

博士(人間科学)学位論文

ストレス負荷時の行動調節における
ボンベシン様ペプチドの役割

A study of the regulation of behaviors under stress
condition by bombesin-like peptides

2004年1月

早稲田大学大学院 人間科学研究科

山田 祐子

Yamada, Yuko

目次

第 1 章 序論: ストレス性精神障害研究における遺伝子改変マウスの適用

1. ストレス性精神障害研究モデルとしての遺伝子改変動物	P. 6
1) 拘束ストレス(restraint stress)	P. 7
2) 強制水泳ストレス(forced swimming stress)	P. 9
3) 分離ストレス(cohort removal)と社会的隔離(social isolation)	P.10
4) 心理的ストレス(psychological stress)	P.13
新奇ストレス(novelty stress)	P.13
社会的ストレス(social stress)	P.13
捕食者ストレス(predator stress)	P.14
過密ストレス(crowding stress)	P.15
心理-社会的ストレス(socio-psychological stress)	P.15
2. 本研究の目的と構成	P.16

第 2 章 ストレス性精神障害研究の新規モデル動物候補の選定

1. ボンベシン(bonbesin)とボンベシン様ペプチド受容体欠損マウス	P.18
2. 方法	P.19
1) 飼育および実験条件	P.19

2) 倫理規定の遵守	P.19
3) 被験体	P.19
4) 装置	P.19
明暗箱	P.19
高架式十字迷路	P.20
5) 手続き	P.20
明暗箱テスト(Light-Dark Box Test)	P.20
高架式十字迷路テスト	
(Elevated Plus Maze Test)	P.20
危険評価行動 (risk assessment behavior) とは	P.21
3. 結果	P.21
1) 明暗箱テスト	P.21
2) 高架式十字迷路	P.22
4. 考察	P.22

第 3 章 ニューロメジン B 受容体欠損マウスにおけるストレス性行動異常

1. ニューロメジン B とニューロメジン B 受容体	P.25
2. ストレス刺激が母性行動(maternal behavior)に及ぼす効果について	P.25
1) 目的	P.25
2) 方法	P.26
被験体	P.26

手続き	P.26
3) 結果	P.28
4) 考察	P.29
3. ストレス刺激が学習・記憶に及ぼす効果について	P.31
1) 目的	P.31
2) 方法	P.31
被験体	P.31
手続き	P.32
a. 拘束ストレスと血糖値測定	P.32
b. 一試行受動的回避学習試験	
(One-trial Passive Avoidance Test)	P.32
c. 自発活動性テスト	P.33
d. 高架式十字迷路	P.33
e. ショック反応性テスト	P.33
3) 結果	P.34
血糖値測定	P.34
一試行受動的回避学習テスト	P.35
自発活動性テスト	P.35
高架式十字迷路	P.36
ショック反応性テスト	P.37
4) 考察	P.37

第4章 ボンベシン様ペプチドによるストレス性精神障害治療効果に関する 検討

1. 外傷性記憶障害に対する GRP の効果	P.40
1) 実験1	P.41
方法	P.41
a. 被験体	P.41
b. 薬品	P.41
c. 装置	P.42
d. 手続き	P.42
結果	P.43
2) 実験2	P.43
方法	P.43
a. 被験体	P.43
b. 手続き	P.44
結果	P.44
考察	P.45
2. 情動的記憶に関するボンベシン様ペプチド受容体アンタゴニストの効果	
1) 目的	P.49
2) 方法	P.49
被験体	P.49
薬物	P.50
装置/手続き	P.50

3) 結果	P.50
4) 考察	P.51

第5章総合的考察と展望

1. NMB/NMB-R システムによるストレス反応調節の生理学的メカニズム	P.54
--	------

2. ストレス性精神障害の予防・治療における本研究の意義	P.55
------------------------------	------

1) ストレス性精神障害モデル動物としての NMB-R 欠損マウス	P.56
-----------------------------------	------

2) BN 関連分子によるストレス性記憶障害および外傷性記憶の 治療効果	P.57
---	------

3. 結び	P.59
-------	------

【文献】	P.61
------	------

【主論文】	P.77
-------	------

【参考論文】	P.79
--------	------

【謝辞】	P.80
------	------

第 1 章 序論: ストレス性精神障害研究における遺伝子改変マウスの適用

1. ストレス性精神障害研究モデルとしての遺伝子改変動物

ストレス負荷は生体に生物学的影響にとどまらず、きわめて大きな心理的・精神的影響を及ぼす。過度のストレス負荷は不安や抑鬱の原因となり、さらには PTSD(心的外傷後ストレス障害)のような重篤な障害をもたらす場合もある。今日、ストレス性精神疾患の病態の解明と治療法の開発が社会的急務となっている。しかし、ストレス性精神疾患は、その発症の契機の特定が困難であるばかりか、症状や経過が極めて多様であるため、臨床研究では病態の解明および治療法の開発には限界がある。また、明らかな疾患とは認められていないが、ストレスとの関連が疑われる諸症状については、いまだ組織的な基礎研究が手つかずの状態である。このような状況をもたらした原因の一つとして、基礎実験のための適切なモデル実験システムの不足があげられる。従来ストレス反応のモデル実験系は、きわめて限られていた。主としてマウスやラットなどの小型げっ歯類を用いた研究では、ストレス負荷による内分泌の変化や、胃潰瘍・十二指腸潰瘍などの形成に関する研究が行われてきた¹。また、犬や霊長類など中型動物を用いた研究では、より人に近い認知的なストレス負荷による研究も行われてきた。Seligmann の犬を被験体とした「学習性絶望」の古典的研究²や、Brady らの「管理職ザルの実験」³はあまりにも有名である。しかし、これらの実験は、その手続きの複雑さや再現性の問題、あるいは動物実験における倫理的問題などの諸事情によって、標準的な実験モデルとして用いられるにはいたらなかった。

近年マウスの胚性幹細胞(ES細胞)に遺伝子組換え体を導入することによって、遺伝子改変マウス(ノックアウト・マウスおよびトランスジェニック・マウス)の作製が可能になった。わずか10年余りの短期間に遺伝子改変動物の作製技術は急速に進歩し、今日では遺伝子改変の標的である個々の遺伝子(分子)機能の解析にとどまらず、多様な疾患モデル動物の提供を可能にしつつある。ストレス研究においても、ストレス反応に主要な役割を果たしていると考えられてきた分子である、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(corticotrophin-releasing hormone: CRH)およびその受容体(CRH receptor: CRHR)や、糖質コルチコイド受容体(glucocorticoid receptor: GR)、鉱質コルチコイド受容体(mineralocorticoid receptor: MR)などのノックアウトマウスやトランスジェニックマウスを用いることによって、これらの分子機能の解析が進められている⁴⁻⁶。しかし、このような技術革新の時代においても、ストレス反応の研究において精神疾患と直接的に関係するストレス誘導性の行動異常に関する研究は、必ずしも十分に行われているわけではない。そこで本章では、主としてマウスやラットを用いたストレス研究で利用されてきた代表的なストレス負荷法について紹介しつつ、遺伝子改変動物におけるストレス反応の研究について、ストレス性行動異常のモデル開発という観点から概観し、遺伝子改変動物におけるストレス性精神疾患研究の現状と展望について議論し、本研究の序論とする。

1) 拘束ストレス(restraint stress)

拘束ストレスは、げっ歯類など小型動物を用いたストレス研究において最も

頻繁に用いられてきた方法である。拘束ストレス負荷によって血中副腎皮質ホルモン(CORT)・副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)濃度あるいは血糖値などが大きく上昇することから⁷⁻⁸、拘束ストレス法はストレスに対する視床下部-下垂体-副腎系(HPA axis)の反応を調べるために優れた方法であるといえる。Schaeferらはアデニリル・シクラーゼ・タイプ VIII(adenylyl cyclase type VIII:AC8)ノックアウトマウスにおいて、拘束ストレス負荷後に高架式十字迷路テストにおける不安反応性が低下する一方、血中CORT濃度の変化は野生型マウスと変わらないことを報告している⁹。ストレスに対する内分泌学的反応と行動変化が必ずしも並行するものではないという実験結果は、ストレス性行動異常や精神疾患が、必ずしもCORTなどストレス反応調節の主要な分子の変化によるものではない可能性を示唆している点において、極めて重要な知見であるといえよう。

またストレスによるHPA系反応の主要分子である、CRHおよびその受容体であるCRHRのノックアウトマウスにおいても、興味深い結果が得られている。すなわち、CRHRノックアウトマウスの行動解析から、CRH/CRHRシステムが不安などストレス関連行動を媒介していることが示されている一方¹⁰⁻¹¹、ノックアウトマウスでは、拘束ストレス負荷を与えても血中ACTHやCORT濃度の上昇が見られず¹²、行動変化も認められなかった¹³。これらの結果は、CRHの欠損によってCRHに代替するリガンドの発現が増強されることによってストレス反応の制御が正常に保持されている可能性を示唆するものであり¹⁴、遺伝子改変動物を用いたストレス研究においては、欠損した機能が他の分子によって代替されている可能性まで含めて検討しなければならないことを強く示している。

拘束ストレス負荷をストレスラーとして用いた研究はきわめて豊富であり、そ

の効果は十分に確認されている。遺伝子改変動物を用いた拘束ストレス負荷による内分泌学的変化に関する研究は多数報告されており、今後もその傾向は増え続けるものと考えられる。拘束ストレス負荷を用いた遺伝子改変動物におけるストレス性行動異常については、本節で紹介したように現状ではまだ報告が少ないが、今後急速に増加するものと期待される。このように拘束ストレス法は極めて有効な方法であるにもかかわらず、残念なことに、拘束ストレスとヒトが社会生活上被る各種ストレス刺激との間にどのような関連があるのかという点については、現時点では十分な検討がなされていない。この点について今後十分な検討が必要である。

2) 強制水泳ストレス(forced swimming stress)

マウスやラットは水泳に長けている。しかし、これらの動物は決して水泳を好むわけではない。従って、実験的に水槽の中で水泳を強いられることは、マウスやラットにとって極めて大きなストレスとなる。このマウスやラットを水槽の中で強制的に泳がせる強制水泳テスト(forced swimming test)は、もともと Porsolt ら¹⁵によって鬱の動物モデル(behavioral despair model)として紹介された。マウスやラットを室温程度(25 程度)の水が入った水槽に入れると、動物は水槽から逃げようとして泳ぎ続ける。この水泳を強制水泳ストレス(forced swimming stress)と呼ぶ。実験では強制水泳ストレス負荷の翌日に再び動物を強制的に水泳させるが、このとき前日の強制水泳ストレス負荷の時間依存的に、動物の水泳時間が減少する。この水泳(活動)時間の減少を指標として、動物の「鬱状態」や「絶望状態」を測定するのが強制水泳テストである¹⁶。イミプラミン

(imipramine)などの 3 環系抗鬱薬の投与で、この水泳時間の減少が抑制されることから¹⁵、強制水泳テストは抗鬱薬のスクリーニング法として広く用いられてきた¹⁷⁻¹⁸。

遺伝子改変動物における強制水泳ストレスの影響は、Sallinen らによって報告されている。Sallinen らはアドレナリン α_2 受容体(adrenergic α_2 -receptor: α_2 -AR)のノックアウトマウスおよび、過剰発現(over expression)トランスジェニックマウスを用いた研究から、強制水泳テストにおいてノックアウトマウスではテスト時の活動性(水泳時間)が野生型マウスよりも長く、一方過剰発現マウスにおいてはテスト時の活動性(水泳時間)が野生型マウスよりもやや短いことを報告している¹⁹⁻²⁰。Sallinen らは行動テストと同時に、 α_2 -AR ノックアウトマウスでは強制水泳後の血中 CORT 濃度上昇が野生型マウスよりも低いことを報告している。

上述のように、強制水泳ストレスおよび強制水泳テストは、「鬱」あるいは「絶望」の動物モデルとして幅広く利用されてきた。強制水泳は逃避不可能な強いストレス状況の優れたモデルであり、また実験系も極めてシンプルである。多様な遺伝子改変動物を用いた研究を展開することによって、PTSD など重篤な障害のモデル動物の開発に寄与するものと期待される。

3) 分離ストレス(cohort removal)と社会的隔離(social isolation)

ヒトはたった一人で取り残されると強い不安を感じる。同様の現象はマウスにおいても観察される。集団で飼育しているマウスを、1 匹ずつ順次ケージから取り出して体温(直腸温)を測定すると、取り出される順番が遅いほど体温が

上昇するという現象が知られている²¹。この現象は、ストレス誘導性過温症 (stress-induced hyperthermia: SIH)とよばれており、マウスにおける不安のモデルとして抗不安薬の評価法などに利用されている²²⁻²³。SIH が ACTH・CORT および血糖値の上昇を伴うことから²⁴、分離ストレスは HPA 系の支配を受けるストレス反応と考えられる。Watanabeらは、集団飼育マウスを1匹ずつ取り出して新しいケージに移すという SIH の変法 (cage-switch stress) を用いて、アンギオテンシン II タイプ 2 受容体 (angiotensin II type 2 receptor: AT2) ノックアウトマウスにおいて、SIH が亢進していることを報告している²⁵。また、SIH にはセロトニン (5-HT) ニューロンの関与が報告されているが²²⁻²³、Bouwknicht らはセロトニン 1B 受容体 (5-HT_{1B} receptor) ノックアウトマウスにおいて、SIH がやや低下することを報告している²⁶。SIH は予期的不安 (anticipatory anxiety) の動物モデルと考えられるので²⁷、この実験系を用いた遺伝子改変動物の研究の発展は、ヒトにおけるストレス性の不安 (stress-induced anxiety) や鬱症状 (stress-induced depression)、特に PTSD など強いストレス負荷後に見られる諸疾患の生物学的メカニズムの究明および治療法の開発に寄与するものと思われる。

分離ストレスとは手続き的に異なるが、隔離飼育 (social isolation) も動物にきわめて強いストレス刺激となる。隔離飼育ストレスは通常、離乳後の動物を他の個体と隔離して飼育する、あるいは集団で飼育していた動物を一定期間個別飼育条件に変えることによって与えられる。Harlow の古典的な研究²⁸ 以来、ヒトを含む哺乳類において、母子関係あるいは他個体との社会的関係の剥奪が、身体・精神両側面において極めて大きな影響を与えることが数多く報告されてきた^{7, 29-30}。遺伝子改変動物における隔離飼育ストレスの研究におい

