

令和 4 年 5 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16009

研究課題名(和文) 異常な習慣の形成に着目した強迫性障害の病態解明と治療標的探索

研究課題名(英文) Pathophysiological mechanisms and therapeutic targets for abnormal habit formation-related obsessive-compulsive symptoms

研究代表者

浅岡 希美 (Asaoka, Nozomi)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：90826091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：強迫性障害は繰り返す強迫観念と強迫行為が特徴の精神疾患で、その詳細な原因はいまだ解明されていません。本研究では、活性酸素産生酵素の一種であるNADPHオキシダーゼ1 (NOX1) の強迫行動発現への関与、およびそのメカニズムを、強迫性障害モデルマウスを用いて検証しました。その結果、線条体に発現するNOX1がモデルマウスでのドパミンD2受容体を介したシナプス可塑的变化の誘導に寄与していることが明らかとなりました。また、強迫性障害モデルマウスにおいてNOX1を阻害することで、強迫行動が改善することを見出しました。本研究結果から、NOX1が強迫性障害に対する新規創薬ターゲットとなる可能性が示唆されます。

研究成果の学術的意義や社会的意義

強迫性障害をはじめ、依存症や摂食障害など、強迫的な行動が問題となる疾患では、ドパミン神経系、特にドパミンD2受容体の異常が示唆されていますが、こうしたドパミン系の異常がどのようなメカニズムで強迫性発現に繋がるのかは明らかになっていませんでした。本研究は、活性酸素産生酵素であるNOX1由来の活性酸素が、ドパミンD2受容体の下流シグナル変動を引き起こすことで、線条体の興奮性シナプス機能の変化を誘発し、強迫性発現に寄与していることを見出しました。本成果は、強迫性発現の新たな神経メカニズム解明、および治療標的の導出に資するものであると考えられます。

研究成果の概要(英文)：Obsessive-compulsive disorder (OCD) is a psychiatric disorder characterized by repeatedly rising concern and repetitive behaviors to get rid of the concern. Its precise pathological mechanisms are still being elucidated. Here, we investigated the involvement of NADPH oxidase 1 (NOX1) in compulsive behavior of OCD model mice. behavioral and electrophysiological analysis showed that NOX1 was necessary for induction of D2 receptor stimulation-induced synaptic plasticity in the striatum of OCD model mice. Acute inhibition of NOX1 significantly reduced OCD-related behaviors. Our study suggests that inhibition of NOX1 may become a novel therapeutic target for OCD.

研究分野：神経薬理学

キーワード：強迫性障害 線条体 ドパミンD2受容体 活性酸素産生酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

強迫性障害は強迫観念と強迫行為を主徴とする精神疾患であり、抗うつ薬である選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)の長期・高用量投与が一般的な薬物治療である。しかし、有効性を示さない場合も多いため、強迫性障害の病態に立脚した治療法の開発は喫緊の課題である。

臨床知見の蓄積により、強迫性障害は気分障害とは異なる疾患として再認識されつつある。この新たな病態理解を支える病態生理学的基盤として、意思決定に關与する眼窩前頭皮質(OFC)やその投射先である線条体の機能異常が提唱されている。一方、活性酸素種(ROS)の増加という神経活動以外の異常も報告されているが、神経機能異常との關連については明らかではない。こうした断片的な知見を裏付け、關連性を検証することは病態の統合的理解につながり、新規治療法開発にも重要となる。しかし、強迫性障害の基礎研究は臨床研究と比較して進んでおらず、「強迫性障害の病態・治療に關与する詳細な神経科学的メカニズム」は未解明であった。

2. 研究の目的

強迫性障害の患者の脳画像解析では詳細な病態メカニズムの検証は難しい。しかし、患者で活動亢進が認められる線条体には、皮質からの情報を「正」に伝達する直接路と「負」に伝達する間接路という異なる経路に属する神経細胞種が混在するため、これらの細胞種選択的な機能変化の検討が必須である。そこで本研究では、線条体中央部(CS)の神経細胞種特異的な機能変化に着目した強迫性障害の病態形成メカニズムの解明を目指した。

一方、細胞障害に至らない低濃度 ROS のセカンドメッセンジャーとしての機能が明らかにされつつある。実際、ROS 生成酵素である NADPH オキシダーゼ(NOX)がシナプスの可塑的变化に關与することが報告されている。そこで、強迫性障害モデルマウスの CS において、非食細胞型分子種である NOX1 の発現量が増加しているという予備的検討結果を踏まえ、強迫性障害の病態形成に寄与する CS の間接路神経選択的な可塑的变化とそのメカニズムについて、セカンドメッセンジャーとしての ROS の關与に着目して検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 強迫性障害モデルマウスの作製

モデル作製には、6-12 週齢の雄性 C57BL6/J 系マウス、および C57BL6/J バックグラウンドの *Nox1* 遺伝子欠損マウスを使用した。ドパミン D_{2/3} 受容体アゴニストである quinpirole (QNP; 1 mg/kg)を 1 日 1 回、腹腔内投与し、7-12 回投与したものを強迫性障害モデルマウスとみなした。

