

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10231

研究課題名（和文）霊長類うつ病モデルを用いた「セロトニン1Bレセプター仮説」の検証

研究課題名（英文）Verification of the "serotonin 1B receptor hypothesis" using a primate model of depression

研究代表者

山中 創（Yamanaka, Hajime）

京都大学・霊長類研究所・特定研究員

研究者番号：10415573

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：うつ病に関する研究はこれまで主にげっ歯類で行われてきたが、非ヒト霊長類の使用がうつ病の症状の類似性を評価する効率を改善することが期待されている。うつ病の診断基準は行動タイプの変化に基づいており、評価システムは少ないため、うつ病様行動を評価するテスト、およびそれらからなるバッテリーを構築することが重要になる。本研究では、マカクザルやコモンマーモセットなどの霊長類に適したいくつかの行動テストやバッテリーを考案・開発した。また、リアルタイムで非侵襲的な脳機能イメージングも実施した。本研究がうつ病の病態メカニズム解明や新しい治療法に貢献することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、うつ病の病態メカニズム解明や新しい抗うつ薬開発の方向性が生み出される可能性がある。本研究によって開発された改良型SPTやテストバッテリーは、特定の性質を持つ個体、病因仮説、および抗うつ薬を選別・特定する探索的なスクリーニング法として、その能力を発揮する。例えば、この評価系を用いて「Monkey C」のようなレセルピン高感受性個体を選択的に繁殖させ、うつ病に対する脆弱性の研究に高い再現性を持つモデル動物を供給することができる。このように、うつ病研究の学術体系や方向性を大きく転換させることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：While research on depression has been performed mainly in rodents so far, the use of non-human primates is expected to improve the efficiency of assessing the similarity of symptoms of depression. Since the diagnostic criteria for depression are based on changes in behavioral types and evaluation system is few, it is important to build tests that evaluate depression-like behaviors, and battery consisting of them. In this study, we devised and developed several behavioral tests and its battery suitable for primates such as macaques and common marmosets. Real-time and noninvasive brain functional imagings were also performed. This study is expected to contribute to elucidation of pathological mechanism and development of new treatments for depression.

研究分野：神経科学

キーワード：うつ病 薬物惹起性モデル 霊長類 テストバッテリー 脳機能イメージング

### 1. 研究開始当初の背景

うつ病は、多様な症状を呈し、自殺や引きこもりの原因となっている重篤な精神疾患である。近年、麻酔薬として知られているケタミンに、急速かつ持続性の高い抗うつ効果があることが報告され、世界的に注目を浴びている (Zarate CA, 2006)。我々は、霊長類を対象とした陽電子断層撮像 (PET) 法を用いた脳内分子イメージング解析を駆使し、この新規抗うつ薬ケタミンが側坐核と腹側淡蒼球のセロトニン 1B レセプター結合活性を上昇されることを初めて明らかにした (Yamanaka H, 2014)。興味深いことに、臨床研究においては、うつ病患者のセロトニン 1B レセプター結合が同じ脳領域において逆に減少していたことが報告されている (Murrrough JW, 2011)。このことから、側坐核と腹側淡蒼球のセロトニン 1B レセプターが、うつ病の病因解明および新しい治療法の開発の突破口になるものと考えた。そこで「うつ状態の発現には、側坐核と腹側淡蒼球のシナプス膜にあるセロトニン 1B レセプター発現低下に伴う神経伝達異常が関与する」というセロトニン 1B レセプター仮説を立て、検証を試みる。

### 2. 研究の目的

本研究では、ヒトにうつ状態を惹起する薬剤投与により、感染性のうつ状態をヒトに近縁なサルに引き起こすことで、うつ病モデルを確立し、PET イメージングと遺伝子修飾により、側坐核や腹側淡蒼球におけるセロトニン 1B レセプターがうつ状態発現に関係するかについて明らかにし、「セロトニン 1B レセプター仮説」を検証することを目的とする。具体的には、うつ状態の評価系の構築に焦点を当て、リボポリサッカロイド (LPS) やレセルピンといったヒトにうつ状態を惹起することが知られている薬剤を用いてうつ病モデルを作製し、うつ状態の評価系を構築し、モデルの妥当性を調べる。快感喪失行動を調べるスクロース嗜好性テスト (Sucrose preference test, SPT) を中心としたマカクザルでの検討、とコモンマーモセットを対象にした 6 種類のテストを網羅したうつ病用テストバッテリー構築によって、薬物惹起性うつ病の霊長類モデルでの評価方法を検討し、各評価系の有用性を明確にした。加えて、LPS モデルにおける炎症性変化と遺伝子修飾のためのウイルス注入部位の同定に関する脳機能イメージングも行った。

