

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月14日現在

機関番号：10101 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21591478
 研究課題名（和文）気分障害の病態・発症機序における情動ストレス神経回路の役割に関する研究
 研究課題名（英文）A study to clarify the role of neurocircuitry of emotional stress for the pathogenesis of mood disorders
 研究代表者
 井上 猛 (INOUE TAKESHI)
 北海道大学・北海道大学病院・講師
 研究者番号：70250438

研究成果の概要（和文）：情動ストレスの動物モデルである恐怖条件付けストレスを用いて、気分障害治療薬の作用機序を神経回路の観点から明らかにした。SSRI、SNRI や mirtazapine などの新規抗うつ薬の不安行動、神経伝達物質に対する効果を減弱、増強する併用薬物を明らかにした。さらに、扁桃体基底核のグルタミン酸神経が恐怖条件付けにおいて重要な役割をはたしていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We clarified the mechanism of therapeutic drugs for mood disorders from an aspect of neurocircuitry by using a conditioned fear stress model, an animal model of emotional stress. We investigated the drugs to reduce or potentiate the effect of new antidepressants, such as SSRI, SNRI and mirtazapine, on anxiety behavior and neurotransmitters. Furthermore, we showed an important role of glutamatergic neurons in the basal nucleus of the amygdala for fear conditioning.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計 ki
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：気分障害、恐怖条件付け、神経科学、ストレス、扁桃体、セロトニン、選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)

1. 研究開始当初の背景

気分障害の発症、病態、症状増悪において情動ストレスが重要な役割をはたしていることは臨床的に周知の事実であり、情動ストレスの脳への影響を研究することは気分障

害の発症、病態、症状増悪の機序の解明につながると思われる。不安・恐怖などの情動ストレスに関する神経科学的研究が近年急速に進み、扁桃体-視床背内側核-前頭前野-扁桃体の神経回路（Yakovlev 回路）と海馬、中

隔が情動ストレスに関与し、とりわけ扁桃体が必須の役割をはたしていることが多くの脳局所破壊実験により明らかになった (LeDoux JE)。さらに、これらの動物実験の結果から最近ではヒトを対象とした functional MRI や PET 研究により扁桃体が不安・恐怖などの情動ストレスに深く関与していることが証明された。しかし、扁桃体内の様々な神経伝達物質や細胞内情報伝達系の情動ストレスにおける役割は十分に解明されていない。

研究代表者はこれまで十数年以上にわたり、心理的ストレスである conditioned fear stress model (CFS、恐怖条件付けストレスモデル) を用いて、CFS の際の神経伝達物質、転写因子の変化を扁桃体で詳細に検討し、論文として発表してきた。その結果、1) CFS による不安行動 (すくみ行動) を選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) 全身投与が減弱すること、2) CFS によって扁桃体のセロトニン及びドパミン神経伝達と転写因子である c-Fos 蛋白発現が亢進すること、3) 扁桃体破壊と扁桃体への SSRI 局所投与が不安行動を抑制すること、4) SSRI は CFS による c-Fos 発現を抑制すること、を明らかにした。これらの結果から、SSRI の情動に対する効果が扁桃体の神経活動に対する抑制作用を介しているという結論を得た。米国の LeDoux JE、Fanselow M、Maren S、Davis M らの研究者らは CFS におけるグルタミン酸の役割を脳局所投与実験によって明らかにしてきたが、情動ストレスにおける扁桃体セロトニンの機能的役割についてはこれまで報告がなく、我々の報告が初めてのものであり、我々の研究はこの領域においては国際的にも先端的である。

SSRI は気分障害の治療に広く用いられ、情動ストレスに拮抗する効果が想定されているのにもかかわらず、その気分障害に対する臨床効果の作用機序はまだほとんど解明されていないのが現状である。上述したように、すでに CFS モデルにおいて SSRI の情動ストレスに対する作用機序が解明されてきていることから、本モデルを用いて SSRI の作用機序解明をすすめることは臨床的に非常に有意義なことである。不安などの情動ストレスの神経回路はすでに詳細に明らかになっており、情動ストレスの神経回路にもとづいた多角的な神経科学的解析を本研究で実施し、気分障害の病因・病態解明の糸口を見出したい。

