

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 10 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22730593

研究課題名（和文） マウスの水迷路学習場面を応用した新しいうつ動物モデル

研究課題名（英文） New animal model of depression using water maze learning situation in mice

研究代表者

土江 伸誉 (DOE NOBUTAKA)

兵庫医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：00434879

研究成果の概要（和文）：マウスを被験体としたモリス型水迷路学習の場面において、課題の難度をある一定の水準以上に設定すると、一部の被験体が、適応的対処行動の学習を徐々に放棄し、うつ的な状態に陥ることを発見した。本研究では、我々が考案した実験手続きのうつ動物モデルとしての妥当性を、うつ状態にある個体(“Loser”と命名)と健常な状態にある個体(“Winner”と命名)の表現型の違いを示すことで補強した。Winnerと比較して、Loserは、ホームケージ内での自発活動性が低かった。更に、Loserでは、海馬の神経細胞新生が抑制されており、うつ病のバイオマーカーとしての可能性が指摘されている IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等の炎症性サイトカインが Winner および実験経験のない健常なマウスより高値であった。

研究成果の概要（英文）：We have developed a new animal model of depression by modifying the Morris water maze learning situation in mice. It is generally believed that mice placed in a pool filled with opaque water will learn to escape onto a platform hidden below the water surface. However, if the difficulty of the task is increased, some of the mice gradually cease to swim and become immobile; this response indicates a depressive state. In this research, the validity of our experimental method as a depression model was verified by demonstrating the phenotypic differences between “nonhelpless” mice (designated “Winner”) and “helpless” mice (designated “Loser”). Compared with nonhelpless mice, helpless mice showed lower spontaneous locomotor activity in their home cage. In addition, helpless mice exhibited impaired neurogenesis in the hippocampus and increased serum levels of proinflammatory cytokines, such as IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：社会科学

科研費の分科・細目：心理学・実験心理学

キーワード：実験系心理学、行動学、神経科学、ストレス、脳神経疾患、動物モデル、うつ病

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らは、雄性の C57BL/6N マウスを被験体とするモリス型の水迷路学習実験の場面において、プラットホームのサイズとプールの周囲の環境を操作して課題の難度をある一定の水準以上に設定すると、一部の被験体が、プラットホームへの速やかな逃避という適応的対処行動の学習を徐々に放棄し、遂には行動的絶望状態に陥ることを発見した。我々は、これらの個体を Loser、対して、良好な学習を示す個体を Winner と命名した。Loser は、体重増加の抑制、オープンフィールドにおける自発活動性の低下、脳内セロトニン量の減少といった特徴を示す。また、Loser の行動的絶望状態は、三環系抗うつ薬や SSRI によって一過的に改善される。Loser という動物個体、また、Loser を得ることが出来るこの実験パラダイムは、従来のうつ動物モデルが抱える問題点の多くを解消しており、次世代の新しいうつ動物モデルとして期待される。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、上記のうつ動物モデル（以下 Winner-Loser モデル）に関して、行動的絶望状態に陥った Loser の (1) 行動学的表現型の解析、Loser の行動的絶望状態の背景にある (2) 生物学的基盤の探索、Loser に対する (3) 抗うつ薬継続投与の効果の検討を行い、うつ動物モデルとしての妥当性を補強することであった。

## 3. 研究の方法

### (1) 行動学的表現型の解析

雄性の C57BL/6N マウスに困難な条件設定下での水迷路学習訓練を 1 日 5 試行 8 日間連続で行った。訓練最終日、5 試行全てで規定時間内の逃避に失敗した個体を Loser、5 試行全てで逃避に成功した個体を Winner と定義した。その他の個体は Middle とした。その後、各タイプの被験体に、プレパルスインヒビション (PPI) テストや高架式十字迷路テスト等の行動実験を順次実施した。特に、飼育場面における自発活動性の日内変動については詳細に検討した。

