ser<sup>187</sup> mediates enhancement of exocytosis by a phorbol ester in INS-1 cells. J Neurosci. 28: 21-30.
- ⑥ Kataoka M, Sekiguchi M, Takahashi M (2009) Identification of a minimal segment of complexin II essential for preferential distribution in axons. J Neurochem, 108: 1109-1115.
- ⑦ Shinohara Y, Hirase H, Watanabe M, Itakura M, Takahashi M, Shigemoto R (2008) Left-right asymmetry of the hippocampal synapses with differential subunit allocation of glutamate receptors. Proc Natl Acad Sci U S A, 105:19498-503.

[学会発表] (計3件)

- ① 鈴木映二、渡辺滋、山森早織、東貞宏、片岡正和、宮岡等、高橋正身、SNAP-25変異マウスの拘束ストレスに対する視床下部におけるドパミンの反応。第18回日本臨床精神神経薬理学会
- ② 鈴木映二、SNAP25のPKC依存性リン酸化部位の変異マウスにおける行動とストレス反応についての研究(シンポジウム) 生体機能と創薬シンポジウム2008
- ③ 鈴木映二、曾根四郎、石川康夫、土屋美樹、摂食障害の経過中に炎症性腸疾患を発症した一例。第14回(静岡県)東部臨床精神科懇話会

[図書] (計1件)

- ① 鈴木映二 (共著)、ネオメディカル、Pharmacotherapy 改訂版、2008、659-752

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 映二 (SUZUKI EIJI)

国際医療福祉大学・大学病院・教授

研究者番号：60226496

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

宮岡 等 (MIYAOKA HITOSHI)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：40209862

高橋 正身 (TAKAHASHI MASAMI)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：10318826