実験てんかんモデルマウスを用いた情動機能変化及び治療薬の探索

武智研志

Neurobehavioral Comorbidities in Pentylenetetrazol-kindled Mice and Role of the $\alpha 4\beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptor

Kenshi Takechi

*Clinical Trial Center for Developmental Therapeutics, Tokushima University Hospital;
2-50-1 Kuramoto-cho, Tokushima 770-8503, Japan.*

(Received June 14, 2019)

Patients with epilepsy are often affected by not only seizures but also a variety of cognitive and psychiatric comorbidities that further impair their quality of life. However, it is unclear whether epilepsy is associated with psychic functioning. The aim of the present study was to clarify the effects of kindling-induced epileptic seizures on psychic functioning, using behavioral pharmacological tests. Pentylenetetrazol (PTZ)-kindled mice displayed impaired motor coordination (in the rotarod test), and social approach impairment (in the three-chamber social test) compared with vehicle mice. Intraperitoneal ABT-418 treatment (0.05 mg/kg) alleviated these behavioral abnormalities in PTZ-kindled mice. Immunolabeling of tissue sections demonstrated that expression of the $\alpha 4$ subunit of the $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor in the piriform cortex was significantly decreased in PTZ-kindled mice. In contrast, expression of the synaptic adhesion molecule neuroligin 3 (NLG3) was significantly higher in the piriform cortex of PTZ-kindled mice compared with vehicle mice. Collectively, our findings suggest that attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD)-like or autistic-like behavioral abnormalities associated with epilepsy are closely linked to downregulation of the $\alpha 4$ subunit of the $\alpha 4\beta 2$ receptor and upregulation of NLG3 in the mouse piriform cortex. In summary, this study indicates that ABT-418 is a good candidate for the treatment of patients with epilepsy complicated by psychiatric symptoms such as autism and ADHD.

Key words——epilepsy; kindling; psychiatric disorder; nicotine

1. 序論

近年、わが国においては、様々な抗てんかん薬が上市され臨床現場において用いられているが、抗てんかん薬により発作が抑制されているてんかん患者においても約 50% の患者で精神症状が発現しており、うつ症状、attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD) 及び自閉症などの様々な精神医学的合併症が患者の生活の質の低下を引き起こし、自殺率の上昇にもつながることが報告されている。¹⁻⁴⁾しかし、これまでの抗てんかん薬の開発は、てんかんの主症状であるけいれん発作を評価指標として開発されてきた経緯から、臨床で問題となっている精

神医学的合併症にフォーカスを当てて開発された薬剤はない。そのため、様々な抗てんかん薬が上市されている現在でも、てんかん患者の精神医学的合併症を治療するための創薬開発は喫緊の課題と考えられる。さらに、臨床において精神機能に対するてんかんそのものの影響を評価することは倫理的な側面からも難しく、病態の詳細な発生機序は不明な点が多く、てんかんの精神症状に対する有効な治療薬の開発が難渋している。本総説では、筆者がこれまでに行ってきた実験てんかんモデルマウスを用いた、てんかんにより誘発される情動機能の変化並びに治療薬の探索に関する研究について解説する。

2. てんかんモデルを用いた情動機能変化の検討

本研究ではてんかんの代表的な動物モデルである、キンドリングモデルを作製し、行動薬理学的手法を用いて検討した。キンドリングモデルは、非競合的な GABA_A 受容体拮抗作用がある pen-

徳島大学病院臨床試験管理センター (〒770-8503 徳島市蔵本町 2 丁目 50-1)

e-mail: takechi.kenshi@tokushima-u.ac.jp

本総説は、2018 年度日本薬学会中国四国支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

Fig. 1. Effects of ABT-418 and Central Drugs on Rotarod Performance in PTZ-kindled Mice

Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. of 8–12 mice. Each drug (TZD, trazodone; MPD, methylphenidate; ABT, ABT-418) was injected intraperitoneally 30 min before rotarod testing. Performance on the rotarod was measured over a 5-min period. * $p < 0.05$ vs. vehicle group; # $p < 0.05$ vs. kindled 48 h group.

tylenetetrazol (PTZ) を4週齢のICRマウスに40 mg/kgを腹腔内に隔日投与することで作製した。比較対照群としてPTZの代わりにsalineを投与した群を設けて検討した。本研究では、キンドリングモデルを用いて、基礎行動、記憶関連行動及び情動関連行動と行動薬理学試験を3種類に分類して検討した。てんかんのモデル動物は、主症状がけいれん発作であることから、基礎行動として考えられる自発運動量及び筋力の低下が予想される。そこで、まずPTZキンドリングモデルの基礎行動を評価する目的でopen field test (OFT)、muscle relaxation test (MRT) 及びrota-rod test (RRT) を行った。その結果、OFT 及び MRT の両試験において、キンドリングマウスと vehicle 群の間に有意な差は認められなかった。一方、RRT では、PTZ キンドリング群は vehicle 群に比べ有意な回転棒からの落下時間の短縮が認められた (Fig. 1)。この結果から PTZ キンドリングモデルは、自発運動量や筋力の変化は生じていないため、記憶関連行動や情動関連行動に関連した行動薬理学試験の評価が可能であること、また RRT の落下時間の短縮より、協調運動障害や運動記憶に対する障害が引き起こされている可能性が考えられた。

