

博士（人間科学）学位論文

ストレス関連因子を標的とする新規抗不安・抗うつ薬に関する
行動薬理学的検討

**Behavioral pharmacological studies on the anxiolytic- and
antidepressant-like effects of drugs targeting stress-related pathways.**

2008年1月

早稲田大学大学院 人間科学研究科

飯島 通彦

Iijima, Michihiko

本学位論文は、下記の原著論文を基に作成され、早稲田大学大学院人間科学研究科に提出されたものである。

1. **Michihiko Iijima** and Shigeyuki Chaki (2007) An arginine vasopressin V(1b) antagonist, SSR149415 elicits antidepressant-like effects in an olfactory bulbectomy model. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry*, 31: 622-627.
2. **Michihiko Iijima**, Toshiharu Shimazaki, Akie Ito and Shigeyuki Chaki (2007) Effects of metabotropic glutamate 2/3 receptor antagonists in the stress-induced hyperthermia test in singly housed mice. *Psychopharmacology*, 190: 233-239.
3. Toshiharu Shimazaki, **Michihiko Iijima** and Shigeyuki Chaki (2006) The pituitary mediates the anxiolytic-like effects of the vasopressin V1B receptor antagonist, SSR149415, in a social interaction test in rats. *European Journal of Pharmacology* 543: 63-67.
4. **Michihiko Iijima** and Shigeyuki Chaki (2005) Separation-induced ultrasonic vocalization in rat pups: further pharmacological characterization. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 82: 652-657.

目次

緒言・・・8

第1編 不安障害・うつ病におけるストレス関連神経ペプチドの役割・・・・・・・・・・15

第1章 母子分離誘発啼鳴反応に対するストレス関連神経ペプチド受容体拮抗薬の作用

1, 序論・・16

2, 実験材料及び方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・17

3, 結果・・18

4, 考察・・22

5, 小括・・22

第2章 嗅球摘出ラットにおけるストレス関連神経ペプチド受容体拮抗薬の作用

1, 序論・・23

2, 実験材料及び方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・23

3, 結果・・25

4, 考察・・28

5, 小括・・32

第3章 下垂体除去ラットにおけるストレス関連神経ペプチド受容体拮抗薬の作用

1, 序論・・33

2, 実験材料及び方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・34

3, 結果・・35

4, 考察・・37

5, 小括・・39

第2編 不安障害・うつ病におけるグルタミン酸神経系の役割・・・・・・・・・・40

第1章 ストレス誘発高体温反応に対する代謝型グルタミン酸受容体拮抗薬の作用

1, 序論・・42

2, 実験材料及び方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・43

3, 結果・・44

4, 考察・・50

5, 小括・・52

第2章 母子分離誘発啼鳴反応に対する代謝型グルタミン酸受容体拮抗薬の作用	
1, 序論	54
2, 実験材料及び方法	54
3, 結果	55
4, 考察	56
5, 小括	56
第3章 ガラス玉覆い隠し行動に対する代謝型グルタミン酸受容体拮抗薬の作用	
1, 序論	57
2, 実験材料及び方法	57
3, 結果	58
4, 考察	59
5, 小括	60
第4章 強制水泳試験における代謝型グルタミン酸受容体拮抗薬の作用	
1, 序論	61
2, 実験材料及び方法	61
3, 結果	62
4, 考察	63
5, 小括	65
総括	66
謝辞	79
引用文献	80

Abbreviations

ACTH: adrenocorticotrophic hormone、副腎皮質刺激ホルモン

AMPA: alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid、 α -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソキサゾールプロピオン酸

AVP: arginine vasopressin、アルギニンバソプレッシン

BDNF: brain-derived neurotrophic factor、脳由来神経栄養因子

CRF: corticotropin-releasing factor、コルチコトロピン放出因子

GR: glucocorticoid receptor、グルココルチコイド受容体

IL: interleukin、インターロイキン

mGluR: metabotropic glutamate receptor、代謝型グルタミン酸受容体

MR: mineralocorticoid receptor、鉱質コルチコイド受容体

mRNA: messenger ribonucleic acid、伝令リボ核酸

NMDA: N-methyl-D-aspartic acid、N-メチル-D-アスパラギン酸

Drugs

CP-154,526: butyl-ethyl-[2,5-dimethyl-7-(2,4,6-trimethylphenyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl]amine、CRF1 受容体拮抗薬

CX546: 1-(1,4-Benzodioxan-6-ylcarbonyl)piperidine、AMPA 受容体刺激増強薬

LY341495: 2S-2-amino-2-(1S,2S-2-carboxycyclopropyl-1-yl)-3-(xanth-9-yl)propanoic acid、

MGS0039: (1R,2R,3R,5R,6R)-2-amino-3-(3,4-dichlorobenzyloxy)-6-fluorobicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylic acid、mGluR2/3 拮抗薬

MGS0008: 5-[2-[4-(6-fluoro-1H-indole-3-yl)piperidin-1-yl]ethyl]-4-(4-fluorophenyl)thiazole-2-c

arboxylic acid amide、mGluR2/3 作動薬

MPEP: 2-methyl-6-phenylethynyl-pyridine、mGluR5 拮抗薬

MTEP: [(2-methyl-1,3-thiazol-4-yl) ethynyl] pyridine、mGluR5 拮抗薬

NBQX: 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzo(f)-quinoxaline、AMPA 受容体拮抗薬

SSR125543A:4-(2-chloro-4-methoxy-5-methylphenyl)-N-[(1S)-2-cyclopropyl-1-(3-fluoro-4-methylphenyl)ethyl]5-methyl-N-(2-propynyl)-1,3-thiazol-2-amine hydrochloride、CRF1 受容体拮抗薬

SSR149415:(2S,4R)-1-[5-chloro-1-[(2,4-dimethoxyphenyl)sulfonyl]-3-(2-methoxyphenyl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-3-yl]-4-hydroxy-N,N-dimethyl-2-pyrrolidinecarboxamide)、V1b 受容体拮抗薬

SSRI: selective serotonin reuptake inhibitor、選択的セロトニン再取り込み阻害薬

SNRI: serotonin noradrenaline reuptake inhibitor、セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬

WAY100635:N-[2-(4-2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]-N-(2-pyridyl)

cyclohexanecarboxamide、セロトニン 1A 受容体拮抗薬

Others

HPA axis: hypothalamic-pituitary- adrenal axis、視床下部—下垂体—副腎皮質系

MRI: magnetic resonance imaging、核磁気共鳴画像法

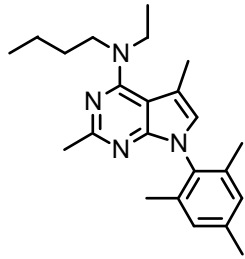
PTSD: post-traumatic stress disorder、心的外傷後ストレス症候群

rpm: revolutions per minute、1 分間当たりの回転数

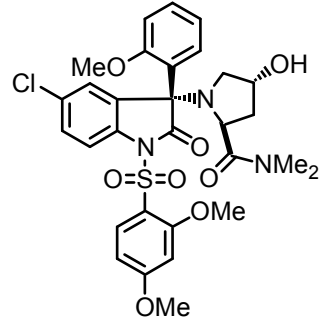
Brain regions

PVN: paraventricular nucleus、室傍核

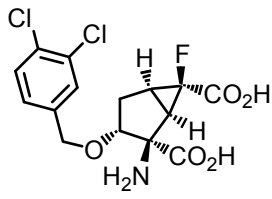
構造式



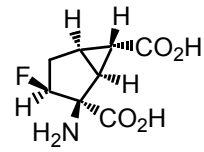
CP-154526



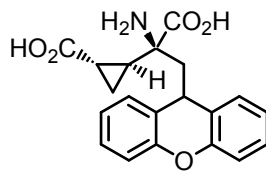
SSR149415



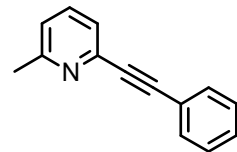
MGS0039



MGS0008



LY341495



MPEP

緒言

「**Stress is the spice of life**」。これは医学の世界に初めてストレスという言葉を持ち込んだ **Hans Selye** の言葉である。**Selye** は 1936 年 **Nature** 誌に、有害な因子（刺激）によって、身体に生じた歪みとそれに対する防衛（適応）反応を「生体内の歪みの状態」=ストレスと発表した。ストレスの原因となるものを、ストレッサーと呼び、通常このストレッサーのことを、我々はストレスと総称しているのである。適度なストレスは、生きていく上で重要であり、人間の行動を活性化するものである。生体はストレスを受けると、脳内情報伝達系の様々な防御及び代償機構によりストレスに抵抗性を示す。しかしながら、それらのシステムは、慢性的に過度なストレスが負荷されると破綻し、様々な疾患の発症に関与していることが報告されている。特にストレスと密接な関与が指摘されている疾患が、不安障害及びうつ病である。

不安は、将来自分に対して起こりそうな危険および苦痛の可能性を感じることにより生じる情動現象の総称であるが、その強度または持続性において過度となった病的症状が不安障害として診断される。一方、うつ病は、抑うつ気分及び興味喪失の何れかが診られる。さらに体重減少、疲労感、無価値観、不眠、自殺企図などが症状としてみられ、これらのエピソードが 2 週間以上続く状態をうつ病と診断する（以上、**Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth edition**、アメリカ精神医学会出版、1994）。うつ病の生涯罹患率は男性 5~12%、女性 10~25%とされている。重篤なうつ病患者の約 15%が自殺により死亡するとされている。加えて、うつ病の再発率は高く 50~60%である。現在、選択的セロトニン再取り込み阻害薬（**SSRI**）及びセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬（**SNRI**）がうつ病及びうつ様症状に有効であり、うつ病に対する薬物治療の第一選択薬となっている。**SSRI** や **SNRI** の投薬で約 70%の患者が効果を示すことが報告されている。しかしながら、いくつかの問題点がある。これらの薬剤は、効果発現までに 4~6 週間かかるといわれている。さらにうつ病患者のおよそ 3 割が難治性うつ病患者といわれてお

り、既存の薬剤では奏効しないことが報告されている。一方、不安障害に対しても、近年 **SSRI** が第一選択薬となっている。**SSRI** は、強迫性障害やパニック障害のみならず、社会不安障害、全般性不安障害及び外傷後ストレス障害など、不安障害全般にわたって第一選択薬としての位置付けがなされている。しかしながら、**SSRI** は幅広く不安障害に効果を示す一方で、効果発現までに期間を要するという欠点がある。また、ベンゾジアゼピン系抗不安薬は、急性的な効果発現を有するが、その効果は急性不安障害及び全般性不安障害など一部の不安障害に限られており、強迫性障害及びパニック障害に対する効果は低いとされる。さらに過度の鎮静、健忘及び依存などの副作用や耐性形成などの点が問題となっている。不安障害及びうつ病は高頻度で併発するため、両疾患に対して早期に効果を示し、副作用の少ない薬剤の開発が望まれている。

上述したように、不安障害及びうつ病の発症は、ストレスが深く関与していると考えられている。即ち、ストレス応答に関する分子機構の解明が、不安障害及びうつ病の治療に寄与すると考えられる。そこで本研究では、生体のストレス反応のうち、視床下部－下垂体－副腎系 (**HPA axis**) とグルタミン酸神経系の 2 点に注目し、これらのシステムを調節する化合物の抗不安・抗うつ薬としての可能性を明らかにすることを目的とした。第 1 編では、**HPA axis** の制御 (図 1) に中心的役割を果たすストレス関連神経ペプチドとしてアルギニンバソプレッシン (**AVP**) 及びコルチコトロピン放出因子 (**CRF**) に注目した。視床下部の室傍核 (**PVN**) は神経内分泌系と自律神経系の高次統合中枢として重要であり、大細胞群と小細胞群から構成されている。大細胞群では、**AVP** やオキシトシンを産生し、その軸索を下垂体後葉に投射し血中にそれらを分泌する。一方、小細胞群では、**CRF** 及び **AVP** が産生されており、正中隆起に投射した軸索終末からそれらが分泌され、下垂体前葉からの副腎皮質刺激ホルモン (**ACTH**) 分泌を引き起こす。**ACTH** は、副腎皮質 (**adrenal cortex**) を刺激し、コルチゾール (両生類、爬虫類、鳥類、一部の哺乳類では、コルチコステロン) の分泌を促す。コルチゾールは、**HPA axis** のネガティブフィードバックループの

主要因子として機能しており、ストレス刺激が過剰に加わらないよう制御している。しかしながら、不安障害及びうつ病患者では、**HPA axis** 機能異常が報告されている。うつ病患者において、①ACTH の分泌上昇と共にコルチゾールの分泌が上昇 (Rubin et al., 1987)、②尿中コルチゾールの上昇 (Carroll et al., 1976) ③脳脊髄液のコルチゾール及び CRF の上昇 (Nemeroff et al., 1984) が確認されている。それらの **HPA axis** 機能異常に加えて、デキサメサゾン抑制試験においても、うつ病患者の **HPA axis** は、異常であることが報告されている。デキサメサゾン抑制試験とは、グルココルチコイド受容体作用薬であるデキサメサゾンを投与し、数時間後に血中グルココルチコイドを測定する試験である。**HPA axis** の機能が正常であれば、デキサメサゾンによりフィードバックループが働き、グルココルチコイドの分泌を抑制する方向、即ち **ACTH** の分泌抑制や血中グルココルチコイドの低下が見られる。しかしながら、うつ病患者では健常人に比べて、デキサメサゾン試験による **ACTH** やグルココルチコイドの抑制に障害が見られる (Carroll, 1982; Holsboer et al., 1986)。即ち、うつ病の病態の一部として、**HPA axis** のネガティブフィードバック機能異常が示唆されている。パニック障害患者において、血漿コルチゾールの上昇 (Roy-Byrne et al., 1986)、心的外傷後ストレス障害 (PTSD) 患者において、脳脊髄液中 **CRF** 量の上昇 (Baker et al, 1999; Bremner et al, 1997) が報告されている。さらに、うつ病患者における脳脊髄液中の **CRF** や血漿 **AVP** の増加が報告されている (Owens et al., 1991; Van Londen et al., 1997)。**CRF** 及び **AVP** はそれぞれ 2 つ (**CRF1**、**CRF2**) 及び 3 つ (**V1a**、**V1b**、**V2**) の受容体サブタイプを有するが、これらのうち、**CRF1** 受容体及び **V1b** 受容体がそれぞれ **CRF** 及び **AVP** による **HPA axis** 機能の調節に関与することが知られている。そこで、本研究において、**CRF1** 受容体拮抗薬及び **V1b** 受容体拮抗薬を用いて、不安障害及びうつ病モデル動物における、それぞれの化合物の効果を明らかにした。

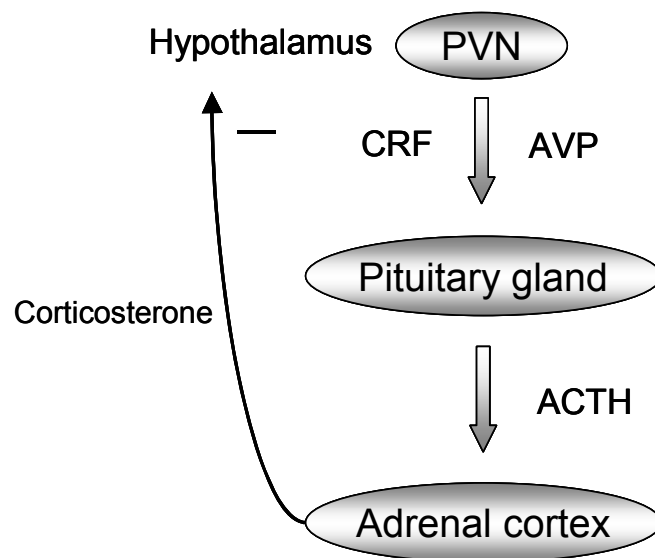


図 1、HPA axis の制御機構

PVN からの CRF 及び AVP の産生が、Pituitary gland からの ACTH の分泌を促す。ACTH は、Adrenal cortex からのコルチコステロンの分泌を促す。コルチコステロンは、ネガティブフィードバック因子として、PVN の CRF 及び AVP の産生を抑制する。

第 2 編では、グルタミン酸神経系 (図 2) と不安障害及びうつ病との関連に注目した。ストレス状態あるいはうつ病状態では、脳内グルタミン酸神経機能異常が示唆されている。即ち、うつ病患者の脳脊髄液中及び血漿中グルタミン酸濃度は増加しており (Levine et al., 2000; Mitani et al., 2006)、後頭皮質においてグルタミン酸濃度は健常人と比較して有意に高値を示す (Sanacora et al., 2004)。一方、proton MRI を用いた検討により、難治性うつ病患者の前帯状回においてグルタミン酸濃度が減少しているとの報告もある (Auer et al.,

2000)。以上の結果から、うつ病患者において脳内グルタミン酸神経機能異常が起こっている（亢進/低下に関しては脳部位の違いやシナプス内/外の受容体の働きも考慮せねばならず、未だ結論は出ていない）ことが示唆される。さらに薬理的な報告からも、この仮説が指示される。NMDA 受容体拮抗薬、グルタミン酸トランスポーター発現を増加させる ceftriaxone (Mineur et al., 2006) などグルタミン酸神経系に作用する薬剤はヒトあるいは動物モデルで抗うつ作用が認められている。また、最近の報告では、グルタミン酸の放出の低下作用及びグルタミン酸取り込み促進作用をもつ薬剤 riluzole がうつ病患者、不安障害患者 (Mathew et al., 2005) 及び治療抵抗性のうつ病患者 (Zarate et al., 2004; Sanacora et al., 2007) にそれぞれ効果を示した。一方で、イオンチャネル型グルタミン酸受容体である NMDA 受容体拮抗薬に関して、有害な副作用が数多く報告されている。それらの報告は NMDA 受容体拮抗薬が Psychotomimetic effects や神経変性、薬物依存性、運動失調及び認知障害を引き起こすなど多岐に渡っている (Parsons et al., 1998)。そこで NMDA 受容体拮抗薬に変わる新たなターゲット因子として、G 蛋白質共役型の代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) に注目が集まっている。mGluR には 8 つのサブタイプが存在しており、中枢神経系のシナプス伝達において多彩な役割を担っている。主にプレシナプス側には、mGluR タイプ 2、4、7 及び 8 が存在し、ポストシナプス側には、mGluR1 及び mGluR5 が存在する。その中でも、mGluR2/3 及び mGluR5 は、ヒト及びラットの大脳皮質、海馬、線条体、側坐核、扁桃体に強く発現しており (Spooren et al., 2001; Daggett et al., 1995)、不安障害及びうつ病と関係があることが報告されている (Palucha and Pilc, 2005)。そこで、本研究では、mGluR2/3 及び mGluR5 の選択的拮抗薬を用いて、不安障害及びうつ病モデル動物におけるそれぞれの化合物の効果を明らかにし、抗不安・抗うつ薬としての可能性を検討した。

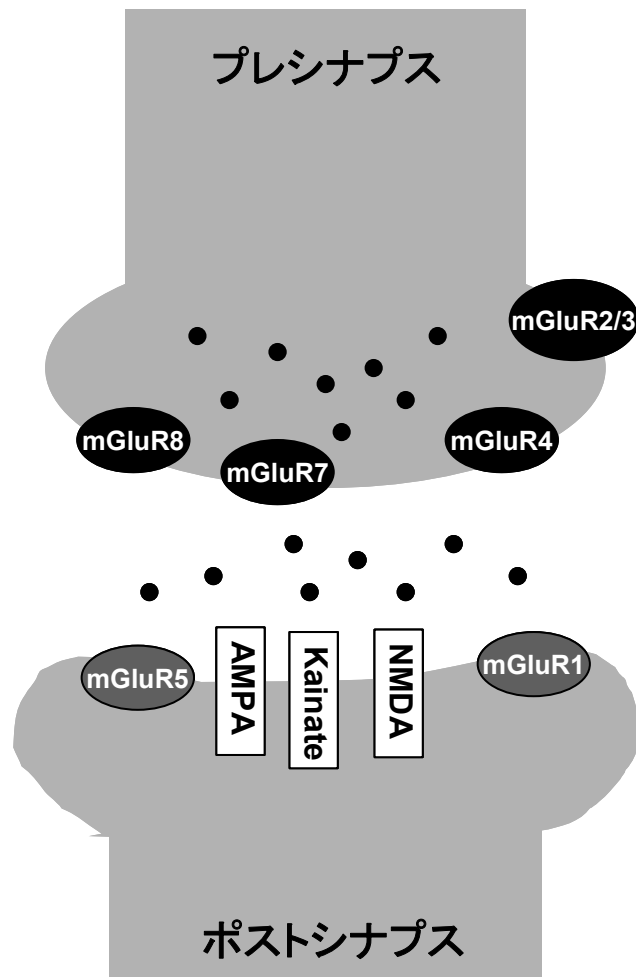


図2、グルタミン酸神経系

mGluR2/3 は、主にプレシナプス側のシナプス周囲に存在し、グルタミン酸放出の調節を行っている。mGluR5 は、主にポストシナプス側に存在し、グルタミン酸伝達に関与している。

本研究は、以上 2 点の生体のストレス反応に注目し、それらのストレス関連因子を標的とする新規化合物の抗不安・抗うつ薬としての可能性を、行動薬理学的に検証し、次世代抗不安・抗うつ薬の創出を目的とした。

第1編 不安障害・うつ病におけるストレス関連ペプチドの役割

近年、不安障害及びうつ病の臨床所見から、**HPA axis** の機能不全が報告されている。**CRF** と **AVP** は **HPA axis** 調節に重要な役割を果たしている神経ペプチドである。**CRF** は、ヒツジの視床下部から単離された 41 個のアミノ酸から成る神経ペプチドホルモンで、下垂体前葉からの **ACTH** 放出に関与しており、**HPA axis** 機能調節に中心的役割を果たしていると考えられている (Vale et al., 1981; Rivier and Plotsky, 1986)。**CRF** は、**G** 蛋白質共役型受容体である **CRF1** 及び **CRF2** 受容体を介し、アデニル酸シクラーゼを活性化する (Steckler and Holsboer, 1999)。特に **CRF1** 受容体は、うつ病及び不安障害との関係が知られており、**CRF1** ノックアウトマウスの表現系では、抗不安作用が確認され (Timpl et al., 1998)、さらに、**CRF1** ノックダウンマウスでも抗不安作用を示している (Heinrichs et al., 1997)。**CRF** と同様に **HPA axis** の調節に関与している神経ペプチドとして **AVP** が挙げられる。**AVP** は、9 個のアミノ酸からなるペプチドホルモンであり、血管収縮、インスリン・グルカゴン分泌及び水の再吸収などさまざまな生理作用を有し、これらの作用は、**V1a**、**V1b** 及び **V2** の 3 つの種類の受容体を介している。**V1b** 受容体は、下垂体に発現し **ACTH** の分泌調節に中心的役割を果たす一方、脳内でも海馬、嗅球、扁桃体及び外側中隔野など情動に関係のある部位に強く発現している (Griebel et al., 2003)。また、**V1b** 受容体ノックアウトマウスは、ストレスによる **ACTH** の上昇が軽減されること (Lolait et al., 2007) や攻撃行動が軽減されること (Wersinger et al., 2002) からも、**V1b** 受容体と情動との関係が支持される。本研究において、**CRF1** 受容体拮抗薬及び **V1b** 受容体拮抗薬を用いて、不安障害及びうつ病モデル動物における、それぞれの化合物の効果を明らかにすることを目的として試験を実施した。

