

平成 30 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15126

研究課題名(和文) 精神疾患および発達障害モデルマウスにおける認知行動療法の神経化学的研究

研究課題名(英文) Neurochemical study for cognitive behavioral therapy in mouse models of neuropsychiatric and neurodevelopmental disorders

研究代表者

田熊 一敬 (Takuma, Kazuhiro)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号：90289025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的とした社会的認知刺激による精神疾患および発達障害モデルマウスの異常行動の改善について検討を試みたが、個体間接触の無い社会的認知刺激(エンカウンター刺激)、および個体間接触を伴う社会的認知刺激(居住者/侵入者系相互作用刺激)のいずれによっても、反復提示による情動行動異常の改善効果を見いだすには至らなかった。一方、代替的な成果にはなるが、発達障害モデル動物を幼若期より認知刺激などを強化した“豊かな飼育環境”で4週間発育させると、異常行動が改善されることを明らかにし、その神経分子基盤が脳海馬CA1領域における樹状突起スパイン密度の低下改善であることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we first tried to examine whether social cognition stimulation could improve abnormal behaviors in mouse models of neuropsychiatric and neurodevelopmental disorders. However, I could not observe significant ameliorating effects by neither of repeated social cognitive stimulation without (encounter stimulation) and with body contacts between individuals (resident-intruder interaction). On the other hand, although it is an alternative outcome, we found that the environmental enrichment, a housing condition in which mice experience more sensory, physical, cognitive and social stimulation, for 4 weeks from the juvenile period ameliorated anxiety-like behavior, social deficits and cognitive impairment in a mouse model of neurodevelopmental disorder, and further that the enriched housing improved loss of dendritic spines in the hippocampal CA1 region of the model mice.

研究分野：薬理学

キーワード：精神疾患 発達障害 エンカウンター試験 社会的相互作用試験 豊かな環境飼育 樹状突起スパイン

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 不安障害と認知行動療法

不安障害は、社交不安障害、パニック障害、広場恐怖症などに分類される疾患群の総称で、その治療については、従来はベンゾジアゼピン系抗不安薬を用いた薬物療法が多かったが、最近、選択的セロトニン再取り込み阻害薬の有効性が示され、不安障害に対する第一選択薬となってきた。

しかしながら、不安障害の薬物療法については、早期の薬物減量によって再発することが多いことから、年単位での継続服用が推奨されており、その服薬コンプライアンスが低いことが問題とされている。

認知行動療法とは、ストレスと感ずる事象に対する受け止め方や考え方、すなわち“認知”のバランスコントロールによって気持ちを和らげる精神療法の一種で、ストレスによる恐怖や不安に上手に対応できるような心理状態へと導くものとされている。近年、不安障害に対して認知行動療法の有効性が明らかにされ、その有用性が注目されている。

### (2) 認知行動療法の精神疾患および発達障害への応用と今後の課題

最近、不安障害のみならず、統合失調症、うつ病、不眠症、摂食障害などの多くの精神疾患、ならびに自閉症、注意欠如・多動性障害 (ADHD) などの発達障害に対して認知行動療法が効果的であることが実証され、広く実施されるようになってきた。

しかしながら、認知行動療法に関わる神経分子基盤は未だ明らかにされておらず、その解明は新たな薬物標的分子の発見をもたらす可能性を有している。

## 2. 研究の目的

### (1) 認知行動療法の動物モデル系の確立

本研究では、精神疾患および発達障害モデル動物を用いて、社交性障害の改善をもたらす社会的認知刺激の反復提示の至適条件を明らかにすること、すなわち、小型実験動物 (マウス) における認知行動療法のモデル系を確立することを目的とした。

研究代表者らは、最近、齧歯類の情動行動評価系として最近独自に考案したエンカウンター・ストレス法 (引用文献) が、被験動物において、相手個体との接触を有さない社会的認知刺激となることを見出しており、認知行動療法のモデル系の確立において、エンカウンター反復刺激の応用を試みた。また、従来から知られている resident-intruder 試験における相手個体との接触を有する社会的認知刺激についても、反復刺激の認知行動療

法モデル系への応用を試みた。

### (2) 認知行動療法の神経分子基盤の解明

本研究ではさらに、認知行動療法の動物モデル系を確立したのち、「症状改善の遷移過程」において、c-Fos マッピング、Golgi 染色解析、神経系マーカータンパク質やスパイン形成関連分子の発現解析などを行い、社会的認知刺激による社交性障害改善に関わる“経時的な”神経ネットワーク網変化を明らかにすることを目的とした。