### (2) 生物学的基盤の探索

8 日間の困難な水迷路学習訓練によって得られた Loser、これと同時に得られた Winner、および無処置で並行飼育した同系統・同週齢のマウス（無処置統制マウス）から採血し、血清を分離して凍結保存した。その後、32 種類のサイトカインの濃度をマルチサスペンションアレイ法で一括して測定した。

また、別の被験体群から得られた Winner、Loser、及び無処置統制マウスに 4 日間連続

で BrdU を処置した。その後、脳を灌流固定して脳切片を作製し、BrdU 抗体を用いて免疫染色を行い、海馬歯状回における神経細胞新生を評価した。

### (3) 抗うつ薬継続投与の効果の検討

Loser に SSRI のひとつであるフルボキサミン (25mg/kg) を 8 日間連続してホームケージ内で投与した後、8 日間の水迷路学習訓練を再度与えて治療効果を評価した。フルボキサミンの急性的な薬理作用が訓練中の行動に反映されないよう、再訓練期間中は毎日の訓練終了 30 分後にフルボキサミンをホームケージ内で投与した。即ち、延べ 16 日間の抗うつ処置を与えた。行動実験終了後、被験体を安楽死させ、血中サイトカインの定量と海馬の神経細胞新生の評価を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 行動学的表現型の解析

Loser は、オープンフィールドテストにおいて、Winner より移動反応 (locomotion) と立ち上がり反応 (rearing) の得点が全体的に低かった。また、Winner では、時間経過に伴って徐々に移動反応得点が減少して明確な馴化の過程が観察されたのに対し、Loser では、移動反応得点の変動に規則性が見られず、個体差も大きかった。更に、ホームケージ内の自発活動性を 48 時間連続で測定したところ、Loser は、日内変動のパターンに異常を示さなかったものの、Winner および無処置統制マウスとは異なり、暗期序盤の活動量が少なかった。つまり、水迷路学習場面で誘発された行動的絶望の影響は、他の実験場面や通常の飼育場面にまで及び、自発活動性の低下として表れた。この結果は、うつ病患者にしばしば見られる日常生活全般における活動性の低下を模した表現型として解釈される。一方、今回実施した PPI テストや高架式十字迷路テスト等の他の行動実験では、Winner と Loser の差は検出されなかった。これらの結果からは、Loser の注意機能や不安傾向には異常が生じていないことが推測される。

### (2) 生物学的基盤の探索

各種サイトカインの濃度については、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等の 7 項目で Loser の値が Winner および無処置統制マウスの値を有意に上回っていた。Winner と無処置統制マウスとの間に差は見られなかった。TNF- $\alpha$  をはじめとする炎症性サイトカインは、ヒトのうつ病患者で上昇しているとの報告があり、うつ病のバイオマーカーとして注目されている。これらの項目で Loser が高値を示したことから、Loser の行動的絶望とヒトのうつ病の発症メカニズムの類似性が推測される。

海馬歯状回における神経細胞新生の評価については、Loser の BrdU 陽性細胞数が、Winner および無処置統制マウスと比較して少なかった。Winner と無処置統制マウスとの間に差は見られなかった。つまり、Loser が示す行動的絶望状態の背景要因として海馬における神経細胞新生の抑制が推測される。臨床的には、重篤なうつ病患者では海馬の萎縮が見られるとの報告もあり、モノアミン仮説やセロトニン仮説に並ぶうつ病の生物学的な説明のひとつとして海馬神経細胞新生の抑制が注目されている。Loser は、こうした仮説の下に進められる基礎研究に適したうつ動物モデルであると考えられる。

今後、脳内セロトニンの減少等これまでに確認された Loser の特徴と本研究で確認されたサイトカインの変動や海馬神経細胞新生の抑制とを相互に関連づけ、Loser の行動的絶望の背景メカニズムについて総合的に検討していく必要がある。

