

原 著

嗅球摘出マウスの認知障害に対するフルボキサミンの改善作用

中川西 修, 吉田 文, 高橋 浩平, 根本 互, 八百板富紀枝, 只野 武,^a 丹野 孝一

^a 金沢大学医薬保健学総合研究科環境健康科学

Fluvoxamine ameliorates cognitive dysfunctions in olfactory bulbectomized mice

Osamu NAKAGAWASAI, Aya YOSHIDA, Kohei TAKAHASHI, Wataru NEMOTO, Fukie YAOITA,
Takeshi TADANO,^a and Koichi TAN-NO

(Received November 20, 2014)

This study was undertaken to examine the effect of the selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) fluvoxamine on cognitive dysfunctions in olfactory bulbectomized (OBX) mice. In the novel object recognition test, OBX mice significantly decreased the exploratory preference in the retention session, but not in the training session. OBX-induced cognitive dysfunctions were significantly improved by chronic (3-week) administration of fluvoxamine (30 mg/kg/day), but not acute. The present study suggests that chronic fluvoxamine treatment may ameliorate OBX-induced cognitive dysfunctions via a mechanism involving enhancement of synaptic plasticity-related signaling. Therefore, SSRI such as fluvoxamine would be potential therapeutic drugs for the treatment of the cognitive dysfunctions of Alzheimer's disease.

Key words — cognitive dysfunction, olfactory bulbectomy, fluvoxamine

緒 論

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) をはじめとする認知症の発症には, 種々の環境因子や生活習慣が関与することが知られている. 認知症の症状は, 中核症状と周辺症状に大きく2つに分かれ, その中核症状は, 脳の神経細胞減少によって引き起こされる記憶障害であり, その中核症状によって引き起こされる二次的な症状を周辺症状という. 周辺症状は, 幻覚妄想, 抑うつなどの精神障害や夜間徘徊などの行動障害が含まれる. 特にその周辺症状の発現は, 介護する家族や社会の負担を甚大にさせ, 患者の生活の質も低下することから, 治療法の開発, 発症機序の解明, 治療薬創出が課題となっている. ADの周辺症状の一つであるうつ症状発現には, serotonin (5-HT) 神経機能低下が報告されている.¹⁾ 例えば, AD患者の血小板への5-HT再取り込み減少,²⁾ 死後脳の海馬におけるserotonin transporter (SERT) 減少³⁾ および5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}受容体数の減少^{4,5)} などである. ADの発症初期にはコリン作動性神経機能低下がみられることから, 現在, ADの治療薬としてコリン神経機能を賦活させる donepezil, galantamine,

rivastigmine が使用されているが, 周辺症状としてうつを伴う病態には, 三環系抗うつ薬は抗コリン作用を有することから認知症を悪化させてしまうので selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI) 等の抗うつ薬が使用される. 主な抗うつ薬の作用機序は, モノアミン仮説に従ってアミンの神経終末への取り込み阻害によるアミン機能の増強によると考えられている. しかし, SSRIの急性期における薬理作用は, 前シナプスに存在するSERTを阻害することによりシナプス間隙の5-HT量を増加させることであるが, 治療効果の発現には数週間を要する. 一方, SSRIの5-HT神経系における作用は投与直後に認められることから, 5-HT神経系に直接に作用するだけでなく, 細胞内の様々なシグナル伝達系に関わる転写因子制御の分子メカニズムが注目されている.^{6,7)}

AD患者には, 上述した症状以外にも嗅覚の障害が早期に認められることは以前からいわれていたが, 最近の学会発表でも単純な嗅覚検査がADの早期特定に有用である報告がなされている. 嗅球摘出 (Olfactory bulbectomy: OBX) 動物は, これらの臨床症状と類似した異常行動を示すことから認知情動障害モデルとして有用であることを当教

室および他のグループで報告している。^{8,11)} 以前, OBX 動物における受動回避反応障害に対して Cholinesterase (ChE) 阻害薬である physostigmine および donepezil の効果を検討したところ, 受動回避反応障害は改善したが, AD の周辺症状に類似する異常行動に対しては ChE 阻害薬は無影響であった。⁹⁾ SSRI には認知機能改善効果が認められる報告がある。¹²⁾ しかしながら, SSRI の認知機能改善作用およびその機序に関しての見解は一致していない。したがって, 認知機能障害を示す OBX 動物を用い, SSRI の認知機能に対する効果を行動薬理的に検討した。

