博士（医　学）　泉　　剛

学位論文題名

不安における脳内 cholecystokinin の関与について

学位論文内容の要旨

最近、神経ペプチドであるcholecystokinin (CCK)が内在性の不安関連物質として注目されている。本論文では、CCKと不安の関連について検討を試みた。

CCKは58個のアミノ酸基よりなるペプチドとして産生され、体内でsulphated CCK8 (CCK8S)やCCK4などの断片に分解される。CCKの受容体としてCCKA受容体とCCKB受容体が区別されている。CCK8Sによる海馬細胞の発火がbenzodiazepineによって抑制されることから、脳内CCK受容体の活性化が不安を惹起することが予想され、実際、ヒトに対するCCK４の静脈内投与はパニック様発作を引き起こした。またCCK４やCCK8Sの投与は、elevated plus-maze testやconflict testなどの不安の動物モデルで不安増強を示し、非ペプチド性CCK受容体拮抗薬の投与は抗不安効果を示した。これらの研究でCCKが不安と関連していることが示されたが、いくつかの問題点がある。ひとつはペプチドであるCCKを末梢投与した場合、それらが血液脳関門を通過するかどうかという問題である。また、CCK受容体のサブタイプのうち、AとBのいずれが不安に関与しているのかという問題がある。抗不安作用が認められているCCK拮抗薬はB受容体に親和性が高いという報告が多いが、A受容体拮抗薬が抗不安作用を示したという報告もある。

筆者はこれらの問題点を解決するため、非ペプチドの選択的なCCKB受容体拮抗薬であるLY288513、比較的選択的なCCKA受容体拮抗薬であるlorglumide、および中枢に移行しない末梢性のCCKA/B受容体拮抗薬であるloxiglumideの急性投与が、不安の動物モデルであるラットのconditioned fear stress (CFS)に及ぼす効果について検討した。CFSはfootshockを負荷してショック箱に条件付けを行ったラットを、再度同じショック箱に入れる操作によって惹起される心理的ストレスである。ラットは危険や苦痛を予測し、無動のまま体をすくませる防御行動(freezing)をとるが、この行動は抗不安薬の投与で拮抗される。

結果であるが、選択的CCKB受容体拮抗薬であるLY288513 (0.03-0.3 mg/kg)のfootshock30分前の投与は24時間後のCFS試験時におけるfreezingの出現を有意に抑制した。footshock5分後の投与がfreezingの出現に影響しなかったことから、footshock30分前のLY288513投与の効果は、CFSの時まで24時間続く長期効果によるものではないと考えられる。また、freezingの出現を有意に抑制した0.3 mg/kgの用量が痛覚に影響しなかったことから、footshock30分前の

LY288513投与によるfreezingの抑制効果は、鎮痛作用によるものではないと考えられる。したがって、LY288513の投与はconditioned fearの獲得過程を阻止したものと考えられる。LY288513 (0.03-0.3 mg/kg) のCFS30分前の投与もまた、freezingの出現を有意に抑制した。LY288513の0.3 mg/kgの投与は自発運動量に影響しなかったことから、自発運動量亢進による非特異的効果は除外できる。これらの結果は、LY288513の投与がconditioned fearの発現過程を阻止したことを意味し、この効果は抗不安作用であると考えられる。一方、比較的選択的なCCKA-受容体拮抗薬であるlorglumideのCFS30分前の投与は、1.0 mg/kgの用量でのみ有意にfreezingを抑制した。lorglumideはCCKA受容体拮抗薬であるが、in vitroの受容体結合実験で、LY288513のCCKB受容体阻害能の約30分の1のCCKB受容体阻害能を有しており、lorglumide1.0 mg/kgの用量はCCKB受容体阻害能からいえばLY288513のfreezingに対する最小有効用量である0.03 mg/kgに相当する。つまりlorglumide1.0 mg/kgでの効果はCCKB受容体阻害を介すると考えても矛盾しない。また中枢にほとんど移行しないことが確認されているCCKA/B受容体拮抗薬であるloxiglumideの投与は、30 mg/kgの高用量でもfreezingに影響しなかった。これらの結果は、末梢のCCKAおよびCCKB受容体は抗不安作用に関与していないことを示唆する。以上より、中枢のCCKB受容体が不安に関与していると考えられる。

次に、ストレス時におけるCCK受容体拮抗薬の脳内モノアミン系に対する効果を調べるため、CCK受容体拮抗薬投与時のラットの脳内モノアミン代謝を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて測定した。　LY288513のconditioned fear群と非conditioned fear群に対する投与では、LY288513投与によって内側前頭前野の5-HT、側坐核のDA、DOPAC、HVAの増加が認められ、2元配置分散分析で交互作用がないことから、CFSに関係しないLY288513単独の効果であると考えられた。またCFSによって側坐核、線条体、扁桃体、海馬のDOPAC、内側前頭前野、側坐核、線条体のHVA、内側前頭前野、扁桃体の5-HIAAが増加し、2元配置分散分析で交互作用がないことから、LY288513投与に関係しないCFS単独の効果であると考えられた。CFSとLY288513投与の交互作用は内側前頭前野のDOPACで認められ、CFSで内側前頭前野のDOPACが増加したが、LY28851投与によってCFSによるDOPAC増加がさらに増強した。したがって、内側前頭前野のDOPAC増加がLY288513の抗不安作用と関連している可能性が示唆される。