第1章 母子分離誘発啼鳴反応に対するストレス関連神経ペプチド受容体拮抗薬の作用

1、序論

生後間もない仔ラットは、母親及び同腹仔から引き離されると、分離直後から 20kHz～60kHz の超音波領域に主成分を持つ啼鳴反応を示すことが知られている。この啼鳴反応は、自然界において鳥などの外敵には検知できない超音波領域にあり、ラットの防御機構の一つとして発達してきた。また、この反応はラットに限らず、マウスやサルなどの他の哺乳類でも観察される幼若期に特異的な反応であり、母仔間におけるストレス応答反応の一つとして考えられている。さらに、この母子分離誘発啼鳴反応は、ベンゾジアゼピン系抗不安薬 (Gardner, 1985; Insel et al., 1986) 及び非ベンゾジアゼピン系抗不安薬 (Olivier et al., 1998a; Kehne et al., 1991) で抑制されることから、不安の動物モデルとして広く用いられている。また、この反応は、現在、不安障害治療の第一選択薬として用いられている SSRI によって抑制される (Borsini et al., 2002) ことから、新規薬剤の抗不安作用検出のための評価系として予測妥当性を有するモデルに位置付けられている。さらに、仔ラットを使用する利点として、薬剤の投与容量が少量で済むことや血液脳関門の未発達による薬剤の脳内移行性の検討を回避できることなどが挙げられる。しかしながら、母子分離誘発啼鳴反応における神経化学的な機構は、未だ解明されていない。そこで、本研究では、ストレス関連神経ペプチド受容体拮抗薬である CRF1 受容体拮抗薬 CP-154,526 及び V1b 受容体拮抗薬 SSR149415 を用いて、母子分離誘発啼鳴反応に対する作用を検討し、両化合物の抗不安薬としての可能性を探索した。さらに、母子分離誘発啼鳴反応時における仔ラットの ACTH を測定し、このモデルにおける HPA axis の関与を検討した。また、対照薬として、SSRI、三環系抗うつ薬及びベンゾジアゼピン系薬剤を用いて、神経ペプチド受容体拮抗薬の作用と比較した。

2、実験材料及び方法

2-1 実験動物

雄性及び雌性 Sprague-Dawley 系ラット 9 日齢～11 日齢 (20-28 g、日本チャールスリバー) 母親付きを用いた。1 母獣に対し 8 匹の仔ラット (雄 4 匹、雌 4 匹) の哺育で統一した。動物は室温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 5\%$ 、12 時間明暗サイクル (7:00-19:00 点灯) に調節された動物施設 (大正製薬株式会社医薬研究所内) において飼育した。飼育時、餌及び水は自由摂取させた。実験動物の取り扱いは大日本実験動物学会の実験動物に関する指針 (1987) 及び大正製薬株式会社医薬研究所の実験動物規定に基づいた。

2-2 使用薬剤

CP-154,526 (3.0、10.0、30.0mg/kg)、SSR149415 (3.0、10.0、30.0mg/kg)、fluvoxamine (0.3、1.0、3.0mg/kg) 及び milnacipran (1.0、3.0、10.0mg/kg) は大正製薬株式会社医薬研究所内にて合成した。Diazepam (0.3、1.0、3.0mg/kg) は大日本製薬株式会社、desipramine (0.3、1.0、3.0mg/kg) は和光純薬工業株式会社からそれぞれ購入した。SSR149415 は 5% Cremophor EL に溶解した。CP-154,526 及び diazepam は 0.3% tween80/saline に溶解した。Fluvoxamine、milnacipran 及び desipramine は saline に溶解した。図中の vehicle 群は、薬剤を溶解した各々の溶媒を使用した。全ての薬剤は 10ml/kg の容量を測定 30 分前に腹腔内投与した。

2-3 啼鳴反応の測定

仔ラットは、母獣より分離後、直ちに防音箱 ($60 \times 70 \times 60 \text{ cm}^3$) 内に設置した 500 ml ビーカーに 5 分間放置し、啼鳴反応を測定した。啼鳴反応は、ビーカー上部に設置したマイクロホン (Aco-7016、ACO 株式会社) で 20kHz-60kHz の周波数を集音し、マイクロ

ホンアンプ (UMA-2、室町機械株式会社) で増幅し、Vocalization analyzer (室町機械株式会社) により音圧 60dB 以上の発声回数をパソコン上に記録した。啼鳴反応測定後、直腸温を BWT-100 thermometer (バイオリサーチセンター株式会社) で測定し、直ちに母獣ケージへ戻した。直腸温の測定は、薬剤自体が基礎直腸温に影響するか否かを見ることを目的として実施した。

2-4 ACTH 量の測定

仔ラットを、母獣より分離 1 分、3 分及び 5 分後に、非分離群はケージから取り出した直後に、それぞれ断頭し、血液を血清分離剤入りポリチューブ (セラクイック-D、アルフレッサファーマ株式会社) に採取した。血液を室温において 30 分間放置させた後、3000rpm で 15 分間遠心分離し、血清を得た。血清 ACTH 量の測定には ACTH IRMA system (三菱化学株式会社) を用いた。

2-5 統計

データは全て、平均値±標準誤差で表示した。啼鳴反応及び直腸温に関して一元配置分散分析を用いて評価し、その後、パラメトリック型 Dunnett's test を用いた。有意水準は 5%とした。

3、結果

CP-154,526 は、母子分離誘発啼鳴反応を用量依存的且つ有意に抑制した [$F(3, 28) = 3.11$, $p < 0.05$] (図 3)。SSR149415 は、母子分離誘発啼鳴反応を抑制したが、統計学的な差は見られなかった [$F(3, 34) = 2.04$, $p = 0.126$] (図 3)。また、CP-154,526 及び SSR149415 は、基礎直腸温に影響を及ぼさなかった (表 1)。さらに、SSRI である fluvoxamine [$F(3,28) = 15.97$, $p < 0.01$]、SNRI である milnacipran [$F(3,36) = 8.00$, $p < 0.01$] 及びベンゾジアゼピ

ン系抗不安薬 diazepam [$F(3,28) = 11.41, p < 0.01$] も同様に用量依存的且つ有意に啼鳴反応を抑制した (図 4)。また、fluvoxamine 及び diazepam は、基礎直腸温に影響を及ぼさなかったのに対し、milnacipran は高用量で、直腸温を低下させた (表 1)。三環系抗うつ薬 desipramine は、啼鳴反応に作用を示さなかった [$F(3,36) = 0.95, p = 0.43$] (図 4)。

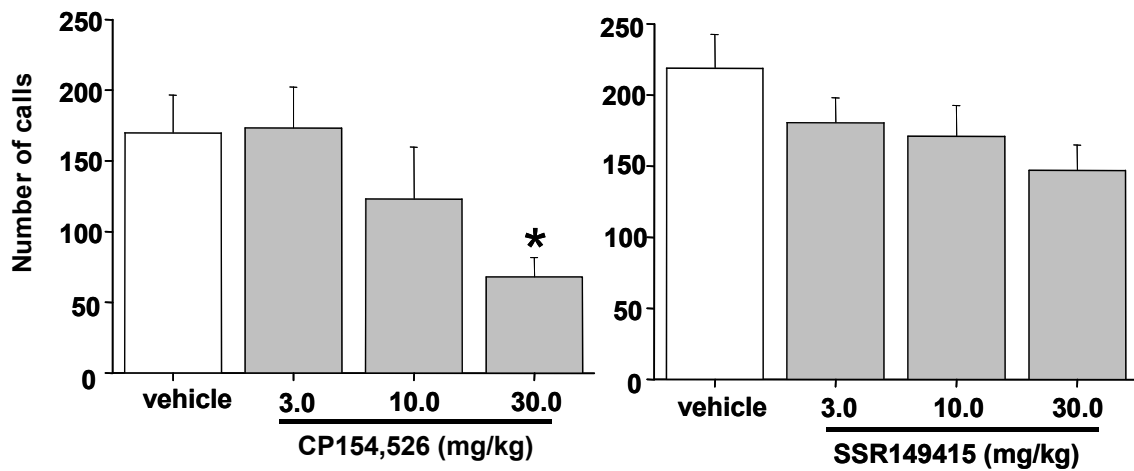


図 3、CP154,526 及び SSR149415 の母子分離誘発啼鳴反応における作用

縦軸は、測定 5 分間の仔ラットの啼鳴回数を表示。データは全て、平均値±標準誤差で表示 (CP154,526; N=8, SSR149415; N=8-10)。* $p < 0.05$ vs vehicle-treated group (Dunnett's test)。

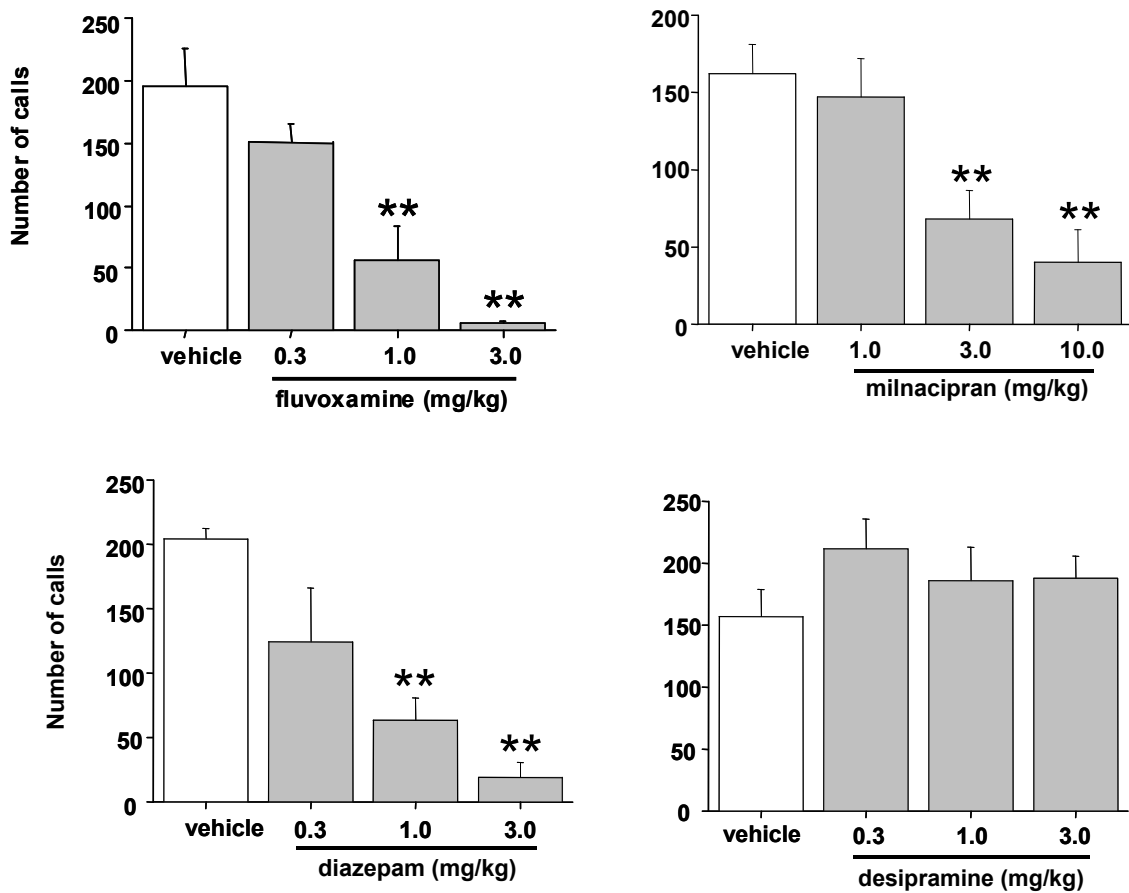


図 4、fluvoxamine、milnacipran、diazepam 及び desipramine の母子分離誘発啼鳴反応における作用

縦軸は、測定 5 分間の仔ラットの啼鳴回数を表示。データは全て、平均値±標準誤差で表示 (fluvoxamine, diazepam; N=8, milnacipran, desipramine; N=10)。** $p < 0.01$ vs vehicle-treated group (Dunnett's test)。

表 1、仔ラット基礎直腸温(°C)に及ぼす試験薬剤の影響

Compounds (mg/kg)	vehicle	Low dose	—————▶	High dose
CP154,526 (3.0, 10.0, 30.0)	34.23 (±0.487)	34.18 (±0.298)	33.31 (±0.496)	33.13 (±0.396)
SSR149415 (3.0, 10.0, 30.0)	34.16 (±0.134)	34.58 (±0.236)	34.37 (±0.127)	34.32 (±0.222)
fluvoxamine (0.3, 1.0, 3.0)	34.64 (±0.233)	34.73 (±0.169)	34.65 (±0.160)	34.68 (±0.251)
milnacipran (1.0, 3.0, 10.0)	34.97 (±0.347)	34.97 (±0.135)	34.54 (±0.153)	*34.17 (±0.218)
diazepam (0.3, 1.0, 3.0)	34.44 (±0.080)	34.12 (±0.162)	33.78 (±0.294)	33.76 (±0.200)
desipramine (0.3, 1.0, 3.0)	35.61 (±0.123)	35.86 (±0.076)	35.33 (±0.146)	35.17 (±0.206)

データは全て、平均値±標準誤差で表示。* $p < 0.05$ vs vehicle-treated group (Dunnett's test)。

血清 ACTH 量は母獣と分離後、1分、3分及び5分それぞれの時間で、非分離群に比べて有意に上昇した (表 2)。

表 2、分離群及び非分離群における仔ラットの血清 ACTH (pg/ml)

Non – separation	Separation		
	1 min	3 min	5 min
6.60 (±0.467)	*9.60 (±0.919)	**9.85 (±0.537)	*11.38 (±2.014)

データは全て、平均値±標準誤差で表示。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ vs vehicle-treated group (Dunnett's test)。

4、考察

本研究において、CRF1 受容体拮抗薬 CP-154,526 及び V1b 受容体拮抗薬 SSR149415 が母子分離誘発啼鳴反応を抑制することを明らかにした。また、fluvoxamine、milnacipran 及び diazepam も用量依存的且つ有意に母子分離誘発啼鳴反応を抑制した。一方、desipramine は、母子分離誘発啼鳴反応に作用を示さなかった。これらの結果を考慮すると、母子分離誘発啼鳴反応の抑制は、臨床において抗不安作用を示す薬剤が有効であり、臨床で効果を示さない薬剤が無効であったため、このモデルは予測妥当性を満たすものであることが示唆された。また、母子分離誘発啼鳴反応時に仔ラットの血清 ACTH が非分離群に比べ有意に上昇したことから、ストレス条件を反映するモデルであることが示唆された。即ちストレス関連因子の評価を行う上で、妥当なモデルであると考えられる。本研究において、CRF1 受容体拮抗薬及び V1b 受容体拮抗薬は、母子分離誘発啼鳴反応を抑制したことから、抗不安薬としての可能性が示唆された。

5、小括

- ① CRF1 受容体拮抗薬 CP-154,526 及び V1b 受容体拮抗薬 SSR149415 は、母子分離誘発啼鳴反応を抑制した。
- ② 母子分離誘発啼鳴反応時に、仔ラットの血清 ACTH が、非分離群に比べて有意に上昇した。

第2章 嗅球摘出ラットにおけるストレス関連神経ペプチド受容体拮抗薬の作用

1、序論

嗅球摘出ラットは、行動、内分泌、免疫及び神経ネットワークなどの様々な機構に変化をきたす。嗅球摘出ラットの異常行動の中で、新奇ストレス環境に対する過剰反応 (Jancsar and Leonard, 1984)、攻撃行動の増加 (Shibata et al., 1983; Noguchi et al., 1992)、性行動の減少 (Lumia et al., 1992) 及びサーカディアンリズムの破綻 (Marcilhac et al., 1997) は、うつ病患者の病態と重複することから、嗅球摘出ラットは、うつ病動物モデルとして広く使用されている。また、嗅球摘出ラットは、セロトニン (van der Stelt et al., 2005) 及びノルアドレナリン (van Riezen and Leonard, 1990) などの神経伝達物質の変動の観点からも、うつ病モデル動物として支持されている。さらに、抗うつ薬である三環系薬剤、SSRI 及び SNRI の慢性投与によりそれらの行動及び神経化学的変化を正常化することが報告されている (Stockert et al., 1988; Possidente et al., 1996; Redmond et al., 1999)。興味深いことに、嗅球摘出ラットの HPA axis は、機能不全を起こしており、抗うつ薬の投与によりその機能が改善したという報告がある (Marcilhac et al., 1999a)。また、嗅球摘出ラットの正中隆起の AVP 量 (Marcilhac et al., 1999b) や視床下部の CRF 量 (Bisette, 2001) が増加していることも報告されている。即ち、嗅球摘出ラットの異常行動は、AVP 及び CRF が一部関与していることが推測される。そこで、本研究では、ストレス関連神経ペプチド受容体拮抗薬である CRF1 受容体拮抗薬 CP-154,526 及び V1b 受容体拮抗薬 SSR149415 を用いて、急性投与及び慢性投与を行い、嗅球摘出ラットにおける作用を検討し、両化合物の抗うつ薬としての可能性を探索した。

2、実験材料及び方法

2-1 実験動物

雄性 Wistar 系ラット、試験開始時 8 週齢 (260-280 g、日本チャールスリバー) を用いた。動物は室温 25±1°C、湿度 30-40 %、12 時間明暗サイクル (1:00-13:00 点灯) に調節された動物施設 (大正製薬株式会社医薬研究所内) において飼育した。その他の条件は、第 1 章 2-1 実験動物に従う。

2-2 使用薬剤

CP-154,526 (3.0、10.0mg/kg)、SSR149415 (10.0、30.0mg/kg) 及び fluvoxamine (30.0mg/kg) は大正製薬株式会社医薬研究所内にて合成した。SSR149415 は 5% Cremophor EL に懸濁した。CP-154,526 は、0.3% tween80/saline に懸濁した。Fluvoxamine は saline に溶解した。全ての薬剤は、2ml/kg の容量を、急性投与の際は、測定 1 時間前に経口投与した。慢性投与の際は、1 日 1 回 (14:00-15:00) 14 日間経口投与し、最終投与 1 時間後に情動過多評価を実施した。

2-3 嗅球摘出

動物は、ペントバルビタールナトリウム (40mg/kg、腹腔内投与) で麻酔し、脳定位固定装置 (成茂科学器械研究所株式会社) に頭部を固定した。嗅球の位置は、ラット脳アトラス (Paxinos and Watson, 1986) で確認し、ブレグマより前方へ 7.5mm、正中線より外側へ 1mm、皮質表面より腹側へ 6mm の部位を、ピペットを用いて吸い出した。手術後、直ぐに個別ケージに戻し、2 週間飼育した。偽手術群も同様の手順で作製し、硬膜のみの貫通により、嗅球は正常状態で保存した。手術後、14 日目に情動方評価を行い、ラットの選別を行った。翌日より、薬剤投与を開始した。

2-4 情動過多評価

情動過多評価は、手術後 14 日目、薬剤投与開始 1 日目 (急性投与) 及び 14 日目 (慢性

投与)に実施(15:00-16:00)した。嗅球摘出ラットの特徴の1つである情動過多の評価法を用いて薬剤の検討を行った。情動過多評価は、先行研究(Shibata et al., 1984)を参考に、以下の4項目に対する反応をスコア化した。①鼻先への棒の提示、②背中への空気の吹き付け、③捕獲及びハンドリング、④尾部への鉗子による圧縮、に対して以下のようにスコア化した。0: no reaction 1: slight 2: moderate 3: marked 4: extreme。さらに、各反応時の発声の有無を加算した。0: no vocalization 1: occasional vocalization 2: marked vocalization。以上、0から最高24のスコアにより評価を行った。手術後14日目に、選択試験を行った。選択試験において、情動過多評価のスコアが12以上のラットを実験に用いた。薬剤の投与群分けは、多変数完全無作為化割付け(SAS system Version 8.2、SAS Institute Japan 株式会社)を用いて、各群のスコアを均一にし、投与開始前の投与群間によるスコアの差を除外した。

2-5 統計

データは全て、平均値±標準誤差で表示した。薬剤の多重比較にはSteel testを、2群間の比較にはMann-Whitney U testを用いた。有意水準は5%とした。

3、結果

SSR149415は、嗅球摘出ラットの情動過多反応を14日間の慢性投与により有意に抑制した(図5b)。一方、急性投与においては、作用を示さなかった(図5a)。Fluvoxamineは、SSR149415と同様、慢性投与のみ作用を示した(図5)。

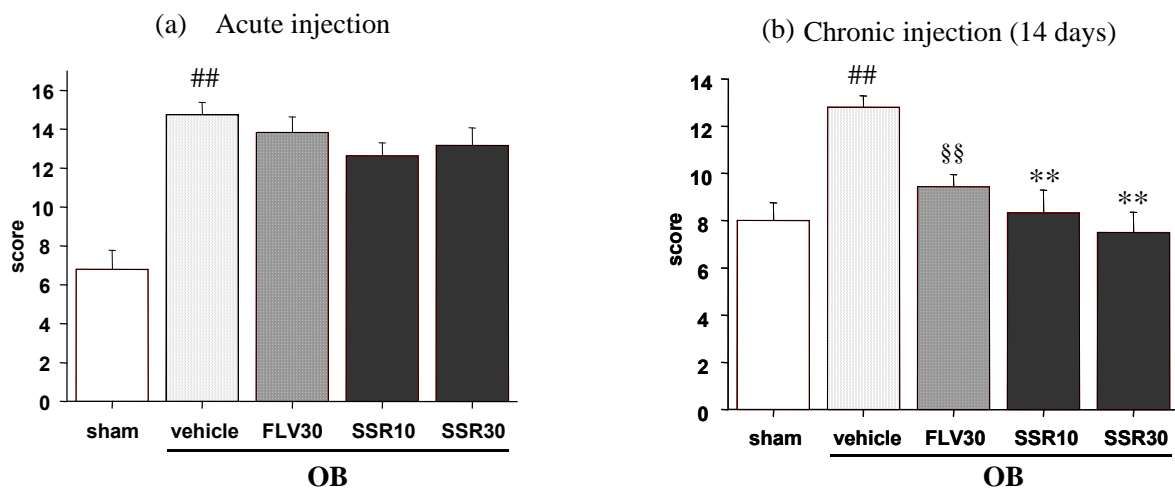


図 5、SSR149415 の嗅球摘出ラット誘発情動過多反応に対する影響

SSR10 (SSR149415, 10mg/kg)、SSR30 (SSR149415, 30mg/kg)、FLV30 (fluvoxamine, 30mg/kg) の急性投与 (a) 及び 14 日間慢性投与 (b)。データは全て、平均値±標準誤差で表示 (N=7-10)。## $p < 0.01$ vs sham-operated rats (Mann-Whitney U-test)。§§ $p < 0.01$ vs vehicle controls (Mann-Whitney U-test)。** $p < 0.01$ vs vehicle controls (Steel test)。

CP-154,526 は、嗅球摘出ラットの情動過多反応を 14 日間の慢性投与により有意に抑制した (図 6b)。一方、急性投与においては、作用を示さなかった (図 6a)。fluvoxamine は、CP-154,526 と同様、慢性投与のみ作用を示した (図 6)。

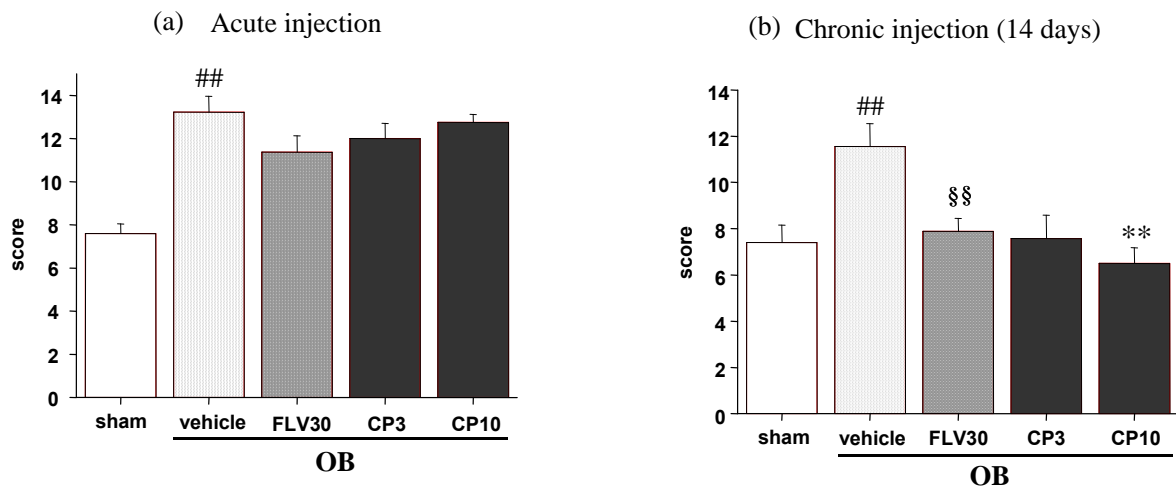


図 6、CP-154,526 の嗅球摘出ラット誘発情動過多反応に対する影響

CP3 (CP-154,526, 3mg/kg)、CP10 (CP-154,526, 10mg/kg)、FLV30 (fluvoxamine, 30mg/kg) の急性投与(a)及び 14 日間慢性投与(b)。データは全て、平均値±標準誤差で表示(N=7-10)。