実験材料および実験方法

1. 使用動物

実験には体重 24~26 g の ddY 系雄性マウス (日本 SLC) を使用し, 実験に供するまで室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 10\%$, 明暗サイクル 12 時間サイクル (明期; 7:00~19:00, 暗期; 19:00~7:00) の一定条件下で飼育した。飼育はプラスチックケージ (縦 30 cm×横 20 cm×高さ 15 cm) に 10 匹の割合で飼育した。これらの動物は飼育期間中, 固形飼料 (船橋農業 F-2) および水を自由に摂取させた。

2. 嗅球摘出法

Pentobarbital sodium (50 mg/kg, 大日本住友製薬) の腹腔内 (i.p.) 投与により麻酔後, マウスを脳定位装置に固定し, 嗅球 (OB) の真上に歯科用ドリルで 2 カ所頭蓋骨に穴を開け, 吸引 (真空機工製, C-12 型吸引ポンプ) によって anterior olfactory nuclei を含む OB のほぼ 2/3 以上を摘出した。さらに, 摘出後マウスに spongel (アステラス製薬) で穴を塞ぎ実験に供した。OBX 時の手術による影響の有無を検討するために, 吸引による OBX は行わず, OB に傷をつけないように穴を開け, spongel で穴を塞いだだけのマウスを偽手術群すなわち対照群 (sham 群) とした。

3. 使用薬物および投与方法

使用薬物は, SSRI の fluvoxamine (Sigma-Aldrich, Inc.) を用いた。Fluvoxamine は, 生理食塩液に溶解し, 腹腔内 (i.p.) 投与した。なお, i.p. 投与の場合には 0.1 ml/10 g body weight の割合で投与した。急性投与実験の際には, 術後 14 日目に fluvoxamine を投与した。慢性投与実験の際には,

術後 14 日目から fluvoxamine の投与を開始し, 3 週間連日 i.p.投与した。

4. Novel object recognition test (NOT) 測定

うすくチップを敷いた black box (縦 35 cm×横 30 cm×高さ 30 cm) 内に, 3 日間連続で 10 分間アダプテーションをし, 4 日目にこの box 内にゴルフボールおよびコンセントソケットを入れ, マウスにこれらの物質を覚えさせる訓練 (training session: 訓練試行) を 5 分間行った。訓練試行 1 時間または 24 時間後に, 2 種類の object のうち片方の物質を全く異なった新規の object (乾電池) と置換し嗜好性および新規物質に接触する時間を 5 分間測定 (retention session: 保持試行) した。薬物投与は NOT 測定の 30 分前に行った。嗜好性は, それぞれの object への探索行動 (嗅ぐ, 見る, 触れる) の秒数を測定し, 比率を算出した。なお, すべての行動実験は 10:00~18:00 までの間に行った。

5. 統計処理

実験結果は, 平均値と標準誤差で示した。有意差検定は, 2 群間の比較には t-検定を用い, それ以上の群間の比較に対しては分散分析 post-hoc test 処理後, Fisher の PLSD 検定を行った。危険率 5% 以下を有意差ありとして判定した。なお, この検定の解析ソフトには Stat view-J 5.0 を用いた。

結 果

1. Novel object recognition test (NOT) における OBX の影響

手術後 14 日目のマウスにおける training session (訓練試行) および retention session (保持試行) 各 5 分間における 2 つの物質に対する総探索行動量および 1 つの物質に対する嗜好性を測定した。その結果, sham 群と比較し OBX 群において training session における探索行動量は増加傾向であったが, 有意な差は認められなかった。Training session 1 時間および 24 時間後の retention session における総探索行動量は両群間で有意な差は認められなかった [Fig. 1 (A) and (B)]. また, 嗜好性については, training session において両群とも個々の object に対して約 50% の嗜好性を示した。しかしながら, 1 時間および 24 時間後 retention session において, sham 群は新規物質に対する嗜好性は増加した。一方, OBX 群においては新規物質



Fig. 1. Novel object recognition memory on the 14th day after olfactory bulbectomy in mice.

(A) and (B); Total exploration time towards both objects in training and retention (interval; (A): 1h and (B): 24h) session. (C) and (D); The exploratory preference (%) on the Y axis is referring to the preference toward the novel object, thus meaning the ability to discriminate between novel object and non-novel object. Vertical bars represent standard errors of means (S.E.M.). **P<0.01 significant difference between sham and OBX group (n = 10 – 15 per group).