### (3) 抗うつ薬継続投与の効果の検討

これまでに、フルボキサミンの投与 30 分後に水迷路学習訓練を行うと、適応的対処行動の学習が再開されることを確認している。ところが、本研究において、フルボキサミンを継続投与した Loser の再訓練期中の逃避潜時は、溶媒のみを与えた Loser の逃避潜時よりやや短くなる傾向にあったものの、訓練の進行に伴って短縮することはなかった。つまり、急性的な薬理作用が混入しない条件で実施した水迷路学習訓練では適応的対処行動の学習は再開されず、永続性のある治療効果は得られなかった。更に、Loser の海馬歯状回における神経細胞新生の抑制も、殆ど改善しなかった。また、抗うつ処置に明確な影響を受けたサイトカインも確認されなかった。これらの結果は、Loser の行動的絶望状態の頑健さを示すものであり、海馬歯状回における神経細胞新生の抑制がその主たる背景要因であることを示唆している。

今後、より長期間のフルボキサミン継続投与や他の薬剤ないしは抗うつ処置の使用によって、Loser の行動的絶望状態が改善するか、更に、これに海馬神経細胞新生の抑制緩和が伴うかを検討していく必要がある。

### (4) まとめ

本研究によって、Winner-Loser モデルのうつ動物モデルとしての妥当性は補強され、行動的絶望状態が堅固に持続するという他の行動科学的うつ動物モデルにはあまり見られない特徴が確認された。同モデルは、遺伝的に極めて相同性が高いとされる近交系マウスから、うつ様の行動学的表現型を示す Loser と、これとは正反対の行動学的表現型を示す Winner とが並行して得られるという

点を最大の特徴としている。強制水泳試験をはじめとする既存のうつ動物モデルが、実験操作を与えた全ての被験体において無条件的(unconditional)に行動的絶望状態が惹起されると仮定しているのとは対照的である。ヒトのうつ病は、複雑多因子疾患であり、遺伝の影響が指摘される一方で、その発症には後天的な環境要因が大きく関与している。更に、遺伝的に等しい素因を持つ者が同じ環境に置かれても、うつ病を発症する者と健常な状態を維持出来る者とに分かれる場合がある。Winner-Loser モデルは、このようなヒトのうつ病の発症メカニズムを動物実験で検討するための有効なツールになると考えられる。

### 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 5 件)

- ① Nakamura, T., Nakai, M., Ookubo, K., Kitamura, Y., Doe, N., Hattori, S., Murakami, N., Yamamoto, A., Honda, G., & Sasaki, Y. F. Genotoxicity-suppressing effect of aqueous extract of *Connarus ruber* cortex. *Genes and Environment*, 査読有, 33, 2011, 81-88. [https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jemsge/33/3/\\_contents/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jemsge/33/3/_contents/-char/ja/)
- ② Saino, O., Taguchi, A., Nakagomi, T., Nakano-Doi, A., Kashiwamura, S., Doe, N., Nakagomi, N., Soma, T., Yoshikawa, H., Stern, D. M., Okamura, H., & Matsuyama, T. Immunodeficiency reduces neural stem/progenitor cell apoptosis and enhances neurogenesis in the cerebral cortex after stroke. *Journal of Neuroscience Research*, 査読有, 88, 2010, 2385-2397. DOI: 10.1002/jnr.22410
- ③ 土江伸登・鶴田裕文・川尻佳八・高橋 励・西口 恵・桐山美香 強制水泳処置が誘発するマウス水迷路学習の獲得障害. *実験動物技術*, 査読有, 45, 2010, 3-8.
- ④ 土江伸登 行動科学的手法によるうつ動物モデルの有用性. *行動科学*, 査読有, 48(2), 2010, 1-9.
- ⑤ Doe, N., Takahashi, T., & Kiriya, M. Behavioral despair during a water maze learning task in mice. *Experimental Animals*, 査読有, 59, 2010, 191-197. [https://www.jstage.jst.go.jp/browse/expanim/59/2/\\_contents](https://www.jstage.jst.go.jp/browse/expanim/59/2/_contents)

[学会発表] (計 14 件)