$p < 0.01$ vs sham-operated rats (Mann-Whitney U-test)。 §§ $p < 0.01$ vs vehicle controls

(Mann-Whitney U-test)。 ** $p < 0.01$ vs vehicle controls (Steel test)。

SSR149415 及び、CP-154,526 は偽手術群の情動反応に対して、急性投与及び慢性投与において、いずれも作用を示さなかった (図 7)。

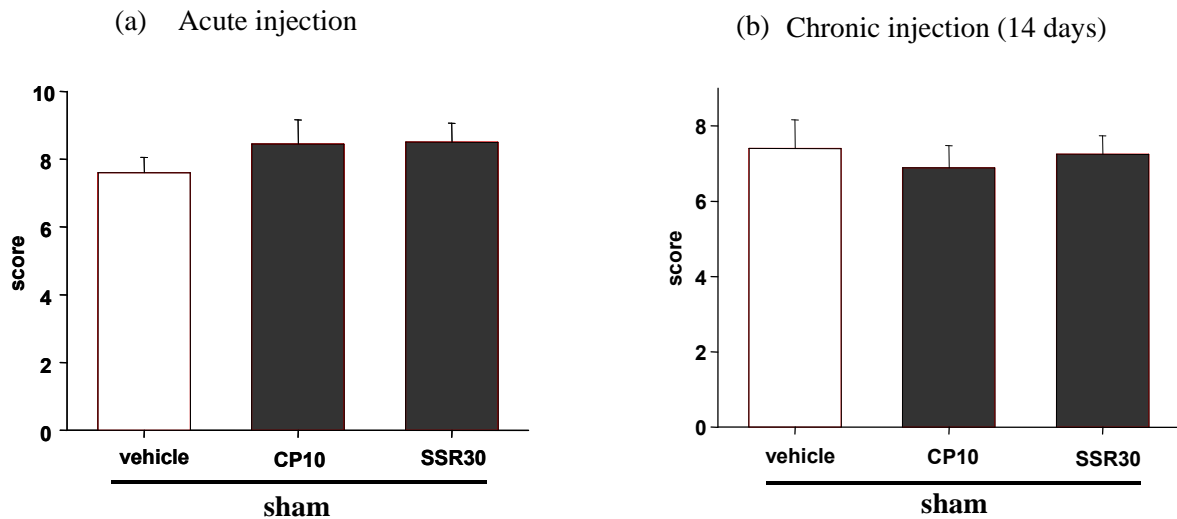


図 7、SSR149415 及び CP-154,526 の偽手術群の情動反応に対する影響

CP10 (CP-154,526, 10mg/kg)、SSR30 (SSR149415, 30mg/kg) の急性投与 (a) 及び 14 日間慢性投与 (b)。データは全て、平均値±標準誤差で表示 (N=8-10)。

4、考察

これまで、抗うつ薬の慢性投与は、嗅球摘出ラットの異常行動及び神経化学的な変化を正常化させると報告されている (Stockert et al., 1988; Possidente et al., 1996; Redmond et al., 1999)。本研究において、V1b 受容体拮抗薬 SSR149415 及び CRF1 受容体拮抗薬 CP-154,526 は、14 日間の慢性投与により嗅球摘出ラットの情動過多反応を抑制した。また、これまでの結果と同様に、fluvoxamine も慢性投与により情動過多反応を抑制した。嗅球摘出ラットの行動の特徴として、喰殺を含む攻撃行動が観察される (Shibata et al., 1984)。

AVP は、ヒトやげっ歯類の攻撃行動に関与していることが報告されている (Coccaro et al., 1998)。また、V1b 受容体拮抗薬 SSR149415 は、ハムスターにおける攻撃行動を抑制することが報告されている (Blanchard et al., 2005)。さらに、V1b ノックアウトマウスは表現系として、攻撃行動の減少が観察される (Wersinger et al., 2002)。これらの報告からも示唆されるように、V1b 受容体拮抗薬は、嗅球摘出ラットを含めた種々の攻撃行動に効果を示す可能性が考えられる。

本研究において、CRF1 受容体拮抗薬 CP-154,526 は急性投与により、嗅球摘出ラットの情動過多反応を抑制しなかった。これまでに我々は、CRF1 受容体拮抗薬の急性投与及び慢性投与により、嗅球摘出ラットの情動過多反応を抑制することを報告している (Okuyama et al., 1999; Chaki et al., 2004)。今回の結果とこれまでの薬剤作用発現の期間の相違は、飼育条件などのストレスレベルに起因すると考えられる。

嗅球摘出ラットにおけるストレス関連神経ペプチド受容体拮抗薬の抗うつ作用の作用機序に関しては、不明な点が多い。ラットの嗅球は、海馬や扁桃体などの辺縁系とネットワークを形成しており、嗅球摘出ラットは、これらのネットワークに破綻が生じていると推測される。これまでの報告においても、嗅球摘出により、海馬及び扁桃体の細胞外セロトニン量の減少や、 β アドレナリン受容体の増加が示されている (van der Stelt et al., 2005; Richardson and Tiong, 1999)。さらに、Keilhoff (2006) らは、嗅球摘出ラットの海馬での細胞増殖の減少を報告しているが、海馬における神経新生の減少は、うつ病発症の原因の一つであると仮定されている (Duman et al., 2001)。SSR149415 及び CRF1 受容体拮抗薬 SSR125543A は、慢性緩和ストレスによって引き起こされた海馬の神経新生の減少を回復させることが明らかにされている (Alonso et al., 2004)。これらの報告から、CRF1 受容体拮抗薬及び V1b 受容体拮抗薬は、嗅球摘出ラットの海馬での神経新生の減少を回復させることで、抗うつ作用をもたらすことが示唆される。しかしながら、この仮説は証明されていないため、今後の研究課題とする。一方、嗅球摘出により扁桃体の神経新生が増加する

ことが明らかにされている (keilhoff et al., 2006)。また、扁桃体の過活動は、うつ様症状を引き起こす原因であること (Sheline et al., 2001) が報告されている。さらに、扁桃体の損傷は、情動性の低下及び攻撃行動の減少が示されている (Aggleton, 1993)。従って、嗅球摘出ラットの情動過多反応には、扁桃体の機能不全が関与していることが示唆される。実際に、SSR149415 の扁桃体への局所注入は強制水泳試験において抗うつ作用を示すこと (Salome et al., 2006) から SSR149415 の抗うつ作用に扁桃体の関与が示唆されている。

HPA axis の過活動には、海馬と扁桃体の機能不全が関与していることが報告されている (Brown et al., 1999)。HPA axis は、海馬のグルココルチコイドによって負の制御を受けており (Gesing et al., 2001)、逆に扁桃体は、HPA axis に対して正の制御を行っている (Ma and Morilak, 2005)。即ち、嗅球摘出ラットの海馬及び扁桃体の機能不全は、HPA axis の制御機構へ影響を及ぼすことが推測される。以上の報告を考え併せると、V1b 受容体拮抗薬及び CRF1 受容体拮抗薬の嗅球摘出ラットへの作用は、HPA axis の異常を正常化すること及び海馬及び扁桃体の機能異常を改善することの両面からによるものである可能性が考えられる (図 8)。

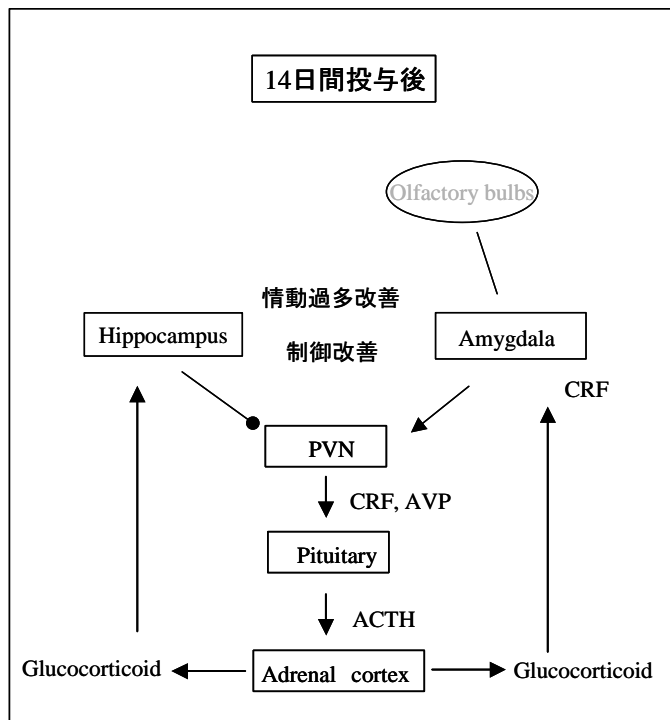
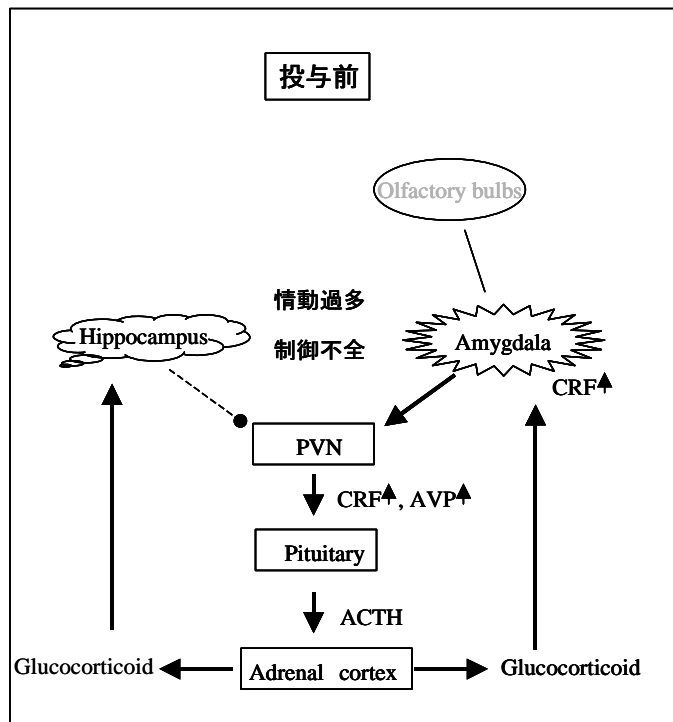


図 8、V1b 及び CRF1 受容体拮抗薬の慢性投与による嗅球摘出ラットの HPA axis、海馬、扁桃体の 3 者間への影響を模式的に示した図

本研究において、V1b 受容体拮抗薬及び CRF1 受容体拮抗薬の慢性投与は、嗅球摘出ラットの情動過多反応を改善することを明らかにした。これまでに両化合物の急性投与の効果における報告は、数多くなされていたが、慢性投与の報告に関しては少なく、本研究において V1b 受容体拮抗薬及び CRF1 受容体拮抗薬の慢性投与が抗うつ効果を示したことから、両化合物の抗うつ薬としての可能性が強く示唆される。

5、小括

- ① V1b 受容体拮抗薬 SSR149415 及び CRF1 受容体拮抗薬 CP-154,526 の 14 日間の慢性投与は、嗅球摘出ラットの情動過多反応を、有意に抑制した。
- ② V1b 受容体拮抗薬 SSR149415 及び CRF1 受容体拮抗薬 CP-154,526 の 14 日間の慢性投与は、偽手術群の情動反応には影響を与えなかった。

第3章 下垂体除去ラットにおけるストレス関連神経ペプチド受容体拮抗薬の作用

1、序論

これまでの報告及び結果より、**V1b** 受容体拮抗薬及び **CRF1** 受容体拮抗薬は、抗不安作用及び抗うつ作用を有することが明らかとなった。本研究では、**V1b** 受容体拮抗薬の抗不安作用が、**HPA axis** を介した機構か否かを明らかにすることを目的とした。最近の報告から、**SSR149415** を用いた抗不安及び抗うつ作用の作用点が明らかにされている。**SSR149415** は、強制水泳試験において、外側中隔野 (Stemmelin et al., 2005)、扁桃体基底外側核、扁桃体中心核及び扁桃体内側核 (Salome et al., 2006) への局所注入により、抗うつ作用を示す。また、下垂体除去ラットを用いた強制水泳試験においても、**SSR149415** の抗うつ作用が認められる。従って、**SSR149415** は、**HPA axis** だけでなく高位中枢に作用して抗うつ作用を示すと考えられる。一方、**SSR149415** は、高架式十字迷路試験において、扁桃体基底外側核への局所注入により抗不安作用を示す (Salome et al., 2006) が、外側中隔野 (Stemmelin et al., 2005)、扁桃体中心核及び扁桃体内側核 (Salome et al., 2006) への局所注入により作用を示さなかった。従って、**SSR149415** による抗うつ作用及び抗不安作用の発現に異なる脳部位が関与することが示唆される。さらに **V1b** 受容体は、脳よりも下垂体に多く発現している (Sugimoto et al., 1994) が、**SSR149415** の抗不安作用における **HPA axis** の関与は、全く検討されていない。そこで、本研究において、下垂体除去ラットを用いて、**SSR149415** の社会性行動試験における作用を検討し、**SSR149415** の抗不安作用の作用点を検討した。社会性行動試験は、化合物の抗不安作用を評価する試験として用いられる一方で、同時に不安惹起を検出できる評価系として 1978 年より用いられてきた。社会性行動試験における薬理的検討では、ベンゾジアゼピン系抗不安薬では、急性投与により抗不安作用を示す (File and Hyde, 1978; Costall et al., 1992) 一方で、**SSRI** の急性投与では、不安を惹起することが報告されている (Bagdy et al., 2001)。

2、実験材料及び方法

2-1 実験動物

雄性 Sprague-Dawley 系ラット [偽手術群 (280-300g、日本チャールスリバー) 及び下垂体除去群 (110-130g、日本チャールスリバー)] を用いた。下垂体除去群は、偽手術群と比較して体重に影響が見られるが、試験時に偽手術群と週齢を合わせ7週齢で試験に使用した。動物は室温 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 30-40 %、12 時間明暗サイクル (7:00-19:00 点灯) に調節された動物施設 (大正製薬株式会社医薬研究所内) において飼育した。試験 6 日前より個別飼育を開始し、試験終了まで継続した。その他の条件は、第 1 章 2-1 実験動物に従う。

2-2 使用薬剤

SSR149415 は大正製薬株式会社医薬研究所内にて合成した。SSR149415 (0.1、0.3mg/kg) は 5% Cremophor EL/ 0.03N HCL に溶解した。Chlordiazepoxide (CDP) (4.0mg/kg) は Sigma-Aldrich 社より購入した。CDP は 0.4% carboxymethylcellulose に懸濁した。CDP は、社会行動試験の陽性対照群として、広く使用されている。全ての薬剤は、2ml/kg の容量を社会性行動試験の 1 時間前に経口投与した。

2-3 社会性行動試験

2 匹のラットをアクリル製の箱 (45×27×30 cm) (照度 100lux) に 10 分間入れて、2 匹の相相互作用時間の合計を、箱上部のカメラ (section 2.3. A) により測定した。照度は 300 lux に統一した。試験開始前 2 日間、試験時使用箱にラットを単独で 4 分間放置し、測定環境に馴化させた。試験開始前にラットの体重に基づいてペアを作り、ペア同士には同じ化合物を投与した。試験は、ペアの動物を 10 分間アクリル箱に放置し、カメ

ラで録画及び解析を行った。Sniffing（におい嗅ぎ行動）、following（後追い行動）、social grooming（社会的毛繕い行動）、crawling under or over another rat（もぐり込み行動及び乗り上がり行動）を社会行動として、2匹の社会行動の時間の総和を1例とした。

2-4 ACTH量の測定

雄性 Sprague-Dawley 系ラット（300g、日本チャールスリバー）を用いて、アクリル製の箱に2匹入れ、5分間相互行動させた。試験後、すぐにそれぞれ断頭し、血液を採取した。血清 ACTH 量の測定には ACTH IRMA system（三菱化学株式会社）を用いた。また、コントロール群は、試験を行わず、飼育ケージより取り出した後、直ちに同様の方法により血清 ACTH 量を測定した。

2-5 統計

データは全て、平均値±標準誤差で表示した。結果は、一元配置分散分析を用いて評価し、その後、Student's *t* test または、パラメトリック型 Dunnett's test を用いた。有意水準は5%とした。

3、結果

社会性行動試験時における血清 ACTH 量は、非試験群に比べ有意に上昇した（表3）。

表3、社会性行動試験時におけるラットの血清 ACTH (pg/ml)

非試験群	社会性行動試験群
6.46 (±1.07)	**34.50 (±3.68)

データは全て、平均値±標準誤差で表示（N=10）。** $p<0.01$ versus vehicle-treated group (Student's *t* test)。

下垂体除去群は、偽手術群と比較して、社会性行動時間を有意に延長した [$F(1, 12)=20.65$, $p<0.01$, $F(1, 13)=73.11$, $p<0.01$] (図 9、10)。また、CDP (4mg/kg) は、偽手術群と下垂体除去群の両群における社会性行動時間を何れも有意に延長した [$F(1, 10)=16.99$, $p<0.01$, $F(1, 10)=33.71$, $p<0.01$] (図 9)。

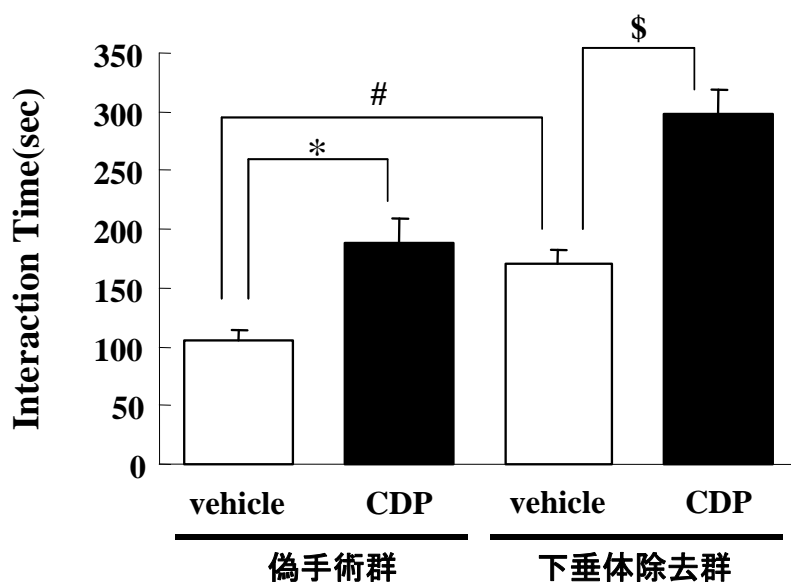


図 9、社会性行動試験における CDP の下垂体除去ラットへの作用

縦軸は、社会性行動時間 (秒)。データは全て、平均値±標準誤差で表示 (N=5-7)。* $p<0.01$ vs the sham-operated vehicle-treated rats (Dunnett's test)。# $p<0.01$ vs sham-operated vehicle-treated rats (Dunnett's test)。\$ $p<0.01$ vs hypophysectomized vehicle-treated groups (Dunnett's test)。() は、各群の N 数。

V1b 受容体拮抗薬 SSR149415 は、偽手術群の社会性行動時間を用量依存的且つ有意に延長した [$F(2, 19)=20.63, p<0.01$] (図 10)。一方、V1b 受容体拮抗薬 SSR149415 は、下垂体除去ラットの社会性行動の持続時間には影響を及ぼさなかった [$F(2, 19)=0.04, p=0.96$] (図 10)。

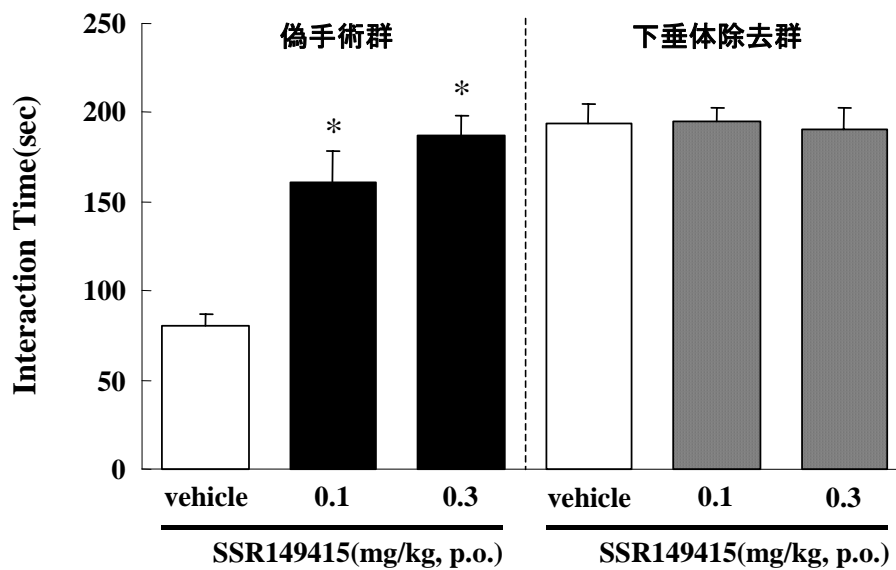


図 10、社会性行動試験における SSR149415 の下垂体除去ラットへの作用

縦軸は、社会行動時間 (秒)。データは全て、平均値±標準誤差で表示 (N=6–8)。* $p<0.01$ vs sham-operated vehicle-treated group (Dunnett's test)。# $p<0.01$ vs sham-operated vehicle-treated rats (Dunnett's test)。() は、各群の N 数。

4、考察

本研究において、V1b 受容体拮抗薬 SSR149415 は、社会性行動試験において抗不安作用を示した。下垂体除去ラットは、偽手術群に比べ社会性行動時間を延長した。さらに CDP

は下垂体除去ラットにおいても抗不安作用を示したのに対し、**V1b** 受容体拮抗薬 **SSR149415** は、抗不安作用を示さなかった。従って、**SSR149415** の社会性行動試験における抗不安作用の作用点が、下垂体 **V1b** 受容体を介していることが示唆された。

社会性行動試験において、試験環境への馴化などの試験条件により誘発する不安の水準が異なる。即ち、観察箱の照度が高い条件下（今回の条件）では、より不安の程度が増加し、その結果、社会性行動時間が短くなるとされている。本試験条件において、ラットの血清 **ACTH** 量が上昇したことから、試験時に **HPA axis** が活性化していることが示された。さらに、下垂体除去により、試験時の **HPA axis** の活性化を起こらなくした条件において社会性行動時間の増加、即ち、抗不安様行動が認められた。従って、本試験条件は高いストレス状態であり、試験時の **HPA axis** の活性化を抑制することにより、抗不安作用が発現されることが示唆された。今回の結果は、低照度条件よりも、高照度条件の方が、**ACTH** 量が上昇すること（File et al., 1984）及び **ACTH** の注入により社会性行動時間が短縮（不安惹起）する（File and Clark, 1980）という報告からも支持される。