では、主として攻撃行動の変化(isolation-induced aggression)が報告されている。Sallinen らは先述の α_2 C-AR ノックアウトマウスおよび過剰発現(over expression)トランスジェニックマウスを用いた研究から、ノックアウトマウスでは隔離飼育によって攻撃行動発現潜時が短縮する一方、過剰発現マウスでは攻撃行動発現潜時が伸張することを報告している³¹。また、Alleva らはインターロイキン6 (interleukin-6: IL-6)のノックアウトマウスおよび過剰発現トランスジェニックマウスを用いた研究から、IL-6 ノックアウトマウスでは隔離飼育によって攻撃行動が亢進すること、一方過剰発現マウス(NSE-hIL-6)では非攻撃性社会行動が亢進することを報告している³²。また我々のグループにおいても、哺乳類におけるボンベシン様ペプチド受容体の一種である、ガストリン放出ペプチド受容体(GRP-R)ノックアウトマウスでは社会的隔離によって非攻撃性社会行動が亢進する一方³³⁻³⁵、ボンベシン受容体サブタイプ3(BRS-3)ノックアウトマウスでは社会的隔離によって非攻撃性社会行動が減少することを見出している³⁶。

上述したように、社会的隔離によるストレス負荷は、きわめて劇的な行動変化を生じる。現在、母子関係の希薄化や育児の放棄、あるいはTV・VTR やコンピュータゲームの流行など、乳幼児・青少年に対する社会的刺激の不足が社会問題化しており、青少年による凶悪犯罪との関連性も注目されている。遺伝子改変動物を用いた社会的隔離ストレス研究の発展は今後、精神医学的側面ばかりではなく、社会医学的側面においてもきわめて重要な意味を持つことになると考えられる。

4) 心理的ストレス(psychological stress)

先述した拘束ストレスや強制水泳ストレスはいわば「物理的な」ストレスといえるが、このようなストレス刺激に対して、「心理的ストレス」と呼ばれるような一群のストレス刺激がある。前述した分離ストレスや社会的隔離ストレスもこの心理的ストレスに分類されるものといえる。ここでは遺伝子改変動物のストレス研究、特に行動異常に関する研究においてまだ比較的扱われていないが、今後研究の発展が望まれる心理的ストレス負荷を用いた実験について簡単に紹介しておく。

新奇ストレス(novelty stress)

新奇ストレス(novelty stress)は、未知の場所や物にさらされたときに経験するストレスである。マウスやラットなどをオープン・フィールド(open field)、明暗箱(light-dark box)、高架式十字迷路(elevated plus maze)等の実験装置に入れた当初に生起する、新奇性忌避反応(neophobia)あるいは新奇性探求反応(novelty seeking)は、新奇事態におけるストレス反応と考えることができる³⁷。遺伝子改変動物の行動解析において、上記の行動課題は極めて標準的なものであり、多くの動物についてデータが蓄積されている³⁸⁻³⁹。蓄積されたデータについて、ストレス反応性という見地から再評価を行うことによって、ストレス性精神疾患のモデル実験系構築の進展に寄与するものと考えられる。

社会的ストレス(social stress)

社会的ストレス(social stress)は集団内における他の個体から受けるストレス

と考えることができる。たとえば、マウスを集団で飼育すると、必然的に社会的に強い個体(socially dominant mouse)と弱い個体(socially subordinate mouse or submissive mouse)という階層が生じる。社会的に強い個体は隔離飼育した個体同様、攻撃性が亢進する傾向がある⁴⁰⁻⁴¹ので、集団内で弱い立場にある個体は、常に強い立場にある個体からのストレスを受け続けることになる。集団飼育下のマウスと人間社会を直接比較することが現実的でないことはいうまでもない。しかし、社会的ストレスがヒトにとって最も強いストレス刺激の一つであることを考えるならば、遺伝子改変動物を用いた社会的ストレスのモデル実験システムの構築が、社会的不適応などの危険因子の同定に有力な手がかりをもたらすことは十分に期待できるであろう。

捕食者ストレス(predator stress)

マウスにとって捕食者であるネコやラットの匂いやなき声、あるいはそれらが生じる音などは、極めて強力なストレス刺激となる。捕食者ストレスによる不安反応は抗不安薬の効果の指標としても用いられてきた⁴²⁻⁴³。LinthorstらはGRのアンチセンスRNAを強制発現させたトランスジェニックマウス(GR-iマウス)において、捕食者ストレスに対する反応性の変化について報告している⁴⁴。実験ケージを小さな穴の開いたプレキシグラスで仕切り、一方にマウスを入れ、他方に刺激用のラットを入れてマウスの行動を観察したところ、GR-iマウスでは活動性が亢進することが見出された。ヒトは現在食物連鎖の頂点にあり、自然界に捕食者はいない。従って、マウスと同レベルにおける捕食者ストレスにさらされることはない。しかし、上述の社会的ストレスと同様に、社会的地位などによって受けるストレスのモデルとして利用可能であろう。

過密ストレス(crowding stress)

飼育密度はマウスの行動ばかりでなく、内分泌反応にも大きな影響を与える。Ortiz ら⁴⁵ は、マウスの飼育密度が高いと体重増加が抑制されることを見出した。また同時に、強制水泳などの急性ストレスによる皮質-副腎系の反応が亢進することを見出した。このように過密ストレスは、持続的ストレスの優れた実験モデルといえるが、残念ながら遺伝子改変動物における組織的な研究報告はない。過密ストレスは現代社会における重要な問題の一つと考えられるので、今後の研究を期待したい。

社会-心理的ストレス(socio-psychological stress)

他人の悲惨な状況を目の当たりにすることは、自分自身が悲惨な目にあわなくても、極めて大きなストレスとなる。このように自分自身は物理的・身体的なストレスにさらされず、他人(他個体)がストレスを受けている状況を観察することで受けるストレスを、「社会 - 心理的ストレス(socio-psychological stress)」あるいは狭い意味で「心理的ストレス(psychological stress)」とよぶ⁴⁶⁻⁴⁷。実験的には、マウスをコミュニケーションボックス(communication box)と呼ばれる装置に入れ、一方のマウスには電気ショックを与え(sender mouse)、他方のマウス(responder mouse)には電気ショックを与えられたマウスを観察させる、という方法を用いる。残念ながらこの方法も遺伝子改変動物による組織的な研究報告はない。生体に物理的な負荷を与えないこの方法は、ヒトにおける精神的ストレスのモデルとして極めて有望である。今後の研究の発展が期待される。

2. 本研究の目的と構成

本章では、遺伝子改変動物(マウス)におけるストレス研究について、主としてストレス性行動変化(異常)の観点から論じてきた。遺伝子改変動物を用いた研究が、医学・生物学領域にとどまらず、創薬や行動科学においても主要な方法論となりつつある現在、遺伝子改変動物を用いたストレス性精神疾患の研究においても、それは例外ではない。

遺伝子改変動物を用いたストレス研究はこれまで、従来からストレス反応との関係が示唆されてきた分子の改変動物が中心を占めてきた⁴⁻⁶。しかし、全生体規模で生じるストレス反応、そしてその結果としてのストレス性精神疾患について、これらの分子だけでその機序を説明することができないことも自明である。したがって、ストレス反応の調節に関係する分子群の探索が極めて重要である。

本章で述べてきたように、現在多様な分子の遺伝子改変動物が作成されている。したがって、これらの動物のスクリーニングによって、ストレス性精神障害研究に新たな視点が開かれるものと考えられる。すなわち、たとえば、ストレス性行動異常を顕著に示す動物は、ストレス脆弱性の分子機構の解明に寄与するばかりでなく、ストレス性障害治療薬の評価系として有効である。また、ストレス性行動異常を示さない動物は、ストレス反応抑制系の分子機構の解明に寄与するとともに、ストレス性障害治療薬の開発のための実験系として有効である。このように、遺伝子改変動物を用いたストレス研究は、ストレス性精神疾患の病態解明と治療薬の開発に大きく貢献するものと期待される。そこで本研究では、ストレス性精神障害の予防法と治療法の開発に向けた基礎研究のた

めの新規動物モデルの構築をおこなうことを目的とする。

本研究の構成は以下のとおりである。

これまで述べてきたように、第1章ではストレス性精神障害研究における遺伝子改変マウスの適用について概観し、本研究の目的を明示する。第2章では、ストレス性精神障害研究のための新たなモデル実験動物候補の選定について述べる。そして第3章では、第2章でモデル動物候補として選定された遺伝子改変マウスに関する、ストレス性行動異常について述べる。これらをもとに、第4章ではストレス性精神障害の治療に関する萌芽的研究について述べる。そして、最終章5章では、本研究について総合的な議論をおこなうとともに、遺伝子改変マウスを用いたストレス性精神障害研究の今後について展望を述べることで、本研究の結びとする。

第 2 章 ストレス性精神障害研究の新規モデル動物候補の選定

1. ボンベシン(bombesin)とボンベシン様ペプチド受容体欠損マウス

ボンベシン(BN)は当初カエル(*Bombina bombina*)の皮膚から精製され⁴⁸、哺乳類ではボンベシン様ペプチドとしてガストリン放出ペプチド(gastrin-releasing peptide: GRP)およびニューロメジン B(neuromedin-B: NMB)が精製されている⁴⁹⁻⁵⁰。これらは G 蛋白質結合型の受容体を介して機能することが知られており、哺乳類ではガストリン放出ペプチド受容体(GRP-R)、ニューロメジン B 受容体(NMB-R)および内在性のリガンドは不明であるがこれらの受容体と相同性の高いボンベシン受容体サブタイプ 3(BRS-3)がクローニングされている⁵¹⁻⁵²。ボンベシン様神経ペプチドおよびその受容体は脳内の広い範囲に分布しており、行動薬理的な解析から、自発活動・摂食行動さらには学習や記憶といった高次脳機能に至る多様な行動調節機能をもつことが知られている⁵³⁻⁵⁵。われわれの研究室では、内在性のボンベシン様神経ペプチドの機能を解析するために、ボンベシン様神経ペプチド受容体を遺伝子工学的に欠損させたノックアウト・マウス(knock-out mouse)を作製し、ボンベシン様神経ペプチドの行動調節機能について明らかにしてきた(表 2-1)。これらの行動変化から、ボンベシン様神経ペプチドは、情動機能の調節に深く関与していることが推察される。情動機能とストレス反応は密接に関係しているので(第 1 章参照)、ボンベシン様ペプチド受容体欠損マウスはストレス性精神障害のモデルとして利用可能であると考えられる。そこで、3 系統のボンベシン様ペプチド受容体欠損マウスの情

動機能について不安反応性に焦点をあてて、明暗箱テスト(light-dark box test)と高架式十字迷路テスト(elevated plus maze test)を用いて検討した。

2. 方法

1) 飼育および実験条件

飼育および実験は空調・温調完備の部屋で行った(23 ± 2 , $60 \pm 5\%$)。明暗周期は 12 時間で(午前 8 時点灯)、実験はすべて明期(13:00 ~ 17:00)に行った。摂食(JCL Inc., CE-2,342.2kcal/100g)・飲水はテスト時を除いて自由とした。この飼育および実験条件は本研究におけるすべての実験で共通である。

2) 倫理規定の遵守

本研究における全ての動物実験は、国立精神・神経センター神経研究所における動物実験倫理規定を遵守し、当施設の実験動物委員会の承認を受けて実施された。

3) 被験体

被験体は実験開始の 1 ヶ月以上前から、個別飼育条件で飼育した(世代・匹数・体重は表 2-2 に示す)。

4) 装置

明暗箱

室町機械(東京)製のものを用いた(図 2-1(A))。白色アクリル製の明室(9 × 9.5 × 14(H) cm)と黒色アクリル製の暗室(14 × 10.5 × 14(H) cm)からなり、5 × 5cm の開閉式ギロチンドアで仕切られている。蓋はそれぞれの箱と同色である。床はステンレス製のグリッド(直径 5 mm、グリッド間の間隔は 10 mm)でできている。

高架式十字迷路

室町機械(東京)製のものを用いた(図 2-1(B))。ブラウンスモークのアクリル製(厚さ 5mm)で、閉鎖腕(closed arm: 6 × 30cm、側壁の高さ 15cm)と、開放腕(open arm: 6 × 30 cm、側壁の高さ 15cm)および、プラットフォーム(plat form: 9 × 9 cm、走路面の高さ(床から)40 cm)で構成されている。

5) 手続き

明暗箱テスト(Light-Dark Box Test)

マウスを明暗箱の暗室に入れ、ギロチンドアを開けた時点から 5 分間、マウスの行動を観察・記録した。観察の指標は、明室に移動するまでの潜時(L-D latency)、危険評価行動(stretched attend posture)の回数、暗室と明室の移動回数および明室での滞在時間とした。

高架式十字迷路テスト(Elevated Plus Maze Test)

マウスを装置中央のプラットフォーム上で、開放腕に向けて配置し、5 分間マウスの行動を観察・記録した。観察の指標は Dalivi & Rodgers⁶³ に従った。なお、実験は VTR に記録し、実験終了後、行動評価のトレーニングを受けた評

価者によって再評価を行った。

危険評価行動 (risk assessment behavior) とは

不安(anxiety)は基本的な情動の一つであり、その異常の解明と治療法の確立は、精神医学における重要なテーマの一つである。通常ネズミを用いた動物実験においては、不安は、明暗箱 (Light-Dark Box)あるいは高架式十字迷路 (elevated plus maze)を用いて測定されている⁵⁹⁻⁶²。これらのテストでは、ネズミが嫌う、明暗箱の明るい部屋や高架式十字迷路の開放腕への進入回数および滞在時間を不安の尺度として、明室や開放腕への進入回数が多いほどあるいは滞在時間が長いほど不安が低いと考えられている。しかし、このような従来の測定法を不足として、より詳細な分析法の必要性が提唱されている⁶³。

危険評価行動(risk assessment behavior)は、ネズミが好む(不安を感じにくい)暗い部屋あるいは閉鎖腕から、これらの場所を出ることなく身体を伸ばして明るい部屋あるいは開放腕を覗くように探索する行動(stretched attend posture)や、身体を伸ばして注意深く這うように前進する行動(flat back approach behavior)であり、動物の不安情動をより適切に測定する指標と考えられる⁶⁴⁻⁶⁵。