2. 研究の目的

以上の研究背景から、本研究では下記のテーマについて種々の行動薬理・神経化学的研究を行うことを目的とした。

(1) CFS に対する SSRI の抗不安作用を増強す

るあるいは減弱する薬理学的操作を探索する。セロトニン神経系の機能をノルアドレナリン神経系が制御していることが最近明らかになっていることから、 $\alpha 1$ 遮断薬、 $\alpha 2$ 遮断薬の SSRI の抗不安作用に対する影響を検討する。さらに $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 受容体に親和性を有する非定型抗精神病薬と新規抗うつ薬である mirtazapine の SSRI の効果に対する作用も検討する。

(2) セロトニン系に作用する新規抗うつ薬である mirtazapine の CFS における抗不安作用に及ぼす、リチウム併用の効果を検討する。

(3) 最近ノルアドレナリン神経系が恐怖記憶再固定化に関与していることを示唆する研究が発表されており、当教室の CFS モデルにおける恐怖記憶再固定化にノルアドレナリン系が関与しているかどうかを薬理学的に検討する。

(4) 脳内微小透析実験により、ノルアドレナリン、セロトニン、ドパミンの脳内濃度を測定し、SSRI、SNRI、MAO 阻害薬の効果と SSRI の効果に対する甲状腺ホルモンの相互作用について検討する。

(5) CFS によって扁桃体基底核の c-Fos 発現が増強するが、c-Fos 陽性細胞がどのような特徴をもった細胞なのかを免疫組織学的に同定する。

3. 研究の方法

(1) 短時間 (5 分間) のフットショック・ストレス (床の金属グリッドに電流を流し、四肢に痛みを加えることにより負荷) をラットに負荷し、翌日ショック箱にフットショックを与えないで 5 分間再曝露することにより CFS をラットに与える。フットショックを加えないでショック箱にラットを置く操作は痛み等の身体的刺激を含まないため、CFS は純粋な心理的ストレスあるいは情動ストレスとみなされる。通常探索行動が活発にみられる場面で、数分間以上にわたって、じっと身動きしない行動がすくみ行動と呼ばれる。すくみ行動を不安・恐怖の指標として用い、SSRI の抗不安作用を、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 受容体アンタゴニストや非定型抗精神病薬、mirtazapine が抑制あるいは促進するかどうかを行動薬理学的に検討する。

(2)(1)と同様に、CFS モデルを用いて、mirtazapine によるすくみ行動抑制効果に対して、リチウム亜慢性投与の併用が及ぼす影響について行動薬理学的に検討した。さらに、SSRI によるすくみ行動抑制効果に対して、グルタミン酸系に作用する薬物 (lamotrigine、MK801) の併用が及ぼす影響について行動薬理学的に検討した。

(3) CFS モデルで、2 回目にショックを与えないでショック箱に曝露する前後に、選択的ノルアドレナリン再取り込み阻害薬

reboxetine と β 遮断薬 propranolol を投与し、翌日にショック箱に再曝露し、恐怖記憶の再固定化が増強あるいは減弱するかどうかを、すくみ行動を指標にして検討した。

(4) 脳内微小透析実験で、ノルアドレナリン、セロトニン、ドパミンの脳内細胞外濃度を測定し、3種類のSSRIの作用の違いを検討した。さらにSNRI急性投与に及ぼす甲状腺亜慢性投与の影響、MAO-A阻害薬とMAO-B阻害薬の相互作用について検討した。

(5) CFSによって発現が増強する扁桃体基底核のc-Fos陽性細胞の数を免疫組織学的に測定した。さらに、グルタミン酸神経細胞のマーカであるglutaminaseとtype I vesicular glutamate transporter (Vglut1)、GABA神経のマーカであるGAD67をc-Fosと二重染色した。CFSによって活性化する細胞が神経細胞であること、またグルタミン酸神経かGABA神経かの同定を行った。