本研究において、**SSR149415** は、偽手術群の社会性行動時間を有意に延長させた。また、先行研究において、**SSR149415** はスナネズミの社会性行動時間を延長することが確認されている（Griebel et al., 2005）。しかしながら、**CDP** は、下垂体除去ラットにおいても社会性行動時間を延長させたのに対し、**SSR149415** の抗不安作用は、下垂体除去ラットにおいては認められなかった。これらの結果より、**V1b** 受容体拮薬は、社会性行動試験において **HPA axis** の過活動を抑制することにより抗不安作用を示すことが示唆された。一方、**CDP** の社会性行動試験における抗不安作用は、**HPA axis** への作用に非依存的であることが示唆された。ベンゾジアゼピン系薬剤は、中隔野、海馬及び扁桃体の注入により、種々の動物モデルで抗不安作用を示すという結果（Sienkiewicz-Jarosz et al., 2003）からも、本仮説は支持される。

これまでの報告では、**SSR149415** における **V1b** 受容体の発現量の高い中隔野への注入は、

高架式十字迷路及び Vogel 試験では、抗不安作用を示さない (Stemmelin et al., 2005) ことが報告されている。外側中隔野は、社会性行動試験と同様に、探索及び葛藤が基盤となる試験において、不安様症状及び抗不安作用発現において重要な脳部位であることが報告されている (Menard and Treit, 1996)。

今回の結果及びこれまでの報告から、V1b 受容体拮抗薬による抗不安作用は外側中隔野を介するものではなく、むしろ HPA axis の活性化を抑制することにより発現することが考えられる。結論として、V1b 受容体拮抗薬は、社会性行動試験において抗不安作用を示した。さらに下垂体除去ラットを用いた試験により V1b 受容体拮抗薬の社会性行動試験における抗不安作用の作用点が、下垂体に発現している V1b 受容体であることが示唆された。今回の検討は、V1b 受容体拮抗薬の抗不安作用における下垂体 V1b 受容体の関与に限ったが、高位中枢の関与は未だ十分に検討されていない。今後、脳内における作用部位の検討も行う必要がある。

5、小括

- ① 社会性行動試験により、ラットの血清 ACTH 量は、コントロール群に比べ、有意に上昇した。
- ② 下垂体除去ラットは、偽手術群に比べ、社会性行動時間を有意に延長し、抗不安様行動を示した。
- ③ V1b 受容体拮抗薬 SSR149415 は、偽手術群の社会性行動時間を有意に延長させたのに対し、下垂体除去ラットにおいては作用を示さなかった。

第2編 不安障害におけるグルタミン酸神経系の役割

グルタミン酸は、哺乳類の中樞神経系において主要な興奮性神経伝達物質である。グルタミン酸受容体及びトランスポーターがクローニングされ、それらは、様々な疾患のターゲット分子として注目されている。本研究では、G 蛋白質共役型の代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) に薬剤の標的を絞り、新規抗不安・抗うつ薬としての可能性を検討することを目的とした。mGluR は、8 つのサブタイプが存在し、これらは、アミノ酸配列の相同性、アゴニストの選択性及び情報伝達系の違いに基づいて3つのグループに分類される。mGluR は、前シナプス、後シナプス及びグリア細胞に発現し、グルタミン酸伝達の調節を行っている。グループ 2 (mGluR2、3) 及びグループ 3 (mGluR4、mGluR6、mGluR7 及び mGluR8) は、Gi と共役し、アデニル酸シクラーゼを抑制する。一方、グループ 1 (mGluR1、5) は、Gq と共役し、ホスホリパーゼ C を活性化する。mGluR の中でも、ヒト及びラットの大脳皮質、海馬、線条体、側坐核及び扁桃体に強く発現している (Spooren et al., 2001; Daggett et al., 1995; Witkin et al., 2007) mGluR2/3 及び mGluR5 (図 11) は、うつ病及び不安障害との関係が示唆されている (Palucha and Pilc, 2005; Chaki et al., 2004)。そこで、本研究において、mGluR2/3 拮抗薬及び mGluR5 拮抗薬を用いて、不安障害及びうつ病モデル動物における、それぞれの化合物の効果を明らかにすることを目的として試験を実施した。

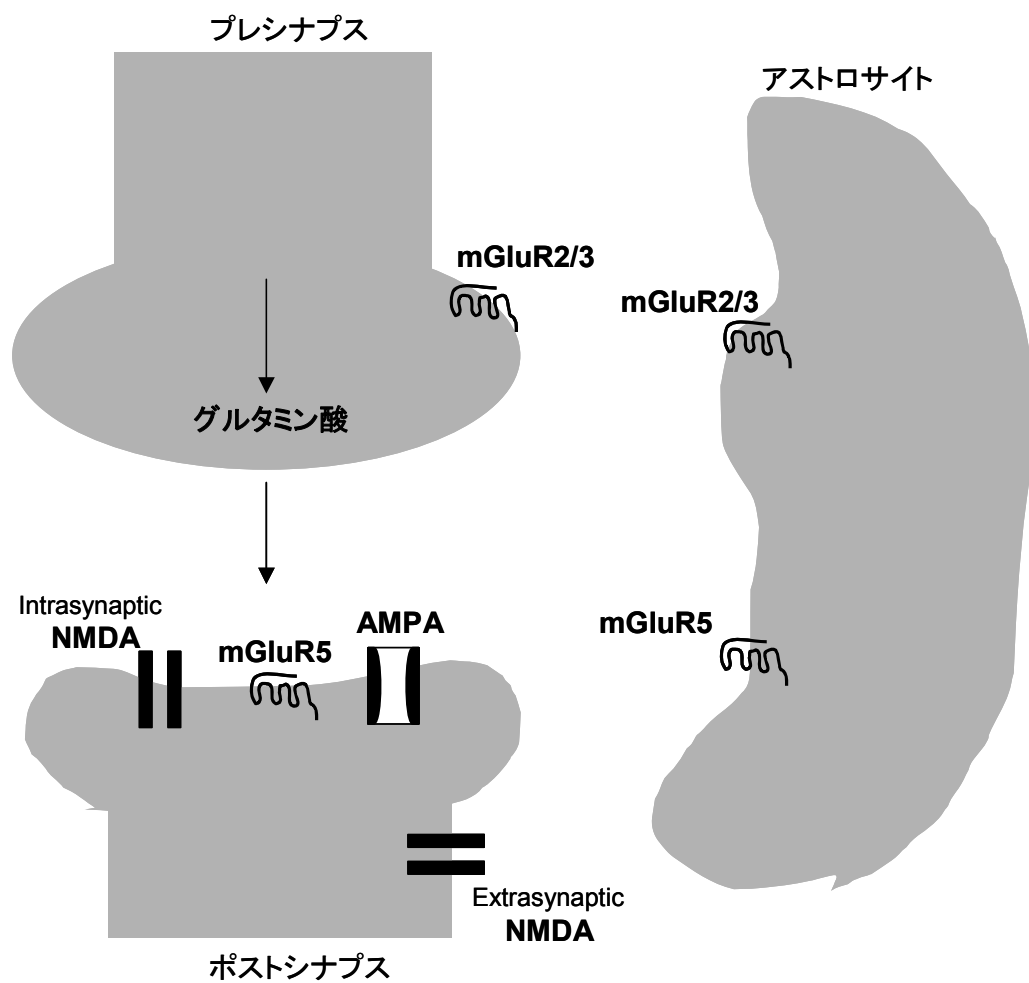


図 11、ニューロン及びアストロサイトにおける mGluR2/3 及び mGluR5 の分布
 mGluR2 は、プレシナプス側のシナプス周囲に強く発現。mGluR3 は、アストロサイトに強
 く発現。mGluR5 は、ポストシナプス及び、アストロサイトに強く発現。

第1章 ストレス誘発高体温反応に対する代謝型グルタミン酸受容体拮抗薬の作用

1、序論

ストレスへの暴露は、体温、心拍及び血圧などの自律神経系の変化を促す (Reeves et al., 1985)。一過性のストレスに対する自律神経系の反応は、第1編で述べた HPA axis の反応に比べて早いことが知られている。ヒトは、これから起こると予測される不安及びストレス状況下において、ストレス誘発高体温が生じることが知られている (Marazziti et al., 1992)。また、Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth edition (アメリカ精神医学会出版、1994) の分類・診断基準によると、自律神経系の過活動は、全般性不安障害の症状と診断されている。さらに、この現象は、げっ歯類でも観察されることが報告されている (Borsini et al., 1989; Olivier et al., 1998)。マウスのストレス誘発高体温は、薬理的な解析が詳細に行われており、ベンゾジアゼピン系抗不安薬 (van der Heyden et al., 1997) 及び非ベンゾジアゼピン系抗不安薬 (Spooren et al., 2002) によって抑制される。また、ストレス誘発高体温は、fluvoxamine 及び fluoxetine などの SSRI によって抑制されない (Olivier et al., 2003) ことが報告されている。ストレス誘発高体温は、SSRI に奏効せず、臨床症状を反映した不安障害の評価系として広く用いられていることが特徴である。しかしながら、ストレス誘発高体温とグルタミン酸との関係については、未解明であり、ストレス誘発高体温における mGluR の働きは十分な検討がなされていない。そこで、本研究では、mGluR2/3 拮抗薬である MGS0039 及び LY341495 を用いて、ストレス誘発高体温への作用を検討し、mGluR2/3 拮抗薬の抗不安薬としての可能性を探索した。また、mGluR2/3 作動薬である MGS0008 及び AMPA 受容体刺激増強薬である CX546 を用いてストレス誘発高体温への作用を検討した。さらに、mGluR2/3 拮抗薬の作用機序解明のためにセロトニン神経系の関与を、セロトニン 1A 受容体拮抗薬である WAY100635 及びセロトニン 1A 受容体部分作動薬である buspirone を用いて検討した。

2、実験材料及び方法

2-1 実験動物

雄性 ICR 系マウス、5 週齢 (25-34 g、日本チャールスリバー) を用いた。動物は室温 25±1°C、湿度 30-40 %、12 時間明暗サイクル (7:00-19:00 点灯) に調節された動物施設 (大正製薬株式会社医薬研究所内) において飼育した。その他の条件は、第 1 章 2-1 実験動物に従う。

2-2 使用薬剤

MGS0039 及び MGS0008 は、大正製薬株式会社医薬研究所内にて合成した。LY341495 は Tocris Cookson 社、diazepam は大日本製薬株式会社、buspirone、WAY100635 及び CX546 は Sigma-Aldrich 社からそれぞれ購入した。MGS0039 (0.3、1.0、3.0mg/kg) 及び LY341495 (0.1、0.3、1.0mg/kg) は 1/15M phosphate buffer (pH8.0) に溶解した。MGS0008 (0.3、1.0、3.0、10.0mg/kg) 及び diazepam (1.0mg/kg) は、0.3% tween80/saline に溶解した。Buspirone (1.0、3.0、10.0mg/kg)、WAY100635 (0.3、1.0、3.0mg/kg) 及び CX546 (3.0、10.0、30.0mg/kg) は saline に溶解した。全ての薬剤は、試験 1 時間前に 10ml/kg の容量で投与した。

2-3 ストレス誘発高体温反応

マウスの直腸温は、合計 2 回測定した。1 回目の測定結果を T1 とし、15 分後の測定結果を T2 とした。1 回目の測定自体がストレスとなり、2 回目測定の直腸温が上昇する特徴を利用して、ストレス誘発高体温は、T2 と T1 の差 [$\Delta T (T2-T1)$] として表記した。直腸温の測定には、BWT-100 体温測定器 (バイオリサーチセンター社) を用いた。測定用プローブをマウスの直腸に 20mm 挿入し、測定した。試験結果を T2 と T1 の差で評

価しているため、薬剤の基礎直腸温 (T1) への影響は、ストレス誘発高体温の結果に反映されてしまう可能性ある。そのため、薬剤自体が基礎直腸温に影響するか否かを、溶媒群の T1 と薬物処置群の T1 を比較することにより評価した。MGS0039、LY341495、MGS0008 及び diazepam は腹腔内投与、WAY100635 及び CX546 は皮下投与、buspirone は経口投与した。

2-4 統計

データは全て、平均値±標準誤差で表示した。結果は、一元配置分散分析を用いて評価し、その後、Student's *t* test または、Dunnett's test を用いた。有意水準は 5%とした。

3、結果

MGS0039 は、ストレス誘発高体温を用量依存的且つ有意に抑制した [$F(3, 35)=8.56$, $p<0.05$] (図 12a)。同様に、LY341495 もストレス誘発高体温を用量依存的且つ有意に抑制した [$F(3, 34)=3.94$, $p<0.05$] (図 12b)。また、MGS0039 及び LY341495 は、基礎直腸温 (T1) には、影響を及ぼさなかった [$F(3, 35)=2.08$, $p=0.12$, $F(3, 34)=1.32$, $p=0.28$] (図 12)。Diazepam (1mg/kg) も基礎直腸温に影響することなく、ストレス誘発高体温を有意に抑制した (図 12a,b)。

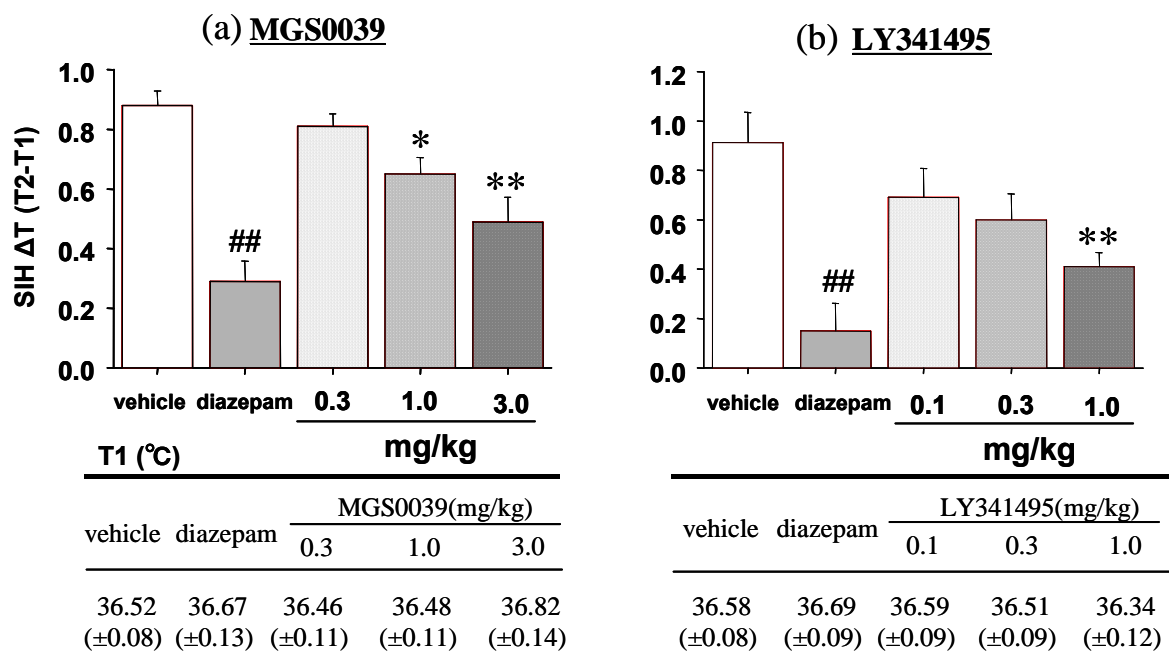


図 12、MGS0039 (a) 及び LY341495 (b) のストレス誘発高体温に対する影響

図は、ストレス誘発高体温に対する ΔT (T2-T1) を表示。表は基礎体温 (T1) を表示。データは全て、平均値±標準誤差で表示 (N=8-10)。## $p < 0.01$ vs vehicle controls (Student's t test)。* $p < 0.05$ 及び** $p < 0.01$ vs vehicle controls (Dunnett's test)。

MGS0039 (3mg/kg) の抗高体温は、セロトニン 1A 受容体拮抗薬である WAY100635 によって用量依存的且つ有意に抑制された [$F(3, 36)=5.38, p < 0.05$] (図 13a)。WAY100635 及び MGS0039 の併用投与は、基礎直腸温に影響を及ぼさなかった [$F(4, 45)=1.45, p=0.23$] (図 13a)。WAY100635 のみは、ストレス誘発高体温 [$F(3, 33)=1.09, p=0.36$] 及び基礎直腸温 [$F(3, 33)=1.82, p=0.16$] に影響を及ぼさなかった (図 13b)。

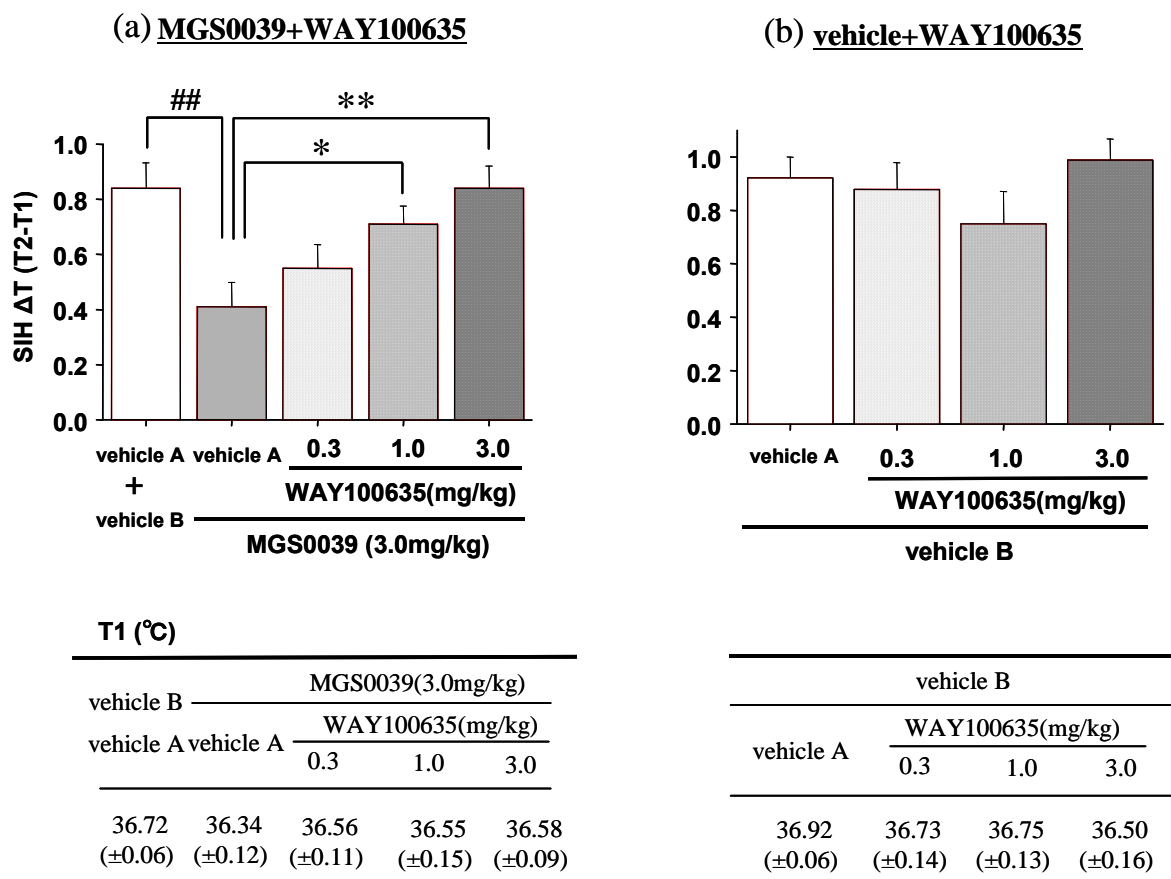


図 13、MGS0039 の抗高体温作用に及ぼす WAY100635 の影響 (a) 及び WAY100635 のストレス誘発高体温に対する影響 (b)

Vehicle A: saline, vehicle B: 1/15M phosphate buffer (pH8.0)。図は、ストレス誘発高体温に対する ΔT (T2-T1) を表示。表は基礎体温 (T1) を表示。データは全て、平均値±標準誤差で表示 (N=8-10)。## $p < 0.01$ vs vehicle controls (Student's t test)。* $p < 0.05$ 及び $p < 0.01$ vs MGS0039-treated group (Dunnett's test)。

セロトニン 1A 受容体部分作動薬である buspirone は、ストレス誘発高体温を用量依存的且つ有意に抑制した [$F(3, 38)=3.07, p < 0.05$] (図 14a)。Buspirone (10mg/kg) の抗高体温

は、WAY100635 の前投与によって用量依存的且つ有意に抑制された [$F(3, 40)=4.00$, $p<0.05$] (図 14b)。Buspirone は、基礎直腸温 (T1) には、影響を及ぼさなかった [$F(3, 35)=2.08$, $p=0.12$] (図 14a)。Diazepam (1mg/kg) も基礎直腸温に影響することなく、ストレス誘発高体温を有意に抑制した (図 14a)。

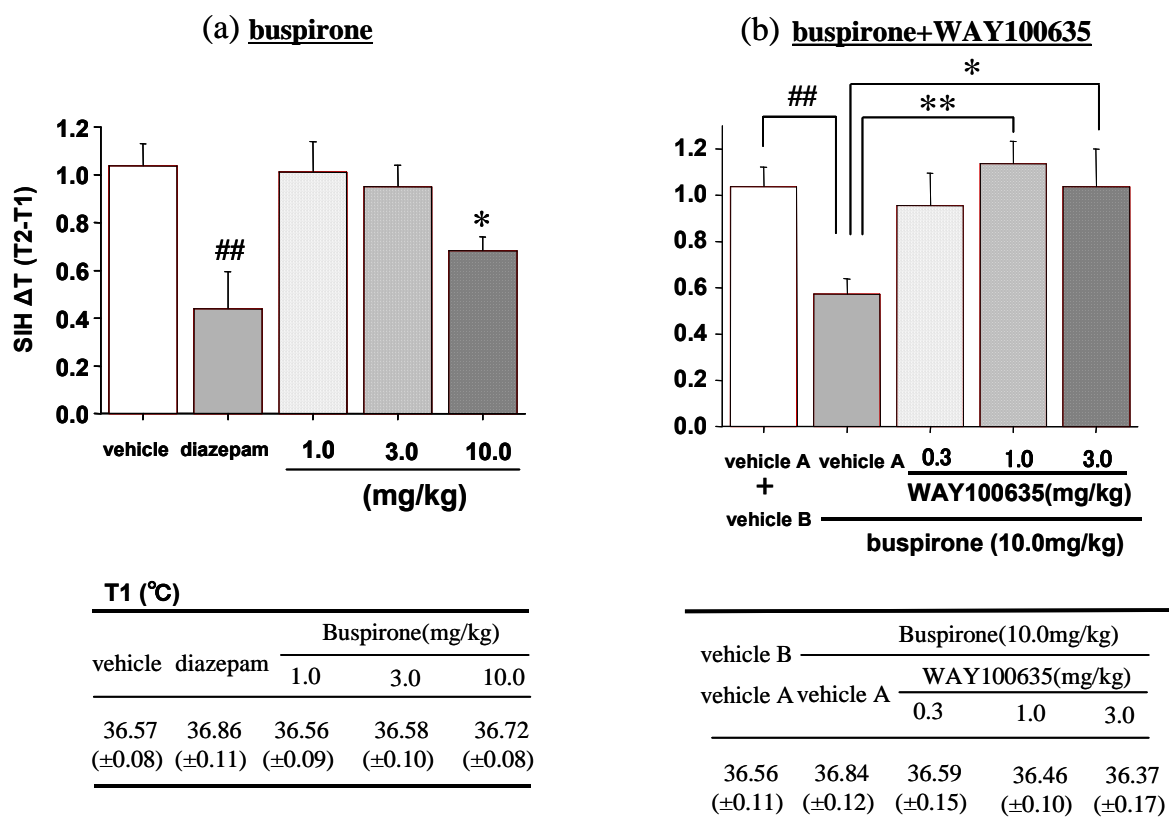


図 14 (a) Buspirone のストレス誘発高体温に対する影響、(b) Buspirone の抗高体温作用に及ぼす WAY100635 の影響

Vehicle A: saline, vehicle B: distilled water。図は、ストレス誘発高体温に対する ΔT (T2-T1) を表示。表は基礎体温 (T1) を表示。データは全て、平均値±標準誤差で表示 (N=10-11)。