3. 結果

1) 明暗箱テスト

図 2-2 には危険評価行動の結果を示す。GRP-R-欠損マウスにおいては、全ての指標において有意な差は認められなかった。一方、BRS-3 欠損マウスでは、

危険評価行動が野生型マウスよりも有意に亢進していた($U=6.5$, $p<0.01$ 、マン・ホイットニーの U 検定(両側検定))。しかし、危険評価行動以外の指標については、有意な差は認められなかった。また、NMB-R 欠損マウスでは、危険評価行動が野生型マウスよりも有意に低下していた($U=7$, $p<0.05$ 、マン・ホイットニーの U 検定(両側検定))。しかし、危険評価行動以外の指標については、有意な差は認められなかった。

2) 高架式十字迷路

GRP-R-欠損マウスでは、全ての指標において有意な差は認められなかった(表 2-3)。一方、BRS-3 欠損マウスでは、開放腕における滞在時間が野生型マウスよりも有意に長かった($U=2$, $p<0.01$ 、マン・ホイットニーの U 検定(両側検定)図 2-3)。また、危険評価行動が野生型マウスよりも有意に亢進していた($U=10$, $p<0.01$ 、マン・ホイットニーの U 検定(両側検定)図 2-4)。しかし、危険評価行動以外の指標については、有意な差は認められなかった(表 2-3)。これに対して、NMB-R 欠損マウスでは、危険評価行動が野生型マウスよりも有意に低下していた($U=13.5$, $p<0.05$ 、マン・ホイットニーの U 検定(両側検定)図 2-5)。しかし、危険評価行動以外の指標については、有意な差は認められなかった(表 2-3)。

4. 考察

本章においては、3 系統のボンベシン様神経ペプチド受容体欠損マウスの不安反応性について、明暗箱テストおよび高架式十字迷路テストを用いて検討を

加えた。明暗箱テスト・高架式十字迷路テストの両テストにおいて、BRS-3 欠損マウスの危険評価行動の亢進と NMB-R 欠損マウスの危険評価行動の低下を見出した(図 2-2、2-4)。また、高架式十字迷路テストにおいて、BRS-3 欠損マウスの開放腕滞在時間に有意な伸張を見出した(図 2-3)。これらの結果は、ボンベシン様神経ペプチド(およびその受容体)が、動物の不安反応性の調節に参与していること、およびその調節機能が類似の各ペプチド間において分化していることを示している。

本章の実験においては、GRP-R 欠損マウスの不安反応性に変化が認められなかった。この結果は、GRP-R 欠損マウスについて報告されている、不安反応性の低下を示唆する社会行動の変化^{34,56}と、一見矛盾するものである。しかし、動物の不安は明瞭な対象の有無によって区別すべきであるという報告がなされている⁶⁶。GRP-R 欠損マウスの結果は、GRP-R 欠損マウスにおける不安反応性の変化が、社会的環境における変化であることを示していると同時に、社会的環境と非社会的環境における不安が質的に異なるものであることを示す新たな証拠であると考えられる。

これに対して、BRS-3 欠損マウスと NMB-R 欠損マウスにおいては、危険評価行動に変化が認められた。BRS-3 欠損マウスでは危険評価行動が野生型マウスと比較して有意に亢進しており、同時に不安反応性の低下を示唆する高架式十字迷路テストにおける開放腕滞在時間も有意に伸張していた。危険評価行動の増加は不安反応性の変化を示すものであり、同時に開放腕滞在時間も伸張しているため、BRS-3 欠損マウスでは、不安反応性が低下している可能性がある。しかし、明暗箱テストにおいては、不安反応性の低下を示す明室滞在時間に伸張が見られないことから、装置およびテスト方法の違いに依拠

したものである可能性も否定できない。従って、現時点では結論を出すことが困難であり、この点に関して、更なる詳細な検討が必要である。

一方、NMB-R 欠損マウスにおいては、BRS-3 欠損マウスとは反対に危険評価行動の低下が認められた。NMB-R 欠損マウスにおいては、防御的覆い隠し行動の減少が見出されており⁸²、このマウスにおいてある種の不安反応性に変化が生じていることは容易に推測できる。NMB-R 欠損マウスが社会的環境において行動変化を示さないことから⁶⁷、NMB-R 欠損マウスにおける不安反応性の変化は、先に述べた GRP-R 欠損マウスとは対照的に、非社会的環境下における不安反応性の変化と考えることができるであろう。

防御行動の低下や危険評価行動の低下は、NMB-R 欠損マウスがある種の危険事態に対する適応性の変化を生じていることを示唆している。従って NMB-R 欠損マウスでは、ストレス事態に対する適応性にも変化を生じている可能性がある。そこで、本研究では、NMB-R 欠損マウスをモデル実験動物候補として、ストレス性行動異常について検討することとした。

第 3 章 ニューロメジン B 受容体欠損マウスにおけるストレス性行動異常

1. ニューロメジン B とニューロメジン B 受容体

ニューロメジン B (NMB) は、豚の消化管から単離・精製されたボンベシン様ペプチドの一種であり⁵⁰、広く中枢神経系に作用している(表 3-1)⁷⁸。NMB は G 蛋白質共役型の NMB 受容体(NMB-R)と結合して機能する⁷⁹。精神薬理学および遺伝子改変マウスの研究から、NMB は体温調節、自発運動量、摂食行動などのさまざまな生理学的・行動学的機能に貢献していることが明らかにされてきた^{67,69,70,72,73,77,80}。加えて、NMB-R 欠損マウスは、情緒的・不安行動の変容、そしてセロトニン(5-HT)系の神経機能の変容を示すことが明らかになってきた^{81,82}。

2. ストレス刺激が母性行動(maternal behavior)に及ぼす効果について

1) 目的

NMB を含むボンベシン様ペプチドがストレス反応を媒介している可能性が報告されている^{71,74}。また、NMB-R 欠損マウスでは、出産後 2 ないしは 3 日で死亡する仔マウスの数が野生型マウスよりも多いことが、繁殖・飼育において日常的にしばしば観察される。このことから、ストレス刺激が NMB-R 欠損マウスの母性行動に及ぼす影響について検討した。

2) 方法

被験体

NMB-R 遺伝子は常染色体上の遺伝子なので、オスとメスの NMB-R ヘテロ接合体(+/-: C57BL/6J 系統のマウスに 14 回戻し交配を行ったもの)の掛けあわせによって作製した。母性行動の経験は、仔マウスに対する行動に決定的な要因となるため、母性行動の経験の影響を排除するために、被験体は性行動未経験で、仔マウスと接触を持ったことのないメスのマウスとした。被験体の週齢および平均体重は、非ストレス野生型マウス(12 週齢、 20.6 ± 0.30 g、n=18)、ストレス野生型マウス(12 週齢、 22.0 ± 0.34 g、n=16)、非ストレス NMB-R 欠損マウス(12 週齢、 21.1 ± 0.28 g、n=15)、ストレス NMB-R 欠損マウス(12 週齢、 20.8 ± 0.38 g、n=15)であった。仔マウスは JCL より購入した C57BL/6 マウスのオスとメスの交配から生まれた仔マウスを使用した。10 日間の交配期間の後、雌マウスの妊娠・出産の確認を毎日 11 時に行った。出産が確認された日を第 1 日目とした。出生後 1 日か 2 日経過した同腹の 3 匹の仔マウスを一組とし、各実験に使用した。

NMB-R 欠損マウスおよびその野生型マウスは、プラスチック飼育ケージ (JCL Inc., CL-0103-1pc, 190x~260x~125(H)mm) で、仔マウスのおいや声の影響を受けないように別の飼育棚で個飼いされた。10 日間の交配期間の後、雌の C57BL/6J マウスも同様に異なる飼育棚で個飼いされた。

手続き

すべての行動実験は被験体マウスのホームケージで行われた。第 1 日目、2

cm の床敷きをホームケージに敷き、仔マウスがいない時のネスティング行動を観察した。第2日目、3ポイント式の評価システムを用いて、各マウスのネスティング行動の評価を行った。床敷きを2cm 以上積み上げたものを、「完全なネスティング(2ポイント)」、床敷きを1cm から2cm 積み上げたものを「不完全なネスティング(1ポイント)」、積み上げた床敷きの高さが1cm 未満のものを「ネスティングなし(0ポイント)」として評価をおこなった。この観察の後、各ネストを壊し、床敷きを平らにした。

ネスティング行動の評価に続いて、ストレス負荷を行うNMB-R 欠損マウスと野生型マウスを、母性行動を観察する直前 30 分間拘束ケージに入れ、ストレスを与えた。拘束ケージは金属製のワイヤーでできており、マウスはこの拘束ケージの中ではわずかにしか動くことしかできない(図 3-1)。ストレス負荷を行わない統制群のマウスは、いったんホームケージから出してまた再びホームケージに戻し、30 分間ホームケージ内に放置した。実験が行われるケージの3隅に、仔マウスをそれぞれ置き、ストレス群は 30 分間の拘束ストレス後、また統制群は 30 分間のホームケージ内放置後、被験体マウスを実験が行われるケージの残りの1隅においた。35 分間の実験時間のうち、下記の母性行動指標について初めの5分間と終わりの5分間観察した(図 3-2)。

母性行動の指標は、仔マウスの身体をなめるリッキング(licking)行動、仔マウスを口でくわえて移動し巣まで連れて行くリトリバル(pup-retrieval)行動、仔マウスを巣まで連れて行き巣の中に集めるグルーピング(grouping)行動、床敷きをホームケージのある一隅に集め仔マウスのために巣を作る行動をネスティング(nesting)行動、仔マウスの上に少なくとも1回覆いかぶさり、この状態を保つクラウチング(crouching)行動とし^{68,75,83}、2人の実験者が実験を観察

し、マウスの行動を評価・得点化した。もし2人の評価者の評価得点が異なった場合は、低いほうの評価得点を採用した。なお、実験後仔マウスは親マウスのホームケージに戻し、ホームケージ内で母親の保護が受けられるか確認した。

母性行動の出現率に関する統計的分析は、イエーツの補正をおこなった² 検定(両側)あるいは直接確率法を利用した(統計処理は統計処理ソフトウェア、エクセル統計(エスミ)によって自動的に選択された)。また、母性行動の達成度の評価には3ポイント制を採用し(0:全くなし、1:部分的、2:完全)、リッキングを除くすべての得点を加算して母性行動得点とした。統計的分析にはマン・ホイットニーのU検定(両側検定)を利用した。

3) 結果

結果は表 3-2 に示してある。仔マウスが不在の場合のネスティング行動は、NMB-R 欠損マウスと野生型マウスの間で差は認められなかった(データは提示していない)。仔マウスが存在する場合、最初の5分間の観察では、ストレスはNMB-R 欠損マウスにも野生型マウスにも影響を与え、両者とも母性行動がほとんどあるいは全く観察されなかった。統計学的には、特に、NMB-R 欠損マウスでは、すべての項目でストレスの影響が観察され、野生型マウスではリトリバル行動とグルーピング行動でストレスの影響が観察されたが、NMB-R 欠損マウスと野生型マウスの間には統計学的差は見られなかった。しかし、最後の5分間の観察時では、ストレスを受けた野生型マウスの母性行動はストレスを受けなかった統制群のマウスのレベルに回復していたが、NMB-R 欠損マウスはストレスを受けなかった統制群のマウスと比較してすべての項目において

母性行動の生起頻度が減少していた。また、ストレスを受けた NMB-R 欠損マウスは、ストレスを受けなかった NMB-R 欠損マウスよりも、グルーピング行動、クラウチング行動およびネスティング行動において統計学的に有意に生起頻度が低かった。これらの結果は、拘束ストレスが母性行動を構成する各行動要素に影響を与え、また NMB-R マウスは野生型マウスよりも、そのストレスの影響を受けやすいことが示された。

図 3-3 は母性行動の達成度得点を示している。NMB-R 欠損マウス、野生型マウス両者において、ストレス群と非ストレス群との間で有意な差が認められた(野生型マウス: $U=44$, $p<0.0002$ 、NMB-R 欠損マウス: $U=15$, $p<0.0001$ 、NMB-R 欠損マウスおよび野生型マウス・ストレス群: $U=90$, $p<0.03$)。最初の 5 分間の観察において母性行動の達成度が低いことは、被験体が出産未経験マウスのためであると考えられる。一方、最終 5 分間の観察時には、ストレスを受けていない NMB-R 欠損マウスと野生型マウスは比較的高い得点を示し、また、野生型ストレス群も比較的高い得点を示しているが、ストレスを受けた NMB-R 欠損マウスは依然として低い得点を示していた。これらの結果は、NMB-R 欠損マウスが、野生型マウスには影響を与えにくい弱いストレスにも影響を受けやすいこと、さらに野生型マウスよりもストレスの影響が長く続くということを示唆している。

4) 考察

本実験においては、拘束ストレスが、マウスの母性行動を阻害するということ、NMB-R 欠損マウスは野生型マウスよりも強く拘束ストレスの影響を受けるとい

うことが示された。NMB-R 欠損マウスは、前述のとおり、ある種の情動的異常性を示すことが示唆されてきたが^{81,82}、ストレスを受けていない NMB-R 欠損マウスが正常な母性行動を示したという事実は、NMB-R 欠損マウスの母性行動異常は、情動的異常性によって二次的にもたらされるのではないと考えられる。本節に示した実験の結果と最近の報告によると、NMB および NMB-R システムはストレス脆弱性を担っていると考えられる。従って、NMB-R 欠損マウスは、ストレス性行動異常の研究、ひいてはストレス性精神疾患の治療薬の開発に有用だと考えられる。

3. ストレス刺激が学習・記憶に及ぼす効果について

1) 目的

前節では、軽度のストレス刺激が NMB-R 欠損マウスの母性行動の生起とその質に重大な影響を及ぼすことを明らかにした。行動は大別して、定型的な反応パターンをとる生得的 / 本能的母行動と、状況に柔軟に対応したパターンを示す習得的 / 学習性行動に分けることができる。母性行動は、プロラクチンやオキシトシンといったホルモンによって規定される⁸³、いわば生得的 / 本能的行動であるといえる。そこで、ストレス負荷は、NMB-R 欠損マウスにおける習得的 / 学習性行動にいかなる影響を与えるのかについて検討を行った。本節では、一試行受動的回避学習テストを、ストレス負荷が NMB-R 欠損マウスの学習・記憶に及ぼす影響について検討することを目的とし、自発活動性・不安反応性および痛覚感受性など、学習・記憶に影響を及ぼしうる他の行動に対する、拘束ストレス負荷の影響についても合わせて確認した。

2) 方法

被験体

88匹の雌のNMB-R欠損マウスと85匹の野生型マウスを被験体として使用した(12週から14週齢、平均体重、NMB-R欠損マウス 21.3 ± 0.20 g、野生型マウス 21.8 ± 0.16 g)。NMB-R欠損マウスと野生型マウスは、前節と同じ方法で作製した(マウスの各群とサンプル数は表3-3を参照)。