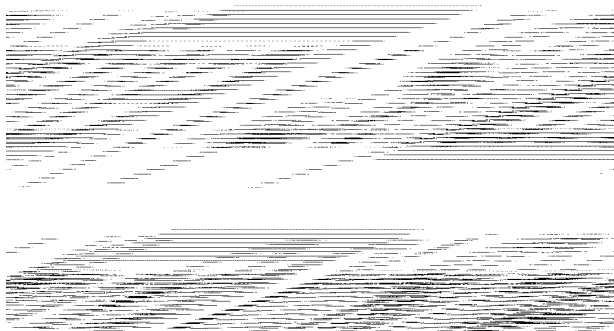


Fig. 2. Effects of acute administered fluvoxamine on OBX-induced cognitive dysfunctions in novel object recognition test (NOT).

The retention session was performed 30 min after fluvoxamine administration. Vertical bars represent S.E.M.. **P<0.01 significant difference between sham and OBX group (n = 10 – 15 per group).

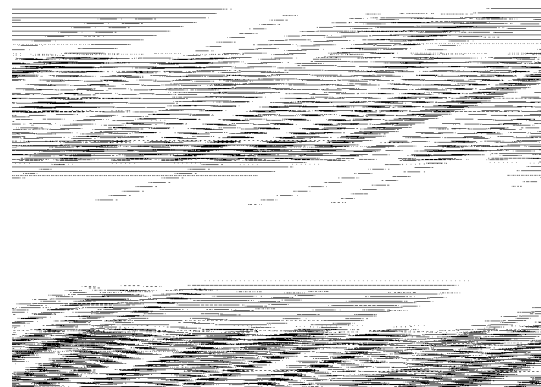


Fig. 3. Effects of chronic administered fluvoxamine on OBX-induced cognitive dysfunctions in NOT.

Vertical bars represent S.E.M.. **P<0.01 significant difference between sham and OBX group. #P<0.05 significant difference between saline treated OBX and fluvoxamine treated OBX group (n = 10 – 15 per group).

に対する嗜好性は sham 群と比較し有意に減少した [Fig. 1 (C) and (D)].

2. OBX マウスの認知障害に対する fluvoxamine 急性投与の影響

手術後 14 日目の OBX マウスが示した認知障害に対する fluvoxamine 急性投与の影響を検討する目的で, fluvoxamine 30 mg/kg の用量をそれぞれの群に投与し NOT を測定した.

その結果, retention session における OBX 群は $54.0 \pm 6.0\%$ に対し自発運動量を抑制しない用量である fluvoxamine 30 mg/kg の急性投与した OBX 群は $60.1 \pm 3.2\%$ と有意な差は認められなかった (Fig. 2).

3. OBX マウスの認知障害に対する fluvoxamine 慢性投与の影響

認知障害に対する fluvoxamine 慢性投与の影響を検討する目的で, fluvoxamine 30 mg/kg の用量をそれぞれの群に 3 週間投与し NOT を測定した.

その結果, retention session における OBX 群は $54.0 \pm 4.4\%$ に対し fluvoxamine 30 mg/kg の慢性投与により OBX 群は $64.9 \pm 1.8\%$ と有意に増加した (Fig. 3).

考 察

本研究において, OBX 誘発性認知障害に対する SSRI の効果を探るために NOT を行った. 認知記憶能力に関しては, 脳内でも特に海馬が重要であることが報告されており,¹³⁾ NOT は海馬破壊動物で記憶障害が顕著に認められることから, 海馬依存性認知記憶能力を調べる方法である.¹⁴⁾ 受動回避反応装置で用いられる電気負荷や, 八方向放射状迷路や T 迷路のようなエサの制限をかけるといった負荷を与える学習試験法とは異なり, 負荷を与えない NOT は動物本来の習性を利用した学習試験法であることから, 現在よく用いられている. OBX マウスの認知能力は, OBX 後 14 日目から測定した. これは OBX 後 14 日目に受動回避反応障害^{9,10)} および Head-twitch response のようなセロトニン関連行動¹¹⁾ といった異常行動が遅延して発現するからである. Fig. 1 に示したように, sham 群および OBX 群とも, 個々の object に対して約 50% の嗜好性を示した. しかしながら, 緒論で述べたように OBX 動物は新規環境下では探索行動が増加することが報告されている¹⁵⁾ が, 本研究では, 個々の object に対する探索時間を測定したが