### 3. 研究の方法

本研究には、ヒトに近縁なサルであるマカクザルとコモンマーモセットを用いた。まず、マカクザルを対象にした LPS 惹起性うつ病モデルの作製を行うとともに、評価系の確立を行った。特に、SPT に注目し、マカクザルに適したテスト方法の最適化を図った。最適なスクロース濃度を特定するために、6 頭を対象にした 9 濃度 (0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3%) のスクロース濃度-反応曲線を作製した。疾患モデルの SPT 使用において課題となるのは、どの濃度のスクロースを用いるかである。なぜなら、高い濃度 (例えば 10% など) を用いればたとえうつ状態を呈していたとしてもスクロース水をより好んで飲み、逆に低い濃度であればうつ状態になっていない場合にも容易に選好性を喪失することが想定されるからである。この結果を基にして最適な濃度を決定し、一日で 3 種類のスクロース濃度を評価するシステムを考案した。これらの濃度の提示順序による選好性と消費量を調べ、最適な提示順序も決定した。そして、7 頭のマカクザルに LPS を投与し 3.5 時間後から 3 濃度提示型 SPT を実施し、LPS 処置による快感喪失行動の兆候を短期間に効率的に検出した。加えて、脳内炎症マーカーである活性型ミクログリアに発現する Translocator 蛋白の PET リガンドである [<sup>11</sup>C] PK-11195 の PET を用いて LPS による脳内炎症像を調べた。さらに、コモンマーモセットを対象にしたレセルピン惹起性うつ病モデルの作製を行うとともに、その症状を捉えるためのテストバッテリーシステムを構築した。「精神障害の診断および統計マニュアル (DSM)」はうつ病研究診断のグローバルスタンダードであり、この基準に 9 つもの症状があげられている。このようなことから、対象動物がうつ状態を呈しているかを確認するモデル動物の評価のために、多数のテストを組み合わせた多面的なテストバッテリーシステムを DSM の診断基準を基に構築した。ヒトにおいてうつ病が発症する薬剤レセルピンをサルに投与し、行動を中心とした 6 種類のテストを組み込んだテストバッテリーを毎日実施し、経時変化を評価し、レセルピンに明確に反応した個体 (Responder) をスクリーニングした。

### 4. 研究成果

#### (1) マカクザル スクロース濃度 反応曲線と改良型 SPT (3 濃度提示型 SPT) の作製

9 濃度のスクロース水を用いて濃度 反応曲線を作製した (図 1)。%Preference においては 0.25% より高濃度な提示時に 90% に達した。また、0.25% スクロース濃度よりスクロース水の消費量が濃度依存的に増加し、その増加は 1.5% スクロース濃度まで続いた。それ以降は飽和状態に達し、一定の 170 mL/kg 前後の消費量を示した。この結果から、0, 0.25, 1.0% の 3 濃度がうつ状態を捉えるのに適した濃度であることが示唆された。次に、最適な提示順序を見つけるために、6 通りの順序提示を比較検討し、高い選好性と消費量を示した "0.25 -> 1.0 -> 0%" スクロースの提示順序が快感喪失行動を標的とした研究においては最適であることが示唆された。

改良型 SPT における LPS 投与の効果 (表 1) LPS は 2 用量 (0.1 と 0.3 mg/kg, i.v.) がテストされ、投与前の値からどれだけ変化したかを調べた。すべての個体においてスクロース水摂取量の低下が認められ、スクロース水

