

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K03365

研究課題名(和文) 新生仔期グルタミン酸受容体遮断による統合失調症モデル動物の認知機能障害とその改善

研究課題名(英文) Cognitive dysfunction in animal model of schizophrenia induced by neonatal glutamate receptor blockade and recovery by antipsychotics

研究代表者

一谷 幸男 (ICHITANI, Yukio)

筑波大学・人間系(名誉教授)・名誉教授

研究者番号：80176289

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：新生仔期にラットのグルタミン酸NメチルDアスパラギン酸(NMDA)受容体を慢性遮断して統合失調症の動物モデルを作成し、成体期の認知機能障害とそれに及ぼす抗精神病薬の効果を検討した。

1)放射状迷路学習が顕著に障害され、アリピプラゾールにより成績の改善が認められた。2)潜在抑制現象(CS先行提示効果)の出現には有意な影響を及ぼさなかった。さらに、3)新生仔期NMDA受容体遮断と離乳後の長期孤立飼育の組み合わせによる疾患モデル動物を作成し、新奇物体再認テストと放射状迷路学習を用いて記憶への影響を検討したところ、組み合わせによって各単独の操作による記憶成績低下を増強する効果は見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

統合失調症は複数の症状を呈する精神疾患であるが、認知機能障害については発症メカニズムの解明や薬物療法の開発が遅れている。本研究は、新生仔期のグルタミン酸受容体慢性遮断による記憶障害が臨床的に人の統合失調症治療で用いられている薬物で改善されるのかを調べ、この動物モデルの妥当性を検討した。また、離乳後の孤立飼育を組み合わせるtwo-hitモデルを導入して、新生仔期の受容体遮断に加えその後の社会的隔離というストレス状態を第2の衝撃として負荷した際に、認知機能障害が出現するのかを検討した。

研究成果の概要(英文)：Animal model of schizophrenia was produced by neonatal chronic treatment of glutamatergic N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist in rats. Effects of atypical antipsychotics on cognitive dysfunction shown in these animals at adult stage were investigated. 1) Radial maze learning was severely disturbed and the impairment could be reduced by administration of aripiprazole. 2) Latent inhibition phenomenon (CS pre-exposure effect) was not disturbed. 3) Two-hit approach of neonatal NMDA receptor blockade combined with long-term isolation rearing after weaning showed that the combination of two treatments did not produce severer effects on novel object recognition test and radial maze performance compared with the single interventions.

研究分野：実験心理学 行動神経科学

キーワード：グルタミン酸受容体 統合失調症 認知機能障害 抗精神病薬 ラット

1. 研究開始当初の背景

(1)統合失調症は、陽性症状、陰性症状、認知症状の3つから特徴づけられる精神疾患である。陽性症状とは、幻覚、妄想、思考障害など、本来あるべきでないものが出現する症状であり、対照的に陰性症状とは、情動の平板化や自発性の欠如、社会的引きこもりなど、正常な行動が欠如していることである。第3の認知症状は、注意の不適切や注意保持の困難、精神運動機能の障害、学習・記憶の障害、思考の低下等がふくまれ多様である。しかし、認知機能障害についてはその発症メカニズムに未解明の点が多く、薬物療法の開発が遅れている。したがって、認知症状の特徴とその神経基盤を明らかにすることは、この疾患の理解にとって重要であり、またこの疾患のモデル動物における各種の認知症状がどのような薬物処置によって改善するのかを知るとは、統合失調症治療の開発において示唆を与えることになる。

(2)統合失調症の発症メカニズムについては、ドーパミン神経系の過活動(ドーパミン仮説)、グルタミン酸神経系の機能不全(グルタミン酸仮説)、発達期の神経系の形成不全(神経発達障害仮説)などの仮説が提唱されている。本研究では、神経発達障害仮説とグルタミン酸仮説の両方を取り入れたモデルとして、新生仔期から幼仔期にかけてグルタミン酸受容体の一種であるNメチルDアスパラギン酸(NMDA)受容体を慢性的に遮断したラットを用い(新生仔期NMDA受容体遮断モデル)、その後の空間的作業記憶と潜在抑制機能の障害を薬物投与が改善しうるかどうかを行動学的に測定するという方法で、統合失調症のモデルとしての妥当性を検討した。