手続き

a. 拘束ストレスと血糖値測定

ストレス負荷は前節と同様の方法で行った。拘束ストレス負荷後 15 から 30 秒の間に、ガラス製の血液収集管 (Terumo, Japan, VC-H075H) によって尾の静脈から血液を採血し、採血後すぐに、i-STAT カートリッジ (EC6+, i-STAT Corporation, USA) を使用して血糖値を測定した。

b. 一試行受動的回避学習試験 (One-trial Passive Avoidance Test)

一試行受動的回避学習試験⁹¹には、明暗箱(L-D box)を使用した。明室は、透明の蓋の明るい白いプラスチック製の箱である(9 x 9.5 x 14 (H) cm)。一方、暗室は黒のプラスチック製で(14 x 10.5 x 14 (H) cm)、蓋も黒のプラスチック製である。5x5cm のスライディングドアが暗室と明室を区切っている。暗室と明室の床は、ステンレス製のグリッド(直径 5mm、間隔 10mm)でできており、電気ショック(0.3mA、3 秒)をショックジェネレータ(Muromachi-Kikai, Japan, SGS-002)を使用してかけることができる(図 2-1 参照)。

馴化試行では、マウスをまず明暗箱の明室に入れた。明室と暗室の間のスライドドアは開放されており、マウスは 5 分間の探索行動が許された。明室にマウスを入れてから、最初にマウスが暗室に移動するまでの時間を測定し、その時間が 60 秒を超える場合は、実験データから、そのマウスのデータを除外した。これは実験の基準データの偏差を少なくするためである。ニューロメジン B 受容体欠損マウスをそれぞれ、2群に分けた(表 3-3 を参照)。群分けは、馴化試行における明暗移動潜時(L-D 潜時)をもとに行った。馴化試行の翌日、条件付けを行った。条件付け試行は、馴化試行と同じ手順で行われたが、暗室にマウ

スが入るとすぐに、電気ショックが与えられた。条件付け試行の際も、暗室に入るまでの潜時を測定し、60 秒以内に暗室に入室しないマウスは、実験から排除した。24 時間後にテスト試行を行い、明室から暗室に入室するまでの潜時を測定した。各試行は、300 秒を限度とし、300 秒以内に暗室に入室しなかったマウスは、その明暗潜時を 300 秒とみなした。各試行の後、明暗箱を 70% のアルコールで清拭した。

c. 自発活動性テスト

ストレス群と非ストレス群両群のマウスの自発活動を自発活動性測定装置 (activity monitor) によって 30 分間測定した³⁶。測定後毎回、実験箱を 70% アルコールで清掃し、各被験体マウスの臭いや糞尿を取り除いた。測定値はコンピューターに自動的に記録され、解析された。実験中の照明は、コンピューターディスプレイのみとした。

d. 高架式十字迷路

第 2 章と同様の方法で行った。

e. ショック反応性テスト

電気ショックに対する、刺激閾値試験を行った⁸⁵。痛み反応はフリンチ-ジャンプ試験 (flinch-jump test) を改良した方法によって測定した。床 (20x20cm) は、平行に並んだステンレス製の棒 (10mm 間隔の直径 5mm) でできたショックグリッドで、マウスを 1 匹ずつその上に置き、1 リットルのガラスピーカーをかぶせた。そして、6 段階のショックを 1 シリーズとし、6 シリーズのショックを与えた (1 シリ

ーズは、20、40、60、80、100、130 μ A)。各ショックは、15 秒間隔でグリッド面から与えられた。一連のショックは上昇系列、および下降系列で与えられた。実験はすべての被験体について、上昇系列から始めた。ショック閾値はマウスが床面から足を離れた最低値とした。各マウスの域値は、6 系列のショック閾値の平均値とした。

3) 結果

血糖値測定

血糖値は、ストレスがかかると上昇するため、ストレスの指標とすることができる⁹³。そこで NMB-R 欠損マウス・ストレス群と野生型マウス・ストレス群、NMB-R 欠損マウス・非ストレス群、野生型マウス・非ストレス群、それぞれの血糖値を測定した(図 3-4)。二元配置の分散分析によると、遺伝子型の主効果が有意であり($F(1, 28)=11.8, p<0.002$)、またストレス負荷の主効果も有意であった($F(1, 28)=175.2, p<0.0001$)。しかし、遺伝子型とストレスの有無の相互作用には有意差はみられなかった($F(1, 28)=0.25$)。下位分析によると、NMB-R 欠損マウス・非ストレス群の血糖値は、野生型マウス・非ストレス群の血糖値よりも有意に低かった($t = 3.23, p<0.01$)。拘束ストレスによって NMB-R 欠損マウスも野生型マウスも血糖値が上昇した(野生型マウス: $t=8.05, p<0.001$ 、NMB-R 欠損マウス: $t=12.2, p<0.001$)。さらに、NMB-R 欠損マウス・ストレス群は、野生型マウス・ストレス群よりも血糖値の上昇が有意に低かった($t=2.20, p<0.05$)。

一試行受動的回避学習テスト

一試行受動的回避テストの結果は図 3-5 に示してある。二元配置の分散分析の結果、条件付けの主効果($F(1, 56)=81.5, p<0.000001$)、グループの主効果($F(3, 56)=8.61, p<0.00001$)および条件付けとグループの交互作用($F(3, 56)=7.78, p<0.0002$)が有意であった。一元配置の分散分析を行ったところ、条件付け試行においては有意な差は認められなかった($F(3, 31)=1.02, n.s.$)。一方、テスト試行においてはグループ間に有意差が認められた($F(3, 31)=8.25, p<0.0005$)。下位分析では、非ストレス群では、NMB-R 欠損マウスと野生型マウスの明暗移動潜時 (step-through latency) の間に統計的有意差は認められなかった ($T=1.10, n.s.$) が、NMB-R 欠損マウス・ストレス群は、野生型マウス・ストレス群よりも明暗移動潜時が有意に短かく ($T = 5.82, p<0.01$)、また、NMB-R 欠損マウス・非ストレス群よりも、短かった($T=6.14, p<0.01$)。NMB-R 欠損マウス・非ストレス群、野生型マウス・非ストレス群、野生型マウス・ストレス群においてテスト試行の明暗移動潜時は条件付け試行よりも有意に長かった ($t=6.58, p<0.0005, t=4.37, p<0.005, t=5.29, p<0.002, respectively$) が、NMB-R 欠損マウス・ストレス群では、両試行において統計的有意差は見られなかった ($t=2.26, n.s.$)。

自発活動性テスト

水平運動量の測定値は図 3-6 に示してある。二元配置の分散分析によると、遺伝子型の主効果($F(1, 36)=0.138$)、またストレス負荷の主効果 ($F(1, 36) = 2.11$)、遺伝子型とストレス負荷の交互作用($F(1, 36)=0.25$)のいずれも有意ではなかった。下位分析においても、NMB-R 欠損マウス・非ストレス群と野生型

マウス・非ストレス群の間($t=1.22$)および、NMB-R 欠損マウス・ストレス群と野生型マウス・ストレス群($t=0.70$)の間には統計的な有意差は認められなかった。しかし、NMB-R 欠損マウス・ストレス群と野生型マウス・ストレス群の両群は、それぞれの非ストレス群よりも有意に自発活動量が多かった(それぞれ $t=2.78$ 、 $p<0.05$ 、 $t=2.38$ 、 $p<0.05$)。垂直運動量(rearing and leaning on the wall)についても同様の分析を行ったが、各群に有意な差は認められなかった(データは提示していない)。

高架式十字迷路

高架式十字迷路テストの結果は、表 3-4 にまとめてある。二元配置の分散分析によると、開放腕への進入回数、閉鎖腕への進入回数、開放腕への進入率、開放腕における滞在時間、閉鎖腕における滞在時間において差が見られた。各指標について、遺伝子型の主効果、ストレス負荷の主効果および遺伝子型とストレス負荷の交互作用のいずれも有意な差は見られなかった。しかし、環境に対する情緒的反応を表していると考えられている、各腕への進入回数については、ストレスの主効果は統計的に有意であった($F(1, 34)=5.30$ 、 $p<0.05$)。しかしながら、遺伝子型の主効果および、遺伝子型とストレスの有無の交互作用には、統計的に有意な差は認められなかった(それぞれ $F(1, 34)=3.20$ 、 $F(1, 34)=1.41$)。下位分析によると、各腕への進入回数の合計は、NMB-R 欠損マウス・非ストレス群よりも野生型マウス・非ストレス群のほうが多く($t=2.36$ 、 $p<0.05$)、NMB-R 欠損マウス・ストレス群の方が NMB-R 欠損マウス・非ストレス群よりも多かった($t=2.82$ 、 $p<0.05$)。

ショック反応性テスト

図 3-7 にショック反応性テストの結果が示してある。二元配置の分散分析では、遺伝子型の主効果 ($F(1, 34) = 1.41$)、ストレス負荷の主効果 ($F(1, 34) = 0.26$)、および遺伝子型とストレスの負荷の交互作用 ($F(1, 34) = 0.26$) のいずれも有意ではなかった。

4) 考察

前節の実験と同様に本節の実験では、比較的穏やかな拘束ストレス(マウスは拘束ケージの中で、わずかではあるが身体を動かすことができた)を使用して、雌の NMB-R 欠損マウスの行動にストレスがどのような影響を及ぼすかを調べた。金属製のワイヤー拘束ケージの中に 30 分間拘束すると、NMB-R 欠損マウスと野生型マウス両方の血糖値が上昇することがわかった(図 3-4)。一試行受動的回避学習テストにおいて、拘束ストレスを条件付けの前に行うと、NMB-R 欠損マウスは著しく記憶が傷害されたが、野生型マウスには記憶障害は起こらなかった(図 3-5)。この行動上の変化は、NMB-R 欠損マウスにおいてストレス刺激に対する行動学的反応性が変化しているということを示唆している。しかし、拘束ストレスは、NMB-R 欠損マウスと野生型マウスの両方の水平運動量と垂直運動量の増加をもたらすが、ストレスを負荷された NMB-R 欠損マウスと野生型マウスの間に明確な違いは観察できなかった(図 3-6)。さらに、拘束ストレスの負荷は高架式十字迷路における不安反応性にも影響与えず(表 3-4)、ショック反応性テストにおける痛覚反応にも影響を与えなかった(図 3-7)。

マウスの自発活動性のレベルは、記憶学習課題の課題達成を決定付ける大きな要因の一つである。過活動は学習を不可能にさせる可能性がある⁸⁹。そこで、まず、ストレスが自発活動性にどのような影響を及ぼすかを検討した。拘束ストレスは NMB-R 欠損マウスと野生型マウスにわずかに影響を与えた。しかし、ストレス負荷を受けた NMB-R 欠損マウスの自発活動性の亢進は比較的穏やかであり、学習/記憶の直接的な阻害要因とはなっていないようである。しかも、ストレス負荷を受けた NMB-R 欠損マウスとストレス負荷を受けた野生型マウスの自発活動性には統計的な有意差はみられなかった。したがって、ストレス後の活動性レベルの上昇によって、ストレス負荷を受けた NMB-R 欠損マウスにおけるストレス後の記憶成績の低下を説明することはできない。

同様に、不安反応性の変化も受動的回避学習の成績にも影響を与えるかもしれない。ストレス負荷を受けた NMB-R 欠損マウスの不安が亢進することによって受動的回避学習の潜時が短くなるのではないということを確認するために、高架式十字迷路のパラダイムによって、ストレス負荷を与えた NMB-R 欠損マウスと野生型マウスの不安反応性を測定した。その結果、NMB-R 欠損マウスと野生型マウスともに、ストレス負荷による不安反応性の変化は認められなかった。ストレス負荷を受けた NMB-R 欠損マウスが正常な不安反応性を示すという結果は、回避学習の成績低下が不安反応性の亢進によるものではないということを示している。

さらに、痛覚感受性も受動的回避学習の成績に影響を与えるもう一つの要因であると考えられる。ストレス刺激は動物の痛みの感受性を低下させるという報告が多くなされている(ストレス鎮痛⁹⁴)。そこで、痛覚感受性と拘束ストレスとの関係を調べた結果、グループ間で痛覚感受性に違いはみられなかった。

従って、ストレス負荷による NMB-R 欠損マウスの学習・記憶成績の低下は、痛覚感受性の低下によるものではないと考えられる。

以上考察してきたように、ストレス負荷を受けた NMB-R 欠損マウスの学習・記憶能力の障害は、自発活動性の亢進、不安反応性の低下、あるいは痛覚感受性の低下のいずれにも関係していないと言える。このような学習や記憶に間接的に影響を及ぼすと思われる諸行動が正常であるということは、ストレス刺激が NMB-R 欠損マウスにおいて、学習や記憶と密接に関係した脳部位や神経伝達系に影響を与えているということを示唆している。ストレス負荷が記憶に及ぼす影響の機能的、神経解剖学的関係が最近明らかにされており(側頭葉および海馬 の変化^{84,87})、さらに NMB-R メッセンジャーRNA が海馬および偏頭体領域に発現していることが明らかにされている(表 3-1 参照)⁹⁵。従って、ストレス負荷を受けた NMB-R 欠損マウスにおけるこれらの脳部位の詳細な分析は、心的外傷後ストレス障害などによる記憶障害の解明に新たな視点を開くものといえよう。

第 4 章 ボンベシン様ペプチドおよび関連分子によるストレス性精神障害の治療効果に関する検討

第 3 章では、NMB-R 欠損マウスがストレス負荷によって行動変化を示すことを明らかにし、NMB/NMB-R システムの障害がストレス脆弱性の危険因子の一つであることを明らかにした。

これらの諸実験結果は、NMB-R 欠損マウスがストレス性精神障害の新しいモデルマウスとして利用できること、そして、ボンベシン様ペプチドおよびその関連分子が、ストレス性精神障害の治療に応用できる可能性を示している。

そこで本章では、ボンベシン様ペプチドおよびその関連分子によるストレス性精神障害の治療効果について、外傷性記憶障害と情動記憶を対象として検討を行うことを目的としている。