(a) ## $p < 0.01$ vs vehicle controls (Student's t test)。* $p < 0.05$ 及び ** $p < 0.01$ vs vehicle controls (Dunnett's test)。(b) ## $p < 0.01$ vs vehicle-treated group (Student's t test)。* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs buspirone-treated group (Dunnett's test)。

AMPA 受容体刺激増強薬である CX546 は、ストレス誘発高体温に影響を及ぼさなかった [$F(3, 35)=0.28, p=0.83$] (図 15)。また、CX546 は、基礎直腸温 (T1) には、影響を及ぼ

さなかった [$F(3, 35)=0.13, p=0.94$] (図 15)。Diazepam (1mg/kg) も基礎直腸温に影響することなく、ストレス誘発高体温を有意に抑制した (図 15)。

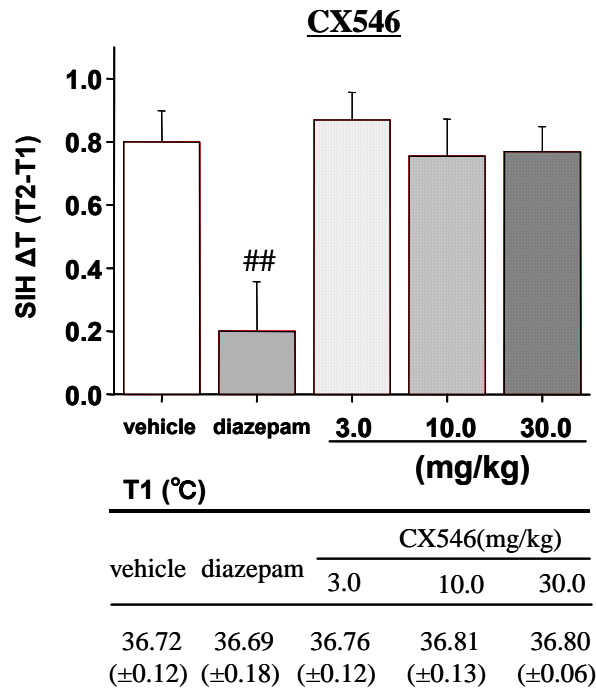


図 15、CX546 のストレス誘発高体温に対する影響

図は、ストレス誘発高体温に対する ΔT (T2-T1) を表示。表は基礎体温 (T1) を表示。データは全て、平均値±標準誤差で表示(N=9-10)。## $p<0.01$ vs vehicle controls (Student's t test)。

mGluR2/3 作動薬である MGS0008 は、ストレス誘発高体温を高用量 (10mg/kg) のみ有意に抑制した [$F(4, 46)=5.50, p<0.05$] (図 16)。また、MGS0008 は、基礎直腸温 (T1) を用量依存的且つ有意に上昇させた [$F(4, 46)=41.01, p<0.05$] (図 16)。Diazepam (1mg/kg)

も基礎直腸温に影響することなく、ストレス誘発高体温を有意に抑制した (図 16)。

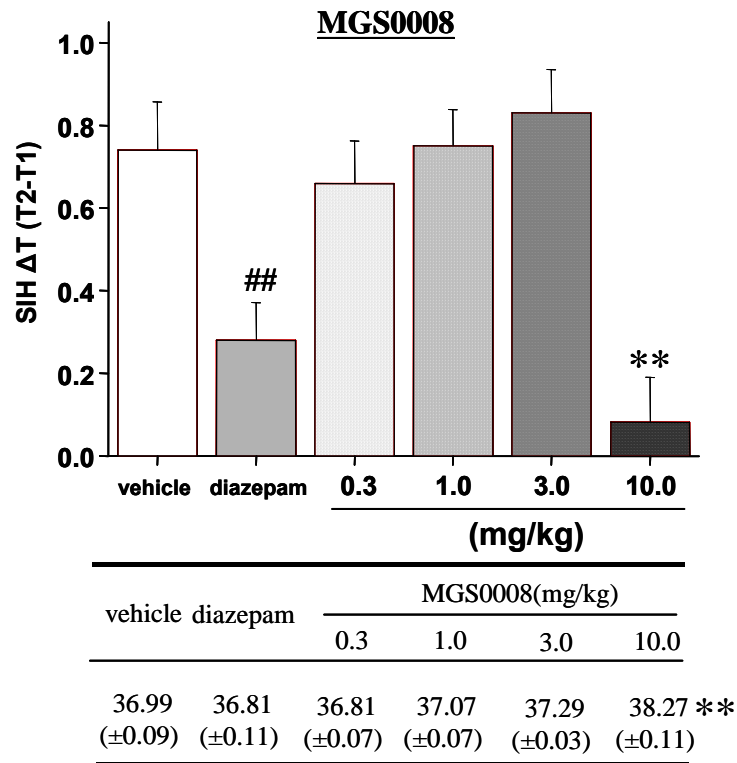


図 16、MGS0008 のストレス誘発高体温に対する影響

図は、ストレス誘発高体温に対する ΔT (T2-T1) を表示。表は基礎体温 (T1) を表示。データは全て、平均値±標準誤差で表示 (N=10-11)。## $p < 0.01$ vs vehicle controls (Student's t test)。** $p < 0.01$ vs vehicle controls (Dunnett's test)。

4、考察

本研究において、mGluR2/3 拮抗薬 MGS0039 及び LY341495 がストレス誘発高体温を基礎直腸温に影響することなく抑制することを明らかにした。さらに、mGluR2/3 拮抗薬の抗高体温作用は、セロトニン 1A 受容体拮抗薬 WAY100635 により、有意に抑制された。また、

これまでの報告では、WAY100635 の高用量投与 (1mg/kg, 腹腔内投与) は、マウスの前頭前野でのセロトニン 1A 誘発ドーパミン上昇を抑制することが明らかにされている (Ago et al., 2003)。ラットの頭前野でのドーパミン上昇は、ポストシナプス側セロトニン 1A 受容体の刺激によるものであることから (Sakaue et al., 2000)、WAY100635 の高用量投与は、ポストシナプス側セロトニン 1A 受容体を拮抗している可能性が示唆される。本研究において、WAY100635 の高用量 (1mg/kg 及び 3mg/kg) の投与により、MGS0039 の抗高体温作用が抑制されたことから、抗高体温の作用機序には、ポストシナプス側セロトニン 1A 受容体の刺激が関与していることが示唆された。我々の先行研究において、mGluR2/3 拮抗薬は、内側前頭前野でのセロトニン量を上昇させることを報告している (Kawashima et al., 2005)。従って、MGS0039 はセロトニン遊離を増加させ、その結果として、ポストシナプス側セロトニン 1A 受容体を刺激することにより、抗高体温作用を示す可能性が考えられる。今回の検討において、セロトニン 1A 受容体部分作動薬の buspirone によって、同様の作用が認められたことから支持される。

mGluR2/3 拮抗薬 MGS0039 及び LY341495 は、強制水泳試験及び尾懸垂試験などのうつ病動物モデルにおいて、抗うつ作用を示している (Chaki et al., 2004)。我々は、AMPA 受容体拮抗薬 NBQX の前投与で、MGS0039 の尾懸垂試験の抗うつ作用を拮抗することを明らかにしている (Karasawa et al., 2005)。これらの報告より、MGS0039 の抗うつ作用の作用機序として、ポストシナプス側 AMPA 受容体の刺激が重要な役割を担っていることが示唆されている。また、AMPA 受容体刺激増強薬は、強制水泳試験及び尾懸垂試験などのうつ病動物モデルにおいて、抗うつ作用を示すことも報告されている (Li et al., 2001, Alt et al., 2005)。そこで、本研究において、ストレス誘発高体温における AMPA 受容体の関与を明らかにするために、AMPA 受容体刺激増強薬 CX546 を用いて、ストレス誘発高体温への作用を検討した。その結果、CX546 はストレス誘発高体温に対して作用を示さなかった。今回の結果は、AMPA 受容体刺激増強薬は、ストレス誘発高体温に作用しないとする

(Rorick-Kehn et al., 2005) 報告とも一致する。従って、MGS0039 は、AMPA 受容体刺激を介した抗うつ作用とは異なる機序により抗不安作用を示すことが示唆された。さらに、AMPA 受容体の関与の有無をより明確にするため、MGS0039 の抗高体温作用における NBQX の作用の検討を試みたが、NBQX の短い半減期のため [ストレス誘発高体温の試験特性 (体温の安定までに投与後最低 1 時間のインターバルが必要)] 検討を断念した。

興味深いことに、mGluR2/3 拮抗薬と同様に、mGluR2/3 作動薬 MGS0008 も、ストレス誘発高体温を有意に抑制した。これまでの報告においても、mGluR2/3 作動薬は、ストレス誘発高体温を抑制することが報告されている (Spooren et al., 2002; Rorick-Kehn et al., 2005, 2006)。しかしながら、MGS0008 は、用量依存的且つ有意に基礎直腸温を上昇させた。即ち、MGS0008 のストレス誘発高体温の抑制は、基礎直腸温の上昇に起因し、MGS0008 の抗不安作用は、偽陽性であることが示唆された。これまでの mGluR2/3 作動薬の結果と本結果の矛盾は、様々な要因が関与していることが推測される。ストレス誘発高体温における反応性は、用いる試験条件に影響される。マウスの系統差は、ストレスに対する自律神経系の反応性の相違を生むことが報告されている (Van Bogaert et al., 2006)。また、ストレスの強度は、体温の上昇に影響を及ぼし、異なるストレス負荷によりマウスの体温の閾値が変化することが報告されている (Rorick-Kehn et al., 2005)。

本研究において、mGluR2/3 拮抗薬は、マウスのストレス誘発高体温を抑制することを明らかにした。さらに、ストレス誘発高体温における mGluR2/3 拮抗薬の作用には、ポストシナプス側セロトニン 1A 受容体の刺激が重要な役割を担っていることが示唆された。本結果より、mGluR2/3 拮抗薬は、不安障害における自律神経系の過活動に対して作用する可能性が示唆された。

5、小括

- ① mGluR2/3 拮抗薬は、マウスのストレス誘発高体温を有意に抑制した。
- ② ストレス誘発高体温における mGluR2/3 拮抗薬の作用には、ポストシナプス側セロトニン 1A 受容体の刺激が関与していることが示唆された。
- ③ mGluR2/3 作動薬は、マウスのストレス誘発高体温を抑制したが、基礎体温を上昇させた。

第2章 母子分離誘発啼鳴反応に対する代謝型グルタミン酸受容体拮抗薬の作用

1、序論

本研究において、第1編、第1章において記述したように母子分離誘発啼鳴反応は化合物の抗不安作用を評価するために有用な動物モデルとして繁用されている。母子分離誘発啼鳴反応とグルタミン酸神経系の関係に関しては、NMDA 受容体拮抗薬に関する報告がある。NMDA 受容体拮抗薬は、母子分離誘発啼鳴反応を抑制するが、運動量に影響を及ぼすなど副作用も検出された (Winslow et al., 1990)。逆に、NMDA 投与により母子分離誘発啼鳴反応を増強することも報告されている (Winslow et al., 1990)。しかしながら、これまで、母子分離誘発啼鳴反応と mGluR の関係に関する報告は、なされていない。そこで本研究において mGluR5 拮抗薬を用いて母子分離誘発啼鳴反応に対する作用を検討し、mGluR5 拮抗薬の抗不安薬としての可能性を検討した。また、mGluR5 拮抗薬投与後の仔ラットの基礎直腸温を測定し、副作用に関する検討を合わせて行った。

2、実験材料及び方法

2-1 実験動物

第1編、第1章、2-1 実験動物に準じて行った。

2-2 使用薬剤

MPEP は Sigma-Aldrich 株式会社から購入した。MPEP (1.0、3.0、10.0mg/kg) は 0.3% tween80/saline に溶解した。薬剤は 10ml/kg の容量を測定 30 分前に腹腔内投与した。

2-3 啼鳴反応の測定

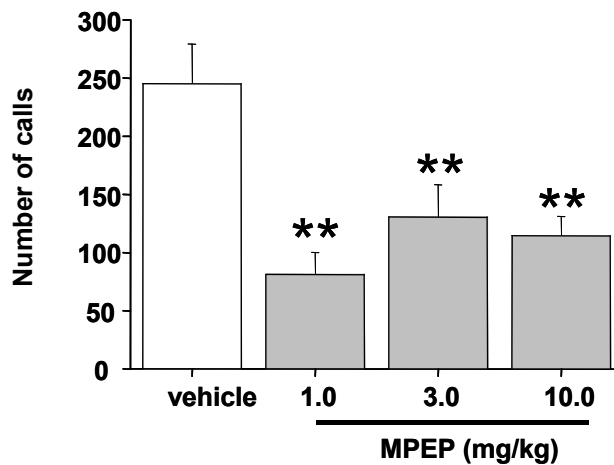
第 1 編、第 1 章、2-3 啼鳴反応の測定に準じて行った。

2-4 統計

第 1 編、第 1 章、2-5 統計に準じて行った。

3、結果

MPEP は、母子分離誘発啼鳴反応を有意に抑制した [F (3, 28) = 3.11, $p < 0.05$]。また、MPEP は、基礎直腸温に影響を及ぼさなかった (図 17)。



基礎直腸温 (°C)

Compound	vehicle	1.0mg/kg	3.0mg/kg	10.0mg/kg
MPEP	34.79 (±0.202)	34.84 (±0.237)	34.33 (±0.213)	34.66 (±0.204)

図 17、MPEP の母子分離誘発啼鳴反応における作用及び基礎直腸温 (°C) に及ぼす影響
図は、測定 5 分間の仔ラットの啼鳴回数を表示。表は基礎直腸温 (°C) を表示。データは全て、平均値±標準誤差で表示 (N=10)。** $p < 0.01$ vs vehicle-treated group (Dunnett's test)。

4、考察

本研究において、mGluR5拮抗薬 MPEP が母子分離誘発啼鳴反応を抑制することを明らかにした。さらに、MPEP は、仔ラットの基礎直腸温に影響を及ぼさなかったため、本モデルにおいて認められた作用は鎮静による非特異的な作用ではないと考えられる。本検討において MPEP は、低用量（1.0mg/kg）から薬効が認められた。これまで、成熟ラットを用いた種々の試験では、MPEP はより高用量（10mg/kg）で抗不安作用を示すと報告されている（Brodkin et al., 2002）。成熟ラットと仔ラットの薬効用量の相違には、血液脳関門の発達が関与していることが推測される。実際に、仔ラットのグルタミン酸への感受性は、成熟ラットよりも過敏であることが報告されている（Garthwaite and Garthwaite, 1989）。また、成熟ラットのストレス誘発啼鳴反応に対しても、mGluR5拮抗薬は作用を示す（Brodkin et al., 2002）。本結果及び先行研究の成熟ラットの結果より、mGluR5 は、不安の発達過程及び発現に深く関与することが示唆された。さらに、本結果において mGluR5拮抗薬は、直腸温に影響を及ぼさなかったことから、NMDA 受容体拮抗薬と比較すると、幻覚やめまいなどの副作用も軽減できる可能性が示唆された。

5、小括

- ① mGluR5拮抗薬 MPEP は、母子分離誘発啼鳴反応を有意に抑制した。
- ② mGluR5拮抗薬 MPEP は、仔ラットの基礎直腸温に影響を及ぼさなかった。

第3章 ガラス玉覆い隠し行動に対する代謝型グルタミン酸受容体拮抗薬の作用

1、序論

Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth edition (アメリカ精神医学会出版、1994) の分類・診断基準では、不安障害の一つに強迫性障害が分類されている。強迫性障害は、強迫観念、不安及び恐怖感を持ち、強迫行為により、その感情を抑制しようとする行為が続くことである (Rasmussen and Eisen, 1992)。現在、強迫性障害の第一選択薬は SSRI であるが、SSRI は 50% 程度の患者でしか効果が得られないことが報告されている (Boyer et al., 1991)。臨床報告では、強迫性障害患者の尾状核のグルタミン酸神経系の伝達異常 (Rosenberg et al., 2000) が明らかにされ、強迫性障害とグルタミン酸神経系の関係が注目されている。現在、強迫性障害の動物モデルとしてガラス玉覆い隠し行動が、幅広く用いられている。マウスのガラス玉覆い隠し行動は、敷き詰めた床敷上に配したガラス玉をマウスが床敷内に埋めてしまう行動であり、SSRI により運動抑制を伴うことなく覆い隠し行動は抑制される。無害なガラス玉を床敷で覆い隠そうとするマウスの行動が不合理と認識しつつ繰り返される強迫性障害患者の強迫行為と見かけ上類似していること、ガラス玉を覆い隠す行動に慣れが生じないこと、強迫性障害の治療薬として有用である SSRI により効果が認められることが、強迫性障害モデルとして位置付けられている要因である (Imanishi et al., 2005)。そこで、本研究では、mGluR2/3 拮抗薬 LY341495 及び mGluR5 拮抗薬 MPEP を用いて、ガラス玉覆い隠し行動に対する作用を検討し、mGluR2/3 拮抗薬及び mGluR5 拮抗薬の抗不安薬としての可能性を検討した。

2、実験材料及び方法

2-1 実験動物

雄性 ICR 系マウス、5 週齢 (25-34 g、日本チャールスリバー) を用いた。動物は室温 25±1°C、湿度 30-40 %、12 時間明暗サイクル (7:00-19:00 点灯) に調節された動物施

設（大正製薬株式会社医薬研究所内）において飼育した。その他の条件は、第1章2-1 実験動物に従う。

2-2 使用薬剤

LY341495 及び fluvoxamine は、大正製薬株式会社医薬研究所内にて合成した。MPEP は Sigma-Aldrich 社より購入した。LY341495 (1.0、3.0、10.0mg/kg) は 1/15M phosphate buffer (pH8.0) に溶解した。MPEP (1.0、3.0、10.0mg/kg) は 0.3% tween80/ saline に溶解した。Fluvoxamine (10mg/kg) は saline に溶解した。全ての薬剤は、10ml/kg の容量を試験開始 30 分前に腹腔内投与した。

2-3 ガラス玉覆い隠し行動

ポリカーボネート製容器 (22×32×13.5cm) に、おがくずを深さ 5cm で敷き詰めた。その上に、直径 1.5cm のガラス玉を等間隔で 24 個並べた。動物を容器内に入れ 30 分後に、動物を取り出し、埋められたガラス玉の数を数え、その個数をデータとした。ガラス玉が 2/3 以上おがくずに埋められたものを、埋められたガラス玉とした。

2-4 統計

データは全て、平均値±標準誤差で表示した。結果は、一元配置分散分析を用いて評価し、その後、2群間の比較には Student's *t* test、多重比較には Dunnett's test を用いた。有意水準は 5%とした。

3、結果

LY341495 は、ガラス玉覆い隠し行動を、用量依存的且つ有意に抑制した [$F(3, 36)=5.62$, $p<0.01$] (図 18)。同様に MPEP も、ガラス玉覆い隠し行動を、用量依存的且つ有意に抑制

した [$F(3, 36)=2.04, p=0.13$] (図 18)。対照薬である fluvoxamine (10mg/kg) もガラス玉覆い隠し行動を有意に抑制した (図 18)。

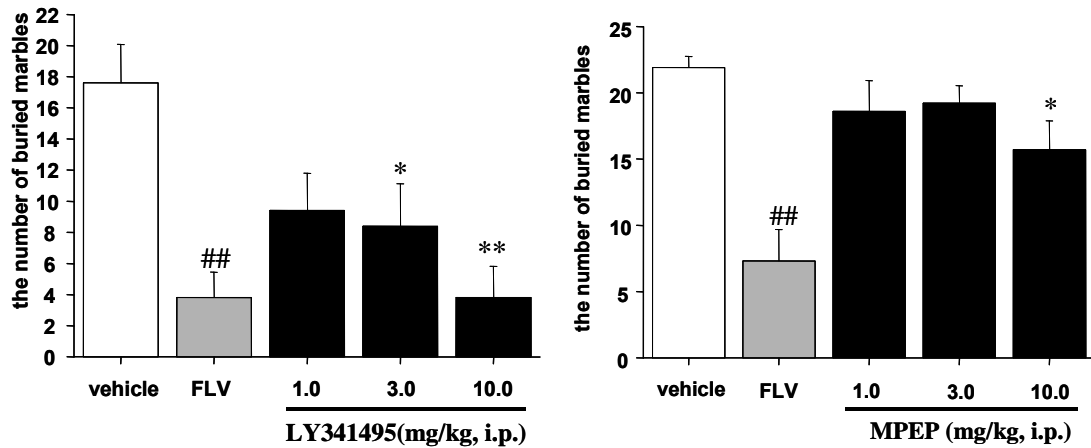


図 18、LY341495 及び MPEP のガラス玉覆い隠し行動における作用

縦軸は、覆い隠されたガラス玉の個数を表示。Fluvoxamine (FLV) は対照薬として使用。データは全て、平均値±標準誤差で表示 (N=10)。## $p<0.01$ vs vehicle-treated group (Student's t test)。* $p<0.05$ 及び** $p<0.01$ vs vehicle-treated group (Dunnett's test)。

4、考察

本研究において、mGluR2/3 拮抗薬 LY341495 がガラス玉覆い隠し行動を抑制することを明らかにした。さらに、mGluR5 拮抗薬 MPEP がガラス玉覆い隠し行動を抑制することを明らかにした。本結果より、mGluR2/3 拮抗薬及び mGluR5 拮抗薬は、強迫性障害に対して抗不安作用を示す可能性が示唆された。グルタミン酸神経系と強迫性障害の関係は臨床においても報告されている。SSRI の一つである paroxetine の 12 週間慢性投与は、グルタミン酸神経系を正常化させ、強迫性障害に効果を示した (Rosenberg et al., 2000)。さらに、ハプロタイプ解析から強迫性障害患者における NMDA 受容体サブタイプ NR2B が、

疾患感受性遺伝子として報告されている (Arnold et al., 2004)。これらの知見から、グルタミン酸の神経伝達を正常化させることが、強迫性障害の治療に繋がることが示唆された。我々は、マイクロダイアリシスを用いた研究において、mGluR2/3 拮抗薬 MGS0039 投与による前頭前野のセロトニン量の上昇を確認している (Karasawa et al., 2005)。さらに、mGluR2/3 拮抗薬 MGS0039 及び LY341495 は背側縫線核セロトニン神経細胞の発火頻度を上昇させることが報告されている (Kawashima et al., 2005)。ガラス玉覆い隠し行動に対して、SSRI 及びセロトニン 1A 受容体部分作動薬など、セロトニン神経系を活性化する薬剤が奏効することから、mGluR2/3 拮抗薬のガラス玉覆い隠し行動に対する作用は、セロトニン神経系を介した作用である可能性が示唆される。一方、mGluR5 拮抗薬のガラス玉覆い隠し行動に対する作用機序は、未だ不明であり、今後の検討課題である。

本研究において、mGluR2/3 拮抗物質及び mGluR5 拮抗物質は、ガラス玉覆い隠し行動を抑制した。本研究は、mGluR2/3 拮抗物質及び mGluR5 拮抗物質が強迫性障害に効果を示す可能性を示唆した。

5、小括

①mGluR2/3 拮抗物質 LY341495 は、ガラス玉覆い隠し行動を用量依存的且つ有意に抑制した。

② mGluR5 拮抗物質 MPEP は、ガラス玉覆い隠し行動を用量依存的且つ有意に抑制した。

第4章 強制水泳試験における代謝型グルタミン酸受容体拮抗薬の作用

1、序論

本研究において、mGluRとうつ病の関係について検討した。うつ病のモデル動物として代表的な試験の一つに強制水泳試験が挙げられる。強制水泳試験は、逃避不可能な水槽内にラットやマウスを入れると、始めは逃れようと泳ぐが、やがて逃げ出すことをあきらめて、無動状態になることを利用した試験である。SSRIなどの抗うつ薬は、この無動状態の時間を短縮させることが報告されており、強制水泳試験は、前臨床において薬剤の抗うつ作用検出のスクリーニング試験として不可欠な評価系である (Cryan et al., 2002)。本研究では、mGluR2/3拮抗薬 LY341495 及び mGluR5拮抗薬 MPEP を用いて、強制水泳試験における作用を検討し、両化合物の抗うつ薬としての可能性を検討した。