新生仔期のグルタミン酸NMDA受容体を慢性的、半慢性的に遮断する手続きは、精神疾患の動物モデルとして広く用いられ、最初の行動科学研究としてはGorter et al. (1992)が空間学習の障害をモリス水迷路課題を用いて報告した。Du Bois & Huang (2007)による総説では、NMDA受容体機能不全にもとづく初期脳発達の障害と統合失調症との関係が述べられ、その中では本研究で用いるMK-801のような選択的なNMDA受容体拮抗薬や、より非選択的で他の受容体にも作用するフェンシクリジン(PCP)を用いた研究が概観されている。精神医学領域では、PCPを用いた統合失調症動物モデルがより頻繁に用いられる傾向がある。これは人がPCPを摂取すると、せん妄が出現するなど統合失調症と類似した症状がみられ、モデルとしての表面的な妥当性が高いためであるが、PCPはNMDA受容体に選択的に作用するのではなく、より広範な神経系に影響を及ぼす。したがって新生仔期・発達期の“NMDA受容体遮断”が後の行動、認知機能にどのような影響を及ぼすのかをより厳密に知るためには、MK-801のような選択的拮抗薬を用いた方が望ましいと考えられる。本研究は、新生仔期の選択的なNMDA受容体慢性遮断による認知障害、記憶障害が臨床的に人の統合失調症患者で用いられている治療薬で改善されるのかを検討し、この動物モデルが疾患のモデルとして適切か、予測的な妥当性を検討した。

(3)研究の後半では、新生仔期のNMDA受容体慢性遮断と、離乳後の社会的孤立飼育を組み合わせるtwo-hitモデルを導入した。このモデルは、Lim et al. (2012)やGaskin et al. (2014)によって提唱されたものであり、新生仔期のNMDA受容体遮断に加えその後の社会的隔離というストレス状態を負荷した際に精神機能障害が出現する、との考え方にもとづく。新生仔期の受容体の不活性化のみでなく、動物が第2の衝撃として孤立飼育という状況に置かれた時、第1の衝撃だけでは生じないようなさらなる認知障害が出現するのかを検討し、受容体の慢性的遮断

のみを単独で行ってきた従来の“one-hit”モデルと比較して、その適切性を考察した。

2. 研究の目的

(1) 研究1では、統合失調症動物モデルの1つであり、その行動的・神経生化学的特徴が多くの先行研究で検討されてきた、新生仔期グルタミン酸受容体遮断による統合失調症モデル動物の認知機能障害を調べた。すでにいくつかの障害が報告されている学習課題、記憶テストのうち、放射状迷路課題の習得および潜在制止現象を取り上げた。放射状迷路学習は、空間的な要素を含む代表的な作業記憶課題であり、遂行には海馬やその関連脳領域が関わることが知られる。一方で潜在制止は、古典的条件づけにおいて将来条件刺激(CS)となるべき刺激をあらかじめ何度か単独で提示することにより、その後の条件づけにおけるCSと無条件刺激(US)の連合が抑制されること、すなわち「CS先行提示効果」であるが、統合失調症患者ではこの現象が消失・減弱していることが知られ、情報処理過程または注意機能障害の1つの反映であると考えられる。

これらの認知機能の障害を改善・回復すると期待できる薬物としては、ドーパミンD2受容体を選択的に遮断する、いわゆる定型抗精神病薬ではなく、むしろ非定型抗精神病薬のうち、ドーパミンD1、D2受容体への親和性は弱いセロトニン受容体等複数のモノアミン受容体にも親和性がある拮抗するクエチアピン、あるいはドーパミン受容体を遮断するが完全にではなく、部分的に遮断することで神経伝達の安定をもたらす薬物(部分アゴニスト)であるアリピプラゾールが挙げられ、この2つについて末梢投与の効果を検討した。