1. 外傷性記憶障害に対する GRP の効果

ボンベシン(BN)とガストリン放出ペプチド(GRP)は、記憶/学習機能を促進することがいくつかの研究で指摘されている。たとえば、訓練後 BN や GRP の投与を行うと、受動的回避学習の記憶が促進される^{53,114}。また、孤束核(the nucleus tractus solitarius: NTS)と扁桃体(amygdala: AMY)の再活性化により BN の記憶に対する効果を高めることができる¹¹⁴。これらのペプチドを中枢に投与して記憶を亢進させるためには高い投与量が必要であるが⁵³、BN を直接 NTS に微量投与しても、放射状迷路と同様に受動的回避学習の記憶を促進する¹¹⁸。これらのことから、BN/GRP が記憶に及ぼす効果は NTS あるいは

ANY を通して発現されると考えられる。また、BN や GRP を訓練後に投与すると、アセチルコリン・アンタゴニスト(拮抗薬)であるスコラミンの記憶喪失効果を阻止するので⁵³、このような BN/GRP の記憶促進効果は、ストレス性障害のような外傷性の記憶障害の改善にも適用できるかもしれない。

そこで、外傷性記憶障害に対する GRP の効果を調べるために、一試行性回避学習行動の実験を行った^{102,109,115,118}。まず、スコラミン投与によってもたらされる記憶喪失における GRP の効果を確認した。続いて、二酸化炭素による窒息で記憶喪失を起こしたマウスにおいて GRP の効果を調べた。

1) 実験 1

方法

a. 被験体

60 匹の雄の C57BL/6J マウス(JCL Inc., Japan)を、被験体として使用した(表 4-1)。約 9 週齢で平均体重は、 24.4 ± 0.12 g であった。マウスは、購入されるとすぐに、1 ケージに 4 匹に分けられた。1 週間の実験室馴致後、実験の 1 週間前に個別飼育された。

b. 薬品

ガストリン放出ペプチド (porcine GRP 14-27、 Peninsula Inc., USA) とスコラミン (scopolamin hydrobromide:RBI, USA) は、実験の前に水に溶かしておいた。スコラミンの投与量は、1 mg/kg と 2 mg/kg (6.4 ml/kg, i.p.)であり、

これはマウスに記憶喪失を起こさせるのに有効であると考えられる投与量である¹¹³。GRPの投与量は、32 nmol/kg (6.4 ml/kg, i.p.)であり、これは摂食抑制を起こさせるのに有効な投与量であるが⁶⁷、以前行った実験においては、自発活動性の異常などは見られてはいない。

c. 装置

実験装置は、前章の実験で用いたものと同じものを用いた。また、実験手続きも薬物投与を除いて同様であった。

d. 手続き

条件付け試行の20分前にスコポラミンあるいは生理食塩水を腹腔内に注射した。条件付け試行では、まずマウスを明室にいれ、間のスライディングドアをあけた。マウスが明室から暗室に侵入すると同時に間のスライディングドアを閉め、電気ショックを与えた。その際、明室から暗室に侵入するまでの潜時を測定した。電気ショックを与えた後すぐに、GRPまたは生理食塩水を腹腔内注射した(60秒たっても暗室に入らないマウスは、実験から除外した)。馴化試行から24時間後にテスト試行を行った。テスト試行では再び、明暗移動潜時を測定した。テスト試行では、明室から暗室に移動するまでの時間が300秒以上のものはデータから除外した。なお、各試行終了後に装置を70%アルコールで清掃した。

結果

実験1の結果は、図 4-1 に示す。条件付け試行と比較して、テスト試行における明室から暗室への移動潜時は、食塩 - 食塩群、食塩 - GRP 群、スコポラミン 1mg-GRP 群において有意に長くなっていた ($T=0$, $p<0.01$; $T=0$, $p<0.01$; $T=3$, $p<0.05$; ウィルコクソンのサインランク検定 (両側検定))。しかしながら、他のグループ間では有意な差は見られなかった。テスト試行においてはスコポラミン 1mg-GRP 群の明暗移動潜時が有意にスコポラミン 1mg-食塩群の明暗移動潜時よりも長かった ($U=12$, $p<0.02$, マン・ホイットニーのU検定 (両側検定))。しかし、食塩-食塩群と食塩-GRP 群の間には有意な差は見られず、また、スコポラミン 2mg-食塩群とスコポラミン 2mg-GRP 群の間にも有意な差は見られなかった。これらの結果から、GRP は記憶力増強に有効であることが確認できた。しかし、今回実験に使用した濃度の GRP (32 nmol/kg) は、スコポラミンの濃度が比較的低い場合にのみ有効であるといえる。

2) 実験 2

方法

a. 被験体

40 匹の雄の C57BL/6J マウス (JCL, Inc., Japan) を被験体として使用した (表 4-1)。約 9 週齢で、平均体重は 24.5 ± 0.15 g であった。実験 1 同様、マウスは購入後すぐに 1 ケージ 4 匹に分けられ、実験 1 週間前に個別飼育された。

b. 手続き

実験 2 で行った受動的回避学習試験の手続きは、実験 1 で行ったものと同様の方法は基本的に同じである。ただし、実験 1 では、スコポラミンによる記憶喪失を利用したが、実験 2 では、二酸化炭素による窒息で生じる記憶喪失を利用した。二酸化炭素による記憶喪失の方法は先行研究に従った¹⁰³。訓練試行において電気ショックを与えた後すぐに、GRP か生理食塩水を腹腔内注射によって投与した。薬物投与後に引き続いて呼吸が停止するまで二酸化炭素が充満したガラス容器にマウスを入れた。そして、人工呼吸によって蘇生させた。偽処置群のマウス（‘Air’- treated groups, 表 4-1）は、空気の充満したガラス容器に入れた。テスト試行は 24 時間後に行った。

結果

実験 2 の結果は、図 4-2 に示してある。条件付け試行と比較してテスト試行における明暗移動潜時はすべてのグループにおいて有意に長くなっていた ($T=0$, $p<0.05$ 、ウイルコクソンのサインランク検定)。テスト試行においては、二酸化炭素による窒息群において明暗移動潜時が有意に短かった(食塩水-空気群>食塩水-二酸化炭素群、 $U=5$, $p<0.001$; GRP-空気群>GRP-二酸化炭素群、 $U=7$, $p<0.005$ 、マンホイットニーのU検定(両側検定))。さらに、GRPを投与した群では明暗移動潜時が有意に長くなっていた(食塩水-空気群<GRP-空気群、 $U=6$, $p<0.01$; 食塩水-二酸化炭素群<GRP-二酸化炭素群、 $U=3$, $p<0.01$ 、マンホイットニーのU検定(両側検定))。GRP投与群において明暗移動潜時が有意に長くなったということから、GRPが記憶力を増強させること、

さらには、二酸化炭素による窒息によって生じる記憶喪失を阻害する可能性が示唆された。

考察

本節の実験では、スコポラミンあるいは二酸化炭素によって生じた記憶喪失に対する GRP の記憶回復効果について調べた。実験 1 においては、1mg/kg のスコポラミンを投与した群 (スコポラミン 1mg-GRP 群) においては、GRP は記憶回復 (増強) 効果をもったが、コントロール群 (食塩水-GRP 群)、および 2mg/kg のスコポラミンを投与した群 (スコポラミン 2mg-GRP 群) では、GRP は明確な効果は示さなかった。これらの結果から、訓練後に 32nmol/kg の濃度の GRP を投与することによって、比較的低い濃度のスコポラミンによって生じた記憶喪失は回復するが、正常のマウスの記憶成績には効果を示さなかったということが言える。実験 2 においては、訓練後 GRP を投与すると、二酸化炭素によって窒息させた群 (Group GRP-CO₂) と同様に、正常マウス、コントロール群 (Group GRP-Air) の記憶成績が向上することがわかった。この結果は、実験 1 のコントロール群の結果と対照的である。実験 1 の食塩水-食塩水群の明暗移動潜時は、実験 2 の食塩水-空気群の潜時よりも明らかに長かった。そして、先に述べたように、実験 1 においては、食塩水-GRP 群と食塩水-食塩水群では記憶回復効果は示されず、また、実験 2 においては、GRP-空気群と食塩水-空気群では記憶回復効果は見られなかった。この二つの実験における結果の矛盾は、実験手続きの違いを反映していると考えられる。たとえば、実験 2 においてマウスは、条件付けの直後に空気が充満したガラスの容器に入れら

れた。この処置が、条件付け後に電気痙攣性ショックを受けたりあるいは新奇環境におかれるといった処置と同様に、記憶固定(memory consolidation)を妨げている可能性がある^{101,117}。この仮説を確かめるために、実験 1 の食塩水-食塩水群の明暗移動潜時と実験 2 の食塩水-空気群の明暗移動潜時の再分析をおこなった。統計的分析によると、食塩水-食塩水群の明暗移動潜時は食塩水-空気群の明暗移動潜時よりも有意に長かった($U=25$ 、 $p<0.05$ 、マン・ホイットニーの U テスト(両側検定))。さらに、C57BL/6J 雄マウスをつかって統制実験を再度実施した。再実験に使用した C57BL/6J は、11 から 13 週齢、被験体の数および平均体重は次のとおりである(食塩水-食塩水群、 $n=8$ 、 27.9 ± 0.58 g;食塩水-空気群、 $n=8$ 、 26.6 ± 0.50 g)。再実験を行ったところ、同様な結果を得た(図 4-3)。両群とも、テスト試行において、明暗移動潜時が長くなっていた(食塩水-食塩水、 $T=0$ 、 $p<0.01$;Group 食塩水-空気群、 $T=0$ 、 $p<0.01$ 、ウイルコクソンのサインランク検定(両側検定))が、食塩水-空気群は、食塩水-食塩水群よりも潜時が短くなっている($U=12$ 、 $p<0.05$ 、マン・ホイットニーの U テスト(両側検定))。この結果から、二酸化炭素が充満していなくても、ガラス容器に入れられたマウスの記憶力は低下すると考えられる。このように考えることが可能ならば、実験 2 に示された GRP による記憶力の回復は BN や GRP の効果が訓練の条件によって異なるという以前の実験結果を支持していることになる。過去の研究によると、BN/GRP の投与は、訓練が弱く不完全である場合に記憶を増強する⁵³。さらに、少なくとも今回の実験で使用された濃度の GRP は、記憶喪失の程度がかなりひどい場合では、記憶力の回復の効果はもたないといえる(実験 1 スコポラミン 2mg-GRP 群参照)。これらの実験結果は、先行研究⁵³ 同様、GRP のそしておそらく BN による記憶増強効果が、訓練の強さや

記憶の障害の程度といった条件に依存していることを示している。

本実験では、GRP の腹腔内注射が実験的に生じさせた記憶障害の回復に及ぼす影響について検討した。ACTH¹¹¹、バソプレッシン(vasopressin)^{107,116}、CCK¹⁰⁴ 等のニューロペプチドあるいはホルモンの腹腔内投与が記憶力を増強するという報告は数多くある。しかし、それぞれのペプチドあるいはホルモンが記憶力を増強する神経メカニズムは多様であると考えられる。たとえば、ACTH あるいはバソプレッシンは、末梢カテコラミナージック(catecholaminergic)メカニズムを通して中枢神経に影響を与えていると考えられる¹⁰⁶。本研究では、記憶障害を生じさせる 2 通りの方法を用いた。一つは、アセチルコリン受容体アンタゴニストであるスコポラミンの投与であり、もう一つの方法は二酸化炭素による窒息である。二酸化炭素による窒息は、脳内のアセチルコリンの放出を減少させる¹⁰⁰。訓練後の GRP の摂取は上述の 2 方法によって生じる記憶障害を回復させた。従って、GRP 投与による記憶の回復は、少なくともある部分で、GRP によるコリナージックシステム活性化によるものと考えられる。BN(と GRP)は腹腔内に注入されると、消化器系の上向性ニューロンを活性化することによって記憶力を強化すると考えられている⁵³。そして、BN と GRP の血液脳関門の透過についてはまだ十分研究されてはいないが、BN を腹腔内投与すると CNS における受容体が活性して食物摂取量が減少するという報告もある¹¹²。従って、GRP とその受容体は、CNS のコリナージックシステムと相互作用をし、コリナージックシステムを活性化すると思われる。今後、GRP によるコリナージックシステムの相互作用や活性化を解明するために、生化学的および分子生物学的研究がさらに必要となっていくと考えられる。

本実験では、GRP の投与がスコポラミン投与による記憶障害および二酸化

炭素による窒息によって生じる記憶障害を改善することが示された。

窒息による記憶障害に対する改善効果は、BN/GRP がある種の外傷性記憶障害の治療に利用可能であることを示すものといえる。従って、神経科学的研究とともに、臨床応用を視野に入れた研究の進展が望まれる。

2. 情動的記憶に対するボンベシン様ペプチド受容体アンタゴニストの効果

1) 目的

一試行回避学習のように、電気ショックのような生体に有害な刺激を用いた学習・記憶課題は、一方では、心的外傷後ストレス障害(PTSD)などにおける情緒的学習・記憶のモデルとしても有効である。前節の実験結果が示すように、BN/GRP の投与がこれらの学習・記憶を増強し維持することから、BN 受容体のブロックによって、これらの学習・記憶が減弱される可能性がある。最近、我々や他のグループが BN 様ペプチド受容体欠損マウスにおける記憶・学習について調べた。GRP-R 欠損マウスはモリスの水迷路において、何ら記憶障害を示さなかった^{33,124} が、恐怖条件付け記憶では成績がよかった¹²⁴。逆に、前章で示したように、NMB-R 欠損マウスは、拘束強制ストレスを受けた後、一試行受動的回避学習の成績が低下したが、ストレスを受けない条件では、変化はなかった(第3章参照)¹²⁵。これらの結果は、先行研究や前節に示したような、精神薬理学的研究の結果と必ずしも一致しない。そこで、一試行受動的回避学習における BN 様ペプチド受容体のアンタゴニストの効果について検討した。

2) 方法

被験体

60匹のC57BL/6Jマウス(JCL, Japan)60匹を被験体として使用した。マウスは、ほぼ、10週齢で、平均体重は、 20.1 ± 0.15 gであった(表4-2)。マウスは、実験

室に搬入された後、実験室に馴らすために、1週間、1ケージ4匹で飼育された。実験1週間前から通常のケージ(JCL、CL-0103-lpc、190×260×125-mm)で個体飼育された。

薬物

GRP 受容体特異的アンタゴニスト[Leu¹³-(ψ-CH₂NH)-Leu¹⁴]BN^{119,123} をシグマ(Sigma; USA)から入手した。NMB-R 特異的アンタゴニスト BIM23127^{72,121} は J.E.Taylor 博士と D.Coy 博士のご好意により、提供していただいた。これらの薬品は使用する直前に蒸留水で希釈した。これらの薬品の濃度は表 4-2 にまとめてある。統制群のマウス(SAL)には、6.4 ml/kg 食塩水(i.p.; Kobayashi, Japan)を与えた。

装置/手続き

装置および手続きは、第3章および前節における実験と同様であった。薬物は条件付けの15分前に投与した。

3) 結果

薬品を投与したマウスは、ホームケージで異常な行動は見せなかった。また条件付け試行においても、明確な異常行動は見せなかった。

GRP 受容体アンタゴニスト投与実験の結果について、一元配置の分散分析によって検定を行ったが、条件付け試行において統計的有意差はなかった($F(3, 36) = 0.32$ 、図 4-4)。一方、テスト試行においては、グループ間に統計的有意差

があった($F(3, 36)=6.74, p<0.002$)。下位検定(チューキーの多重比較法)によると、実験群の明暗移動潜時は、統制群のそれよりも有意に短かった(Group L16: $T = 5.01, p < 0.01$; Group L32: $T = 5.65, p < 0.01$; Group L64: $T = 4.44, p < 0.05$)。しかしながら、投与量の効果は見られなかった。

NMB-R アンタゴニスト投与実験の結果について、一元配置の分散分析をおこなったところ、条件付け試行における潜時には統計的有意差は見られなかった。 $(F(3, 30) = 1.17, \text{図 } 4-5)$ 。テスト試行においては、グループ間に統計的に有意な差がみられた($F(3, 30)=3.15, p<0.05$)。下位検定(チューキーの多重比較法)によると、中程度の投与量のグループ(Group B32)においてのみ、統制群よりも有意に明暗移動潜時が短かった ($T = 4.19, p<0.05$)。

同じ投与量の GRP-R アンタゴニストと NMB-R アンタゴニスト ($[\text{Leu}^{13}-(\psi\text{-CH}_2\text{NH})\text{-Leu}^{14}]\text{BN}$ and BIM23127) の効果も比較したが、有意な差はなかった (SAL: $t=0.28$; L16 vs B16: $t=0.74$; L32 v.s. B32: $t=0.18$; L64 v.s. B64: $t=0.39, t$ 検定(両側))。

4) 考察

本実験では、GRP-R アンタゴニスト腹腔内投与が一試行受動的回避学習における記憶を低下させることを示した。また、GRP-R と同様に NMB-R をブロックすることで、記憶能力を阻害することも示した。

BN 様ペプチド受容体をブロックすることによって記憶能力が低下するということは、内因性の BN 様ペプチドが記憶・学習を制御していることを示している。この観点から、本実験の結果は、BN や BN 様ペプチドの腹腔内投与後

に記憶能力が改善するという前節および先行研究の結果と一致している^{53,91,114}。これらの研究では、BN や BN 様ペプチドの記憶向上効果が、これらのペプチドの薬理学的効果や BN や BN 受容体の生理学的機能を反映しているかどうかは、明らかではなかった。本実験では、記憶・学習の制御が、BN 様ペプチドの薬理学的効果を反映しているだけでなく、生理学的機能に基づくものであることを明らかにした。さらに、BIM23127 による記憶力の低下は、NMB/NMB-R の経路が、記憶の獲得や固定のシステムに関与していることを示している。BN は、GRP-R と NMB-R の両方と結合するので、本実験結果は、BN の記憶増強効果が GRP よりも強いという先行研究の結果⁵³を説明するものである。

摂食行動の場合と同様に⁹⁰、本実験の結果は、ロックアウトマウスの研究の結果と必ずしも一致するものではない^{33,124,125}。GRP-R 欠損マウスは、恐怖に関連付けられた事象の記憶能力は高いが、GRP-R アンタゴニストの投与によって一試行受動的回避学習の成績の低下が生じた。他方、NMB-R 欠損マウスは、一試行性回避学習テストにおいては変化を示さないが、NMB-R アンタゴニストを投与すると、同じ学習課題の成績が落ちた。これらの矛盾は、GRP/GRP 受容体システムと NMB/NMB-R システムが行動学上、受容体の遺伝子の欠失とアンタゴニストによる受容体機能の障害が異なる結果を導くのと同じく、記憶獲得においても異なる機能を果たしていることを示唆している。従って、BN 様ペプチドとその受容体のシステムが、記憶・学習の調節機能にどのような役割を果たしているのかを明確にするためには、これら二つの方法を直接比較する研究が必要であろう。

さらに、GRP-R/NMB-R アンタゴニストの投与によって、情動的学習・記憶の

獲得が阻害されたことは、これらの物質(分子)が、PTSD などの治療薬として利用できる可能性を示唆するものである。このような点からも、今後の研究の進展が望まれる。

第 5 章 総合的考察と展望

1. NMB/NMB-R システムによるストレス反応調節の生理学的メカニズム

ストレス反応の発現経路は、主として自律神経系と視床下部 - 下垂体 - 副腎皮質系 (HPA 系) である。一過性のストレスに対しては、自律神経系のほうが早く反応する。自律神経系の反応に遅れて HPA 系の反応がおこる (図 5-1)。視床下部からの副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) の放出は、下垂体門脈系をとおして下垂体に作用し、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) を放出させる。放出された ACTH は、副腎皮質からの糖質コルチコイド (コルチコステロン: CORT) を分泌させ、ストレスに対する全身反応を引き起こす。過剰に分泌された CORT は、大脳辺縁系 (主として海馬) を介して HPA 系の活動を抑制すると考えられている。

一方、中脳縫線核 (DR) に発するセロトニン (5-HT) 作動性ニューロンは視床下部の CRH ニューロンの活動を促進すると考えられている。NMB-R は、DR に多量に分布しているため、NMB/NMB-R システムが DR における 5-HT ニューロンの活動の調節をしていることが予想された。Yamada ら⁸² は、NMB-R 欠損マウスにおいて DR における 5-HT ニューロンの活動性の亢進、全脳レベルにおける 5-HT_{1A} 受容体の発現量の低下を報告している。この結果は、NMB/NMB-R システムが 5-HT ニューロンの調節を担っていることを示している。また、Yamano ら⁹⁸ は最近、野生型マウスに見られる拘束ストレス負荷後の DR における 5-HT 発現量の増加が NMB-R 欠損マウスでは認められないこと、視床下部室傍核 (PVN) における c-Fos 発現が NMB-R 欠損マウスで亢進してい

ること、さらに拘束ストレス負荷時の NMB-R 欠損マウスの血中 CORT 濃度が野生型マウスと比較して有意に高いことを報告している。これらの結果は、NMB/NMB-R システムが、5-HT ニューロンを媒介としてストレス反応を調節していることを示している。

図 5-2 は、NMB/NMB-R システムによるストレス反応の調節機構の概略を示している。DR における NMB/NMB-R システムの活性化が、5-HT 発現を誘導し、DR を始点とする上向性の 5-HT 作動性ニューロンを活性化する。5-HT 作動性ニューロンの活性化が、PVN における CRH ニューロンを活性化させることによって HPA 系におけるストレス反応が生じる。5-HT ニューロンの活動は、自己受容体である 5-HT_{1A} によって抑制的に制御されるが、NMB-R 欠損マウスにおいては、5-HT_{1A} 受容体の発現量が低下しているため、この抑制的な制御機構になんらかの障害が生じることによってストレス反応の異常が引き起こされると考えられる。HPA 系の機能修飾はストレス性精神障害のみならず、うつ病など多様な精神疾患の創薬ターゲットとなりえるので、今後、NMB/NMB-R システムによる 5-HT ニューロンの機能修飾について更なる詳細な分子機構の解明が望まれる。

2. ストレス性精神障害の予防・治療における本研究の意義

本研究では、ストレス性精神障害の予防法と治療法の開発を目指した基礎研究として、BN/BN 様ペプチドに焦点を当てて、ストレス性精神障害モデル動物の開発と BN 関連分子によるストレス性記憶障害および外傷性記憶の治療効果に関する行動薬理的解析を行った。以下、これらについてストレス性精

神障害の予防・治療研究における意義について考察する。

1) ストレス性精神障害モデル動物としての NMB-R 欠損マウス

第 3 章で示したように、NMB-R 欠損マウスでは、野生型マウスでは行動変異を生じない程度の軽度のストレス負荷でも、母性行動や情動的学習・記憶に重篤な障害を生じた。この結果は、NMB/NMB-R システムの異常がストレス性精神障害の危険因子のひとつであることを示しており、同時に NMB-R 欠損マウスがストレス性精神障害の新しいモデル動物として有効であることを意味している。また、NMB-R 欠損マウスにおけるこれらの行動変化が、ストレス負荷による自発活動性や不安反応性あるいは痛覚感受性などの変化による二次的な行動変化ではないという結果は、ヒトにおけるストレス障害の解明に新しい方向性を与えるものである。ヒトにおけるストレス性精神障害は、必ずしも予兆が認められるものばかりではない。突発的に発症する異常行動は、重大な事件・事故を誘発する危険性がある。従来、突発性の異常行動(例えば、「突然キレル」など)は、ストレス性精神障害として扱われることが少なかったが、本研究の結果は、これらの異常行動もストレス性精神障害の範疇にはいるものである可能性を示唆している。

前節で述べたように、NMB-R 欠損マウスにおけるストレス性行動異常は、脳内 5-HT ニューロン活動の異常に依拠したものであると考えられる。従って、言葉を変えれば、5-HT システムに異常が認められる場合には NMB/NMB-R システム(あるいは全 BN システム)の異常を伴っている可能性がある。また、突発性行動異常の治療に、選択的セロトニン再取り込み阻害剤(SSRI)が有

効であるという臨床知見から、今後はヒトにおける遺伝子多型研究 (SNPs 等) 等との連携によって、5-HT 関連分子と共に NMB/NMB-R システムの変異がヒトにおいてもストレス性精神障害の危険因子になっているかどうかを検討してゆく必要がある。

ストレス性精神障害における 5-HT システムと NMB/NMB-R システムとの関連は、従来 SSRI 等脳内セロトニン系が標的であった精神疾患について、NMB/NMB-R システムが新たな創薬の標的となる可能性を示唆するものである。このように、NMB-R 欠損マウスは、単にストレス刺激によって誘発される行動異常のモデルにとどまらず、生理学的基盤に基づいた新規創薬モデルとしても有効である。

2) BN 関連分子によるストレス性記憶障害および外傷性記憶の治療効果

これまで述べてきたように、NMB/NMB-R システムの異常はストレス脆弱性の危険因子のひとつであるといえる。これは NMB/NMB-R システム、ひいては脳内 BN/BN-R システムが生体のストレス反応性の制御に密接にかかわっていることを意味しており、言い換えれば、BN 関連分子がストレス性精神障害の予防あるいは治療に適用可能性であることを示唆している。第 4 章では、BN 様ペプチドの一種である GRP の投与が窒息による外傷性の記憶障害に対して治療効果を持つこと、また、GRP-R および NMB-R アンタゴニストの投与が情動的・外傷的記憶の固定を阻害することが示された。

地下鉄サリン事件被害者の一部など PTSD 患者において、記憶障害が生じるという報告がなされている¹²⁶。従って、GRP が、記憶障害の回復に有効であ

るという結果は、PTSD に見られる一部の症状の治療に GRP あるいは GRP-R を標的とした分子が適用可能であることを示唆している。

一方、PTSD など重篤なストレス障害はきわめて情動性の強い体験の記憶（外傷的記憶）を伴い、これらの記憶が繰り返し想起されることによって、症状が長期にわたって維持される。従って、外傷体験の長期的な記憶としての固定化を阻止することができれば、PTSD などの障害の発症を防ぐことが可能となると考えられる。GRP-R および NMB-R 拮抗薬の投与が、マウスにおいて電気ショックというきわめて情動性の強い経験の記憶の固定を阻害したという結果は、これらの分子が PTSD の予防や治療に有効である可能性を示唆している。本研究では、薬物投与が情動経験（電気ショック）に先行する場合についてその有効性が確認された。これは、これらの分子が PTSD の予防効果を持つことを意味している。しかし、PTSD をひきおこすようなきわめて強い情動経験は、事故・事件・災害など予測不可能な場合が多い事象に伴う。従って、治療薬は、強い情動体験（外傷体験）の経験から一定時間経過後にも有効である必要がある。最近、情動経験（電気ショック）後の GRP-R および NMB-R アンタゴニスト投与も情動経験の記憶の固定を阻害するという報告がなされており¹²⁷、これらの分子が予防効果だけでなく治療効果も持ちうるということが明らかにされつつある。

このように、本研究の結果から、BN 関連分子はストレス性精神障害の予防・治療薬候補のひとつとなりうることが示された。しかし、ペプチドは生体内で分解されやすく、また投与経路も極めて限られているので予防薬・治療薬として臨床応用するためには、解決すべき問題は多い。BN 受容体を標的とした非ペプチド系の作動薬および拮抗薬や経口投与が可能な低分子化合物などの

開発が望まれる。

3. 結び

本研究では、BN 様ペプチドおよびその関連分子が生体のストレス反応性の調節に重要な役割を果たしていることを明らかにした。本研究の基本的研究方法は、神経ペプチド受容体の遺伝子改変マウスの行動解析とその結果を基にした行動薬理学的実験である。遺伝子改変マウスの行動解析によって当該遺伝子(分子)とストレス反応性調節との関連を明らかにし、当該遺伝子に関連する分子がストレス性行動異常に与える効果を検討するという方法は、従来のストレスおよびストレス性精神疾患研究にはない新しい方法といえる。遺伝子改変動物の利用が、生物学のみならず基礎医学・行動科学の主要な研究方法になりつつある現在、本研究の方法は今後創薬を含めた精神疾患研究の主流のひとつとなるであろう。

ストレス性精神障害に関する研究においては、現在 HPA 系を中心とした生理学的反応の研究とともに、ストレス脆弱性因子の探索が重要な課題となっている。本研究では、BN 様ペプチド/受容体システムの一つである NMB/NMB-R システムの異常がストレス脆弱性の危険因子の一つであることを明らかにした。NMB/NMB-R システムが脳内 5-HT ニューロンの修飾を行っているように、ストレス反応制御に関わる脳内の主要神経伝達システムの修飾には、多様な神経ペプチドが関わっていることが予想される。それらの神経ペプチド関連分子について、多くの遺伝子改変マウスが開発されている。これらのマウスを対象として本研究で用いた研究方法を適用することで、未知のストレス脆弱性因子ある

いは抗ストレス因子が解明されると考えられる。今後の研究の発展が強く望まれる。

【文献】

1. 平野鉄雄, 新島旭: 脳とストレス - ストレスにたちむかう脳. ブレインサイエンス・シリーズ 13, 大村裕, 中川八郎 編, 共立出版, 東京, 1995
2. Seligmann ME: Learned helplessness. *Ann Rev Med* **23**: 407-412, 1972.
3. Brady JV, Porter RW, Conrad DG *et al*: Avoidance behavior and the development of gastroduodenal ulcers. *J Exp Analysis Behav* **1**: 69-72, 1958.
4. Gass P, Reichardt HM, Strekalova T *et al*: Mice with target mutations of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors: models for depression and anxiety? *Physiol Behav* **73**: 811-825, 2001.
5. Muller MB, Keck ME: Genetically engineered mice for studies of stress-related clinical conditions. *J Psychiatr Res* **36**: 53-76, 2002.
6. Bakshi VP, Kalin NH: Corticotropin-releasing hormone and animal models of anxiety: gene-environment interactions. *Biol Psychiatry* **48**: 1175-1198, 2000.
7. Giralt M, Armario A: Individual housing does not influence the adaptation of the pituitary-adrenal axis and other physiological variables to chronic stress in adult male rats. *Physiol Behav* **45**: 477-481, 1989.
8. Tabata H, Kitamura T, Nagamatsu N: Comparison of effects of restraint, cage transportation, anaesthesia and repeated bleeding on plasma glucose levels between mice and rats. *Laboratory Animals* **32**: 143-148, 1998.
9. Schaefer ML, Wong ST, Wozniak DF *et al*: Altered stress-induced anxiety

- in adenylyl cyclase type VIII-deficient mice. *J Neurosci* **13**: 4809-4820, 2000.
10. Bale TL, Picetti R, Contarino A *et al*: Mice deficient for both corticotrophin-releasing factor receptor 1 (CRFR1) and CRFR2 have an impaired stress response and display sexually dichotomous anxiety-like behavior. *J Neurosci* **22**: 193-199, 2002.
11. Coste SC, Murray SE, Stenzel-Poore MP: Animal models of CRH excess and CRH receptor deficiency display altered adaptation to stress. *Peptides* **23**: 733-741, 2001.
12. Jeong K-H, Jacobson L, Pacak K *et al*: Impaired basal and restraint-induced epinephrine secretion in corticotrophin-releasing hormone-deficient mice. *Endocrinology* **141**: 1142-1150, 2000.
13. Weninger SC, Dunn AJ, Muglia LJ *et al*: Stress-induced behaviors require the corticotrophin-releasing hormone (CRH) receptor, but not CRH. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 8283-8288, 1999.
14. Weninger SC, Peters LL, Majzoub JA: Urocortin expression in the edinger-westphal nucleus is up-regulated by stress and corticotrophin-releasing hormone deficiency. *Endocrinology* **141**: 256-263, 2000.
15. Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M: "Behavioral despair" in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine. *Eur J Pharmacol* **51**: 291-294, 1978.
16. 辻村徹, 中根允文: 気分障害・動物モデルの行動評価法. 連載講座: 脳・

- 神経系実験動物モデル～テクニック・方法論～, 分子精神医学 2: 62-67, 2002.
17. Porsolt RD, Bertin A, Blavet N *et al*: Immobility induced by forced swimming in rats: effects of agents which modify central catecholamine and serotonin activity. *Eur J Pharmacol* **57**: 201-210, 1979.
 18. Borsini F, Meli A: Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology (Berl)* **94**: 147-160, 1988.
 19. Sallinen J, Haapalinna A, MacDonald E *et al*: Genetic alteration of the α_2 -adrenoceptor subtype c in mice affects the development of behavioral despair and stress-induced increases in plasma corticosterone levels. *Mol Psychiatr* **4**: 443-452, 1999.
 20. Scheinin M, Sallinen J, Haapalinna A: Evaluation of the α_2 -adrenoceptor as a neuropsychiatric drug target studies in transgenic mouse models. *Life Sci* **68**: 2277-2285, 2001.
 21. Zethof TJJ, Van Der Heyden JAM, Tolboom JTBM *et al*: Stress-induced hyperthermia in mice: a methodological study. *Physiol Behav* **55**: 109-115, 1994.
 22. Groenink L, Van Der Gugten J, Zethof TJJ *et al*: Neuroendocrine effects of diazepam and flesinoxan in the stress-induced hyperthermia test in mice. *Pharmacol Biochem Behav* **54**: 249-253, 1996.
 23. Borsini F, Brambilla A, Grippa N *et al*: Behavioral effects of flibanserin (BIMT 17). *Pharmacol Biochem Behav* **64**: 137-146, 1999.

24. Groenink L, Van Der Gugten J, Zethof TJJ *et al*: Stress-induced hyperthermia in mice: hormonal correlates. *Physiol Behav* **56**: 747-749, 1994.
25. Watanabe T, Hashimoto M, Okuyama S *et al*: Effects of targeted disruption of the mouse angiotensin II type 2 receptor gene on stress-induced hyperthermia. *J Physiology* **515**: 881-885, 1999.
26. Bouwknegt JA, Van Der Gugten J, Hijzen TH *et al*: Corticosterone responses in 5-HT_{1B} receptor knockout mice to stress or 5-HT_{1A} receptor activation are normal. *Psychopharmacology* **153**: 484-490, 2001.
27. Rodgers RJ, Cole JC, Harrison-Phillips DJ: "Cohort removal" induces hyperthermia but fails to influence plus-maze behaviour in male mice. *Physiol Behav* **55**: 189-192, 1994.
28. Harlow HF, Harlow MK: Social deprivation in monkeys. *Sci Am* **207**: 136-146, 1962.
29. Liu D, Diorio J, Tannenbaum B *et al*: Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* **277**: 1659-1662, 1997.
30. Francis DD, Meaney MJ: Maternal care and the development of stress responses. *Curr Opin Neurobiol* **9**: 128-134, 1999.
31. Sallinen J, Haapalinna A, Viitamaa T *et al*: Adrenergic α_2 -receptors modulate the acoustic reflex, prepluse inhibition, and aggression in mice. *J Neurosci* **18**: 3035-3042, 1998.
32. Alleva E, Cirulli F, Bianchi M *et al*: Behavioural characterization of

- interleukin-6 overexpressing or deficient mice during agonistic encounters. *Eur J Neurosci* **10**: 3664-3672, 1998.
33. Wada E, Watase K, Yamada K *et al*: Generation and characterization of mice lacking gastrin-releasing peptide receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **239**: 28-33, 1997.
34. Yamada K, Wada E, Wada K: Male mice lacking gastrin-releasing peptide receptor (GRP-R) display elevated preference for conspecific odors and increased social investigatory behaviors. *Brain Res* 870: 20-26, 2000.
35. Yamada K, Wada E, Wada K: Female gastrin-releasing peptide receptor (GRP-R)-deficient mice exhibit altered social preference for male conspecifics: implications for GRP/GRP-R modulation of GABAergic function. *Brain Res* 894: 281-287, 2001.
36. Yamada K, Ohki-Hamazaki H, Wada K: Differential effects of social isolation upon body weight, food consumption, and responsiveness to novel and social environment in bombesin receptor subtype-3 (BRS-3) deficient mice. *Physiol Behav* 68: 555-561, 2000.
37. Miczek KA: Aggressive and social stress responses in genetically modified mice: from horizontal to vertical strategy. *Psychopharmacology* **147**: 17-19, 1999.
38. Nelson RJ, Young KY: Behavior in mice with targeted disruption of single genes. *Neurosci Biobehav Rev* **22**: 453-462, 1998.
39. Anagnostopoulos AV, Mobraaten LE, Sharp JJ *et al*: Transgenic and knockout databases: behavioral profiles of mouse mutants. *Physiol Behav*

- 73: 675-689, 2001.
40. Crowcroft P, Rowe FP: Social organization and territorial behaviour in the wild house mouse (*Mus Musculus* L.). *Proc Zool Soc London* **140**: 517-531, 1963.
 41. Lister RG, Hilakivi LA: The effects of novelty, isolation, light and ethanol on the social behavior of mice. *Psychopharmacology (Berl)* **96**: 181-187, 1988.
 42. Kavaliers M, Wiebe JP, Galea LAM: Reduction of predator odor-induced anxiety in mice by the neurosteroid 3 α -hydroxy-4-pregnen-20-one (3 HP). *Brain Res* **645**: 325-329, 1994.
 43. Griebel G, Perrault G, Soubrie P: Effects of SR48968, a selective non-peptide NK2 receptor antagonist on emotional processes in rodents. *Psychopharmacology (Berl)* **158**: 241-251, 2001.
 44. Linthorst ACE, Flachskamm C, Barden N *et al*: Glucocorticoid receptor impairment alters CNS responses to a psychological stressor: an *in vivo* microdialysis study in transgenic mice. *Eur J Neurosci* **12**: 283-291, 2000.
 45. Ortiz R, Armario A, Castellanos JM *et al*: Post-weaning crowding induces corticoadrenal hyperreactivity in male mice. *Physiol Behav* **34**: 857-860, 1985.
 46. Kamei J, Ohsawa M: Socio-psychological stress-induced antinociception in diabetic mice. *Psychopharmacology* **149**: 397-400, 2000.
 47. Yobimoto K, Matsumoto K, Huong NTT *et al*: Suppressive effects of Vietnamese ginseng saponin and its major component majonoside-R2 on

- psychological stress-induced enhancement of lipid peroxidation in the mouse brain. *Pharmacol Biochem Behav* **66**: 661-665, 2000.
48. Anastasi A, Erspamer V, Bucchi M: Isolation and structure of bombesin and alytensin, two analogous active peptides from the skin of the European amphibians *Bombina* and *Alytes*. *Experientia* **27**: 166-167, 1971.
49. McDonald TJ, Jornvall H, Nilsson G *et al*: Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue. *Biochem Biophys Res Commun* **90**: 227-233, 1979.
50. Minamino N, Kangawa K, Matsuo H: Neuromedin B: a novel bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun* **114**: 541-548, 1983.
51. Wada E, Wray S, Key S *et al*: Comparison of gene expression for two distinct bombesin receptor subtypes in rat central nervous system. *Mol Cell Neurosci* **3**: 446-460, 1992.
52. Ohiki-Hamazaki H, Wada E, Matsui K *et al*: Cloning and expression of the bombesin receptor genes in the mouse. *Brain Res* **762**: 165-172, 1997.
53. Flood JF, Morley JE: Effects of bombesin and gastrin-releasing peptide on memory processing. *Brain Res* **460**: 314-322, 1988.
54. Flynn FW: Effects of fourth ventricle bombesin injection on meal-related parameters and grooming behavior. *Peptide* **12**: 761-765, 1991.
55. Kirkham TC, Perez S, Gibbs J: Prefeeding potentiates anorectic actions of neuromedin B and gastrin-releasing peptide. *Physiol Behav* **54**: 467-470, 1993.

56. Wada K, Wada E, Watase K *et al*: Bombesin, obesity, and social behavior. *Mol Psychiatry* **3**: 204-206, 1998.
57. Ohki-Hamazaki H, Watase K, Yamamoto K *et al*: Mice lacking bombesin receptor subtype-3 develop metabolic defects and obesity. *Nature* **390**: 165-169, 1997.
58. Yamada K, Wada E, Imaki J *et al*: Hyperresponsiveness to palatable and aversive taste stimuli in genetically obese (bombesin receptor subtype-3 deficient) mice. *Physiol Behav* **66**: 863-867, 1999.
59. Crawley JN: Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. *Brain Res* **835**: 18-26, 1999.
60. Crestani F, Lorez M, Baer K *et al*: Decreased GABAA-receptor clustering results in enhanced anxiety and a bias for threar cues. *Nature Neurosci* **2**: 833-839, 1999.
61. Rodgers RJ, Johnson NTJ, Champion AJ *et al*: Modulation of plus-maze behavior in mice by the preferential D3-receptor agonist 7-OH-DPAT. *Pharmacol Biochem Behav* **54**: 79-84, 1996.
62. Ferrari PF, Palanza P, Parmigiani S *et al*: Interindividual variability in swiss male mice: relationship between social factors, aggression, and anxiety. *Physiol Behav* **63**: 821-827, 1998.
63. Dalvi A, Rodgers RJ: GABAergic influences on plus@maze behavior in mice. *Psychopharmacol.* **128**: 380-397, 1996.
64. Grewal SS, Shepherd JK, Bill DJ *et al*: Behavioral and pharmacological

- characterisation of the canopy stretched attend posture test as a model of anxiety in mice and rats. *Psychopharmacol* **133**: 29-38, 1997.
65. Griebel G, Perrault G, Sanger DJ: Characterization of the behavioral profile of the non-peptide CRF receptor antagonist CP-154,526 in anxiety models in rodents. *Psychopharmacol* **138**: 55-66, 1998.
66. Griebel G, Blanchard DC, Blanchard RJ: Evidence that the behaviors in the mouse defense test battery relate to different emotional states: a factor analytic study. *Physiol Behav* **60**: 1255-1260, 1996.
67. Ohki-Hamazaki H, Sakai Y, Kamata K *et al*: Functional properties of two bombesin-like peptide receptors revealed by the analysis of mice lacking neuromedin B receptor. *J Neurosci* **19**: 948-954, 1999.
68. Alleva E, Caprioli A, Laviola G: Litter gender composition affects maternal behavior of the primiparous mouse dam (*Mus musculus*). *J Comp Psychol* **103**: 83-87, 1989.
69. Itoh S, Takahash A, Itoh T *et al*: Open-field behavior of rats following intracerebroventricular administration of neuromedin B, neuromedin C, and related amphibian peptides. *Jpn J Physiol* **44**: 271-281, 1994.
70. Itoh S, Takahashi A, Itoh T *et al*: Effects of neuromedins and related peptides on the body temperature of rats. *Jpn J Physiol* **45**: 37-45, 1995.
71. Kent P, Anisman H, Merali Z: Are bombesin-like peptides involved in the mediation of stress response? *Life Sci* **62**: 103-114, 1998.
72. Ladenheim EE, Taylor JE, Coy DH *et al*: Blockade of feeding inhibition by neuromedin B using a selective receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* **271**:

- R7-R9, 1994.
73. Ladenheim EE, Wirke KE, Moran TH: Receptor subtype mediation of feeding suppression by bombesin-like peptides. *Pharmacol Biochem Behav* **54**: 705-711, 1996.
74. Malendwicz LK and Nussdorfer GG: Investigation on the acute effects of neuropeptides on the pituitary-adrenocortical function in normal and cold-stressed rats. I. Bombesin and neuromedin B. *Exp Toxicol Pathol* **47**: 31-34, 1995.
75. Olzabal DE and Ferreira A: Maternal behavior in rats with kainic acid-induced lesions of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Physiol Behav* **61**: 779-784, 1997.
76. Rushing PA, Gibbs J, Geary JN: Brief, meal-contingent infusion of gastrin-releasing peptide 1-27 and neuromedin B-10 inhibit spontaneous feeding in rats. *Physiol Behav* **60**: 501-504, 1996.
77. Thaw AK, Smith JC, Gibbs J: Mammalian bombesin-like peptides extend the intermeal interval in freely feeding rats. *Physiol Behav* **64**: 425-428, 1998.
78. Wada E, Way J, Lebaq-Verheyden AM *et al*: Neuromedin B and gastrin-releasing peptide mRNAs are differentially distributed in the rat nervous system. *J Neurosci* **10**: 2917-2930, 1990.
79. Wada E, Way J, Shapira H *et al*: cDNA cloning, characterization, and brain region-specific expression of a neuromedin-B-preferring bombesin receptor. *Neuron* **6**: 421-430, 1991.