### (3) 社会的認知刺激の代替法による情動行動改善の検討

本研究は、社会的認知刺激の反復提示を鍵として、認知行動療法の動物モデル系の確立を目指して立案した萌芽的研究であり、計画通りに研究が進展しない可能性が考えられた。そこで、研究を計画通りに進めることができなかつた場合の代替的検討として、認知刺激を強化しうる“豊かな環境飼育”を適用した実験を追加実施した。

## 3. 研究の方法

### (1) 精神疾患および発達障害モデルマウスの作製

統合失調症モデル：3週齢より6週間、不透明なケージ内で1匹だけでの隔離飼育を行ったマウスをモデルとした。透明なケージ内5～6匹で集団飼育したマウスを対照群として用いた。

覚せい剤精神病モデル：メタンフェタミン (1 mg/kg, 1日1回) を7日間連続で腹腔内投与したマウスをモデルとした (引用文献)。

難治性うつ病モデル：コルチコステロン (20 mg/kg, 1日1回) を21日間連続で皮下投与したマウスをモデルとした (引用文献)。

発達障害モデルマウス：妊娠12.5日目にバルプロ酸 (VPA; 500 mg/kg) を腹腔内投与したマウスより出生した仔マウスを発達障害モデルとした (引用文献)。

### (2) 認知刺激の提示方法

個体間非接触型の社会的認知刺激：研究代表者らが考案したエンカウンター試験 (引用文献) ケージ (図1) を用いて、個体間接触の無い社会的認知刺激を負荷した。

侵襲型の社会的認知刺激：Resident-intruder 試験 (引用文献) を参考として、個体間接触を伴う社会的認知刺激を負荷した (引用文献)。

豊かな環境飼育による認知刺激：豊かな環境飼育は、一般的な飼育ケージより大きな 65 × 35 × 30 cm<sup>3</sup> のプラスチックケージに小動

## 物用輪回し装置，ゴールデンハムスター用

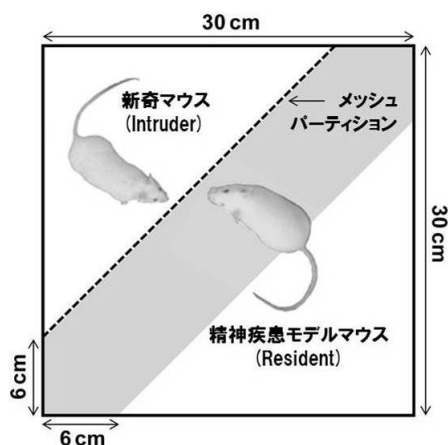


図 1. エンカウンター試験装置と社会的認知刺激。大小 2 つの区画をもつケージの大きい区画に疾患モデルマウスを入れて馴化させた後に、小さい区画に intruder マウスを入れて社会的認知刺激を提示する。

パイプ、Shepherd Shack®などを配置した環境下で行った。なお、対照となる通常環境群は、一般的な透明なプラスチックケージ (28 × 20 × 12 cm<sup>3</sup>) で飼育した。各飼育群とも、1 ケージあたり 5-7 匹のグループとした。

### (3) 認知刺激の提示条件

社会的認知刺激の提示条件：1 日あたり 10 分の提示とし、7 あるいは 14 日間繰り返し提示することとした。

豊かな環境飼育による認知刺激の提示条件：4 週齢より 4 週間の飼育状況下において認知刺激を含む種々刺激を提示した。

### (4) 薬物投与

抗精神病薬 (リスペリドン、アリピプラゾールおよびハロペリドール) の単回投与は、社会性行動試験の 24 時間前、新奇物体認識試験の試験試行の 24 時間前に行った。オキシトシンの単回投与は、社会性行動試験の 20 分前、新奇物体認識試験の訓練試行の直後に行った。抗精神病薬あるいはオキシトシンの慢性投与は、1 日 1 回 2 週間行い、最終投与の 24 時間後に各種試験を行った。

### (5) 行動解析試験

自発運動量はオープンフィールド試験、不安様行動は高架式十字迷路試験、社会性行動は resident-intruder 相互作用試験、ならびに学習記憶能は新奇物体認識試験によりそれぞれ評価した。

### (6) 神経生化学および神経組織化学的解析

樹状突起スパイン密度は Golgi 染色法、脳

由来神経栄養因子 (BDNF) およびシナプス関連分子 (PSD-95, Shank2, Shank3) の mRNA 発現量解析は real-time PCR 法によりそれぞれ数値化した。

### (6) 統計解析

データは、統計解析ソフト GraphPad Prism 6 for Mac を用いて比較検定を行った。2 群の比較検定は unpaired *t*-test により、多重比較検定は two-way repeated measures ANOVA あるいは two-way ANOVA の後、Bonferroni multiple comparison test により行った。なお、有意水準は  $P < 0.05$  とした。