(2) 研究2では、最近になって提唱されたもう1つの動物モデルを導入し、検討した。新生仔期のNMDA受容体遮断処置と離乳後の社会的隔離は、いずれも統合失調症の神経発達障害動物モデルとして用いられてきた。しかしこれらのアプローチはいずれも、単独で適用された場合には一過性や限定された認知障害しかもたらさないという報告もあった。そこで近年、それらを組み合わせたモデルとして、統合失調症のtwo-hitモデルが考案され(Lim et al., 2012; Gaskin et al., 2014) この疾患の行動的症候(表現型)をよりよく再現するかどうか議論されている。このモデルは、後の障害(異常行動)を徐々に進展させるような素因を作る発達初期の損傷の存在を仮定し、そのあとで第2の損傷や衝撃があると、思春期や成人初期に発病を引き起こす直接のきっかけとなるという仮説にもとづいている。

3. 研究の方法

(1) 新生仔期グルタミン酸 NMDA 受容体遮断モデル動物における認知機能障害と非定型抗精神病薬の効果【研究1】

新生仔期薬物処置：被験体としてWistar系のラットを用いた。母ラットから生まれた仔ラットのうち雄に、7日齢から20日齢までの14日間連続で毎日2回、NMDA受容体の拮抗薬であるMK-801(dizocilpine)を0.4 mg/kg皮下投与した。統制群には生理食塩水を与えた。同腹の仔ラットで2群が半数ずつ含まれるよう、ランダムに振り分けた。4週齢で離乳してさらに集団で飼育し、成体期(8週齢以降)に以下の行動実験を行った。

放射状迷路学習障害に対する抗精神病薬の効果：食餌制限を開始し、放射状迷路学習課題の訓練を行った。中央プラットホームと8本のアームから成る放射状迷路装置を用い、1日1試行の習得訓練を行った。アームの先端に報酬ペレットを1個ずつ置き、ラットがすべての報酬を取り終えるまでを1試行とした。正選択はその試行でまだラットが進入していないアームに入ることとし、学習基準を最初の8選択中の正選択が7以上である試行が5試行連続することとした。

群構成：新生仔期薬物投与により2群の動物がいたため、それぞれをさらに3群に振り分けた。クエチアピン実験では5, 10 mg/kgまたは溶媒を、アリピプラゾール実験では、0.5, 1.0 mg/kgまたは溶媒を、毎日の試行開始直前に腹腔内投与した。したがって、それぞれの抗精神病薬実験について、新生仔期投与2群(MK-801, 生理食塩水)×訓練時投与3群(低用量、高用量、溶媒)の計6群となった。学習完成までの試行数、学習曲線、試行での走行速度をもとにし

て、新生仔期 MK-801 投与による学習障害、および成体期における訓練前薬物投与の改善効果を分析した。

潜在制止の障害に対する抗精神病薬の効果：成体期に、まず毎日の水の摂取可能時間を制限し、その後味覚嫌悪条件づけを用いた潜在制止実験を行った。飲水訓練（3-4 日間）に続き、以下のとおり行った。

先行提示期（3 日間）：先行提示群にはスクロース溶液を、非先行提示群には水を 15 分間飲ませた。条件づけ期（1 日間）：すべての動物に、まずスクロース溶液を 15 分間飲ませたあと、直後に嫌悪状態を引き起こす刺激として、塩化リチウム溶液（0.15M, 10 mL/kg）を腹腔内投与した。テスト期（3 日間）：回復期を 1-2 日置いたあと、スクロース溶液に対する選好性を調べるため、2 瓶法でスクロース溶液と水を対にして 15 分間ラットに提示し、それぞれの摂取量を測定した。テスト期の液体摂取量からスクロース選好率、すなわち全摂取量に対するスクロース摂取量の割合（%）を求め、非先行提示群と比較した先行提示群での選好率の上昇分を、先行提示の効果（潜在制止現象）の指標とした。

以上の手続きによる群構成は、新生仔期投与 2 群（MK-801, 生理食塩水）× 先行提示の有無の 2 群（先行提示、非先行提示）の 4 群であった。抗精神病薬の効果を見るため、それぞれの群をさらに 2 群に分け、アリピプラゾール（実験群）または溶媒（統制群）を、先行提示期と条件づけ期（計 4 日間）の 20 分前に腹腔内投与した。