(2) 強迫性障害様行動の評価

強迫性障害様の行動は、以下の 2 点について評価を行った。

自発的反復行動の評価

マウスは 1 匹ずつ飼育を行い、飼育中のケージをホームケージとして十分に馴化を行った。QNP を腹腔内投与したのち、ホームケージに戻し、投与 20 分から 30 分後の自発的な行動をビデオ記録した。解析には 10 分間の解析中に chewing 行動を行った時間を用いた。また、chewing 行動は以下の定義に従って判別した。

- 前足や口でケージ内の床材や同居マウスの毛をつかみ、繰り返し引き延ばしたり梳いたりするような動作。
- 穴掘り行動 (digging) や毛づくろい行動 (grooming) は chewing とは区別し、別個に評価を行った

思考柔軟性の評価

マウスは集団で飼育し、試験開始の 1 週間以上前から正常体重の 80-90% の体重を維持するよう接触制限を行った。実験には T 字型迷路を使用し、報酬提示による左右弁別学習を行った。最初の 6-7 日間は、QNP の投与を行わず左右弁別を学習させ、一定以上の正答率に達したマウスのみを次のステップに使用した。次のステップでは、同様の左右弁別学習を続けるが、試験の開始 20 分前に QNP の投与を行った。この試行を 8 日間続け、なお一定値以上の正答率を維持したマウスを最終のステップへと用いた。最終ステップでは、報酬の位置を左右反転させる逆転学習課題を 4 日間かけて行った。本ステップでも試験の開始 20 分前に QNP の投与を行った。解析には各ステップにおける正答率の変動を用い、逆転学習試験時の正答率の上昇抑制を思考柔軟性の低下として評価した。

(3) 電気生理学的検討

Quinpirole または溶媒(生理食塩水)の 8 回目の投与が終了した翌日に記録を行った。マウスはイソフルランによる深麻酔下で断頭し、脳を摘出した。ピプラトームを用いて、線条体を含む厚さ 200 μm の冠状切片を作製し、酸素ガスを通気した人工脳脊髄液 (ACSF)中に安置した。切片は作製後、1 - 4 時間以内に使用した。

4. 研究成果

(1) 活性酸素産生酵素 NOX1 の強迫様行動発現への関与

初めに、Nox1 の欠損が強迫性モデルマウスの行動異常に与える影響を検討した。Nox1 欠損マウスに QNP の反復投与を行ったところ、初回に現れる鎮静作用は野生型のマウスと同程度であったのに対し、反復行動は有意に減少した。また、野生型マウスで QNP の反復投与を行ったうち、反復行動の評価前のみ、NOX1 阻害薬 (ML171) を腹腔内投与しても、反復行動が有意に減弱することが明らかとなった。同様に、T 字型迷路を用いた左右弁別学習とその逆転学習においても、Nox1 欠損の強迫性障害モデルマウスでは、野生型のモデルマウスと比較して有意に逆転学習時の正答率が改善された。

(2) 強迫性障害モデルマウスにおける脳部位選択的な NOX1 発現変動

依存症患者などの脳画像研究より、強迫性への関与が示唆される脳領域が明らかとされつつある。そこで、こうした脳領域のうち、NOX1 の関与が強い脳領域を検討するため、Nox1 遺伝子発現量の検討を行った。強迫性への関与が示唆される脳領域(眼窩前頭皮質(OFC)、背側線条体(DS)、線条体中央部(CS)、視床、海馬、腹側被蓋野)のうち、Nox1 の発現は DS と CS で有意に高く、その他の領域と比較して 10-70 倍高い発現量を示した。こうした、領域間での明らかな発現量の偏りは、NOX のその他のサブタイプである NOX2 や NOX4 では認められなかった。また、コントロール処置のマウスと強迫性障害モデルマウスの Nox1 遺伝子発現量を比較したところ、CS でのみ、モデルマウスにおいて有意に Nox1 遺伝子の発現誘導が起こっていることが明らかとなった。以上の結果から、CS における Nox1 遺伝子発現亢進が強迫性障害様行動の発現に寄与していることが示唆された。

(3) 強迫性障害モデルマウスの CS における NOX1 依存的な興奮性シナプス増強の誘発

以前の検討より、強迫性モデルマウスでは CS の間接路中型有棘神経(iMSN)において測定中に QNP による D₂ 受容体の追加刺激を行った際に、興奮性入力指標である AMPA/NMDA 比が有意に増大し、興奮性シナプスが増強することを見出している。そこで、この D₂ 受容体の追加刺激によるシナプス増強における NOX1 の関与を検討した。追加刺激前は、QNP 反復投与の有無や遺伝子型による AMPA/NMDA 比の有意な差は認められなかった。一方、追加刺激後では、野生型の強迫性モデルマウス由来の iMSN では AMPA/NMDA 比の有意な増大が認められた。Nox1 欠損の強迫性モデルマウス由来の iMSN では、AMPA/NMDA 比の有意な変動は認められなかった。また、野生型のモデルマウス由来の iMSN でも、NOX1 阻害薬 ML171 を添加した状態では、追加刺激による AMPA/NMDA 比の上昇が認められなくなった。以上の結果より、強迫性モデルマウス由来の iMSN では、D₂ 受容体シグナルを介した興奮性シナプス増強が起こっており、その誘導には NOX1 が必要であることが示唆された。