- ① 土居亜紀子・土江伸登・中込隆之・田片将

- 士・蘆山・金岡伸一・立花久大・田口明彦・松山知弘 骨髄単核球投与は視床の神経再生を介して脳梗塞後の感覚障害を改善する 第34回日本神経科学大会 (2011/9/18-21, 於パシフィコ横浜)
- ②土江伸誉 マウスの行動的絶望と自発活動性との関係 日本心理学会第75回大会 (2011/9/15-17, 於日本大学)
- ③土江伸誉 水迷路学習場面におけるマウスの行動的絶望と海馬神経細胞新生との関係 日本動物心理学会第71回大会 (Animal 2011) (2011/9/8-11, 於慶應義塾大学)
- ④土江伸誉 4月生まれは本当に得か? -日本の競馬騎手における相対的年齢効果の逆転- 日本感情心理学会第19回大会 (2011/9/2-4, 於京都光華女子大学)
- ⑤Matsuyama, T., Doe, N., Nakagomi, T., Nakano-Doi, A., Saino, O., Takata, M., Lu, S., Mimura, O., Tachibana, H., Taguchi, A. Edaravone is effective to ameliorate the sensory neurologic deficit developed in chronic phase of cerebral infarction in mice. XXVth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function & Xth International Conference on Quantification of Brain Function and PET, Brain 2011, 5.24-28, 2011, Barcelona, Spain.
- ⑥土江伸誉 水迷路学習場面におけるマウスの行動的絶望 -うつ発症の個人差を検討可能な動物モデル- 日本動物心理学会第155回例会 (2011/3/30, 於名古屋ホテル新名)
- ⑦土江伸誉 水迷路学習場面におけるマウスの行動的絶望 -メタンフェタミンに対する感受性- 関西心理学会第122回大会 (2010/11/7, 於兵庫医療大学)
- ⑧Matsuyama, T., Saino, O., Nakagomi, T., Nakano-Doi, A., Takata, M., Kashiwamura, S., Doe, N., Nakagomi, N., Mimura, O., & Taguchi, A. CD25-positive T lymphocytes are key immunomodulators of neurogenesis after stroke. 7th World Stroke Congress, 10.13-16, 2010, Soeal, Korea.
- ⑨土江伸誉 水迷路学習の消去によって誘発されるマウスのうつの状態 日本心理学会第74回大会 (2010/9/20-22, 於大阪大学)
- ⑩土江伸誉 強制水泳処置とオープンスペース水泳処置はマウスに異なるうつの状態を誘発する 日本動物心理学会第69回大会 (2010/8/27-29, 於帝京大学)

[図書] (計2件)

- ①大山 正 監修・廣中直行 編, 廣中直行・澤幸祐・堀 耕治・永石高敏・沼田恵太郎・栗原 彬・高野裕治・土江伸誉・野村理朗・津田 彰・堀内 聡・山口 拓・富樫廣子・吉岡充弘・佐藤暢哉・山田富美雄・大平英樹 著, 誠信書房, 『シリーズ心理学研究法 第3巻 学習・動機・情動』 第6章 回避・逃避, 2011, P.121-140.
- ②平野哲司・土江伸誉・今西 明・一言英文・石 暁玲・中見仁美 著, 関西学院大学出版会, 『K.G.りぶれっと No.26 心理科学研究の最前線』 第2章 ネズミはうつ病になるか?, 2010, P.29-48.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 脳梗塞後うつ病モデル動物及びその使用並びにうつ状態に対する被検薬物及び移植細胞の有効性のスクリーニング方法  
 発明者: 松山知弘・土江伸誉・田口明彦  
 権利者: 財団法人先端医療振興財団  
 種類: 特許  
 番号: 特願 2012- 053456  
 出願年月日: 2012年3月9日  
 国内外の別: 国内

○取得状況 (計1件)

名称: 鬱モデルマウス作製法  
 発明者: 土江伸誉・桐山美香・谷口泰造  
 権利者: 土江伸誉・谷口泰造・有限会社行動医科学研究所  
 種類: 特許  
 番号: 特許第 4619823 号  
 取得年月日: 2010年11月5日  
 国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土江 伸誉 (DOE NOBUTAKA)  
 兵庫医科大学・医学部・非常勤講師  
 研究者番号: 00434879

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: