

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860943

研究課題名(和文) 抗うつ薬誘発性躁転に対する気分安定薬の作用に関連する神経回路の探索

研究課題名(英文) An exploratory study of the neural networks related to the effect of mood stabilizers on antidepressant-induced mania

研究代表者

倉富 剛 (KURATOMI, GO)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：00593592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：気分障害の治療では、抗うつ薬によって誘発される躁転や攻撃性は患者の対人関係に影響を与える重大な問題となる。我々は抗うつ薬投与により誘発される躁転の病態を解析するために、気分障害様の行動異常を示す変異ミトコンドリアDNA複製酵素トランスジェニックマウスを用いて抗うつ薬imipramineの慢性投与下における行動解析を行い、本マウスが社会的行動と活動リズムの異常、imipramine投与初期における高い敵対性を示すことを明らかにした。また、imipramine投与が本マウスの社会的順位を低下させること、気分安定薬lithiumの低用量投与では予防効果が認められないことを示した。

研究成果の概要(英文)：Antidepressant-induced mania and aggressive behavior during the pharmacologic treatment of mood disorders are severe problems that affect patient's interpersonal relationships. For the purpose of analyzing pathological mechanisms of antidepressant-induced mania, we conducted behavioral analysis of mutant mitochondrial DNA polymerase gamma 1 transgenic (Tg) mice, which was reported to show mood disorder-like phenotypes, during continuous treatment with antidepressant imipramine. We revealed that Tg mice displayed abnormalities of social behaviors and the activity rhythm. Tg mice also showed high agonistic behavior in the early phase of imipramine treatment. We also demonstrate imipramine treatment lowered the dominance hierarchy of Tg mice, which was not prevented by treatment with low-dose lithium.

研究分野：精神医学

キーワード：双極性障害 うつ病 気分障害 抗うつ薬

1. 研究開始当初の背景

双極性障害は、気分や行動の亢進が認められる躁病相とそれらの低下が認められるうつ病相が、症状のない寛解状態を挟んで繰り返すことを特徴とする疾患である。双極性障害の素因を持つ患者では、一部の抗うつ薬を服薬した場合に躁転を引き起こすことが報告されており、lithium 等の気分安定薬との併用が推奨される (Salvadore et al., 2010)。またうつ病相のみを繰り返す疾患である大うつ病性障害 (うつ病) の患者の一部においても、抗うつ薬の投与初期において攻撃性や衝動性が誘発される (賦活症候群)。双極性障害やうつ病に代表される気分障害の治療では、抗うつ薬によって誘発される躁転や攻撃性、衝動性の増加は患者の対人関係や社会生活に影響を与える重大な問題となり得る。

気分障害の動物モデルとしては、エキソヌクレアーゼ活性を欠損したミトコンドリア DNA 複製酵素 (DNA polymerase gamma 1: polg1) の変異体を CaMKII プロモーター下に発現させた変異 Polg1 トランスジェニック (Tg) マウスが報告されている (Kasahara et al., 2006)。本 Tg マウスは前脳において異常なミトコンドリア DNA の蓄積が認められ、雌において性周期依存的な輪回し行動量の変化と明期初期・終期における輪回し行動量の増加を示す。性周期依存的な輪回し行動量変化は、lithium の慢性投与により改善する。また、雄の Tg マウスでは、三環系抗うつ薬 amitriptyline の慢性投与により、輪回し行動量の増加が認められる。本研究では、三環系抗うつ薬慢性投与により躁転様の行動変化が生じ得る気分障害モデルマウスとして、変異 Polg1 Tg マウスを解析対象に選択した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、抗うつ薬慢性投与によって惹起される躁転様行動の病態機序を解析することである。第一に、気分障害モデルマウスである変異 Polg1 Tg マウスに対し三環系抗うつ薬を慢性投与し、Tg マウスに生じる社会的行動の異常を動物行動学的手法によって解析する。次に Tg マウスに対する気分安定薬の慢性投与が、三環系抗うつ薬誘発性の行動異常を改善するか検討する。また行動異常に関連する前脳領域における異常ミトコンドリアの局在を、免疫組織化学染色によって検討する。