4. 研究成果

(1) 恐怖条件付けストレスモデルを用いて、SSRIの不安に対する効果の作用機序、増強療法の可能性について検討した。SSRIの効果は $\alpha 2$ 遮断薬は軽度増強し、 $\alpha 1$ 遮断薬は抑制した。また、臨床で併用されることが多い非定型抗精神病薬はSSRIの効果を増強することはなく、むしろ減弱する傾向を示したが、 $\alpha 1$ 遮断作用が影響している可能性が考えられた。さらに、SSRIの効果を増強する新規抗うつ薬であるmirtazapine併用が顕著に増強したが、その作用機序の一部はmirtazapineの $\alpha 2$ 遮断作用を介している可能性が考えられた。

(2) 恐怖条件付けストレスで新規抗うつ薬であるmirtazapineが抗不安作用を有し、その効果は $\alpha 1$ 拮抗剤、セロトニン1A拮抗薬で阻害されることを報告した。SSRIと同様に、mirtazapineの恐怖条件付け発現過程に及ぼす効果はフットショックからの時間に依存しており、フットショック後1日では効果はみられるが、1週間後には見られなくなった。臨床ではmirtazapineとリチウムを併用することが多いため、mirtazapineの抗不安作用に対するリチウム前投与の影響を検討した。その結果、リチウムはSSRIに対する効果と同様にmirtazapineの抗不安作用を増強することが明らかになった。一方、類似の四環系抗うつ薬であるmianserinは恐怖条件付けストレスで抗不安作用を示さず、リチウム亜慢性投与により効果が増強することもなかった。Mirtazapineとmianserinの作用の違いはmianserinの有する $\alpha 1$ 遮断作用をmirtazapineが有さないためと考えられた。

(3) 恐怖条件付けストレスモデルを用いて、SSRIの不安に対する効果の作用機序、増強療法の可能性について検討した。恐怖条件付けではセロトニンのみならず、グルタミン酸も強く関与することから、グルタミン酸に作用する薬物のSSRIの効果に対する効果をまず検討した。脳内の細胞外グルタミン酸濃度を下げる作用を有するlamotrigine併用およびNMDAアンタゴニストであるMK-801併用はSSRIの効果に有意な影響を与えなかった。グルタミン酸受容体のサブタイプのうち、NMDA受容体遮断薬CPPとAMPA受容体遮断薬IEM-1460をそれぞれ単独あるいは併用で投与したところ、両者の交互作用はみられず、IEM-1460のみが恐怖条件付けストレスの獲得過程を抑制した。

(4) β 遮断薬であるpropranololが文脈的恐怖条件付けストレスへの再曝露後の恐怖記憶の再固定化を阻害することが報告されているため、再曝露前後にpropranololをラットに全身投与したが、恐怖記憶の再固定化に及ぼす効果は追試できなかった。ノルアドレナリン系に対して、propranololと反対の作用を有するノルアドレナリン再取り込み阻害薬であるreboxetineの恐怖記憶再固定化に及ぼす影響も検討したが効果はみられなかった。

(5) 本邦臨床で用いられている3種類のSSRI(paroxetine, fluvoxamine, sertraline)の細胞外モノアミン濃度を脳内透析法により測定し、SSRI間の違いについて検討した。測定した脳部位は前頭前野、側坐核、線条体の3脳部位である。いずれのSSRIも3脳部位で細胞外セロトニンを増加させた。さらに3つのSSRIともに側坐核で細胞外ノルアドレナリンも増加させたが、その作用機序は現時点では不明である。さらに、sertralineのみがそのドパミン再取り込み阻害作用により側坐核、線条体で細胞外ドパミン濃度を増加させた。SSRI間の生化学的相違がみられることは、SSRI間の変更の妥当性の理論的根拠となりうる。