2、実験材料及び方法

2-1 実験動物

雄性 Sprague-Dawley 系ラット、(255-276 g、日本チャールスリバー) を用いた。動物は室温 25±1℃、湿度 30-40 %、12 時間明暗サイクル (7:00-19:00 点灯) に調節された動物施設 (大正製薬株式会社医薬研究所内) において飼育した。その他の条件は、第 1 章 2-1 実験動物に従う。

2-2 使用薬剤

LY341495 は、大正製薬株式会社医薬研究所内にて合成した。MPEP (1.0、3.0mg/kg) は Sigma-Aldrich 社より購入した。LY341495 (0.3、1.0mg/kg) は 1/15M phosphate buffer (pH8.0) に溶解した。MPEP は 0.3% tween80/ saline に溶解した。全ての薬剤は、2ml/kg の容量を本試験の 24 時間前及び 1 時間前に経口投与した。

2-3 強制水泳試験

アクリル製の円筒（直径 18cm、高さ 50cm）に 1.5%塩化ナトリウム入り水道水（25℃）を水深 30cm になるように入れた。動物を、その円筒に静かに入れ 15 分間放置した（プレ試験）。15 分後に円筒から動物を取り出し保温箱の中で 15 分放置した。15 分後動物を保温箱から取り出し、薬剤を投与し、もとのケージに戻し、一晩飼育した。24 時間後に本試験を行い、その映像を DVD に録画した。1 日目と同様の円筒（水深 30cm になるように、1.5%塩化ナトリウム入り水道水を含む）に動物を入れ、5 分間カメラで撮影した。ラットが水中で全く動かないか、あるいは水に沈むのを防ぐため後肢を動かすのみの行動を無動化として、無動化時間を、うつ様症状の指標として測定した。

2-4 統計

データは全て、平均値±標準誤差で表示した。結果は、一元配置分散分析を用いて評価し、その後、Student's *t* test または、パラメトリック型 Dunnett's test を用いた。有意水準は 5%とした。

3、結果

LY341495 は、強制水泳試験における無動化時間を有意に短縮させた [$F(2, 21)=8.55$, $p<0.01$] (図 19)。同様に、MPEP も強制水泳試験における無動化時間を有意に短縮させた [$F(2, 21)=3.58$, $p<0.05$] (図 19)。

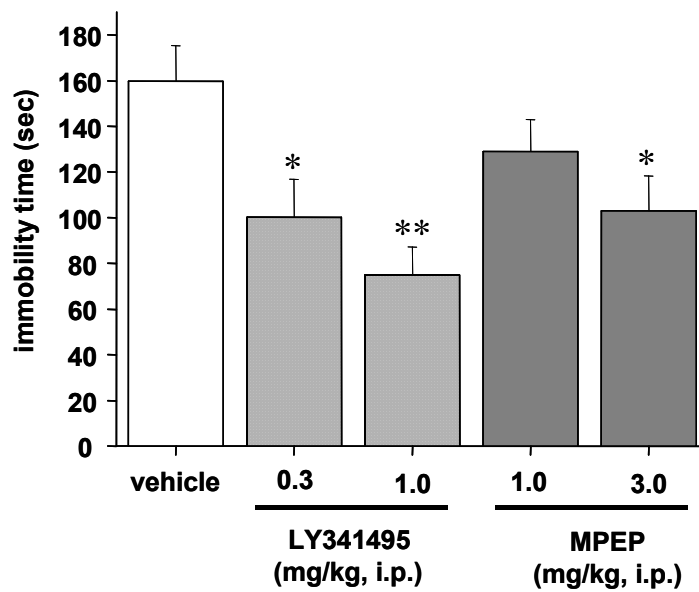


図 19、LY341495 及び MPEP の強制水泳試験における作用

縦軸は、無動化時間 (秒) を表示。データは全て、平均値±標準誤差で表示 (N=8)。* $p<0.05$ 及び** $p<0.01$ vs vehicle-treated group (Dunnett's test)。

4、考察

本研究において、mGluR2/3 拮抗薬 LY341495 及び mGluR5 拮抗薬 MPEP は、強制水泳試験における無動化時間を短縮させることを明らかにした。mGluR2/3 拮抗薬 MGS0039 及び LY341495 は、尾懸垂試験などのうつ病動物モデルにおいて、抗うつ作用をすることが報告

されている (Chaki et al., 2004)。

我々は、AMPA 受容体拮抗薬 NBQX の前投与が、MGS0039 の尾懸垂試験における抗うつ作用を拮抗することを明らかにしている (Karasawa et al., 2005)。これらの報告より、mGluR2/3 拮抗薬の抗うつ作用の作用機序として、ポストシナプス側 AMPA 受容体の刺激が重要な役割を担っていることが示唆されている。また、AMPA 受容体刺激増強薬は、強制水泳試験及び尾懸垂試験などのうつ病動物モデルにおいて、抗うつ作用を示すことも報告されている (Li et al., 2001, Alt et al., 2005)。さらに、臨床試験において NMDA 受容体拮抗薬である ketamine は投与後、数時間以内に抗うつ作用を発現することが報告されている (Berman et al., 2000) が、最新の報告において、ketamine の抗うつ作用は、AMPA 受容体の刺激を介した作用であることも明らかとなっている (Maeng et al., 2007)。また、AMPA 受容体刺激増強薬はうつ病のモデルである submissive behavior において、SSRI よりも早く抗うつ作用を示すことが報告されている (Knapp et al., 2002)。従って、AMPA 受容体の刺激を介して抗うつ作用を示す mGluR2/3 拮抗薬も、ketamine と同様の効果発現の早い薬剤となる可能性が推測される。

一方、先行研究において、mGluR5 拮抗薬の抗うつ作用は、マウスの強制水泳試験で確認されている (Li et al., 2006)。さらに、mGluR5 ノックアウトマウスも同様に無動化時間の短縮を示す (Li et al., 2006)。mGluR5 拮抗薬の作用機序は以下のように示唆されている。即ち、mGluR5 拮抗薬は、セロトニン神経系及びノルアドレナリン神経系を調節する働きが明らかにされている。MPEP の急性投与は、セロトニン 1A 受容体拮抗物質によって減弱される血清コルチコステロン量を増加させる (Bradbury et al., 2003)。一方、MPEP の慢性投与は、セロトニン 1A 受容体の脱感作を引き起こすことが報告されている (Bradbury et al., 2003)。即ち、MPEP は、セロトニン神経伝達において神経可塑的な変化を引き起こすことによって、抗うつ作用を発現させる可能性が示唆される。また、mGluR5 拮抗物質は、ストレス誘発による前頭前野でのノルアドレナリンの放出を抑えることも、マイクロダイアリ

シスの結果より明らかにされている (Page et al., 2005)。また、mGluR5 拮抗薬の投与により海馬において BDNF 産生を促進することが報告されている。BDNF は急性投与によりうつ病モデル (学習性無力モデル、強制水泳試験) において抗うつ作用を示すことから、mGluR5 拮抗薬の抗うつ作用に BDNF 産生促進が関与する可能性が考えられる。さらに、mGluR5 の刺激は、NMDA 受容体機能を促進することが報告されていることから、mGluR5 拮抗薬は、NMDA 受容体機能を間接的に抑制することが示唆される。

本研究において、mGluR2/3 拮抗薬及び mGluR5 拮抗薬は、強制水泳試験において、無動化時間を短縮させることを明らかにした。本結果より、mGluR2/3 拮抗薬及び mGluR5 拮抗薬の抗うつ作用が示唆された。

5、小括

- ① mGluR2/3 拮抗薬 LY341495 は、強制水泳試験における無動化時間を有意に短縮させた。
- ② mGluR5 拮抗薬 MPEP は、強制水泳試験における無動化時間を有意に短縮させた。

総括

本研究の目的は、ストレス関連因子を標的とする化合物の抗不安・抗うつ作用を動物モデルにおいて検討することである。さらに、ストレス応答に関する分子機構の解明を薬理的に検討し、考察することを副題として研究を遂行した。本研究の成果として、以下の2点を明らかにした。

① ストレス関連神経ペプチド受容体拮抗薬（CRF1 受容体拮抗薬及び V1b 受容体拮抗薬）は、種々の動物モデルにおいて抗不安・抗うつ作用を示した。さらに、V1b 受容体拮抗薬の抗不安作用に、下垂体に発現している V1b 受容体が重要な役割を果たしていることが示唆された。

② 代謝型グルタミン酸受容体拮抗薬（mGluR2/3 拮抗薬 及び mGluR5 拮抗薬）は、種々の動物モデルにおいて抗不安・抗うつ作用を示した。さらに、mGluR2/3 拮抗薬の抗不安作用に、ポストシナプス側セロトニン 1A 受容体の活性化が関与する可能性が示唆された。また mGluR2/3 拮抗薬の抗不安作用には、AMPA 受容体刺激の関与が低いことが示され、mGluR2/3 拮抗薬による抗不安作用の作用機序と抗うつ作用のそれとは異なる可能性が示唆された。

以上の結果より、ストレス関連神経ペプチド受容体拮抗薬及び代謝型グルタミン酸受容体拮抗薬は次世代の抗不安・抗うつ薬として有用である可能性が示唆された。

本研究において、生体のストレス反応のうち、HPA axis とグルタミン酸神経系の 2 点に注目し、これらのシステムを調節する化合物の抗不安・抗うつ薬としての可能性を検討した。本論文の総括として、ストレス応答に関する分子機構について、今回得られた結果及びこれまでの先行研究を併せて考察する。

HPA axis

HPA axis の機能異常は、うつ病や不安障害患者に診られる臨床所見の一つである。興味深いことに、HPA axis 機能異常は、高齢者及び重篤なうつ病患者に多く見られることが報告されている (Mason and Pariante, 2006)。今後、更に高齢化が進むことを考慮に入れると、HPA axis 機能異常の分子機構解明は、うつ病及び不安障害の治療に寄与すると考えられる。CRF と AVP は HPA axis の活性調節に重要な役割を果たしている神経ペプチドであることは、第 1 編で述べた通りであるが、ここでは、急性ストレス及び慢性ストレス負荷によるそれぞれのペプチドの変化の違いと作用点に関する考察をする。PVN において CRF 神経の約 50% が AVP を含んだ細胞体と共発現している (Whitnall, 1987)。特に、それらの細胞は、PVN の背側に多く存在している。また、ヒトの視床下部の全ての CRF 神経は、AVP を含んでいるという報告もある (Mouri et al., 1993)。さらに、慢性ストレスを受けると、それらの AVP 含有 CRF の発現が増加することも報告されている (De Goeij et al., 1991, 1992)。CRF 及び AVP はグルココルチコイドによるフィードバック制御を受けている (Keller-Wood and Dallman, 1984)。グルココルチコイド受容体には、2 つのサブタイプが存在する。タイプ 1 と呼ばれる鉱質コルチコイド受容体 (MR) とタイプ 2 と呼ばれる糖質コルチコイド受容体 (GR) である。MR はグルココルチコイドに高い親和性を持ち、正常状態では、ACTH の制御の中心的役割を果たしている (de Kloet et al., 1998)。一方、GR はデキサメサゾンに高い親和性を持ち、コルチコイドに対しては、低親和性である。つまり、GR はストレスに対して HPA axis が反応した時、即ち、グルココルチコイドが上昇した時に、中心的役割を果たすことが明らかにされている (McEwen et al., 1997)。CRF 及び AVP は、グルココルチコイドによる制御の感受性に違いが見られる (Ma et al., 1999)。CRF mRNA は、上昇したグルココルチコイドによって、減少することが報告されている (Zhou et al., 1996)。即ち、CRF 及び CRF1 受容体は、グルココルチコイドによって負の制御を受けていることが示唆される。一方、V1b 受容体 mRNA 発現は、グルココルチコイドに刺激さ

れ、AVP 誘発の ACTH 分泌に対して、抵抗性を示す (Aguilera and Rabadan-Diehl, 2000)。下垂体の V1b 受容体 mRNA は、繰り返しの拘束ストレス及び高浸透圧の生理食塩水投与によって、上昇することも報告されている (Rabadan-Diehl et al., 1995)。これらの知見をまとめると、慢性ストレスにより、グルココルコイドは上昇し、下垂体の V1b 受容体も上昇する一方で、CRF1 受容体は減少することが示唆された。さらに、ストレスによる CRF 及び AVP の発現には、経時的な差が見られ、CRF の上昇が一過的に見られ、その後に AVP の発現が上昇し、その発現が持続することも報告されている (Ma et al., 1999)。CRF と AVP は HPA axis 調節に重要な役割を果たしている神経ペプチドであるが、ストレスに暴露される条件 (強度及び時間) により、発現量にも差が見られ、複雑に HPA axis の調節に関与していることが示唆された。

先行研究より CRF1 受容体拮抗薬の抗不安・抗うつ作用の作用点に関する報告がいくつかされている。CRF1 受容体拮抗薬は、ラットを用いた研究において、CRF 及び断続的 footshock ストレスにより上昇した ACTH を抑制することが示されている (Ising et al., 2007)。一方、臨床研究において、CRF1 受容体拮抗薬の 14 日間投与は、CRF 誘発コルチゾールの上昇に対して拮抗作用は示されなかったが、社会性ストレス誘発コルチゾールの上昇を有意に抑制した (Ising et al., 2007)。これらの報告から、CRF1 受容体拮抗薬の抗不安・抗うつ作用の作用点を考察する上で、神経内分泌機構及び神経調節機構を考慮する必要がある。ストレスに対する神経内分泌機構の調節には、下垂体 CRF が中心的役割を果たしていると考えられている。一方で、神経調節機構には、前頭前野及び辺縁系の CRF1 受容体に関与していることが示唆されている。先行研究において、CRF1 受容体のアンチセンスをラット扁桃体に投与すると、抗不安作用を示すこと (Heinrichs et al., 1997) や、前頭前野及び辺縁系コンディショナルノックアウトマウスは、抗不安作用を示すが、ACTH 及びコルチコステロンに影響はないことも併せて報告している (Muller et al., 2003)。即ち、CRF1 受容体拮抗薬の抗不安・抗うつ作用の作用点として、神経内分泌機構を調節する HPA

axis 及び神経調節機構に関与する脳の各部位の両面からの作用が示唆された。一方、V1b 受容体拮抗薬の作用点に関しては、本研究において、抗不安作用に下垂体 V1b 受容体が関与していることを明らかにした。また、V1b 受容体拮抗薬の抗うつ作用には、下垂体除去の章の序論で述べたように、脳の各部位が関与していることが明らかにされている。即ち、V1b 受容体拮抗薬の作用点に関して、抗不安作用と抗うつ作用では、異なる作用機序で効果を示す可能性が示唆された。

今後の研究として、脳内の CRF 及び AVP の挙動と CRF1 及び V1b 受容体拮抗薬の関係を動物モデルを用いて明らかにすることが検討課題である。うつ病患者の HPA axis 機能不全の細分化が可能になれば、うつ病治療時の CRF1 受容体拮抗薬及び V1b 受容体拮抗薬の選択が、よりその患者の状態に適したものになるのではないだろうか。

グルタミン酸神経系

本研究では、mGluR2/3 拮抗薬及び mGluR5 拮抗物質の抗不安・抗うつ作用を動物モデルにおいて明らかにした。ここでは、これまでの知見を含め、mGluR2/3 拮抗薬 及び mGluR5 拮抗薬の抗不安・抗うつ作用の作用機序に関して、①グルタミン酸濃度とストレスの関係、②グルタミン酸と他の神経伝達物質の関係、③グルタミン酸と神経新生の関係、の 3 つの点より考察する。

①臨床試験から、気分障害患者において血清及び脳脊髄液中のグルタミン酸やグルタミン酸/グルタミンの割合が変化していることが報告されている (Kim et al., 1982; Altamura et al., 1993, 1995; Levine et al., 2000)。さらに、MRI による解析では、うつ病患者の帯状回皮質のグルタミン酸濃度が減少していることが確認されている (Auer et al., 2000; Mirza et al., 2004)。一方、Sanacora ら (2004) はうつ病患者の後頭皮質のグルタミン酸濃度が上昇していることを報告している。また、うつ病患者に診られるグリア細胞の減少 (Ongur et al.,

1998; Rajkowaka et al., 1999; Cotter et al., 2001; Hamidi et al., 2004) は、グリア型グルタミン酸トランスポーターの発現の減少を導き、結果として、グリア細胞によるシナプス間隙のグルタミン酸濃度の調節機能を低下させていることが推測されている。実際に、最近のマイクロアレイの結果では、うつ病患者の帯状回皮質及び背外側前頭前野におけるグリア型グルタミン酸トランスポーターの発現量が減少していることが確認されている (Choudary et al., 2005)。げっ歯類を用いた研究においても、ストレス負荷により、グルタミン酸受容体の発現量及びその機能の変化 (Kole et al., 2002; McEwen et al., 2002)、グルタミン酸トランスポーターの変化 (Reagan et al., 2004; Wood et al., 2004)、海馬における細胞外グルタミン酸濃度の上昇 (Bagley and Moghaddam, 1997; Lowy et al., 1995)、扁桃体における細胞外グルタミン酸濃度の上昇 (Reznikov et al., 2007) が報告されている。さらに、ストレスによるラットの海馬の形態学的変化にグルタミン酸神経系が関与していることが示された (Watanabe et al., 1992; Magarinos and McEwen, 1995)。これらの報告から、ストレスはグルタミン酸神経系に影響を及ぼし、脳内の各部位で神経化学的及び形態学的な変化をもたらすことが示唆された。グルタミン酸濃度と mGluR2/3 の関係について、いくつか報告がある。プレシナプスのシナプス周囲に発現している mGluR2 (Shigemoto et al., 1997) (図 11) は、シナプス間隙のグルタミン酸濃度が通常状態下では、不活性化状態にあるのに対し、高濃度条件下で活性化することが示唆されている (Forsythe and Barnes-Davies, 1997; Cartmell and Schoepp, 2000)。即ち、ストレスによりグルタミン酸濃度が上昇することにより、シナプス周囲の mGluR2 が活性化し、プレシナプス側で、グルタミン酸放出の調節が行われることが推測される (図 20)。また、mGluR3 は、グリア細胞に強く発現していることが明らかにされており (Ohishi et al., 1993,1994; Mineff and Valtschanoff, 1999)、過剰なグルタミン酸は、グリア型 mGluR3 を刺激し、IL-1 β 存在下で IL-6 の放出を促進する (Aronica et al., 2005)。血清 IL-6 はうつ病患者において上昇することが報告されている (Soygur et al., 2007)。即ち、グリア型 mGluR3 を拮抗することによ

り、IL-6の放出を抑制することが示唆される。これらの知見から、mGluR2/3拮抗薬は、プレシナプスのmGluR2及びアストロサイトのmGluR3に作用し、ストレス誘発によるグルタミン酸濃度異常を調節することにより、抗不安・抗うつ作用を示す可能性が示唆された(図21)。

さらに、第2編、第4章の考察で述べたように、mGluR2/3拮抗薬の抗うつ作用には、ポストシナプスのAMPA受容体の刺激が重要な役割を担っていることが示唆されている。即ち、mGluR2/3拮抗薬は、プレシナプス及びアストロサイトを介して、グルタミン酸濃度を調節し、ポストシナプスのAMPA受容体を刺激することにより、抗うつ作用を示すことが考えられる。一方、mGluR5は、ポストシナプス(Shigemoto et al., 1997)及びアストロサイト(図11)に発現している。mGluR5拮抗薬は、NMDA受容体の機能低下を引き起こすことがいくつかの脳部位で報告されている(Attucci et al., 2001; Awad et al., 2000; Pisani et al., 2001)。即ち、mGluR5拮抗薬は、間接的にNMDA受容体拮抗薬と同様の働きを示している可能性が示唆され、この作用が、mGluR5拮抗物質の抗不安・抗うつ作用の作用機序の一つであると考えられる。さらに、最近、アストロサイト型mGluR5の作用にも注目が集まっている。アストロサイト型mGluR5の刺激は、カルシウムオシレーション及びグリア伝達を活性化することにより、グリア細胞からのグルタミン酸放出を促進し、NMDA受容体サブタイプNR2B(extrasynaptic NMDA受容体と考えられている)を刺激することが明らかにされた(D'Ascenzo et al., 2007)。即ち、アストロサイト型mGluR5を拮抗することにより、extrasynaptic NMDAへの刺激も抑制することが考えられる。Extrasynaptic NMDA受容体の拮抗は、脳由来神経栄養因子(BDNF)を上昇させることが明らかにされている(Hardingham et al., 2002)。BDNFに関しては、③で考察する。