3. 研究の方法

(1) 動物

変異 Polg1 Tg マウスは理化学研究所バイオリソースセンターより凍結胚として提供を受け本学で繁殖したものをを用いた。母子間における異常なミトコンドリア DNA の伝達を避けるため、雄 Tg マウスと雌 C57BL/6J 間で繁殖を行い、実験には雌のヘテロ接合体と野生型マウスを用いた。マウスは 12 時間の明

暗周期のもと、自由給餌、自由給水環境下で飼育した。本研究は獨協医科大学動物実験委員会、獨協医科大学組換え DNA 実験安全委員会の承認を得たうえで実施した。

(2) ケージ内行動解析

浸透圧ポンプを用いて三環系抗うつ薬 imipramine または生理食塩水を慢性投与した Tg マウスと野生型マウスを実験に用いた (雌、20-22 週齢、各群 n = 7-8)。浸透圧ポンプを埋め込んだマウス (被験マウス) を、ケージメイト (野生型、雌、同腹マウス) とともに透明なフタ付の飼育ケージで 24 日間飼育した。ケージ内は、上部に取り付けた暗視機能付きビデオカメラを用いて常時撮影した。録画ファイルのうち、隔日 (投薬後 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23 日) の明期初期 (明期開始後 1 時間) および暗期初期 (暗期開始後 1 時間) の動画について、行動コーディングソフトウェア Solomon Coder を用いて、被験マウスが以下に示す行動に費やした時間と頻度を測定した。

非社会的行動

- ・摂食：被験マウスが給餌器に鼻を押し当て餌ペレットを摂食する
- ・自己グルーミング：被験マウスが自身の身体を毛づくろいする
- ・無動・睡眠：被験マウスの身体全体が無動状態にある
- 社会的行動 (接触)
- ・鼻・鼻間接触：被験マウスの鼻がケージメイトの鼻と接触する
- ・鼻・生殖器肛門間接触：被験マウスの鼻がケージメイトの生殖器・肛門領域と接触する
- ・鼻・身体間接触：被験マウスの鼻が、ケージメイトの鼻、生殖器・肛門領域以外の部位と接触する
- ・その他の接触：被験マウスの鼻以外の領域がケージメイトと接触する
- 社会的接触 (親和性)
- ・群集：被験マウスがケージメイトと接触し、かつ両マウスが無動状態にある
- ・社会的グルーミング：被験マウスがケージメイトを毛づくろいする
- 社会的接触 (攻撃性)
- ・採餌競合：被験マウスが、摂食中のケージメイトに対して頭や身体を強く押し付け、ケージメイトを給餌器の前から押し出す
- ・追撃：被験マウスが逃走するケージメイトを追いかける
- ・レスリング：被験マウスとケージメイトが後脚で立って向き合い、前脚や頭を激しく振る

また、被験マウスのケージメイトに対する敵対性は、敵対性スコア (被験マウスがケージメイトを追撃する総時間 - 被験マウスがケージメイトから逃走する総時間) を用いて評価した。統計解析において $P < 0.05$ を有意水準とした。

(3) 社会的相互作用試験、シヨ糖嗜好性試験

24 日間のケージ内行動解析後に、社会的相互作用試験（投薬後 25 日）と、シヨ糖嗜好性試験（投薬後 26-28 日）を実施した。

社会的相互作用試験は、図 1 のフィールドを用い、相互作用ゾーン内にワイヤー製のカゴ（直径 10 cm）を置いて実施した。二つの試験条件下 [カゴ内が空、カゴ内に標的マウス（新奇の野生型雌マウス）が存在] で、被験マウスをフィールド内に入れて

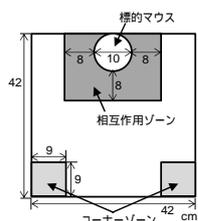


図1 相互作用試験用フィールド

2.5 分間探索させ、被験マウスが各ゾーンに滞在する時間を計測した。新奇マウスに対する社会的探索行動は、社会的相互作用比率（標的マウス存在時の相互作用ゾーン滞在時間/標的マウス非存在時の相互作用ゾーン滞在時間）を用いて評価した。シヨ糖嗜好性試験は、被験マウスの飼育ケージに設置した二つの給水ボトル（1%シヨ糖溶液、水）の消費量を 2 日間計測することにより実施した。シヨ糖嗜好性は「1%シヨ糖溶液の消費量/1%シヨ糖溶液と水の消費量」により算出した。