(6) ラットの脳内透析実験を用いて、選択的MAO-A阻害剤であるRo 41-1049と選択的MAO-B阻害剤であるlazabemideの細胞外セロトニン及びノルアドレナリン濃度に対する併用効果を内側前頭前野で検討した。Ro 41-1049はセロトニンとノルアドレナリン濃度を増加させたが、lazabemideは両アミンの濃度に影響を与えなかった。両者の併用はRo 41-1049によるノルアドレナリン濃度増加作用をさらに増強したが、セロトニン濃度増加作用には影響を与えなかった。

(7) うつ病の増強治療に用いられる甲状腺ホルモンをラットに1週間投与したところ前頭前野の細胞外セロトニン濃度が増加し、SNRIであるmilnacipranによる細胞外セロトニン濃度増加に対して相加的に作用した。

(8) 恐怖条件付けストレスで扁桃体基底核のc-Fos蛋白発現が増加するが、その大部分はグルタミン作動性神経における発現であった。したがって、恐怖条件付けストレスにより条件刺激である文脈情報の入力部位である扁桃体基底核のグルタミン作動性神経で最初期遺伝子が駆動されることが細胞レベルで証明された。

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 16 件)

- ① Masuda T, Nakagawa S, Boku S, Nishikawa H, Takamura N, Kato A, Inoue T, Koyama T: Noradrenaline increases neural precursor cells derived from adult rat dentate gyrus through beta2 receptor. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 36: 44-51, 2012. 査読有
- ② Kitaichi Y, Inoue T, Nakagawa S, Boku S and Koyama T: Effects of combined treatment with clorgyline and selegiline on extracellular noradrenaline and serotonin levels. *Acta Neuropsychiatr*. Accepted manuscript online: 24 JAN 2012
DOI:10.1111/j.1601-5215.2012.00652.x
査読有
- ③ Song N, Boku S, Nakagawa S, Kato A, Toda H, Takamura N, Omiya Y, Kitaichi Y, Inoue T, Koyama T: Mood stabilizers commonly restore staurosporine-induced increase of p53 expression and following decrease of Bcl-2 expression in SH-SY5Y cells. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2012 Mar 29. [Epub ahead of print]
PubMed PMID: 22484386 査読有
- ④ Masuda T, Nishikawa H, Inoue T, Toda H, Nakagawa S, Boku S, Koyama T: 5-HT depletion, but not 5-HT1A antagonist, prevents the anxiolytic-like effect of citalopram in rat contextual conditioned fear stress model. *Acta Neuropsychiatr*. Accepted manuscript online: 3 MAY 2012 12:05PM EST |

DOI: 10.1111/j.1601-5215.2012.00669.x
査読有

- ⑤ 井上 猛, 小山 司: 不安障害 (特集 生物学的精神医学の進歩). *BRAIN and NERVE* 64(2):131-138, 2012. 査読無
- ⑥ Boku S, Nakagawa S, Masuda T, Nishikawa H, Kato A, Toda H, Song N, Kitaichi Y, Inoue T, Koyama T: Effects of mood stabilizers on adult dentate gyrus-derived neural precursor cells. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 35:111-117, 2011. 査読有
- ⑦ Nakato Y, Abekawa T, Ito K, Inoue T, Koyama T: Lamotrigine blocks apoptosis induced by repeated administration of high-dose methamphetamine in the medial prefrontal cortex of rats. *Neurosci Lett*. 490:161-164, 2011. 査読有
- ⑧ Izumi T, Boku S, Shinmin W, Inoue T, Konno K, Yamaguchi T, Yoshida T, Matsumoto M, Watanabe M, Koyama T, Yoshioka M: Retrieval of conditioned fear activates the basolateral and intercalated nucleus of amygdala. *J Neurosci Res*. 89 (5): 773-790, 2011. 査読有
- ⑨ Inoue T, Kitaichi Y, Koyama T: SSRIs and conditioned fear. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35: 1810-1819, 2011. 査読有
- ⑩ Nakato Y, Abekawa T, Inoue T, Ito K, Koyama T: Lamotrigine blocks repeated high-dose methamphetamine-induced behavioral sensitization to dizocilpine (MK-801), but not methamphetamine in rats. *Neurosci Lett*. 504(2):131-4, 2011 査読有
- ⑪ Kitaichi Y, Inoue T, Nakagawa S, Boku S, Izumi T, Koyama T: Combined treatment with MAO-A inhibitor and MAO-B inhibitor increases extracellular noradrenaline levels more than MAO-A inhibitor alone through increases in β -phenylethylamine. *Eur J Pharmacol*. 637(1-3):77-82, 2010. 査読有
- ⑫ Nishikawa H, Inoue T, Izumi T, Nakagawa S, Koyama T: SSR504734, a glycine transporter-1 (GlyT1) inhibitor, attenuates acquisition and expression of contextual conditioned fear in rats. *Behav Pharmacol* 21(5-6):576-9, 2010. 査読有
- ⑬ Nakato Y, Abekawa T, Ito K, Inoue T, Koyama T: Lamotrigine blocks the initiation and expression of repeated