## 4. 研究成果

### (1) マウスにおける認知行動療法の条件検討

エンカウンターケージを用いた社会的認知刺激について、統合失調症モデルマウス (長期隔離飼育マウス) および覚せい剤精神病モデル (メタンフェタミン慢性投与マウス) において、繰り返しの提示が可能であることを確認したが、情動行動異常を改善する至適条件を見いだすに至らなかった。また、個体間接触の無い社会的認知刺激については、モデル動物の攻撃性の発現が強く、実施を断念した。今後、更なる条件検討が必要である。

### (2) 社会的認知刺激による行動変化に関わる神経化学基盤の解析

覚せい剤精神病モデルマウスが、初めての社会的認知刺激 (エンカウンター刺激) の提示により行動過多を発現すること、この行動変化に前頭前皮質のセロトニン神経とドパミン神経が関与することを明らかとした。

### (3) 発達障害モデル動物の情動行動異常に対する豊かな環境飼育の効果

豊かな環境飼育は、発達障害モデルマウス (胎仔期 VPA 曝露マウス) の示す不安様行動の増加、社会性行動障害および学習記憶障害を対照群マウスと同程度にまで改善した (図 2a)。また、豊かな環境飼育は、対照群、発達障害モデル群ともに海馬において BDNF mRNA 発現量を増加し、さらに、発達障害モデル群の海馬で認められた CA1 領域の樹状突起スパイン密度の低下 (図 2b)、ならびに PSD-95 および Shank2 mRNA の発現低下を改善した。

すなわち、豊かな環境飼育が、脳海馬領域において樹状突起スパイン密度低下の改善を介して、発達障害モデル動物の異常行動を緩和する可能性を示した。

### (4) 発達障害モデル動物の自閉症様行動に対する抗精神病薬およびオキシトシンの効果

発達障害モデルマウス (胎仔期 VPA 曝露マ

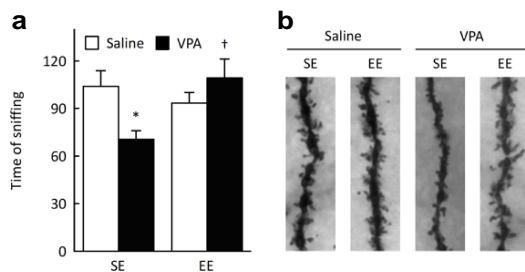


図 2. 発達障害モデルマウスの社会性行動異常および脳海馬樹状突起スパイン密度の低下に対する豊かな環境飼育の効果。豊かな環境飼育は 4 週齢より 4 週間行った。a) Resident-intruder 相互作用試験における匂い嗅ぎ行動回数。b) 海馬における樹状突起スパイン密度。対照群 ( ) と比較して, \* $P < 0.05$ ; 通常飼育の発達障害モデル (胎生期 VPA 曝露) 群と比較して, † $P < 0.05$  (Two-way ANOVA followed by *post-hoc* Bonferroni multiple comparison test)。SE: 通常環境飼育群; EE: 豊かな環境飼育群。

ウス) の社会性行動異常に対して, 定型抗精神病薬 (ハロペリドール) は単回投与および 2 週間慢性投与ともに効果を示さなかったが, 非定型抗精神病薬 (リスペリドンおよびアリピプラゾール) は 2 週間の慢性投与により改善効果を示した。この非定型抗精神病薬による社会性行動異常の改善効果が, 前頭前皮質 (PFC) における反復したドパミン遊離と, それによりもたらされる樹状突起スパイン密度低下を回復であることを示唆した。

オキシトシンの効果については, 経鼻単回投与により, 用量依存的に発達障害モデルマウスの社会性行動障害を抑制することを見いだした。さらに, オキシトシンを 2 週間経鼻慢性投与すると, 社会性行動障害に対する持続的な抑制効果が認められ, 少なくとも投与 24 時間後まで効果が継続することを見いだした。

#### < 引用文献 >

- Ago, Y. et al., 2013. *Neuropsychopharmacology* 38, 1535-1547.
- Ago, Y. et al., 2012. *Neuropharmacology* 62, 1634-1639.
- Ago, Y. et al., 2008. *Neuropharmacology* 55, 1355-1363.
- Kataoka, S. et al., 2013. *Int. J. Neuro-psycho-pharmacol* 16, 91-103.
- Takuma, K. et al., 2014. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 126, 43-49.
- Moretti, P. et al., 2005. *Hum. Mol. Genet.* 14, 205-220.

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文] (計 8 件)

Hara, Y., Ago, Y., Higuchi, M., Hasebe, S., Nakazawa, T., Hashimoto, H., Matsuda, T., Takuma, K., 2017. Oxytocin attenuates deficits in social interaction but not recognition memory in a prenatal valproic acid-induced mouse model of autism. *Horm. Behav.* 96, 130-136.  
DOI: 10.1016/j.yhbeh.2017.09.013.