(4) チューブ試験

浸透圧ポンプを用いて lithium chloride または水を投与した Tg マウスと野生型マウスを実験に用いた（雌、24-40 週齢、各群 n = 3-4）。7 日間の lithium 投与の後に 3 日間 lithium と imipramine の併用投与を行い、被験マウスのケージメイトに対する社会的順位（social rank）の変化をチューブ試験によって評価した。アクリルチューブの両端から被験マウスとケージメイトを入れてチューブの中央で向い合せ、後退して先にチューブから脱出したマウスを敗、チューブに留まったマウスを勝、両方のマウスが 2 分間チューブ内に留まった場合は引き分けとした。試験は 1 日 3 回実施し、日毎に勝点（勝 = 1, 引分 = 0.5, 敗 = 0）を算出した。Imipramine 投与による順位の変化は、「投薬 3 日目の勝点 - 投薬前日の勝点」により評価した。

(5) 免疫組織化学染色

4%PFA で灌流固定した Tg マウス脳由来切片を用い、COX（ミトコンドリア DNA 由来ミトコンドリア呼吸鎖タンパク質）、SDH（核 DNA 由来ミトコンドリア呼吸鎖タンパク質）、VGLUT2（グルタミン酸作動性ニューロン神経終末マーカー）、CTIP2（大脳皮質 V 層マーカー）に対する抗体を用いて浮遊法により多重免疫染色、およびリポフスチンによる自家蛍光を抑制するための硫酸銅溶液処理を行った。共焦点レーザー顕微鏡を用いて、内側前頭前皮質 V 層領域の光学切片像を連続的に撮影し、ImageJ の Colocalization plugin と

Analyze Particles を用いて COX、SDH、VGLUT2 が共局在する puncta（斑点状構造）数を測定した。

4. 研究成果

(1) Imipramine 慢性投与下におけるケージ内行動の解析

三環系抗うつ薬の慢性投与が変異 Polg1 Tg マウスの行動に与える影響を調べるために、浸透圧ポンプを用いて imipramine を慢性投与した Tg マウスのケージ内行動を 24 日間撮影し行動解析を行った。明期および暗期開始後 1 時間の各種行動を隔日（計 12 日分）で計測し、遺伝子型（Tg、野生型）と薬物（imipramine、vehicle）を要因として two-way ANOVA を用いて統計解析を実施した。

遺伝子型による効果

・非社会的行動：Tg マウスは野生型マウスに比べ、明期初期において、無動・睡眠時間が有意に短く、摂食時間が有意に長かった。一方、暗期初期では Tg マウスは野生型マウスに比べ、無動・睡眠時間が有意に長く、自己グルーミング時間が有意に短かった。

・社会的行動：Tg マウスは野生型マウスに比べ、明期初期においてケージメイトに対する接触（鼻・鼻間接触、鼻・生殖器肛門間接触、鼻・身体間接触）、親和的行動（社会的グルーミング）、攻撃的行動（採餌競合、追撃）が有意に長かった。また暗期初期では、Tg マウスは野生型マウスに比べ、攻撃的行動（採餌競合）が有意に長かった。

Imipramine 投与による効果：Imipramine 投与群は対照群に比べ、暗期初期においてケージメイトに対する接触（鼻・鼻間接触、鼻・身体間接触、その他の接触）と自己グルーミングが有意に短かった。血清中の imipramine 濃度は、Tg マウスと野生型マウスの間で有意な差は認められなかった（Tg = 108.6 ± 34.5 ng/ml, 野生型 = 109.8 ± 31.3 ng/ml, Mean \pm SD）。

遺伝子型と薬物の相互作用：いずれの行動時間においても、遺伝子型と投薬間に有意な相互作用は認められなかった。

次に、被験マウスのケージメイトに対する敵対性を one-way ANOVA と多重比較検定（Tukey 法）を用いて解析した結果、imipramine 投与初期（投与 1-3 日目）において、Tg マウスは野生型マウスより有意に高い敵対性を示すことが明らかになった。