（2）新生仔期グルタミン酸 NMDA 受容体遮断と社会的隔離の組合せ（two-hit）モデルにおける認知機能障害【研究 2】

新生仔期薬物処置：研究 1 と同様であるが、ここでは 7 日齢から 14 日齢までの 8 日間連続とし、毎日 2 回 NMDA 受容体拮抗薬 MK-801 0.2 mg/kg または溶媒を皮下投与した。離乳時（21 日齢）にそれぞれを孤立飼育群（1 ケージに 1 匹）と集団飼育群（1 ケージに 4 匹）に分け、8 週間維持した。以上 4 群（溶媒-集団飼育、溶媒-孤立飼育、MK-集団飼育、MK-孤立飼育）のラットが 12 週齢になってから新奇物体再認テストと、空間的作業記憶課題である放射状迷路学習訓練を行った。

新奇物体再認テスト：装置として 90x90 cm のアリーナを用い、対角線上の 2 か所に同一の物体（缶、鋳物、ガラス等）を配置した。ラットを 10 分間自由に探索させ（見本期）その後待機ケージに戻した（遅延期 6 時間）。テスト期（5 分間）には、一方の物体のみを新奇な物体に置き換えた状態でラットをアリーナに戻し、2 つの物体（見慣れた物体と新奇な物体）に対する接近（探索）行動を記録した。テスト期の主たる行動指標は、弁別率（ $[(\text{新奇物体への探索時間} / 2 \text{ つの物体への総探索時間}) \times 100]$ （%））とした。理論値（50%）との有意差検定により、見本期の物体情報についての記憶の証拠とした。

放射状迷路学習：方法は研究 1 と同じ。

4. 研究成果

（1）新生仔期グルタミン酸 NMDA 受容体遮断モデル動物における放射状迷路学習と抗精神病薬の効果

新生仔期 NMDA 受容体慢性遮断により、成体期の放射状迷路学習は顕著に障害された。これらの動物に対し、試行直前にクエチアピンを投与しても、学習障害の改善はほとんど見られなかった。一方、アリピプラゾール 0.5mg/kg を投与した群では学習成績の改善が認められ、より速く学習基準に達した。以上のことから、ドーパミン受容体部分アゴニストが、統合失調症の学習・認知機能障害を回復させる作用を持つ可能性が示唆された。

（2）新生仔期グルタミン酸 NMDA 受容体遮断モデル動物における潜在制止と抗精神病薬の効果

新生仔期 MK-801 投与群は、生理食塩水投与群と同程度のスクロース選好率を示したことから、新生仔期 NMDA 受容体慢性遮断は潜在制止現象（先行提示群と非提示群の間のスクロース選好率の差）の出現に対し、有意な影響を及ぼさなかった。この結果は Niikura et al. (2015) とは一致しなかった。そこで条件づけの消去過程を分析したところ、新生仔期 MK-801 投与はテスト期

を繰り返すことによる嫌悪条件づけの除去を早めていた。またアリピプラゾールは、新生仔期 NMDA 受容体遮断による条件づけ除去の促進を抑制する傾向が見られた。

(3) 新生仔期グルタミン酸 NMDA 受容体遮断と社会的隔離の組合せ (two-hit) モデルにおける認知機能障害の検討

全体的には、新生仔期 NMDA 受容体遮断と孤立飼育の組み合わせによって、各単独の操作による記憶障害を上回るような影響は見いだされなかった。すなわち、成体期における新奇物体再認テストでは、新生仔期 NMDA 受容体遮断または孤立飼育のいずれかにより 6 時間遅延条件のテストで成績が有意に低下した。しかし、両者の組み合わせによって効果が増強することはなかった。また、放射状迷路学習では新生仔期 NMDA 受容体遮断によって学習基準達成までの遂行が顕著に悪化した。しかし、離乳後の長期孤立飼育がその障害をさらに増強するという影響は認められなかった。