high-dose methamphetamine-induced prepulse inhibition deficit in rats. *Neurosci Lett* 481:183-187, 2010. 査読有

- ⑭ Kitaichi Y, Inoue T, Nakagawa S, Boku S, Kakuta A, Izumi T, Koyama T: Sertraline increases extracellular levels not only of serotonin, but also of dopamine in the nucleus accumbens and striatum of rats. *Eur J Pharmacol*. 647: 90-96, 2010. 査読有
- ⑮ 井上 猛、小山 司: 痛覚による恐怖条件付けにおけるセロトニンの機能的役割. *医学のあゆみ* 232(1): 75-79, 2010. 査読無
- ⑯ 井上 猛、小山 司: 不安障害における扁桃体セロトニンの役割 (シンポジウム「脳科学による心身医学の解明」). *心身医学* 49(4): 291-297, 2009. 査読無

[学会発表] (計 12 件)

- ① Inoue T: Emotional memory and animal models of psychiatric disorders: an overview and learning-based animal models of anxiety. (Symposium) 2nd Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology 2011.9.23 (2011.9.23-24, Seoul, Korea)
- ② Toda H, Nakagawa S, Boku S, Kato A, Takamura N, Song N, Inoue T, Koyama T: Maternal separation stress and vulnerability to anxiety behavior in rats. 40th annual meeting of Society for Neuroscience (2010.11.13-17., San Diego, USA)
- ③ Inoue T, Masuda T, Takamura N, Nakagawa S, Boku S, Toda H, Koyama T: Effect of co-administration of mirtazapine with citalopram in rat contextual conditioned fear stress model. 第 19 回日本臨床精神神経薬理学会・第 39 回日本神経精神薬理学会・The 1st Meeting of the Asian College of Neuropsychopharmacology (AsCNP) 合同年会 (会期 2009.11.13-15, 国立京都国際会館 (京都))
- ④ Toda H, Nakagawa S, Boku S, Song N, Kato A, Inoue T, Koyama T: Dexamethasone /corticotrophin releasing hormone test in maternal separation stress models. 39th Annual Meeting of Society for Neuroscience (2009.10.17-22., Chicago, USA)

[図書] (計 2 件)

- ① 井上 猛、小山 司: SSRI の抗不安作用の作用機序と作用脳部位の解明: 不安恐怖ストレスの脳内機序—扁桃体の役割. 専門医のための精神科臨床リュミエール「27. 精神科領域からみた心身症」(石津宏編) 中山書店、東京、pp77-88, 2011.
- ② 井上 猛: 気分障害におけるドパミンの役割. 気分障害の薬理・生化学—総括と新たな挑戦—, 医薬ジャーナル、東京、2012 (印刷中)

[産業財産権] 出現・取得ともになし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 猛 (INOUE TAKESHI)
北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号: 70250438

(2) 研究分担者

中川 伸 (NAKAGAWA SHIN)
北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号: 60360905

(3) 連携研究者

なし