両群間で変化はなかった. この結果は, NOT での training session を始める 3 日前から毎日 10 分間この装置内で十分に環境順応したため, training session における探索時間に有意な差がなかったものと考えられる. 24 時間後の retention session において, sham 群は新規物質に対する嗜好性は約 75% と増加した. 一方, OBX 群においては新規物質に対する嗜好性は約 50% と sham 群と比較し有意に減少した. このことから, OBX 群において長期空間記憶障害が認められた. さらに, 長期空間記憶だけではなく短期空間記憶 (1 時間後 retention session) も OBX により障害を示した結果 [Fig. 1 (C) and (D)] は, 短期空間記憶の評価法である T 迷路¹⁶⁾ および当教室における Y-迷路の報告¹⁷⁾ と一致した. これらの結果は嗅覚システム欠落により環境や物質等へ対して認知障害を起こすという以前の報告,¹⁸⁾ すなわち, 嗅球と線維連絡を有する脳部位, 例えば学習・記憶に重要な役割を担っている扁桃体, 海馬¹⁹⁾ などが, OBX によって逆行性の神経変性を起こすことに起因している可能性が示唆された.

5-HT 神経系は, コリン神経, グルタミン酸神経, ドパミン神経および GABA 神経などと相互作用し, 学習や記憶に重要な役割を果たしている. 5-HT_{2A/2C} または 5-HT₄ 受容体アゴニスト, 5-HT_{1A}, 5-HT₃ および 5-HT_{1B} 受容体アンタゴニストは, 記憶障害の防止や学習の促進に関与するという報告がある.²⁰⁾ 臨床的には positron emission tomography (PET) により AD 患者の 5-HT₂ 受容体が, コントロール群およびうつ病患者と比較し, 海馬, 扁桃体において減少していることが報告されており,²¹⁾ 当研究室の OBX 動物を用いた実験において 5-HT_{2A} 受容体の下流域に存在する calmodulin kinase II (CaMK II) レベルが低下していることを報告している.¹⁷⁾ したがって, OBX 誘発性認知障害は海馬における 5-HT_{2A} 受容体機能の低下が関与している可能性がある. そこで本研究において AD 患者の周辺症状の治療やうつ病患者の治療²²⁾ に用いられている SSRI に着目し検討したところ, fluvoxamine の急性投与 (Fig. 2) ではなく慢性投与によって OBX 誘発性認知障害が改善した (Fig. 3). この結果は, 以前の報告で Morris の水迷路試験法を用いた OBX ラットの空間記憶障害が SSRI である fluvoxamine および paroxetine 慢性投与によって改善したことと¹²⁾ 一致する. 今回

の fluvoxamine による OBX 誘発性認知障害の改善作用には、直接的な 5-HT 再取り込み阻害作用の関与の可能性は少ないと考えられる。なぜなら、緒論でも述べたように fluvoxamine の 5-HT の再取り込み作用は投与直後に認められるが、今回認知機能改善作用は、急性ではなく 3 週間の慢性投与によって認められたからである。Fluvoxamine は、5-HT 再取り込み阻害作用の他に、ラット脳において fluvoxamine 慢性投与によって、脳内神経の形成や発達、さらには生存に重要であり、さらに、神経可塑性にも関与している脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor: BDNF) の遺伝子発現が増加する作用も有する。²³⁾ 他の SSRI では、fluoxetine の投与によってマウスの海馬における CREB (c-AMP response element binding protein) の遺伝子発現が増加すること²⁴⁾ や BDNF ヘテロ欠損マウスにおいて神経新生促進作用の減弱²⁵⁾ が報告されている。これらの知見から、fluvoxamine 慢性投与による OBX 誘発性認知障害改善の作用機序のひとつとして、5-HT 再取り込み阻害により 5-HT が増加し、5-HT 受容体結合後、CaMK, protein kinase C (PKC) を活性化させ、CREB タンパクのリン酸化を促進し、最終的には、CREB タンパクのリン酸化によって、核内で BDNF 遺伝子の発現が増加し、神経新生や神経可塑性の変化につながると考えられる。⁷⁾ また、fluvoxamine は σ_1 受容体刺激作用から細胞内 Ca^{2+} 遊離量を増加させ、最終的に BDNF を増加させ神経可塑性を増強し認知障害を改善することも報告されている。⁷⁾ この σ_1 受容体に高い活性を持つ薬物として fluvoxamine, fluoxetine などの SSRI が同定されている。²⁶⁾ したがって、慢性 fluvoxamine による OBX 誘発性認知障害の改善機序は、CREB のリン酸化や BDNF 発現増加といったような細胞内情報伝達路の下流域機能を増加させ認知機能を改善させた可能性が示唆された。今後、分子生物学的並びに免疫組織化学的手法により CREB や BDNF の定量分析を詳細に検討する必要があると考えられる。