80. Yamada K, Wada E, Wada K: Bombesin-like peptides: studies on food intake and social behavior with receptor knock-out mice. *Ann Med* **32**: 519-529, 2000.
81. Yamada K, Santo-Yamada Y, Wada E *et al*: Role of bombesin (BN)-like peptides/receptors in emotional behavior by comparison of three strains of BN-like peptide receptor knockout mice. *Mol Psychiatr* **7**: 113-117, 2002.
82. Yamada K, Wada E, Yamano M *et al*: Decreased marble burying behavior in female mice lacking neuromedin-B receptor (NMB-R) implies the involvement of NMB/NMB-R in 5-HT neuron function. *Brain Res* **942**: 71-78, 2002.
83. Yu G-Z, Kaba H, Okutani F *et al*: The olfactory bulb: a crucial site of action for oxytocin in the induction of maternal behavior in rat. *Neuroscience* **72**: 1083-1088, 1996.
84. Bremner JD, Krystal JH, Southwick SM *et al*: Functional neuroanatomical correlates of the effects of stress on memory. *J Trauma Stress* **8**:527-553, 1995.
85. Cabib S, Castellano C, Patacchioli FR *et al*: Opposite strain-dependent effects of post-training corticosterone in a passive avoidance task in mice: role of dopamine. *Brain Res* **729**:110-118, 1996.
86. Gross C, Santarelli L, Brunner D *et al*: Altered fear circuits in 5-HT_{1A} receptor KO mice. *Biol Psychiatry* **48**:1157-1163, 2000.
87. Joseph R: The neurology of traumatic “dissociative” amnesia: commentary and literature review. *Child Abuse Negl* **23**:715-727, 1999.

88. Lefebvre H, Contesse V, Delarue C *et al*: Serotonergic regulation of adrenocortical function. *Horm Metab Res* **30**:398-403, 1998.
89. McDonald MP, Wong R, Goldstein G *et al*: Hyperactivity and learning deficits in transgenic mice bearing a human mutant thyroid hormone receptor gene. *Learn Mem* **5**:289-301, 1998.
90. Merali Z, McIntosh H, Anisman H: Role of bombesin-related peptides in the control of food intake. *Neuropeptides* **33**:376-386, 1999.
91. Santo-Yamada Y, Yamada K, Wada K: Post-training administration of gastrin-releasing peptide (GRP) improves memory loss in scopolamine- and hypoxia-induced amnesic mice. *Physiol Behav* **74**:139-143, 2001.
92. Saudou F, Amara DA, Dierich A *et al*: Enhanced aggressive behavior in mice lacking 5-HT_{1B} receptor. *Science* **265**:1875-1878, 1994.
93. Tabata H, Kitamura T, Nagamatsu N: Comparison of effects of restraint, cage transportation, anaesthesia and repeated bleeding on plasma glucose levels between mice and rats. *Laboratory Animals* **32**:143-148, 1998.
94. Takahashi M: Stress-induced analgesia. *Yakubutsu Seishin Kodo* **11**:279-295, 1991.
95. Battey J, Wada E: Two distinct receptor subtypes for mammalian bombesin-like peptides. *TINS* **12**: 524-528, 1991.
96. Yamada K, Wada E, Santo-Yamada Y *et al*: Bombesin and its family of peptides: prospects for the treatment of obesity. *Eur J Pharmacol* **440**:281-290; 2002.
97. Yamada K, Santo-Yamada Y, Wada K: restraint stress impaired maternal

- behavior in female mice lacking the neuromedin B receptor (NMB-R) gene. *Neurosci Lett* **330**: 163-166, 2002.
98. Yamano M, Ogura H, Okuyama S et al: Modulation of 5-HT system in mice with a targeted disruption of neuromedin B receptor. *J Neurosci Res* **68**:59-64; 2002.
99. Battey JF, Way JM, Corjay MH *et al*: Molecular cloning of the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor from Swiss 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **15**: 395-399, 1991.
100. Chleide E, Ishikawa K: Hypoxia-induced decrease of brain acetylcholine release detected by microdialysis. *NeuroReport* **1**: 197-199, 1990.
101. Duncan CP: The retroactive effect of electroshock on learning. *J Comp Physiol Psychol* **42**: 32-44, 1949.
102. Egawa T, Mishima K, Mtsumoto Y *et al*: Rolipram and its optical isomers, phosphodiesterase 4 inhibitors, attenuated the scopolamine-induced impairments of learning and memory in rats. *Jpn J Pharmacol* **75**: 275-281, 1997.
103. Eguchi J, Yuasa T, Egawa M *et al*: Effects of a novel compound MCI-225 on impaired learning and memory in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **48**: 345-349, 1994.
104. Flood JM, Smith GE, Morley JE: Modulation of memory processing by cholecystokinin: dependence on the vagus nerve. *Science* **236**: 832-834, 1987.

105. Iwasaki K: Step-through passive avoidance experiment. *Seitai no Kagaku* **45**: 496-497, 1994. (in Japanese)
106. Izquierdo I, Netto CA: Role of β -endorphin in behavioral regulation. *Ann NY Acad Sci* **444**: 162-177, 1985.
107. Koob GF, Lebrun C, Martinez JL *et al*: Arginine vasopressin, stress, and memory. *Ann NY Acad Sci* **444**: 194-202, 1985.
108. Lebacqz-Verheyden A-M, Trepel J, Sausville EA *et al*: Bombesin and gastrin releasing peptide: neuropeptides, secretagogues, and growth factors, in: M.B. Sporn, A.B. Roberts eds. *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 95/II. Peptide growth factors and their receptors II, Springer-Verlag, Berlin, 1990. pp.71-124.
109. Leonard BE, Rigter H: Changes in brain monoamine metabolism and carbon dioxide induced amnesia in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* **3**: 775-780, 1975.
110. Masui A, Kato N, Itoshima T *et al*: Scratching behavior induced by bombesin-related peptides. Comparison of bombesin, gastrin-releasing peptide and phyllolitorins. *Eur J Pharmacol* **238**: 297-301, 1993.
111. McGaugh JL: Peripheral and central adrenergic influences on brain systems involved in the modulation of memory storage. *Ann NY Acad Sci* **444**: 150-161, 1985.
112. Motamedi F, Rashidy-Pour A, Zarrindast MR *et al*: Bombesin-induced anorexia requires central bombesin receptor activation: independence from interaction with central catecholaminergic systems.

- Psychopharmacol* **110**: 193-197, 1993.
113. Nagatani T, Yamamoto T, Takao K *et al*: Pharmacological profile of a potential anxiolytic: AP159, a new benzothieno-pyridine derivative. *Psychopharmacology* **104**: 432-438, 1991.
114. Rashidy-Pour A, Razvani ME: Unilateral reversible inactivations of the nucleus tractus solitarius and amygdala attenuate the effects of bombesin on memory storage. *Brain Res* **814**: 127-132, 1998.
115. Silva RH, Felico LF, Frussa-Filho R: Ganglioside GM1 attenuates scopolamine-induced amnesia in rats and mice. *Psychopharmacol* **141**: 111-117, 1999.
116. Tanabe S, Shishido Y, Furushiro M *et al*: Facilitation of passive avoidance response by newly synthesized cationized arginine vasopressin fragment 4-9 in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **57**: 251-256, 1997.
117. Whitlow JW, Jr.: Short-term memory in habituation and dishabituation. *J Exp Psychol Anim Behav Proc* **1**: 241-243, 1975.
118. Williams CL, McGaugh JL: Enhancement of memory processing in an inhibitory avoidance and radial maze task by post-training infusion of bombesin into the nucleus tractus solitarius. *Brain Res* **654**: 251-256, 1994.
119. Garrido MM, Manzanares J, Fuentes JA: Hypothalamus, anterior pituitary and adrenal gland involvement in the activation of adrenocorticotropin and corticosterone secretion by gastrin-releasing peptide. *Brain Res* **828**: 20-26, 1999.
120. Johnston SA, Merali Z: Specific neuroanatomical and neurochemical

- correlates of locomotor and grooming effects of bombesin. *Peptides* **9**: 245-256, 1988.
121. Ladenheim EE, Taylor JE, Coy DH et al: Caudal hindbrain neuromedin B-preferring receptors participate in the control of food intake. *Am J Physiol* **272**: R433-437, 1997.
122. Schulz D, Kalivas PW, Nemeroff CB et al: Bombesin-induced locomotor hyperactivity: evaluation of the involvement of the mesolimbic dopamine system. *Brain Res* **204**: 377-382, 1984.
123. Severi C, Coy DH, Jensen RT et al: Pharmacological characterization of [Leu-13- ψ -CH₂NH-Leu14]-bombesin as a specific bombesin receptor antagonist on isolated smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther* **251**: 713-717, 1989.
124. Shumyatsky GP, Tsvetkov E, Malleret G et al: Identification of a signaling network in lateral nucleus of amygdale important for inhibiting memory specifically related to learned fear. *Cell* **111**: 905-918, 2002.
125. Yamada K, Santo-Yamada Y, Wada K: Stress-induced memory impairment of inhibitory avoidance learning in female neuromedin B receptor-deficient mice. *Physiol Behav* **78**: 303-309, 2003.
126. 加藤進昌 他 編・著 PTSD とその周辺をめぐって 臨床精神医学 2002年増刊号 アークメディア、東京、2002.
127. 山田一之 マウスの恐怖条件づけにおけるボンベシン受容体アンタゴニストニストの効果. 日本心理学会第 67 回大会発表論文集, 2003, 377.

【主論文】

第 1 章

遺伝子改変動物によるストレス研究：山田一之，山田祐子，和田圭司，特集 PTSD の分子生物学 分子精神医学 2 (2002) 7-14.

第 2 章

Role of BN-like peptides/receptors in risk assessment behavior by comparison of three strains of bombesin (BN)-like peptide receptor knockout mice. Kazuyuki Yamada*, Yuko Santo-Yamada*, Etsuko Wada and Keiji Wada: 2002 Molecular Psychiatry, 7 (2002) 113-117. (*: joint first author)

引用文献 #81

NMB-R-deficient mouse in the elevated plus maze. Kazuyuki Yamada, Yuko Santo-Yamada, Etsuko Wada and Keiji Wada: Molecular Psychiatry, 7 (2002) 6. (IMAGE section)

第 3 章

Restraint stress impaired maternal behavior in female mice lacking the neuromedin B receptor (NMB-R) gene. Kazuyuki Yamada*, Yuko Santo-Yamada*, and Keiji Wada: Neuroscience Letters, 330 :(2002) 163-166.

(*: joint first author) 引用文献 #97

Stress-induced memory impairment of inhibitory avoidance learning in female neuromedin B receptor-deficient mice. Kazuyuki Yamada*, Yuko

Santo-Yamada* and Keiji Wada: Physiology and Behavior, 78 (2003) 303-309.

(*: joint first author) 引用文献 #125

第4章

Post-training administration of gastrin-releasing peptide (GRP) improves memory loss in scopolamine- and hypoxia-induced amnesic mice. Yuko Santo-Yamada, Kazuyuki Yamada and Keiji Wada: Physiology & Behavior, 74 (2001) 139-143. 引用文献 #91

Blockade of bombesin (BN)-like peptide receptors impairs inhibitory avoidance learning in mice. Yuko Santo-Yamada, Kazuyuki Yamada, Etsuko Wada, Yu-ichi Goto and Keiji Wada: Neuroscience Letters, Neuroscience Letters, 340 (2003) 65-68.

【参考論文】

Bombesin and its family of peptides: prospects for the treatment of obesity.
Kazuyuki Yamada, Etsuko Wada, Yuko Santo-Yamada and Keiji Wada.
European Journal of Pharmacology, 440 (2002) 281-290.

ストレス感受性変異マウスを用いたストレス性精神疾患病態解明と治療法の開発．前野浩巳，山田一之，孫英傑，山田祐子，佐藤栄一，和田圭司．
精神神経薬物治療研究年報，35 (2002) 223-231.

認知の分子遺伝学的基盤．和田圭司，滝沢修一，山田祐子，山田一之．
武田雅俊（編）新世紀の精神科治療 第6巻，「認知の科学と臨床」 pp.3-14
頁（2002）中山書店（東京）

【謝辞】

本研究をまとめるにあたり、多くの先生方にご指導・ご協力をいただきました。ご指導・ご協力をいただいた先生方、学位申請をご快諾して下さった共同執筆者の諸先生方に、この場をお借りして御礼申し上げます。

早稲田大学大学院人間科学研究科 木村一郎 教授には、本研究をまとめる機会をあたえて下さったことに心から御礼申し上げます。

国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第四部の皆様には、並々ならぬご指導・ご協力をいただきました。心から感謝申し上げます。

国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第四部 和田圭司部長、疾病研究第二部 後藤雄一 部長には、研究の機会を与えていただいたことを深く感謝いたします。

本研究の主要部分(第3章・第4章)は、文部科学省科学技術振興調整費 目標達成型脳科学研究「ストレス性脳機能障害とその修復過程の分子機構 解明および治療法の開発」(研究代表者 加藤進昌 東京大学、分担研究者 和田圭司)の一部として行われた。

最後に、共同研究者でもあり指導者でもある 夫 山田一之(理化学研究所 脳科学総合研究センター)に、本論文作製にあたり多大な時間を割いて、指

導・協力してくれたことに心から感謝します。