

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24730636

研究課題名(和文) うつ病の発症脆弱性規定因を検討可能な行動科学的動物モデルの確立

研究課題名(英文) New behavioral animal model to study vulnerability factors for depression

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの水迷路学習において、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、水泳を徐々に諦め、無力状態に陥ることを発見した。本研究では、この無力マウスのうつ病的表現型の背景要因について検討した。無力マウスの出現率は、訓練初期の逃避失敗によって上昇した。しかしながら、偶発的な逃避成功は、不動反応を増強し、その後の学習課題の獲得を阻害した。また、24日間のフルボキサミン継続投与によって、無力マウスの海馬歯状回におけるBrdU陽性細胞数は増加し、行動面でも改善が見られた。この結果は、海馬の神経細胞新生の抑制が、無力マウスの持続的で堅固な行動異常と関連していることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：We have developed a new animal model of depression by modifying the water maze learning task in mice. When the difficulty of the task is increased, some of the mice gradually cease to swim and become immobile; this response indicates a helpless state. In this research, we investigated a critical mechanism underlying depression-like phenotypes of the helpless mice. Escape failures at early stage of training increased occurrence of the helpless mice. However, occasional successful escape during the training phase enhanced immobility and cognitive impairments in subsequent learning task. On the other hand, repeated administration of fluvoxamine for 24 days caused a significant increase in the number of BrdU-positive cells in the dentate gyrus of the helpless mice, an effect which was paralleled by a behavioral improvement. This result suggests that the reduction of hippocampal neurogenesis is associated with robust and consistent behavioral abnormalities in the helpless mice.

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：うつ病 動物モデル 水迷路学習 マウス 行動的絶望 発症脆弱性 個体差 神経細胞新生

## 1. 研究開始当初の背景

うつ病の病因究明や新規治療薬候補の前臨床的評価を行うために、齧歯類を用いたうつ動物モデルは必要不可欠である。申請者は、雄性の C57BL/6N マウスを被験体とする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(鬱モデルマウス作製法(特許第 4619823 号))。申請者は、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、自発活動性の低下、血中コルチコステロンの増加、脳内セロトニンの減少、海馬歯状回における神経細胞新生の抑制といった特徴を示す。また、Loser は、選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)を含むいくつかのクラスの抗うつ薬へ明確な感受性を示す。Loser という動物個体、また、Loser を得るための実験手続きは、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

上記のうつ動物モデル(以下 Winner-Loser モデル)は、遺伝的相同性が非常に高い近交系マウスに同一の実験課題を与えるにも関わらず、うつ的な表現型を示す Loser と健全性を維持する Winner が並行して得られるという特徴を持つ。この点を活かし、本研究では、Winner-Loser モデルを、うつ病の発症脆弱性を左右する要因を探索可能なモデルとして確立し、提案することを目指した。そのために、1. Loser を出現させる学習性の要因の特定、更に、2. Loser の行動的絶望状態の背景にある生物学的基盤の検討の 2 点を研究目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) Winner-Loser モデルの実験手続き

本研究では、雄性の C57BL/6N マウスを被験体とし、困難な水迷路学習実験の場面において 1 日 5 試行の逃避訓練を 8 日間連続で行った際、訓練最終日の全試行で規定時間内の逃避に失敗した個体を Loser、同日の全試行で逃避に成功した個体を Winner と定義した。

Loser の特徴を明らかにするための比較対照には、同時に得られた Winner、実験経験のないまま並行飼育したマウス、更に、うつ動物モデルとしての使用実績が多い慢性的弱ストレス(chronic mild stress, CMS)処置を施したマウスを用いた。

### (2) Loser を出現させる学習性の要因の検討

マウスの水迷路学習場面において、プラットホームの効率的な探索とそこへのいち早

い逃避は、負の強化によって獲得される適応的対処行動の学習に他ならない。であるならば、Loser の行動的絶望状態は、課題の難度が高いが故に適切な強化が得られず、こうした学習に失敗した結果であると解釈される。