したがって、two-hit モデル動物において、新生仔期 NMDA 受容体遮断と離乳後の孤立飼育というそれぞれ単独の操作 (one-hit) の影響を増強する現象は確認することはできなかった。しかし、新生仔期薬物処置の期間、孤立飼育の期間を延長することで成体期の認知機能への影響が強まる可能性もある。また、本研究で観察した学習課題や記憶テスト以外の方法を用いて、異なる領域の認知機能について検討することが今後の課題として残される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shimoda Shota, Ozawa Takaaki, Ichitani Yukio, Yamada Kazuo	4. 巻 16
2. 論文標題 Long-term associative memory in rats: Effects of familiarization period in object-place-context recognition test	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0254570
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0254570	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ozawa Takaaki, Itokazu Tatsumi, Ichitani Yukio, Yamada Kazuo	4. 巻 41
2. 論文標題 Pharmacologically induced N methyl D aspartate receptor hypofunction impairs goal directed food seeking in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacology Reports	6. 最初と最後の頁 526 ~ 531
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/npr2.12209	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Toyoshima Michimasa, Mitsui Koshiro, Yamada Kazuo	4. 巻 765
2. 論文標題 Prior stress experience modulates social preference for stressed conspecifics in male rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 136253
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2021.136253	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujihara, K., Yamada, K., Ichitani, Y., Kakizaki, T., Jiang, W., Miyata, S., Suto, T., Kato, D., Saito, S., Watanabe, M., Kajita, Y., Ohshiro, T., Mushiake, H., Miyasaka, Y., Mashimo, T., Yasuda, H. & Yanagawa, Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-engineered Gad1 elimination in rats leads to complex behavioral changes: implications for schizophrenia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Translational Psychiatry	6. 最初と最後の頁 426
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41398-020-01108-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Furuie Hiroki, Yamada Kazuo, Ichitani Yukio	4. 巻 1721
2. 論文標題 Differential effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade during the second and third postnatal weeks on spatial working and reference memory in adult rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 146339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2019.146339	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ozawa Takaaki, Yamada Kazuo, Ichitani Yukio	4. 巻 187
2. 論文標題 D-Cycloserine reverses scopolamine-induced object and place memory deficits in a spontaneous recognition paradigm in rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pharmacology Biochemistry and Behavior	6. 最初と最後の頁 172798
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pbb.2019.172798	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Katsumasa, Toyoshima Michimasa, Ichitani Yukio, Yamada Kazuo	4. 巻 378
2. 論文標題 Enhanced methamphetamine-induced conditioned place preference in risk-taking rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Behavioural Brain Research	6. 最初と最後の頁 112299
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbr.2019.112299	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Ozawa, T., Itokazu, T., Ichitani, Y. & Yamada, K.
2. 発表標題 Pharmacologically-induced N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction impairs goal-directed food seeking in rats
3. 学会等名 日本動物心理学会第81回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takahashi, K., Ichitani, Y. & Yamada, K.
2. 発表標題 The relationship between risk-taking behaviors and methamphetamine-induced conditioned place preference in rats
3. 学会等名 50th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shimoda, S., Ozawa, T. & Yamada, K.
2. 発表標題 Role of the retrosplenial cortex in the retrieval of spatial context memory
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梶田麻菜美・山田一夫・一谷幸男
2. 発表標題 ラットの時間的順序記憶における内側前頭前野グルタミン酸受容体の役割
3. 学会等名 第38回日本生理心理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加瀬田晃大・小澤貴明・一谷幸男・山田一夫
2. 発表標題 恐怖条件づけの消去におけるアデノシン受容体阻害薬の影響
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 豊島理公・山田一夫・梶田麻菜美・一谷幸男
2. 発表標題 社会的再認記憶における海馬下位領域の関与：高記憶負荷条件における社会的記憶の脳内機構の検討
3. 学会等名 第37回日本生理心理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下田翔太・五十嵐優香・小澤貴明・山田一夫・一谷幸男
2. 発表標題 学習の速さと記憶促進薬の効果には個体差がある：空間記憶の記録におけるラットの個体差とD-cycloserineの効果
3. 学会等名 日本心理学会第83回大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

筑波大学人間系 教員情報 http://www.human.tsukuba.ac.jp/faculty_j/ichitani-yukio 筑波大学大学院人間総合科学学術院 ニューロサイエンス学位プログラム 行動神経科学グループ http://www.kansei.tsukuba.ac.jp/~ichitanilab/
--

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
研究分担者	山田 一夫 (YAMADA Kazuo) (30282312)	筑波大学・人間系・教授 (12102)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	上原 マルティン (UEHARA Martin)		
研究協力者	ムハマド アイマン ビン イスマ イル (Muhamad Aiman Bin Ismail)		
研究協力者	梶田 麻菜美 (SUGITA Manami)		
研究協力者	小澤 貴明 (OZAWA Takaaki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関