さらにfootshock負荷時のラットの内側前頭前野、側坐核、線条体、扁桃体、海馬、中心灰白質でのCCK8Sの含量をradioimmunoassay (RIA)で定量した。このうち、扁桃体でCCK8S含量の低下が認められた。この結果から、ストレスによってCCK8Sのシナプス間隙への放出および代謝が増加してCCK8Sが枯渇した可能性と、CCKの合成自体が低下した可能性が考えられるが、ラットの断頭はストレス負荷を開始してから30分後に行われており、時間経過から前者の可能性が高いものと思われる。これは、不安において扁桃体のCCKが関与していることを示唆している。

以上より、cholecystokininB (CCKB) 受容体拮抗薬が抗不安作用を有すること

を示し、同薬物の作用が、内側前頭前野のdopamine代謝の亢進と関連している可能性を示唆した。さらにストレス時の脳内CCK含量の検討から、扁桃体もCCKの不安惹起作用と関連している可能性を示した。

学位論文審査の要旨

主　査　教　授　小　山　　司
副　査　教　授　菅　野　盛　夫
副　査　教　授　吉　岡　充　弘

学位論文題名

不安における脳内 cholecystokinin の関与について

最近、神経ペプチドであるcholecystokinin (CCK)が内在性の不安関連物質として注目されている。sulphated CCK8(CCK8S)による海馬細胞の発火がbenzodiazepineによって抑制されることから、脳内CCK受容体の活性化が不安を惹起することが予想され、実際、ヒトに対するCCK４の静脈内投与はパニック様発作を引き起こした。またCCK４やCCK8Sの投与は不安の動物モデルで不安増強を示し、非ペプチド性CCK受容体拮抗薬の投与は抗不安効果を示した。これらの研究でCCKが不安と関連していることが示されたが、ペプチドであるCCKが血液脳関門を通過するかどうか、またCCK受容体のサブタイプのうち、AとBのいずれが不安に関与しているかという問題が残された。筆者はこれらの問題点を解決するため、非ペプチドの選択的なCCK受容体拮抗薬が、不安の動物モデルであるラットのconditioned fear stress (CFS)に及ぼす効果について検討した。CFSはfootshockを負荷してショック箱に条件付けを行ったラットを、再度同じショック箱に入れる操作によって惹起される心理的ストレスである。ラットは危険や苦痛を予測し、無動のまま体をすくませる防御行動(freezing)をとる。結果であるが、選択的CCKB受容体拮抗薬であるLY288513のfootshock30分前の投与はCFS試験時におけるfreezingの出現を有意に抑制した。したがって、LY288513の投与はconditioned fearの獲得過程を阻止したものと考えられる。LY288513のCFS30分前の投与もまた、freezingの出現を有意に抑制した。この結果は、LY288513の投与がconditioned fearの発現過程を阻止したことを意味し、この効果は抗不安作用であると考えられる。一方、比較的選択的なCCKA受容体拮抗薬であるlorglumideのCFS30分前の投与は、高用量でのみ有意にfreezingを抑制した。lorglumideはLY288513の約30分の1のCCKB受容体阻害能を有しており、lorglumideの高用量での効果はCCKB受容体阻害を介すると考えても矛盾しない。中枢にほとんど移行しないことが確認されているCCKA/B受容体拮抗薬である

loxiglumideの投与は、高用量でもfreezingに影響しなかった。以上より、中枢のCCKB受容体が不安に関与していると考えられる。次に、ストレス時におけるCCK受容体拮抗薬の脳内モノアミン代謝に対する効果を調べるため、CCK受容体拮抗薬投与時のラットの脳内モノアミン代謝を高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。　LY288513のconditioned fear群と非conditioned fear群に対する投与では、CFSとLY288513投与の交互作用が内側前頭前野のDOPACで認められ、LY28851投与によってCFSによるDOPAC増加が増強した。したがって、内側前頭前野のDOPAC増加がLY288513の抗不安作用と関連している可能性が示唆された。さらにfootshock負荷時のラットの脳内CCK8Sの含量をradioimmunoassayで定量したところ、扁桃体で含量の低下が認められた。この結果から、ストレスによってCCK8Sのシナプス間隙への放出が増加してCCK8Sが枯渇した可能性が示唆された。これは、不安において扁桃体のCCKが関与していることを示唆している。以上の発表に際し、質問を受け解答した。吉岡充弘教授。（1）ＣＣＫＢ受容体拮抗薬のCFSに対する効果は、記憶に対する効果ではないのか。-CFSの発現に対する効果は抗不安効果だが、獲得については記憶に対する効果を除外できない。（2）不安と脳内ドーパミン系の関係は。-2次的なものと考える。（3）ＣＣＫＢ受容体拮抗薬は筋弛緩や依存などの副作用を有するか。-持たない。菅野盛夫教授。（1）ＣＣＫ作働性ニューロンとGABAとの関係は。-ＣＣＫはGABAのco-transmitterとして作用している。（2）CFSの雄雌差と経時的変化について。-雄雌差は確認していない。CFSは獲得2週間後にも保持されていた。（3）ＣＣＫＢ受容体拮抗薬の臨床応用について。-抗潰瘍薬として開発が進められている。（4）CFSの不安の動物モデルとしての有用性について。-ベンゾジアゼピン以外の抗不安薬のスクリーニングにも適しており、有用である。

本研究の結果は、不安と脳内CCKの関係を明らかにするものである。また、今後、不安の病態生理をさらに解明するのに役立つことが期待される。審査員一同は、これらの成績を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。