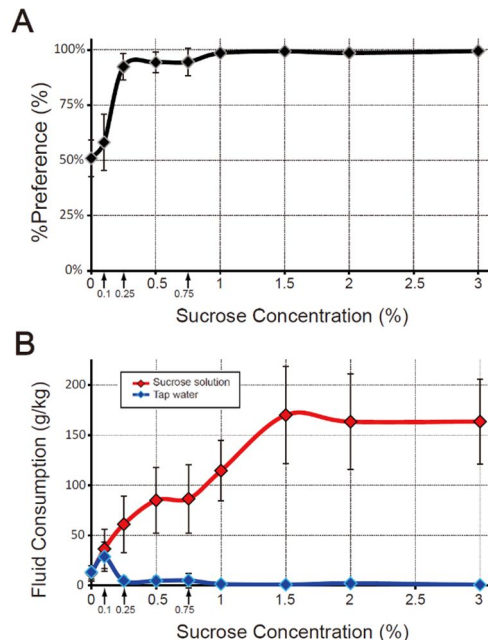


図1 マカクザルのスクロース濃度 反応曲線

表1 スクロース消費量と%Preference における LPS 投与の影響

Test concentration	Sucrose solution consumption				%Preference			
	0.1 mg/kg LPS		0.3 mg/kg LPS		0.1 mg/kg LPS		0.3 mg/kg LPS	
	0.25% sucrose	1.0% sucrose	0.25% sucrose	1.0% sucrose	0.25% sucrose	1.0% sucrose	0.25% sucrose	1.0% sucrose
Monkey R1	7.8%	-14.9%	-34.7%	-19.8%	33.3%	0.1%	30.7%	-0.3%
Monkey R2	-88.3%	-71.9%	-56.8%	-63.8%	-6.0%	-0.1%	-0.6%	0.6%
Monkey R3	-57.8%	-63.9%	-87.0%	-63.5%	-19.6%	-1.6%	10.4%	0.6%
Monkey R4	-65.7%	-67.3%	-70.9%	-54.1%	-0.7%	-0.5%	-3.9%	0.1%
Monkey H	-73.6%	-100.0%	-91.1%	-44.4%	-3.4%	-98.8%	-1.4%	-0.1%
Monkey I	-86.5%	-61.7%	-69.3%	-51.6%	-1.6%	-0.1%	-0.3%	-0.1%
Monkey O	-37.5%	-12.9%	-32.7%	12.5%	2.5%	0.3%	3.2%	0.5%
Mean	-57.4%	-56.1%	-63.2%	-40.7%	0.6%	-14.4%	5.5%	0.2%

太字データは LPS 投与前より低下したものを示している

に対する選好性 (%Preference) 低下は 2 頭のみ観察された。この投与用量はヒトへの投与用量 ( $8 \times 10^{-6}$  mg/kg) と比較して極端に高いことから、より低い用量にて検討する必要性が示唆された。

脳内炎症イメージングにおける LPS 投与の効果

2 頭を対象に 0.1 mg/kg LPS の投与前後に  $[^{11}C]PK-11195$  の集積を全脳にわたって調べたが、炎症を示唆するような集積は特定できなかった。しかし、先行研究のヒヒを用いた LPS の脳内炎症イメージング研究では、脳全体に集積上昇が観察された (Hannestad J, 2012)。

ウイルス導入実験における MR 撮像によるモニタリング

ウイルスによる遺伝子導入実験において、対象領域の物理的な障害に由来する炎症や注入部位を生きたままの状態でのモニタリングできることが重要である。その可能性を明確にするために、ウイルス投与後に起きる炎症などの病変を捉える MR 撮像を検討した結果、ウイルス注入直後には検出されなかった T2 と FLAIR の高信号が、導入遺伝子が発現すると見込まれる時期と場所に出現した。なお、この高信号は約一か月後より次第に消失した。

(2) コモンマーモセット

ヒトにおいてうつ病が発症する薬剤レセルピンをサルに投与し、行動を中心とした 6 種類のテストを組み込んだテストバッテリーを毎日実施し、経時変化を評価した (図 2)。まずは、DSM 基準の興味喪失に関連する視覚探索行動を調べるために「のぞき穴テスト (Peephole test, PhT)」が独自に開発された。同種個体を刺激にした場合、視覚探索行動が強力に誘導されることが明確になった。次に、2 日間を 1 ブロックとした 4 つのブロックにより構成されたレセルピン投与実験が行われた。ブロック 1 と 4 で溶媒のみを投与し、レセルピンを漸増的に投与するブロック 2 ~ 3 を挟み込む形の投薬スケジュールが組まれた。6 つのテスト測定を 1 ブロック内にすべて収めることで、テスト 1 つずつのブロック単位の変化パターンを明確にすることができる。レセルピン投与に反応して V 字型の回復曲線を示したレセルピン高感受性個体 (Responder) をスクリーニングしたところ、9 頭中 1 ~ 4 頭ずつの Responder がテストごとに見つかり、うち 1 頭 (Monkey C) だけが 6 テストすべてに共通して Responder となった (表 2)。本研究におけるこの出現率 (11%) と臨床報告でのうつ病発症率 (19%) はほぼ同値であることから、このテストバッテリーは有用であることが示唆された。我々の知る限り、霊長類のうつ状態を多面的かつ網羅的に評価するテストバッテリーは本システムが最初となる。これまでにない新しい研究基盤となる「うつ病のマーモセット用テストバッテリー」