これらの結果より、変異 Polg1 Tg マウスが活動リズムと社会的行動の異常、三環系抗うつ薬の投与初期における高い敵対性を示すことが明らかとなった。

(2) アンヘドニア様行動の評価

24 日間のケージ内行動解析を終えた Tg マウスに対し、抑うつ状態における快樂喪失（アンヘドニア）様行動の評価に用いられるシヨ糖嗜好性試験と、新奇マウスに対する社会的探索行動の評価に用いられる社会性相

相互作用試験を実施した。

シヨ糖嗜好性について遺伝子型と薬物を要因とした two-way ANOVA で解析した結果、遺伝子型の主効果は認められなかったが、薬物の主効果は認められた。Imipramine 投与群は対照群に比べ、有意に低いシヨ糖嗜好性を示した。

新奇マウスに対する社会的探索行動について、遺伝子型と薬物を要因とした two-way ANOVA を用いて解析を行った結果、遺伝子型と薬物の有意な主効果および相互作用は認められなかった。一方で Tg マウスは、標的マウスの有無に関わらずコーナーゾーンの滞在時間が野生型に比べ有意に短かった。

これらの結果より、本研究の条件下では変異 Polg1 Tg マウスは甘味や社会的刺激に対して正常な反応を示すこと、低い不安レベルを示すことが明らかとなった。

(3) Imipramine と lithium が社会的順位に与える影響

ケージ内行動解析により、imipramine 投与初期において Tg マウスはケージメイトに対して高い敵対性を示すことが明らかになった。そこでマウス間の社会的順位を評価するチューブ試験を用いて、imipramine の短期投与が Tg マウスの順位に与える影響と、気分安定薬 lithium の併用による予防効果について解析を行った。

7日間の lithium 投与後に3日間 lithium・imipramine の併用投与を行い、imipramine 投与によるチューブ試験の勝点の変化を遺伝子型 (Tg、野生型) と薬物 (lithium、vehicle) を要因として two-way ANOVA により解析した。遺伝子型による有意な主効果が認められ、Tg マウスは野生型マウスに比べ imipramine 投与によって勝点が低下することが示された。一方で、薬物による主効果および遺伝子型と薬物の相互作用は認められなかった。Tg マウスと野生型マウス間で血清 lithium 濃度に有意な差は認められなかったが (Tg = 0.38 ± 0.04 mM, 野生型 = 0.38 ± 0.12 mM, Mean \pm SD), 臨床で用いられる治療濃度 (0.4-1.0 mM) を下回った。

これらの結果より、三環系抗うつ薬の短期投与が変異 Polg1 Tg マウスの社会的順位に影響を与え、低用量 lithium では順位変化に対する予防効果が認められないことが示唆された。

(4) 内側前頭前皮質の synaptic puncta におけるミトコンドリア局在

マウス間の社会的順位の制御には、内側前頭前皮質 V 層への興奮性シナプス入力に関連することが報告されている (Wang et al., 2011)。そこで、Tg マウス内側前頭前皮質 V 層の VGLUT2 陽性 puncta におけるミトコンドリアの局在について、VGLUT2、COX、SDH に対する多重染色法を用いて解析を行った。VGLUT2 陽性 puncta において、SDH との共局

在、SDH・COX との共局在はいずれも低率 (<2%) で認められ、内側前頭前皮質 V 層の VGLUT2 陽性シナプス前終末は低頻度でミトコンドリアを含有することが示された。今後は、Tg マウスの内側前頭前皮質 V 層の後シナプスにおける異常ミトコンドリアの蓄積について解析し、チューブ試験における社会的順位の変化との関連を検討することが課題となる。

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)

[学会発表](計3件)

Kuratomi G. Evaluation of home-cage social behaviors in a mouse model of mood disorders by chronic treatment with imipramine. Neuroscience 2016, San Diego (US). Nov. 12, 2016.

Kuratomi G. Evaluation of home cage social behaviors in mutant mitochondrial DNA polymerase transgenic mice. Neuroscience 2015. Chicago (US). Oct. 21, 2015.

倉富剛、変異 POLG トランスジェニックマウスにおける社会性行動解析、第 37 回日本生物学的精神医学会、タワーホール船堀(東京・江戸川区)、2015年9月25日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉富 剛 (KURATOMI, Go)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：00593592