Hara, Y., Ago, Y., Taruta, A., Hasebe, S., Kawase, H., Tanabe, W., Tsukada, S., Nakazawa, T., Hashimoto, H., Matsuda, T., Takuma, K., 2017. Risperidone and aripiprazole alleviate prenatal valproic acid-induced abnormalities in behaviors and dendritic spine density in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 234, 3217-3228.  
DOI: 10.1007/s00213-017-4703-9.

Hara, Y., Ago, Y., Takano, E., Hasebe, S., Nakazawa, T., Hashimoto, H., Matsuda, T., Takuma, K., 2017. Prenatal exposure to valproic acid increases miR-132 levels in the mouse embryonic brain. *Mol. Autism* 8, 33.  
DOI: 10.1186/s13229-017-0149-5.

Yamaguchi, H., Hara, Y., Ago, Y., Takano, E., Hasebe, S., Nakazawa, T., Hashimoto, H., Matsuda, T., Takuma, K., 2017. Environmental enrichment attenuates behavioral abnormalities in valproic acid-exposed autism model mice. *Behav. Brain Res.* 333, 67-73.  
DOI: 10.1016/j.bbr.2017.06.035.

Ago, Y., Hasebe, S., Hiramatsu, N., Hashimoto, H., Takuma, K., Matsuda, T., 2017. Psychopharmacology of combined activation of the serotonin<sub>1A</sub> and  $\sigma_1$  receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 809, 172-177.  
DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.05.035.

Tanaka, T., Ago, Y., Umehara, C., Imoto, E., Hasebe, S., Hashimoto, H., Takuma, K., Matsuda, T., 2017. Role of prefrontal serotonergic and dopaminergic systems in encounter-induced hyperactivity in

methamphetamine-sensitized mice. Int. J. Neuropsychopharmacol. 20, 410-421. DOI: 10.1093/ijnp/pyw115.

Hasebe, S., Ago, Y., Watabe, Y., Oka, S., Hiramatsu, N., Tanaka, T., Umehara, C., Hashimoto, H., Takuma, K., Matsuda, T., 2017. Anti-anhedonic effect of selective serotonin reuptake inhibitors with affinity for sigma-1 receptors in picrotoxin-treated mice. Br. J. Pharmacol. 174, 314-327. DOI: 10.1111/bph.13692.

Ago, Y., Hasebe, S., Hiramatsu, N., Mori, K., Watabe, Y., Onaka, Y., Hashimoto, H., Takuma, K., Matsuda, T., 2016. Involvement of GABA<sub>A</sub> receptors in 5-HT<sub>1A</sub> and  $\sigma_1$  receptor synergism on prefrontal dopaminergic transmission under circulating neurosteroid deficiency. Psychopharmacology (Berl). 233, 3125-3134. DOI: 10.1007/s00213-016-4353-3.

#### [学会発表](計5件)

Yuta Hara (他7名), Effects of intranasal oxytocin on autism-like behavioral abnormalities in valproic acid-induced mouse model of autism, The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018), 2018.

Shigeru Hasebe (他7名), Continuous activation of dopaminergic system improves autism-related behavioral abnormalities in mice prenatally exposed to valproic acid, The 46th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2017.

長谷部 茂 (他7名), ドパミン神経賦活薬の慢性投与は胎仔期バルプロ酸曝露マウスの自閉症様行動を改善する, 第38回日本生物学的精神医学会・第59回日本神経化学会大会合同年会, 2017.

吾郷 由希夫 (他6名), ドパミン神経賦活薬の慢性投与は胎仔期バルプロ酸曝露マウスの自閉症様行動を改善する, 自閉症モデルマウスにおける前頭前皮質ドパミン神経系の異常~ADHD治療薬による行動異常の改善, 2017.

川瀬 啓生 (他6名), 雌性マウスを用いた意欲・報酬探索行動評価試験, 第129回日本薬理学会近畿部会, 2017.

[図書](0件)

[産業財産権]

出願状況(0件)

取得状況(0件)

[その他]

ホームページ等

<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~pharm/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

田熊 一敞 (TAKUMA, Kazuhiro)  
大阪大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号: 90289025

##### (2) 研究分担者

吾郷 由希夫 (AGO, Yukio)  
大阪大学・大学院薬学研究科・助教  
研究者番号: 50403027

長谷部 茂 (HASEBE, Shigeru)  
大阪大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号: 30754725  
(平成29年7月まで)

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

松田 敏夫 (MATSUDA, Toshio)  
原 雄大 (HARA, Yuta)  
前田 優子 (MAEDA, Yuko)