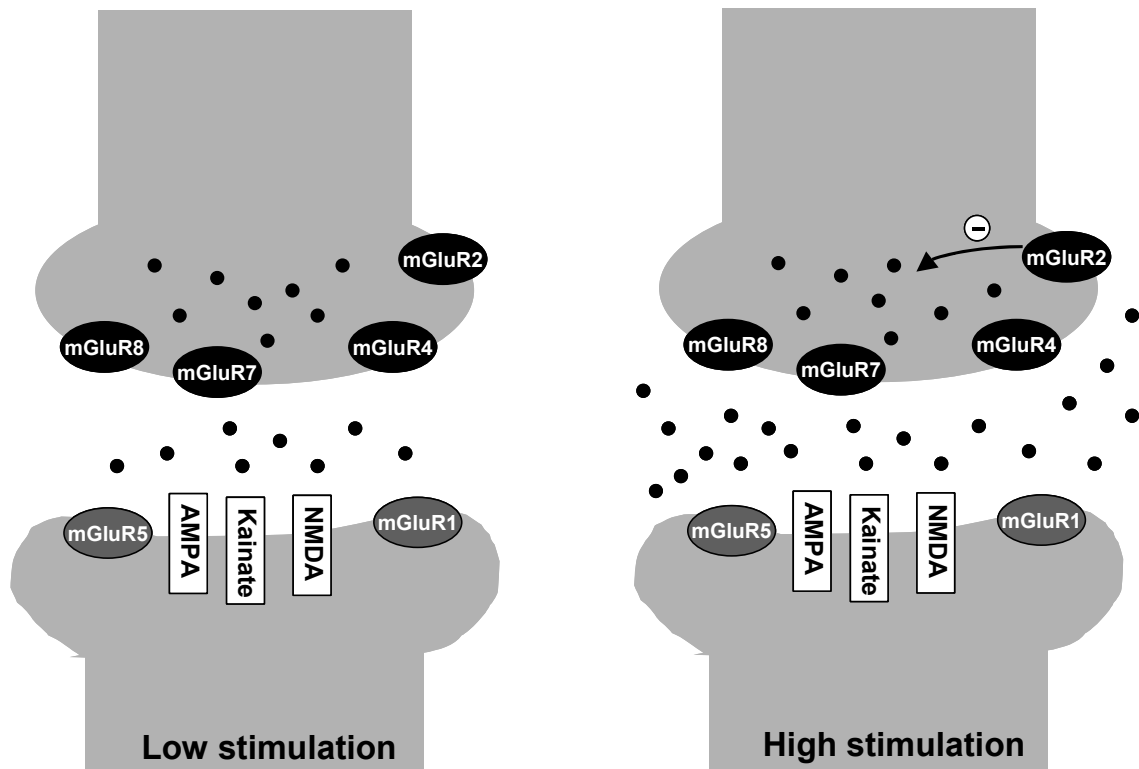


図 20、グルタミン酸濃度による mGluR2 の働き

シナプス間隙のグルタミン酸濃度が高くなると、それまで不活性状態にあった mGluR2 が活性化して、グルタミン酸の放出を制御する。

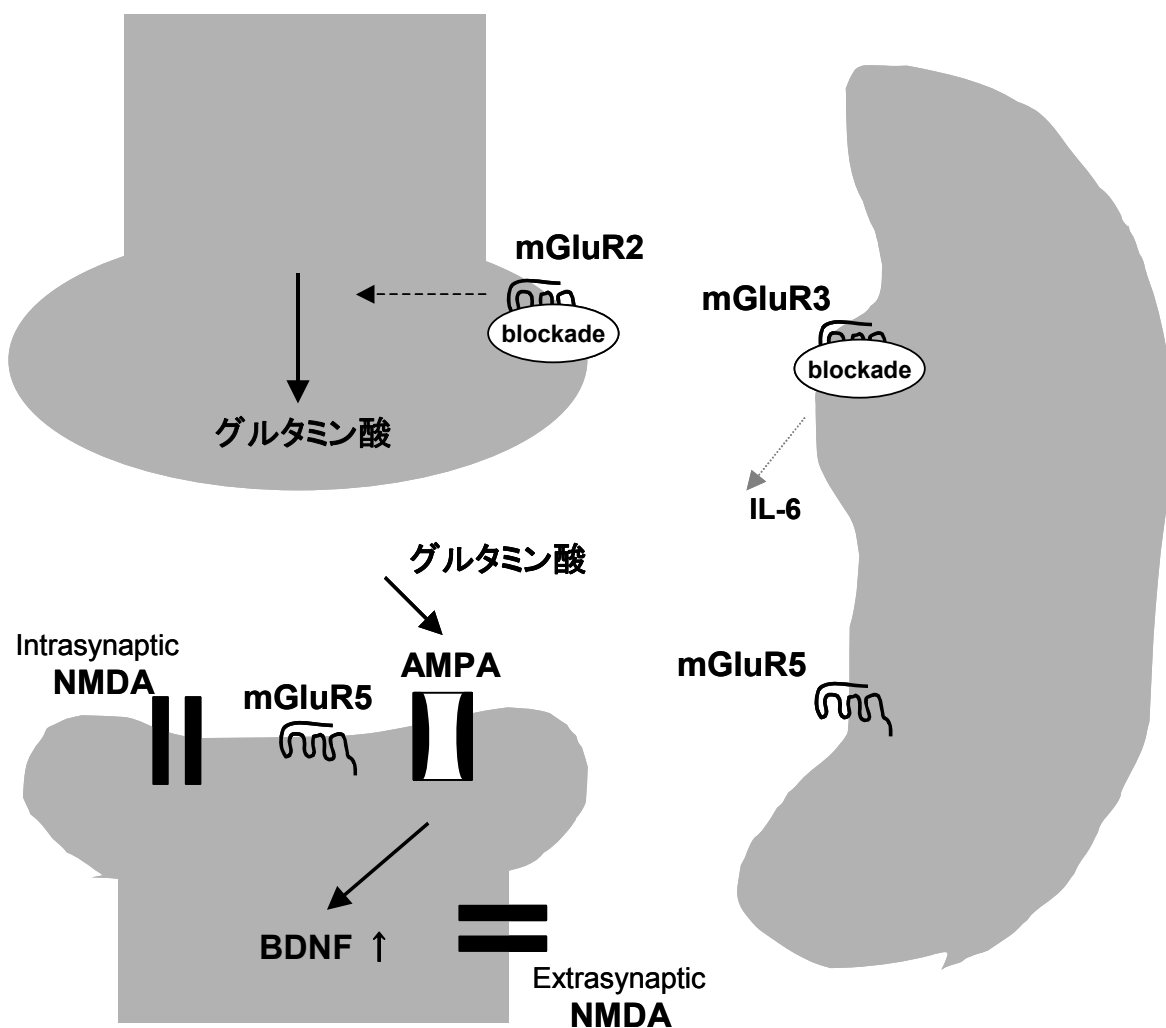


図 21、mGluR2/3 拮抗薬の抗うつ作用発現のメカニズム

プレシナプスの mGluR2 を拮抗することによりグルタミン酸濃度を調節する。アストロサイトの mGluR3 を拮抗することにより IL-6 の放出を抑制する。調節を受けたグルタミン酸は、ポストシナプスの AMPA 受容体を刺激する。

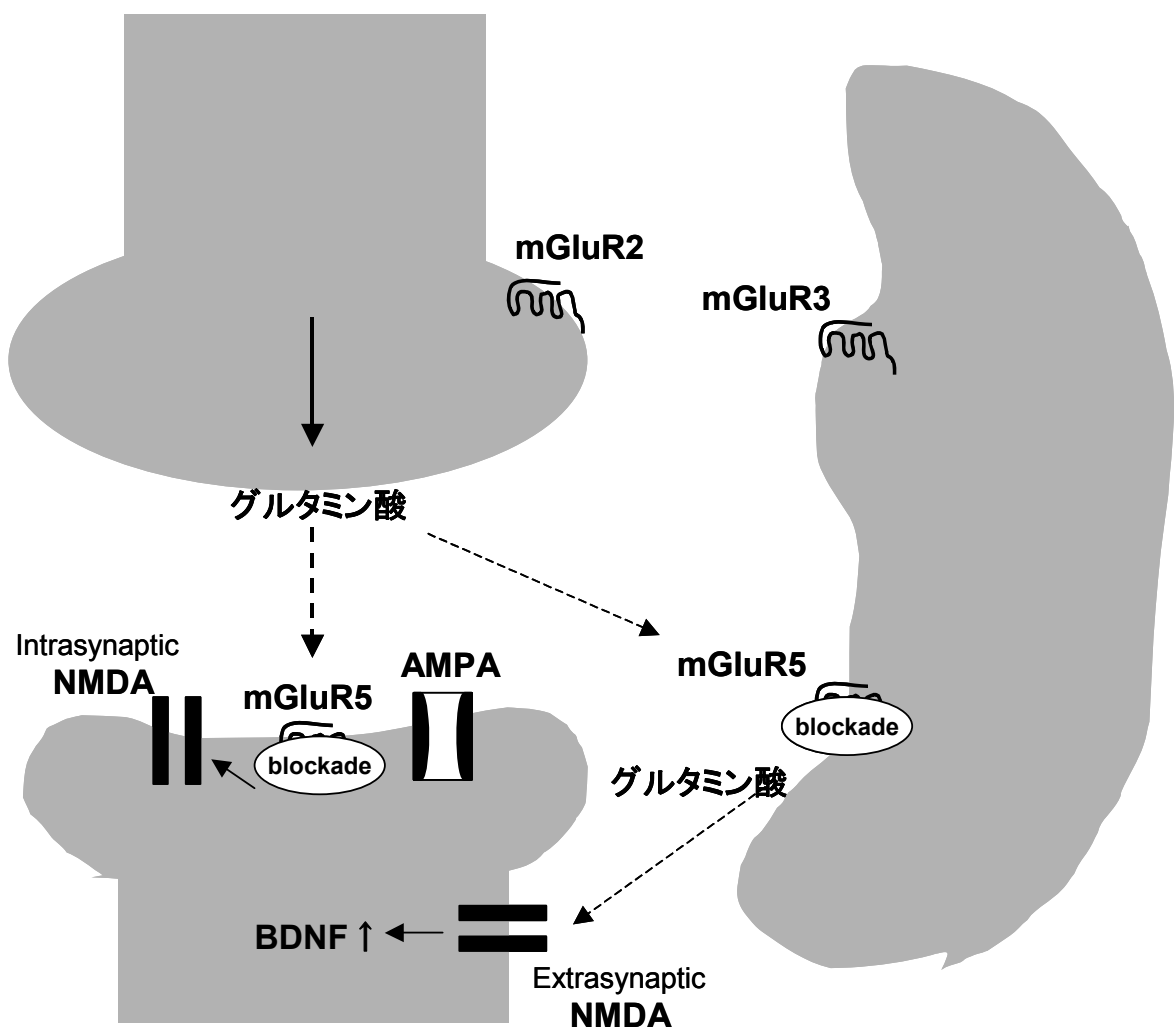


図 22、mGluR5 拮抗薬の抗うつ作用発現のメカニズム

ポストシナプスの mGluR5 を拮抗することにより、過剰なグルタミン酸の伝達を抑制する。
 さらに、アストロサイトの mGluR5 を拮抗することにより、アストロサイトからのグルタミン酸放出を抑制し、Extrasynaptic NMDA 受容体への刺激を抑制する。

②代謝型グルタミン酸受容体は、グルタミン酸神経伝達の調節だけでなく他の神経伝達物質の調節も行っている (Cartmell and Schoepp, 2000)。我々は、マイクロダイアリシスを用いた研究において、mGluR2/3 拮抗薬 MGS0039 投与による前頭前野のセロトニン量の上昇を確認している (Karasawa et al., 2005)。さらに、mGluR2/3 拮抗薬 MGS0039 及び LY341495 は背側縫線核セロトニン神経細胞の発火頻度を上昇させることが報告されている (Kawashima et al., 2005)。また、MGS0039 は、側坐核 shell におけるドーパミン量を上昇させる (Karasawa et al., 2006)。他グループの報告においても、LY341495 は海馬でのセロトニン量を上昇させることが明らかにされた (Witkin et al., 2007)。さらに、先行研究では、mGluR2/3 とセロトニン 2A 受容体は、前頭前野において共発現しており (Marek et al., 2000)、2つの受容体は共役していることが示唆されている。一方、mGluR5 拮抗薬 MPEP 及び MTEP は、ストレス誘発のノルエピネフリンの上昇を抑える (Page et al., 2005) ことが報告されている。これらの知見から、mGluR2/3 拮抗薬及び mGluR5 拮抗薬の抗不安・抗うつ作用の作用機序として、グルタミン酸神経系以外のモノアミン神経系の調節も一部関与している可能性が考えられる。MGS0039 の抗不安作用が、セロトニン 1A 受容体拮抗薬で抑制されたという本研究の結果も、この仮説を支持するものである。

③既存の抗うつ薬が効果発現に時間を要する理由として、機能タンパク質の発現を介する神経可塑的变化が注目されているが、中でも脳内で最も豊富な神経栄養因子である BDNF と海馬顆粒細胞下における神経新生について多くの研究がなされている。例えば、ストレスによって海馬における BDNF の発現が減少すること (Smith et al., 1995)、また抗うつ薬の慢性投与や電気けいれん刺激は、ストレスによるラット海馬における BDNF の減少を改善させること (Nibuya et al., 1995) が報告されている。さらに、X線照射により海馬神経新生を阻害すると抗うつ効果が消失した (Santarelli et al., 2003) ことから、抗うつ薬の作用発現には、海馬神経新生を要することが示唆されている。我々は、MGS0039 の 14 日間の慢性投与により、ラット海馬の細胞増殖を促進することを明らかにしている (Yoshimizu et

al., 2004)。さらに、MPEP の 14 日間の慢性投与により、ラット海馬における BDNF 発現の上昇が報告されている (Legutko et al., 2006)。これらの知見から、mGluR2/3 拮抗薬及び mGluR5 拮抗薬の抗うつ作用の作用機序として海馬の神経新生及び BDNF の上昇が一部関与している可能性が考えられる。

HPA axis とグルタミン酸神経系の相互作用

最後に HPA axis とグルタミン酸神経系の相互作用に関して BDNF を中心に考察する。上述したように、抗うつ薬の作用機序の一つに海馬の神経新生及び BDNF の上昇が一部関与していることが示唆される。CRF1 受容体拮抗薬及び V1b 受容体拮抗薬は、慢性緩和緩和ストレスによって引き起こされた海馬の神経新生の減少を回復させることが明らかにされている (Alonso et al., 2004)。即ち、CRF1 受容体拮抗薬及び V1b 受容体拮抗薬の抗うつ薬の作用機序として BDNF 産生及び神経新生の促進が考えられている。さらに、BDNF 産生の促進は、グルタミン酸神経系にも影響を及ぼす。慢性的な BDNF mRNA の上昇は、AMPA 受容体の膜への輸送を促進することが報告されている (Nakata and Nakamura, 2007)。上述したように、AMPA 受容体は、mGluR2/3 拮抗薬の抗うつ作用の作用点として考えられており、CRF1 受容体拮抗薬及び V1b 受容体拮抗薬の抗うつ作用の作用機序として、BDNF 産生を介した間接的なグルタミン酸神経系への関与も示唆される (図 23)。

一方、mGluR2/3 拮抗薬及び mGluR5 拮抗薬は、それぞれ海馬の神経新生及び BDNF 産生を促進することが報告されている (Yoshimizu et al., 2004, Legutko et al., 2006)。HPA axis は、ストレス負荷時に、海馬のグルココルチコイドによって負の制御を受けている (Gesing et al., 2001)。即ち、海馬の機能不全は、HPA axis の制御機構へ影響を及ぼすことが推測される。mGluR2/3 拮抗薬及び mGluR5 拮抗薬は、脳内のグルタミン酸濃度を正常化させ、BDNF 産生及び海馬の神経新生を促進し、HPA axis 機能の正常化を導くことが示唆される (図 23)。

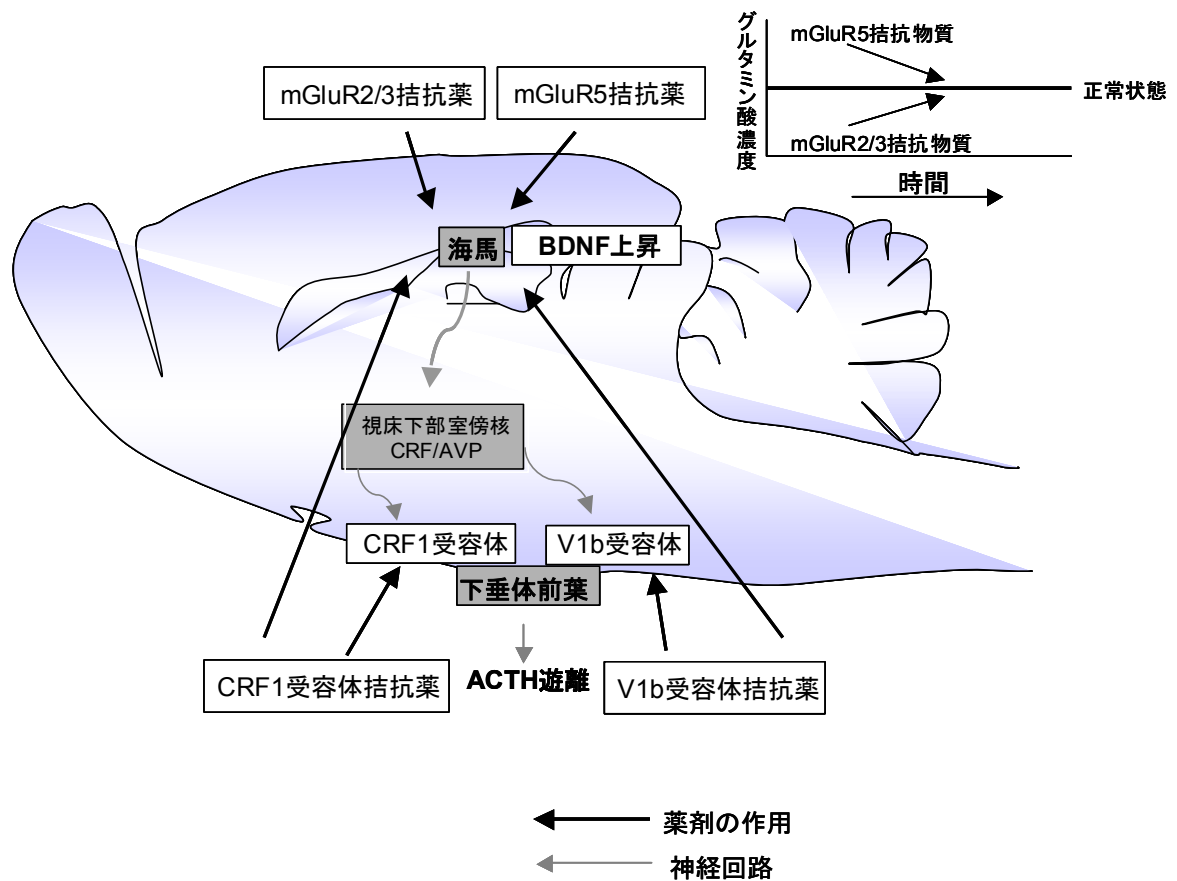


図 23、ストレス関連神経ペプチド受容体拮抗薬（CRF1 受容体拮抗薬、V1b 受容体拮抗薬）及び代謝型グルタミン酸受容体拮抗薬（mGluR2/3 拮抗薬、mGluR5 拮抗薬）の神経回路に及ぼす作用

ストレス関連神経ペプチド受容体拮抗薬の海馬への作用は、BDNF 産生を介して、AMPA 受容体の膜へ移行に関与している。代謝型グルタミン酸受容体拮抗薬は、脳内のグルタミン酸濃度を正常化させ、海馬での神経新生及び BDNF の産生に関与している。代謝型グルタミン酸受容体拮抗薬の海馬への作用は、視床下部室傍核を介して、HPA axis の機能を調節している。

以上のように、本研究は 2 点の生体のストレス反応に注目し、それらのストレス関連因子を標的とする新規化合物の抗不安・抗うつ薬としての可能性を、行動薬理学的に検証した。その結果、種々の動物モデルにおいて、ストレス関連神経ペプチド受容体拮抗薬及び代謝型グルタミン酸受容体拮抗薬は、抗不安・抗うつ作用を示した。これらの化合物が臨床において効果を示し、上市されることを期待して総括とする。

謝辞

本論文の作成にあたり、ご指導とご鞭撻を賜りました早稲田大学大学院先進理工学研究科電気・情報生命専攻 柴田重信教授に深甚なる謝意を表します。また、本論文の作成に際し、ご助言とご高閲を賜りました早稲田大学大学院人間科学研究科健康・生命医科学研究領域 山内兄人教授、早稲田大学大学院人間科学研究科健康・生命医科学研究領域 木村一郎教授、並びに早稲田大学大学院人間科学研究科健康・生命医科学研究領域 永島計准教授に謹んで感謝致します。

また、本研究の機会を与えて頂きました大正製薬株式会社 上原明社長、大平明副社長に謹んで感謝致します。また、多大なるご指導とご鞭撻を賜りました大正製薬株式会社 薬理機能研究所 創薬薬理研究室 GM 茶木茂之博士に心より深くお礼申し上げます。また、多岐に渡りご支援を賜りました大正製薬株式会社 医薬研究開発本部副本部長 森本繁夫博士、薬理機能研究所所長 中池司郎博士、創薬薬理研究室室長 中澤潔博士に感謝致します。

さらに、本研究の遂行に際し、ご指導とご協力を頂きました大正製薬株式会社 薬理機能研究所 創薬薬理研究室 島崎聡立博士、伊藤晃依氏を始めとする薬理機能研究所の方々、並びに大正製薬株式会社 医薬化学研究所の方々に心より感謝致します。

References

Aggleton JP The contribution of the amygdala to normal and abnormal emotional states. Trends Neurosci 1993. 16: 328-33

Ago Y, Koyama Y, Baba A, Matsuda T. Regulation by 5-HT_{1A} receptors of the in vivo release of 5-HT and DA in mouse frontal cortex. Neuropharmacology 2003; 45:1050-1056

Aguilera G, Rabadan-Diehl C. Vasopressinergic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for stress adaptation. Regul Pept 2000; 96: 23-29.

Alonso R, Griebel G, Pavone G, Stemmelin J, Le Fur G, Soubrie P Blockade of CRF(1) or V(1b) receptors reverses stress-induced suppression of neurogenesis in a mouse model of depression. Mol Psychiatry 2004; 9: 278-86

American Psychiatric Association Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition. Washington DC, American Psychiatric Press 1994

Arnold PD, Rosenberg DR, Mundo E, Tharmalingam S, Kennedy JL, Richter MA. Association of a glutamate (NMDA) subunit receptor gene (GRIN2B) with obsessive-compulsive disorder: a preliminary study. Psychopharmacology (Berl) 2004;174(4):530-8.

Auer DP, Putz B, Kraft E, Lipinski B, Schill J, Holsboer F. Reduced glutamate in the anterior cingulate cortex in depression: an in vivo proton magnetic resonance spectroscopy study. *Biol Psychiatry* 2000; 47(4):305-13.

Baker DG, West SA, Nicholson WE, Ekhtor NN, Kasckow JW, Hill KK et al. Serial CSF corticotropin-releasing hormone levels and adrenocortical activity in combat veterans with posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry* 1999; 156: 585–8.

Bagdy G, Graf M, Anheuer ZE, Modos EA, Kantor S. Anxiety-like effects induced by acute fluoxetine, sertraline or m-CPP treatment are reversed by pretreatment with the 5-HT_{2C} receptor antagonist SB-242084 but not the 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY-100635. *Int J Neuropsychopharmacol* 2001;4(4):399-408.

Bergink V, Westenberg HG. Metabotropic glutamate II receptor agonists in panic disorder: a double blind clinical trial with LY354740. *Int Clin Psychopharmacol* 2005; 20:291-3.

Berman RM, Cappiello A, Anand A, Oren DA, Heninger GR, Charney DS, Krystal JH. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry* 2000; 47(4):351-4.

Blanchard RJ, Griebel G, Farrokhi C, Markham C, Yang M, Blanchard DC. AVP V1b selective antagonist SSR149415 blocks aggressive behaviors in hamsters. *Pharmacol Biochem Behav* 2005; 80: 189-94

Borsini F, Lecci A, Volterra G, Meli A. A model to measure anticipatory anxiety in mice?

Psychopharmacology (Berl) 1989; 98:207-11.

Borsini F, Podhorna J, Marazziti D. Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? Psychopharmacology (Berl) 2002; 163: 121-41.

Bouwknegt JA, Paylor R. Behavioral and physiological mouse assays for anxiety: a survey in nine mouse strains. Behav Brain Res 2002; 136:489-501.

Bradbury MJ, Giracello DR, Chapman DF, Holtz G, Schaffhauser H, Rao SP, Varney MA, Anderson JJ. Metabotropic glutamate receptor 5 antagonist-induced stimulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: interaction with serotonergic systems. Neuropharmacology 2003;44(5):562-72.

Bremner JD, Licinio J, Darnell A, Krystal JH, Owens MJ, Southwick SM et al Elevated CSF corticotropin-releasing factor concentrations in posttraumatic stress disorder. Am J Psychiatry 1997; 154: 624–9.

Brodkin J, Bradbury M, Busse C, Warren N, Bristow LJ, Varney MA. Reduced stress-induced hyperthermia in mGluR5 knockout mice. Eur J Neurosci 2002;16:2241-4.

Brodkin J, Busse C, Sukoff SJ, Varney MA. Anxiolytic-like activity of the mGluR5 antagonist MPEP a comparison with diazepam and buspirone. Pharmacol Biochem Behav 2002;73(2):359-66.

Brown ES, Rush AJ, McEwen BS. Hippocampal remodeling and damage by corticosteroids: implications for mood disorders. *Neuropsychopharmacology* 1999; 21: 474-84.

Carroll BJ. Use of the dexamethasone suppression test in depression. *J Clin Psychiatry* 1982;43(11 Pt 2):44-50.

Carroll BJ, Curtis GC, Davies BM, Mendels J, Sugerman AA. Urinary free cortisol excretion in depression. *Psychol Med.* 1976 Feb;6(1):43-50.

Chaki S, Nakazato A, Kennis L, Nakamura M, Mackie C, Sugiura M, Vinken P, Ashton D, Langlois X, Steckler T. Anxiolytic- and antidepressant-like profile of a new CRF1 receptor antagonist, R278995/CRA0450. *Eur J Pharmacol* 2004; 485: 145-58.

Chaki S, Yoshikawa R, Hirota S, Shimazaki T, Maeda M, Kawashima N, Yoshimizu T, Yasuhara A, Sakagami K, Okuyama S, Nakanishi S, Nakazato A. MGS0039: a potent and selective group II metabotropic glutamate receptor antagonist with antidepressant-like activity. *Neuropharmacology* 2004; 46:457-67.

Coccaro EF, Kavoussi RJ, Hauger RL, Cooper TB, Ferris CF. Cerebrospinal fluid vasopressin levels: correlates with aggression and serotonin function in personality-disordered subjects. *Arch Gen Psychiatry* 1998; 55: 708-14.

Costall B, Domeney AM, Farre AJ, Kelly ME, Martinez L, Naylor RJ. Profile of action of a novel 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor ligand E-4424 to inhibit aversive behavior in the

mouse, rat and marmoset. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 262(1):90-8.