以上のことから、SSRI である fluvoxamine 慢性投与は AD 患者の周辺症状のみならず中核症状も緩和する可能性が示唆された。今後、認知症の治療法として積極的に SSRI を用いることにより認知症の進行を遅延させることが期待される。

REFERENCES

- 1) Mann J. J., *Neuropsychopharmacology*, **21**, 99S–105S (1999).
- 2) Inestrosa N. C., Alarcón R., Arriagada J., Donoso A., Alvarez J., *Neurosci. Lett.*, **163**, 8–10 (1993).
- 3) Tejani-Butt S. M., Yang J., Pawlyk A. C., *Neuroreport*, **30**, 1207–1210 (1995).
- 4) Cross A. J., Crow T. J., Ferrier I. N., Johnson J. A., Bloom S. R., Corsellis J. A., *J Neurochem.*, **43**, 1574–1581 (1984).
- 5) Jansen K. L., Faull R. L., Dragunow M., Synek B. L., *Neuroscience*, **39**, 613–627 (1990).
- 6) Nestler E. J., Barrot M., DiLeone R. J., Eisch A. J., Gold S. J., *Neuron*, **34**, 13–25 (2002).
- 7) Hashimoto K., Fujita Y., Ishima T., Hagiwara H., Iyo M., *Eur. J. Pharmacol.*, **28**, 191–195 (2006).
- 8) Yamamoto T., Jin J., Watanabe S., *Behav. Brain Res.*, **83**, 57–62 (1997).
- 9) Hozumi S., Nakagawasai O., Tan-No K., Nijijima F., Yamadera F., Murata A., Arai Y., Yasuhara H., Tadano T., *Behav. Brain Res.*, **138**, 9–15 (2003).
- 10) Nakagawasai O., Hozumi S., Tan-No K., Nijijima F., Arai Y., Yasuhara H., Tadano T., *Behav. Brain Res.*, **142**, 63–67 (2003).
- 11) Nakagawasai O., Tadano T., Arai Y., Hozumi S., Oba A., Tan-No K., Yasuhara H., Kisara K., Orelund L., *Neuroscience*, **117**, 1017–1023 (2003).
- 12) Kelly J. P., Wrynn A. S., Leonard B. E., *Pharmacol. Ther.*, **74**, 299–316 (1997).
- 13) He J., Yamada K., Nabeshima T., *Neuropsychopharmacology*, **26**, 259–268 (2002).
- 14) Cohen S. J., Stackman Jr. R. W., *Behav. Brain Res.*, In press.
- 15) Song C., Leonard B.E., *Neuroimmunomodulation*, **2**, 263–273 (1995).
- 16) Bobkova N. V., Nesterova I. V., Nesterov V. V., *Bull. Exp. Biol. Med.*, **131**, 427–431 (2001).
- 17) Moriguchi S., Han F., Nakagawasai O., Tadano T., Fukunaga K., *J. Neurochem.*, **97**, 22–29 (2006).
- 18) Leonard B.E., Tuite M., *Int. Rev. Neurobiol.*, **22**, 251–286 (1981).
- 19) Van Riezen H., Leonard B.E., *Pharmacol. Ther.*, **47**, 21–34 (1990).

- 20) Buhot M. C., Martin S., Segu L., *Ann. Med.*, **32**, 210–221 (2000).
- 21) Meltzer C. C., Price J. C., Mathis C. A., Greer P. J., Cantwell M. N., Houck P. R., Mulsant B. H., Ben-Eliezer D., Lopresti B., DeKosky S. T., Reynolds C. F. 3rd., *Am. J. Psychiatry*, **156**, 1871–1878 (1999).
- 22) Mandelli L., Serretti A., Colombo C., Florita M., Santoro A., Rossini D., Zanardi R., Smeraldi E., *Psychiatry Clin. Neurosci.*, **60**, 598–604 (2006).
- 23) Yagasaki Y., Numakawa T., Kumamaru E., Hayashi T., Su T. P., Kunugi H., *J. Biol. Chem.*, **281**, 12941–12949 (2006).
- 24) Blom J. M., Tascetta F., Carra S., Ferraguti C., Barden N., Brunello N., *Neuropsychopharmacology*, **26**, 605–614 (2002).
- 25) Pinnock S. B., Lazic S. E., Wong H. T., Wong I. H., Herbert J., *Neuroscience*, **158**, 1644–1651 (2009).
- 26) Narita N., Hashimoto K., Tomitaka S., Minabe Y., *Eur. J. Pharmacol.*, **307**, 117–119 (1996).