そこで、研究目的 1 を達成するために、強化(プラットホームへ到達させるか否か)の履歴を操作した実験を行った。

### (3) 抗うつ薬長期継続投与実験

Loser は、SSRI を含むいくつかのクラスの抗うつ薬に感受性を示すものの、その効果は、投与直後の一時的なものに留まる。これまでに、5、8、あるいは 16 日間にわたって抗うつ薬を継続投与する実験を行ったが、薬物の急性的な効果が消失した後は、行動的絶望状態が依然として持続していた。その背景に、殆ど改善していない海馬歯状回における神経細胞新生の抑制を認めたことから、この脳内の障害こそが、Loser の堅固な行動的絶望状態の生物学的基盤であるとの仮説を得た。そこで、本研究では、研究目的 2 を達成するために、海馬の神経細胞新生を亢進させるのに十分と判断される 24 日間にわたって SSRI のひとつであるフルボキサミンを継続投与する実験を行った。実験期間の最終 4 日間は BrdU を処置した。全ての行動実験が終了した後、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。

## 4. 研究成果

### (1) Loser を出現させる学習性の要因

水迷路学習訓練の前半に逃避失敗試行を多く経験させると、Loser の出現率が上昇した。一方、訓練の前半に大きなプラットホームを与えて逃避失敗を防ぐと、Loser の出現率は顕著に低下した。しかしながら、訓練の後半に大きなプラットホームを与えても、Loser 化(逃避潜時の延長)を示し始めた一部の被験体の学習成績は改善しなかった。つまり、Loser 化は、訓練の初期に逃避失敗試行を多く経験することによって生じることが明らかとなった。訓練の前半は、逃避の成否が偶然に委ねられる段階である。つまり、この段階で、失敗試行を偶然多く経験した個体が、適応的対処行動の学習を徐々に放棄し、行動的絶望状態に陥ることが示唆された。

次に、1 日 5 試行、延べ 8 日間の全試行で逃避失敗を経験させた被験体と Loser とを比較した。その結果、強制水泳試験での不動反応時間や新たな学習課題の獲得成績によって評価されるうつの傾向は、全試行で逃避失敗を経験させた動物よりも、少なくとも何回かは逃避成功を経験し水泳時間も短い Loser において顕著であった。即ち、Loser 化において逃避失敗の経験は重要な役割を果たしているものの、逃避の成功と失敗とが混在した履歴を経ることで、より重篤なうつの状態が誘発されることが明らかとなった。

## (2)行動的絶望状態の生物学的基盤

8日間の困難な水迷路学習訓練を経て出現した Loser に対して、フルボキサミンの24日間継続投与を行った結果、Loser は行動的絶望状態から回復し、薬物非投与下で実施した水迷路学習実験においても適応的対処行動の良好な獲得を示した。

更に、フルボキサミンを継続投与した Loser では、海馬歯状回における BrdU 陽性細胞数が、抗うつ処置を施さずに並行飼育した Loser よりも有意に多く、Winner と同水準にあった。Winner と無処置統制マウスとの間に差は見られなかった。抗うつ処置を施さなかった Loser の BrdU 陽性細胞数は、8日間の水迷路学習訓練終了直後の Loser と差がなく、28日間にわたって CMS 処置を負荷したマウスと同水準にあった。

これらの結果から、Loser の堅固な行動的絶望状態の背景には、海馬における神経細胞新生の抑制があることが推測される。

## (4)まとめ

Winner-Loser モデルでは、水迷路学習訓練の初期における逃避失敗経験がうつの状態の誘発に重要な役割を果たしていること、更に、逃避の成功と失敗とが混在した履歴が、うつの状態を一層増強することが明らかとなった。これらの結果は、Loser の行動的絶望状態が、水泳処置(運動や水への暴露)に対する無条件性のストレス反応ではないことを示している。