Cratty MS, Birkle DL. N-methyl-D-aspartate (NMDA)-mediated corticotropin-releasing factor (CRF) release in cultured rat amygdala neurons. *Peptides* 1999;20(1):93-100.

Cryan JF, Kelly PH, Neijt HC, Sansig G, Flor PJ, van Der Putten H. Antidepressant and anxiolytic-like effects in mice lacking the group III metabotropic glutamate receptor mGluR7. *Eur J Neurosci* 2003; 17:2409-17.

Daggett LP, Saccaan AI, Akong M, Rao SP, Hess SD, Liaw C, Urrutia A, Jachec C, Ellis SB, Dreessen J, et al. Molecular and functional characterization of recombinant human metabotropic glutamate receptor subtype 5. *Neuropharmacology* 1995;34(8):871-86.

Duman RS, Malberg J, Nakagawa S. Regulation of adult neurogenesis by psychotropic drugs and stress. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299: 401-7.

S.E. File. The validation of animal tests of anxiety-pharmacological implications, *Pol. J. Pharmacol. Pharm* 1984; 36: 505–12.

S.E. File and J.R. Hyde. Can social interaction be used to measure anxiety?, *Br. J. Pharmacol* 1978; 62:19–24.

Gardner CR. Distress vocalization in rat pups. A simple screening method for anxiolytic drugs. *J Pharmacol Methods* 1985; 14: 181-7.

Garthwaite G, Garthwaite J. Differential dependence on Ca²⁺ of N-methyl-D-aspartate and quisqualate neurotoxicity in young rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* 1989; 97(3):316-22.

Gesing A, Bilanz-Bleuel A, Droste SK, Linthorst AC, Holsboer F, Reul JM. Psychological stress increases hippocampal mineralocorticoid receptor levels: involvement of corticotropin-releasing hormone. *J Neurosci* 2001; 21:4822-9

Griebel G, Simiand J, Serradeil-Le Gal C, Wagnon J, Pascal M, Scatton B, Maffrand JP, Soubrie P Anxiolytic- and antidepressant-like effects of the non-peptide vasopressin V1b receptor antagonist, SSR149415, suggest an innovative approach for the treatment of stress-related disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 6370–5.

Griebel G, Simiand J, Stemmelin J, Gal CS, Steinberg R. The vasopressin V1b receptor as a therapeutic target in stress-related disorders. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2003 Jun;2(3):191-200. Review.

Griebel G, Stemmelin J, Gal CS, Soubrie P. Non-peptide vasopressin V1b receptor antagonists as potential drugs for the treatment of stress-related disorders. *Curr Pharm Des* 2005;11(12):1549-59. Review.

Grillon C, Cordova J, Levine LR, Morgan CA 3rd. Anxiolytic effects of a novel group II metabotropic glutamate receptor agonist (LY354740) in the fear-potentiated startle paradigm in humans. *Psychopharmacology (Berl)* 2003; 168:446-54.

Heinrichs SC, De Souza EB, Schulteis G, Lapsansky JL, Grigoriadis DE. Brain penetrance, receptor occupancy and antistress in vivo efficacy of a small molecule corticotropin releasing factor type I receptor selective antagonist. *Neuropsychopharmacology* 2002; 27:194-202.

Heinrichs SC, Lapsansky J, Lovenberg TW, De Souza EB, Chalmers DT. Corticotropin-releasing factor CRF1, but not CRF2, receptors mediate anxiogenic-like behavior. *Regul Pept* 1997;71(1):15-21.

Helton DR, Tizzano JP, Monn JA, Schoepp DD, Kallman MJ. Anxiolytic and side-effect profile of LY354740: a potent, highly selective, orally active agonist for group II metabotropic glutamate receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 284:651-60

Holsboer F, Haack D, Gerken A, Vecsei P. Plasma dexamethasone concentrations and differential suppression response of cortisol and corticosterone in depressives and controls. *Biol Psychiatry* 1984;19(3):281-91.

Holsboer F, Philipp M, Steiger A, Gerken A. Multisteroid analysis after DST in depressed patients--a controlled study. *J Affect Disord* 1986;10(3):241-9.

Insel TR, Hill JL, Mayor RB. Rat pup ultrasonic isolation calls: possible mediation by the benzodiazepine receptor complex. *Pharmacol Biochem Behav* 1986; 5: 1263-7

Ising M, Zimmermann US, Künzel HE, Uhr M, Foster AC, Learned-Coughlin SM, Holsboer F, Grigoriadis DE. High-affinity CRF1 receptor antagonist NBI-34041: preclinical and clinical data suggest safety and efficacy in attenuating elevated stress response. *Neuropsychopharmacology*. 2007;32:1941-9.

Jancsar SM, Leonard BE. The effect of (+/-)mianserin and its enantiomers on the behavioural hyperactivity of the olfactory-bulbectomized rat. *Neuropharmacology* 1984; 23: 1065-70.

Karasawa J, Shimazaki T, Kawashima N, Chaki S. AMPA receptor stimulation mediates the antidepressant-like effect of a group II metabotropic glutamate receptor antagonist. *Brain Res* 2005;1042:92-8.

Kawashima N, Karasawa J, Shimazaki T, Chaki S, Okuyama S, Yasuhara A, Nakazato A. Neuropharmacological profiles of antagonists of group II metabotropic glutamate receptors. *Neurosci Lett* 2005; 378:131-4.

Kasa K, Otsuki S, Yamamoto M, Sato M, Kuroda H, Ogawa N. Cerebrospinal fluid γ -aminobutyric acid and homovanillic acid in depressive disorders. *Biol Psychiatry* 1982;17(8):877-83.

Kehne JH, Coverdale S, McCloskey TC, Hoffman DC, Cassella JV. Effects of the CRF(1) receptor antagonist, CP 154,526, in the separation-induced vocalization anxiolytic test in rat pups. *Neuropharmacology* 2000; 39: 1357-67.

Keilhoff G, Becker A, Grecksch G, Bernstein HG, Wolf G. Cell Proliferation is Influenced by Bulbectomy and Normalized by Imipramine Treatment in a Region-Specific Manner. *Neuropsychopharmacology* 2006; 31: 1165-76

Kellner M, Muhtz C, Stark K, Yassouridis A, Arlt J, Wiedemann K. Effects of a metabotropic glutamate(2/3) receptor agonist (LY544344/LY354740) on panic anxiety induced by cholecystokinin tetrapeptide in healthy humans: preliminary results. *Psychopharmacology (Berl)* 2005; 179:310-5.

Klodzinska A, Chojnacka-Wojcik E, Palucha A, Branski P, Popik P, Pilc A. Potential anti-anxiety, anti-addictive effects of LY 354740, a selective group II glutamate metabotropic receptors agonist in animal models. *Neuropharmacology* 1999; 38:1831-9.

Knapp RJ, Goldenberg R, Shuck C, Cecil A, Watkins J, Miller C, Crites G, Malatynska E. Antidepressant activity of memory-enhancing drugs in the reduction of submissive behavior model. *Eur J Pharmacol* 2002; 440(1):27-35.

Levine J, Panchalingam K, Rapoport A, Gershon S, McClure RJ, Pettegrew JW. Increased cerebrospinal fluid glutamine levels in depressed patients. *Biol Psychiatry* 2000;47(7):586-93.

Li X, Need AB, Baez M, Witkin JM. Metabotropic glutamate 5 receptor antagonism is associated with antidepressant-like effects in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;

319(1):254-9.

Linden AM, Shannon H, Baez M, Yu JL, Koester A, Schoepp DD. Anxiolytic-like activity of the mGlu2/3 receptor agonist LY354740 in the elevated plus maze test is disrupted in metabotropic glutamate receptor 2 and 3 knock-out mice. *Psychopharmacology (Berl)* 2005;179:284-91.

Lolait SJ, Stewart LQ, Jessop DS, Young WS 3rd, O'Carroll AM. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to stress in mice lacking functional vasopressin V1b receptors. *Endocrinology* 2007;148(2):849-56.

Lumia AR, Teicher MH, Salchli F, Ayers E, Possidente B. Olfactory bulbectomy as a model for agitated hyposerotonergic depression. *Brain Res* 1992; 587:181-5.

Ma S, Morilak DA. Norepinephrine release in medial amygdala facilitates activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to acute immobilisation stress. *J Neuroendocrinol* 2005;17: 22-8.

Maeng S, Zarate CA Jr, Du J, Schloesser RJ, McCammon J, Chen G, Manji HK. Cellular Mechanisms Underlying the Antidepressant Effects of Ketamine: Role of alpha-Amino-3-Hydroxy-5-Methylisoxazole-4-Propionic Acid Receptors. *Biol Psychiatry*. 2007 in press.

Marazziti D, Di Muro A, Castrogiovanni P Psychological stress and body temperature

changes in humans. *Physiol Behav* 1992; 52:393-5.

Marcilhac A, Anglade G, Hery F, Siaud P. Olfactory bulbectomy increases vasopressin, but not corticotropin-releasing hormone, content in the external layer of the median eminence of male rats. *Neurosci Lett* 1999b; 262: 89-92.

Marcilhac A, Maurel D, Anglade G, Ixart G, Mekaouche M, Hery F, Siaud P. Effects of bilateral olfactory bulbectomy on circadian rhythms of ACTH, corticosterone, motor activity and body temperature in male rats. *Arch Physiol Biochem* 1997;105: 552-9.

Mathew SJ, Amiel JM, Coplan JD, Fitterling HA, Sackeim HA, Gorman JM. Open-label trial of riluzole in generalized anxiety disorder. *Am J Psychiatry* 2005;162(12):2379-81.

Mathew SJ, Coplan JD, Schoepp DD, Smith EL, Rosenblum LA, Gorman JM. Glutamate-hypothalamic-pituitary-adrenal axis interactions: implications for mood and anxiety disorders. *CNS Spectr* 2001; 6(7):555-6, 561-4.

McEwen BS, Albeck D, Cameron H, Chao HM, Gould E, Hastings N, Kuroda Y, Luine V, Magarinos AM, McKittrick CR, et al. Stress and the brain: a paradoxical role for adrenal steroids. *Vitam Horm* 1995;51:371-402. Review.

Melendez RI, Kalivas PW. Metabotropic glutamate receptor regulation of extracellular glutamate levels in the prefrontal cortex. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1003:443-4.

Menard J, Treit D. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety, *Neurosci. Biobehav. Rev* 1999; 23: 591–613.

Mitani H, Shirayama Y, Yamada T, Maeda K, Ashby CR Jr, Kawahara R. Correlation between plasma levels of glutamate, alanine and serine with severity of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2006; 30(6):1155-8.

Mineur YS, Picciotto MR, Sanacora G. Antidepressant-like effects of ceftriaxone in male C57BL/6J mice. *Biol Psychiatry* 2007;61(2):250-2.

Moghaddam B, Bolinao ML, Stein-Behrens B, Sapolsky R. Glucocorticoids mediate the stress-induced extracellular accumulation of glutamate. *Brain Res* 1994; 655(1-2):251-4.

Nakata H, Nakamura S. Brain-derived neurotrophic factor regulates AMPA receptor trafficking to post-synaptic densities via IP3R and TRPC calcium signaling. *FEBS Lett* 2007;581(10):2047-54

Nakazato A, Kumagai T, Sakagami K, Yoshikawa R, Suzuki Y, Chaki S, Ito H, Taguchi T, Nakanishi S, Okuyama S. Synthesis, SARs, and pharmacological characterization of 2-amino-3 or 6-fluorobicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylic acid derivatives as potent, selective, and orally active group II metabotropic glutamate receptor agonists. *J Med Chem* 2000; 43: 4893-909.

Nemeroff CB, Widerlov E, Bissette G, Walleus H, Karlsson I, Eklund K, Kilts CD, Loosen PT,

Vale W. Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science* 1984; 226: 1342-4.

Noguchi S, Inukai T, Kuno T, Tanaka C. The suppression of olfactory bulbectomy-induced muricide by antidepressants and antihistamines via histamine H1 receptor blocking. *Physiol Behav* 1992; 51: 1123-7.

Okuyama S, Chaki S, Kawashima N, Suzuki Y, Ogawa S, Nakazato A, Kumagai T, Okubo T, Tomisawa K. Receptor binding, behavioral, and electrophysiological profiles of nonpeptide corticotropin-releasing factor subtype 1 receptor antagonists CRA1000 and CRA1001. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 289: 926-35.

Olivier B, Molewijk HE, van der Heyden JA, van Oorschot R, Ronken E, Mos J, Miczek KA. Ultrasonic vocalizations in rat pups: effects of serotonergic ligands. *Neurosci Biobehav Rev* 1998a; 23: 215-27.

Olivier B, Molewijk E, van Oorschot R, van der Heyden J, Ronken E, Mos J. Rat pup ultrasonic vocalization: effects of benzodiazepine receptor ligands. *Eur J Pharmacol* 1998b; 358: 117-128.

Olivier B, Zethof TJ, Ronken E, van der Heyden JA (1998) Anxiolytic effects of flesinoxan in the stress-induced hyperthermia paradigm in singly-housed mice are 5-HT_{1A} receptor mediated. *Eur J Pharmacol* 342:177-182

Owens MJ, Overstreet DH, Knight DL, Rezvani AH, Ritchie JC, Bissette G, Janowsky DS, Nemeroff CB. Alterations in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in a proposed animal model of depression with genetic muscarinic supersensitivity. *Neuropsychopharmacology* 1991; 4(2):87-93.

Page ME, Szeliga P, Gasparini F, Cryan JF. Blockade of the mGlu5 receptor decreases basal and stress-induced cortical norepinephrine in rodents. *Psychopharmacology (Berl)* 2005;179(1):240-6.

Palucha A, Pilc A. The involvement of glutamate in the pathophysiology of depression. *Drug News Perspect* 2005;18(4):262-8.

Parsons CG, Danysz W, Quack G. Glutamate in CNS disorders as a target for drug development: an update. *Drug News Perspect* 1998; 11(9):523-69.

Possidente B, Lumia AR, McGinnis MY, Rapp M, McEldowney S. Effects of fluoxetine and olfactory bulbectomy on mouse circadian activity rhythms. *Brain Res* 1996; 713: 108-13.

Reeves DL, Levinson DM, Justesen DR, Lubin B. Endogenous hyperthermia in normal human subjects: experimental study of emotional states (II). *Int J Psychosom* 1985; 32:18-23.

Redmond AM, Kelly JP, Leonard BE. The determination of the optimal dose of milnacipran in the olfactory bulbectomized rat model of depression. *Pharmacol Biochem Behav* 1999; 62:

619-23.

Richardson JS, Tiong AH. Amygdaloid and hippocampal beta-adrenoceptors in the olfactory bulbectomy syndrome: effects of desipramine. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 877: 764-8.

Rivier CL, Plotsky PM. Mediation by corticotropin releasing factor (CRF) of adenohipophysial hormone secretion. *Annu Rev Physiol* 1986;48:475-94.

Rorick-Kehn LM, Hart JC, McKinzie DL. Pharmacological characterization of stress-induced hyperthermia in DBA/2 mice using metabotropic and ionotropic glutamate receptor ligands. *Psychopharmacology (Berl)* 2005;183:226-40.

Rorick-Kehn LM, Perkins EJ, Knitowski KM, Hart JC, Johnson BG, Schoepp DD, McKinzie DL. Improved bioavailability of the mGlu2/3 receptor agonist LY354740 using a prodrug strategy: in vivo pharmacology of LY544344. *J Pharmacol Exp Ther* 2006 316:905-13.

Roy-Byrne PP, Uhde TW, Post RM, Gallucci W, Chrousos GP, Gold PW. The corticotropin-releasing hormone stimulation test in patients with panic disorder. *Am J Psychiatry* 1986; 143: 896-9.

Roy M, David NK, Danao JV, Baribault H, Tian H, Giorgetti M. Genetic Inactivation of Melanin-Concentrating Hormone Receptor Subtype 1 (MCHR1) in Mice Exerts Anxiolytic-Like Behavioral Effects. *Neuropsychopharmacology* 2006; 31:112-20.

Rubin RT, Poland RE, Lesser IM, Martin DJ, Blodgett AL, Winston RA. Neuroendocrine aspects of primary endogenous depression. III. Cortisol secretion in relation to diagnosis and symptom patterns. *Psychol Med* 1987;17(3):609-19.

Sakaue M, Somboonthum P, Nishihara B, Koyama Y, Hashimoto H, Baba A, Matsuda T (2000) Postsynaptic 5-hydroxytryptamine(1A) receptor activation increases in vivo dopamine release in rat prefrontal cortex. *Br J Pharmacol* 129:1028-34.

Salome N, Stemmelin J, Cohen C, Griebel G. Differential roles of amygdaloid nuclei in the anxiolytic- and antidepressant-like effects of the V1b receptor antagonist, SSR149415, in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2006;187: 237-44.

Sanacora G, Gueorguieva R, Epperson CN, Wu YT, Appel M, Rothman DL, Krystal JH, Mason GF: Subtype-specific alterations of gamma-aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression. *Arch Gen Psychiatry* 2004;61(7):705-13.

Sanacora G, Kendell SF, Levin Y, Simen AA, Fenton LR, Coric V, Krystal JH. Preliminary evidence of riluzole efficacy in antidepressant-treated patients with residual depressive symptoms. *Biol Psychiatry* 2007;61(6):822-5.

Schoepp DD, Wright RA, Levine LR, Gaydos B, Potter WZ. LY354740, an mGlu2/3 receptor agonist as a novel approach to treat anxiety/stress. *Stress* 2003; 6:189-97.

Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. *J Neuropsychiatry Clin*

Neurosci 1998 Spring;10(2):230-1

Serradeil-Le Gal C, Wagnon J, Simiand J, Griebel G, Lacour C, Guillon G, Barberis C, Brossard G, Soubrie P, Nisato D, Pascal M, Pruss R, Scatton B, Maffrand JP, Le Fur G. Characterization of (2S,4R)-1-[5-chloro-1-[(2,4-dimethoxyphenyl)sulfonyl]-3-(2-methoxy-phenyl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-3-yl]-4-hydroxy-N,N-dimethyl-2-pyrrolidine carboxamide (SSR149415), a selective and orally active vasopressin V1b receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300: 1122-30.

Sheline YI, Barch DM, Donnelly JM, Ollinger JM, Snyder AZ, Mintun MA. Increased amygdala response to masked emotional faces in depressed subjects resolves with antidepressant treatment: an fMRI study. *Biol Psychiatry* 2001; 50: 651-8.

Shibata S, Nakanishi H, Watanabe S, Ueki S. Effects of chronic administration of antidepressants on mouse-killing behavior (muricide) in olfactory bulbectomized rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1984; 21:225-30.

Shimazaki T, Iijima M, Chaki S. Anxiolytic-like activity of MGS0039, a potent group II metabotropic glutamate receptor antagonist, in a marble-burying behavior test. *Eur J Pharmacol* 2004; 501:121-5.

Sienkiewicz-Jarosz H, Maciejak P, Krzascik P, Czlonkowska AI, Szyndler J, Bidzinski A, Kostowski W, Plaznik A. The effects of central administration of physostigmine in two

models of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 2003;75(2):491-6.

Singewald N, Zhou GY, Chen F, Philippu A. Corticotropin-releasing factor modulates basal and stress-induced excitatory amino acid release in the locus coeruleus of conscious rats. *Neurosci Lett* 1996;204(1-2):45-8.

Soygur H, Palaoglu O, Akarsu ES, Cankurtaran ES, Ozalp E, Turhan L, Ayhan IH. Interleukin-6 levels and HPA axis activation in breast cancer patients with major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2007;31(6):1242-7.

Spooren WP, Gasparini F, Salt TE, Kuhn R: Novel allosteric antagonists shed light on mglu(5) receptors and CNS disorders. *Trends Pharmacol Sci* 200;22(7):331-7. Review.

Spooren WP, Schoeffter P, Gasparini F, Kuhn R, Gentsch C. Pharmacological and endocrinological characterisation of stress-induced hyperthermia in singly housed mice using classical and candidate anxiolytics (LY314582, MPEP and NKP608). *Eur J Pharmacol* 2002; 435:161-70.

Steckler T, Holsboer F. Corticotropin-releasing hormone receptor subtypes and emotion. *Biol Psychiatry* 1999; 46(11):1480-508. Review.

J. Stemmelin, L. Lukovic, N. Salome and G. Griebel. Evidence that the lateral septum is involved in the antidepressant-like effects of the vasopressin V1b receptor antagonist, SSR149415, *Neuropsychopharmacology* 2005; 30: 35–42.

Stockert M, Serra J, De Robertis E. Effect of olfactory bulbectomy and chronic amitryptiline treatment in rats. 3H-imipramine binding and behavioral analysis by swimming and open field tests. *Pharmacol Biochem Behav* 1988; 29: 681-6.

Sugimoto T, Saito M, Mochizuki S, Watanabe Y, Hashimoto S, Kawashima H. Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding the human V1b vasopressin receptor. *J Biol Chem*. 1994 Oct 28;269(43):27088-92.

Tatarczynska E, Klodzinska A, Chojnacka-Wojcik E, Palucha A, Gasparini F, Kuhn R, Pilc A (2001) Potential anxiolytic- and antidepressant-like effects of MPEP, a potent, selective and systemically active mGlu5 receptor antagonist. *Br J Pharmacol* 132:1423-1430.

Timpl P, Spanagel R, Sillaber I, Kresse A, Reul JM, Stalla GK, Blanquet V, Steckler T, Holsboer F, Wurst W. Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1. *Nat Genet* 1998;19(2):162-6.

Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 1981;213(4514):1394-7.

Van Bogaert MJ, Groenink L, Oosting RS, Westphal KG, van der Gugten J, Olivier B. Mouse strain differences in autonomic responses to stress. *Genes Brain Behav* 2006; 5:139-49.

Van der Heyden JA, Zethof TJ, Olivier B. Stress-induced hyperthermia in singly housed mice. *Physiol Behav* 1997; 62:463-70.

Van de Kar LD, Blair ML. Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Front Neuroendocrinol* 1999; 20:1-48.

van Londen L, Goekoop JG, van Kempen GM, Frankhuijzen-Sierevogel AC, Wiegant VM, van der Velde EA, De Wied D. Plasma levels of arginine vasopressin elevated in patients with major depression. *Neuropsychopharmacology* 1997; 17: 284-92.

van der Stelt HM, Breuer ME, Olivier B, Westenberg HG. Permanent deficits in serotonergic functioning of olfactory bulbectomized rats: an in vivo microdialysis study. *Biol Psychiatry* 2005; 57: 1061-7.

van Riezen H, Leonard BE. Effects of psychotropic drugs on the behavior and neurochemistry of olfactory bulbectomized rats. *Pharmacol Ther* 1990; 47: 21-34.

Walker CD, Scribner KA, Cascio CS, Dallman MF. The pituitary-adrenocortical system of neonatal rats is responsive to stress throughout development in a time-dependent and stressor-specific fashion. *Endocrinology* 1991; 128:1385-95.

Wersinger SR, Ginns EI, O'Carroll AM, Lolait SJ, Young WS 3rd. Vasopressin V1b receptor knockout reduces aggressive behavior in male mice. *Mol Psychiatry* 2002; 7: 975-84.

Witkin JM, Marek GJ, Johnson BG, Schoepp DD. Metabotropic glutamate receptors in the control of mood disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2007; 6(2):87-100. Review.

Xi ZX, Baker DA, Shen H, Carson DS, Kalivas PW. Group II metabotropic glutamate receptors modulate extracellular glutamate in the nucleus accumbens. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300:162-171.

Yoshimizu T, Shimazaki T, Ito A, Chaki S. An mGluR2/3 antagonist, MGS0039, exerts antidepressant and anxiolytic effects in behavioral models in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2006;186:587-93.

Zarate CA Jr, Payne JL, Quiroz J, Sporn J, Denicoff KK, Luckenbaugh D, Charney DS, Manji HK. An open-label trial of riluzole in patients with treatment-resistant major depression. *Am J Psychiatry* 2004;161(1):171-4.