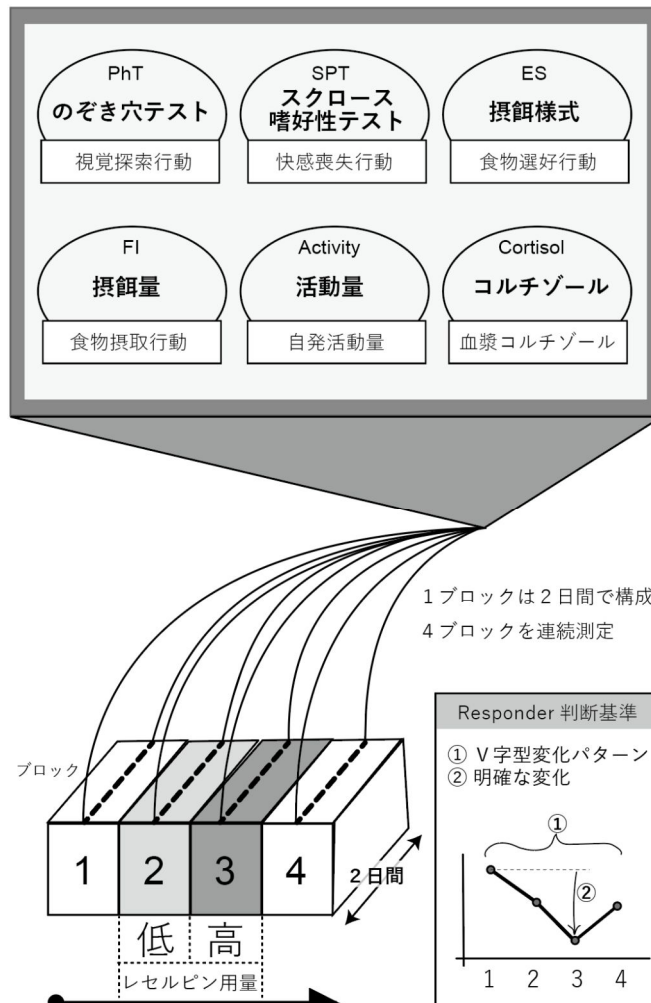


図 2 テスバッテリーによる評価方法

であれば、うつ病研究の学術体系や方向性を大きく転換させることが期待できる。

表2 9頭のテストバッテリーの結果

個体名	のぞき穴 テスト	スクロース 嗜好性テスト	摂餌様式	摂餌量	活動量	コルチ ゾール
Monkey A	-	-	-	-	-	-
Monkey B	<b>R</b>	-	<b>R</b>	-	<b>R</b>	<b>R</b>
Monkey C	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>
Monkey D	-	-	-	-	-	<b>R</b>
Monkey E	-	-	-	-	-	-
Monkey F	<b>R</b>	-	<b>R</b>	-	-	-
Monkey G	-	-	-	-	-	<b>R</b>
Monkey H	-	-	-	-	<b>R</b>	-
Monkey I	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	-	-	-
Responder (R)の合計	4	2	4	1	3	4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hajime Yamanaka <sup>1</sup> , Nami Hosaka, Masahiko Takada, Hirotaka Onoe
2. 発表標題 マカクザルにおけるうつ様行動評価のためのスクロース嗜好性テストの改良
3. 学会等名 日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hajime Yamanaka, Nami Hosaka, Masahiko Takada, Hirotaka Onoe
2. 発表標題 A sucrose preference test modified for evaluation of depression-like behavior in macaque monkeys
3. 学会等名 Society for Neuroscience 2017 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yamanaka H, Ishibashi H, Takada M, Nakamura K.
2. 発表標題 A test battery to assess depression-like behaviors in common marmosets.
3. 学会等名 日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamanaka H, Ishibashi H, Takada M, Nakamura K.
2. 発表標題 Estimation of depression-like behaviors using a test battery in drug-induced model of common marmosets.
3. 学会等名 日本生物学的精神医学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----