D₂ 受容体は、Gi/o 共役型の GPCR であり、多くの神経細胞においてそのシグナルは神経活動を抑制することが知られている。無処置の野生型マウス由来の iMSN で AMPA/NMDA 比の上昇が認められなかった点と合わせて考えると、Gi/o タンパク質由来の細胞内シグナルを介して、モデルマウス由来の iMSN で認められた AMPA/NMDA 比の上昇が起こったとは考えにくい。そこで、GPCR の内在化と、G タンパク質とは別種の細胞内シグナルの誘導に関与することが知られている、アレスチンを介したシグナルの関与について検討を行った。この検討では、D₂ 受容体のアゴニストとして機能するが、G タンパク質のシグナルを流しにくく、アレスチンを介したシグナルが流れやすいといった特性を持つ、バイアスドアゴニスト(UNC9994)を QNP の代わりに測定液に添加して先ほどと同様の検討を行った。その結果、QNP による追加刺激と同様に、野生型の強迫性モデルマウス由来の iMSN では UNC9994 の処置により AMPA/NMDA 比の有意な増大が認められた。一方で、Nox1 欠損の強迫性モデルマウス由来の iMSN では、測定液に UNC9994 を添加しても、AMPA/NMDA 比の有意な変動は認められなかった。これらの結果から、強迫性障害モデルマウスの iMSN では、D₂ 受容体刺激時に アレスチンシグナルを介した興奮性シナプス増強が起こっており、その誘導には NOX1 が必要であることが示唆された。

(4) 線条体 NOX1 の強迫性障害様行動発現への関与

最後に、線条体の NOX1 がモデルマウスの強迫性障害様行動の発現に寄与しているか否かを検討した。強迫性モデルマウスの線条体へ薬物局所投与用のインジェクションカニューレを留置し、反復行動試験の直前に アレスチン阻害薬(barbadin)や NOX1/4 阻害薬(setanaxib)を局所投与したところ、反復行動は有意に減少した。また、NOX1 に対する miRNA を神経細胞選択的に発現させるアデノウイルスベクターを線条体内に投与した強迫性モデルマウスにおいて、反復行動の評価を行ったところ、コントロール miRNA を発現させた群と比較して、反復行動に費やす時間が有意に減少した。同じく、線条体の神経細胞選択的に Nox1 をノックダウンした強迫性モデルマウスにおいて、逆転学習試験の正答率を比較したところ、こちらでも、Nox1 ノックダウン群において有意な正答率の改善が認められた。以上の結果より、線条体の NOX1 が D₂ 受容体の反復刺激時の強迫様行動に関与することが明らかとなった。

以上の結果を踏まえると、D₂ 受容体が繰り返し刺激されることで、CS における D₂ 受容体刺激時のシグナルが G タンパク質を介したものから β アレスチンを介したシグナルへと変動していることが明らかとなり、こうしたシグナルの変化が強迫性障害様の行動異常に寄与することが示唆された。また、強迫性モデルマウスの作製後であっても NOX1 阻害薬の単回投与や処置によって、強迫様行動や iMSN におけるシナプス増強が改善しうることが示された。こうした本研究結果より、NOX1 阻害は依存症における強迫性における新規の創薬ターゲットとなることが示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Asaoka Nozomi, Ibi Masakazu, Hatakama Hikari, Nagaoka Koki, Iwata Kazumi, Matsumoto Misaki, Katsuyama Masato, Kaneko Shuji, Yabe-Nishimura Chihiro	4. 巻 41
2. 論文標題 NOX1/NADPH Oxidase Promotes Synaptic Facilitation Induced by Repeated D2 Receptor Stimulation: Involvement in Behavioral Repetition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 2780 ~ 2794
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.2121-20.2021	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 Hatakama Hikari, Asaoka Nozomi, Nagayasu Kazuki, Shirakawa Hisashi, Kaneko Shuji	4. 巻 206
2. 論文標題 A selective serotonin reuptake inhibitor ameliorates obsessive-compulsive disorder-like perseverative behavior by attenuating 5-HT2C receptor signaling in the orbitofrontal cortex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuropharmacology	6. 最初と最後の頁 108926 ~ 108926
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuropharm.2021.108926	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 浅岡 希美、衣斐 督和、金子 周司、矢部 千尋
2. 発表標題 NOX1/NADPH oxidase regulates compulsive-like repetitive behaviors through promoting D2 receptor-mediated synaptic facilitation in the striatum
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅岡 希美、金子 周司、矢部 千尋
2. 発表標題 NOX1/NADPH oxidaseはドパミンD2受容体を介した 線条体のシナプス増強を促進することで強迫様行動の誘発に関与する
3. 学会等名 第71回 日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅岡 希美, 金子 周司, 矢部 千尋
2. 発表標題 NOX1/NADPH oxidase regulates compulsive-like repetitive behaviors through promoting D2 receptor-mediated synaptic facilitation in the striatum
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 CJK第1回国際会議 (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------