また、Loser に対する抗うつ薬の長期継続投与が、行動レベルで健全性を回復させるとともに、抑制されていた海馬歯状回の神経細胞新生を亢進させ、健全な状態にまで回復させることが明らかとなった。このことは、Loser の持続的かつ堅固な行動的絶望状態の背景要因が、海馬における機能異常であるという仮説を支持する。

臨床的には、抗うつ薬の薬理作用自体は投与後速やかに生じるにも関わらず、治療効果が得られるまでには数週間を要することが知られている。本研究の結果は、抗うつ薬投与開始と治療効果発現のずれが、海馬における機能異常からの回復に要する期間に相当するという仮説を導く。

うつ病は、複雑多因子疾患であり、遺伝の影響が指摘されている一方、その発症には環境要因が大きく関与すると考えられる。しかしながら、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全な状態を維持出来る者とに分かれる場合がある。このようなヒトのうつ病の発症にしばしば個人差が見られるという実情を Winner-Loser モデルはよく模し得ている。本研究では、マウスが行動的絶望状態へ至る過程ではたらく学習性の要因を特定し、更に、行動的絶望状態の頑健さと密接な関係がある海馬の異常について明らかにした。今後、この両者に介在するメカニズムの検討が必

要であると考えられる。

## 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2件)

Kato, T., Funakoshi, H., Kadoyama, K., Noma, S., Kanai, M., Ohya-Shimada, W., Mizuno, S., Doe, N., Taniguchi, T., & Nakamura, T. (2012). Hepatocyte growth factor (HGF) overexpression in the nervous system enhances learning and memory performance in mice. *Journal of Neuroscience Research*, 査読有, 90, 1743-1755.

DOI: 10.1002/jnr.23065

Tsuruoka, N., Beppu, Y., Koda, H., Doe, N., Watanabe, H., Abe, K. (2012). A DKP Cyclo(L-Phe-L-Phe) found in chicken essence is a dual inhibitor of the serotonin transporter and acetylcholinesterase. *Plos One*, 査読有, 7(11), 1-10.

DOI: PLOS ONE 10.1371/journal.pone.0050824

### [学会発表](計7件)

Yamanishi, K., Doe, N., Yamamoto, H., Xu, Y., Li, W., Sumida, M., Yamanishi, H., Okamura, H., & Matsunaga, H. Molecular analysis of prefrontal cortex in mice exposed to chronic mild stress; the influence on homeostasis in depressive state. 18th World Congress on Advances in Oncology and 16th International Symposium on Molecular Medicine, 10-12, October, 2013. Crete, Greece.

土江伸誉 慢性弱ストレス処置により生じるマウスの行動変化 日本心理学会第77回大会 (2013/9/19-21, 於札幌コンベンションセンター・札幌市産業振興センター)

土江伸誉 水迷路学習場面におけるマウスの行動的絶望 -フルボキサミン長期継続投与の効果- 日本動物心理学会第73回大会 (2013/9/14-16, 筑波大学)

Yamanishi, K., Doe, N., Yamamoto, H., Xu, Y., Li, W., Kiriyama, M., Yamanishi, H., Okamura, H., & Matsunaga, H. Gene expression profiling of prefrontal cortex comparing in mice behavioral despair after a water maze learning task and Chronic Mild Stress. 11th World Congress of Biological

Psychiatry, 22-27, June, 2013, Kyoto. 松山知弘・土江伸誉・土居亜紀子・盧山・田口明彦 脳卒中後うつ病のマウスモデルの確立とその応用 第35回日本神経

科学大会 (2012/9/18-21, 於名古屋国際  
会議場)

土江伸誉 マウスの行動的絶望と血中サ  
イトカインとの関連 日本心理学会第76  
回大会 (2012/9/11-13, 於専修大学)

土江伸誉 水迷路学習場面におけるマウ  
スの行動的絶望 -フルボキサミン継続投  
与の効果- 日本動物心理学会第72回大  
会(2012/5/12-13, 於関西学院大学)

〔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

## 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：