次に、てんかんによる記憶に対する影響を評価する目的で、Y-maze test 及び novel objective location test (NOLT) を用いて検討を行った。その結果、PTZ キンドリングマウスは、Y-maze test では、短期記憶の評価指標である spontaneous alternation は vehicle 群と比べ有意な差はみられなかった。⁵⁾ 一方、NOLT では vehicle 群が物体配置について記憶が保

持できた試験条件に対して、PTZ キンドリング群は新規の物体配置に対して有意な滞在時間の延長が観察されなかった。⁵⁾ この結果は、PTZ キンドリングマウスでは、短期記憶に対する変化はないが、記憶の保持機能が重要となってくる長期記憶の低下が示唆された。

これらの結果を基に、続いて情動機能に対する行動薬理学試験を行った。本研究では、不安症状を評価する目的で elevated plus maze test (EPMT) を用いて評価を行った。EPMT は、壁のある closed arm と壁のない open arm からなり、マウスが高いという不安や恐怖を示すと open arm への滞在時間が減少するという習性を利用した評価系である。本検討では、open arm への滞在時間及び open arm への進入回数は vehicle 群に比べて PTZ キンドリングマウスでは有意に増加した (Fig. 2)。このことから、PTZ キンドリングでは不安の閾値が上がっており、臨床での不穏症状に似た状態を引き起こしている可能性が考えられた。一方、抗うつ薬のスクリーニング方法として用いられている forced swim test (FST) では、vehicle 群と PTZ キンドリング群で不動時間に有意な差は観察されなかったが、ドパミントランスポーター (DAT) 及びノルアドレ

武智研志

2006 年京都薬科大学薬学部卒業、2011 年岡山大学大学院医歯薬学総合研究科博士後期課程修了、2011 年愛媛大学医学部附属病院薬剤部薬剤師、2016 年徳島大学病院臨床試験管理センター 特任助教、専門分野は中枢薬理学、臨床研究。目標：基礎と臨床をつなぎ創薬に貢献する。

Fig. 2. Behavior of PTZ-kindled Mice in the Elevated Plus Maze Test

A, Open arm entries in the elevated plus maze test. B, Closed arm entries in the elevated plus maze test. C, Time spent in the open arm in the elevated plus maze test. DIZ, diazepam. Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. of 7–11 mice. * $p < 0.05$ vs. vehicle group; ** $p < 0.01$ vs. vehicle group; # $p < 0.05$ vs. kindled 48 h group.

ナリントランスポーター (NET) 阻害剤であるブプロピオン及びアトモセチンの投与により、不動時間の短縮作用が PTZ キンドリングで低用量より認められた。⁶⁾ 本結果から、PTZ キンドリングマウスではうつ症状自体には変化が生じていないが、てんかんの形成によってトランスポーターの発現変化が影響している可能性が考えられた。最後に、社会行動の変化を検討するために、three chamber social test (TCST) を行った。本研究では TCST は test 1 と test 2 の二段階に分けて社会行動の評価を行った。すなわち、test 1 ではこれまで一度もあったことのないマウス (stranger 1) が入ったケージのある部屋と空のケージのある部屋がある状況での各部

屋への滞在時間を評価し、test 2 では、一度もあったことのないマウス (stranger 2) と先ほどの stranger 1 のいる部屋へを用意し、マウスの滞在時間を検討した。vehicle 群では test 1 においては、空のケージのある部屋に比して stranger 1 のいる部屋への滞在時間が長く、test 2 においては stranger 2 への滞在時間が stranger 1 のいる部屋への滞在時間よりも有意に延長した (Fig. 3)。しかし、PTZ キンドリングマウスでは、test 1 及び test 2 のいずれにおいても、vehicle 群とは異なり両部屋への滞在時間に有意な差は観察されなかった (Fig. 3)。したがって、PTZ キンドリングは vehicle 群が行う通常の社会性行動が見受けられなくなったことか

Fig. 3. Effects of ABT-418 on Social Approach in PTZ-kindled Mice

A, Representative animal tracks during the test session for vehicle-treated mice in Tests 1 and 2. B, Time spent in the different zones of the area during Test 1 for vehicle-treated, kindled and ABT-418-treated kindled mice. ABT-418 was injected intraperitoneally 30 min before Test 1. The social approach time was measured over a 5-min period for each test. C, Time spent in the different zones of the area during Test 2 for vehicle-treated, kindled and ABT-418-treated kindled mice. Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. of 8–10 mice. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, within-group comparison to the opposite side.

ら、てんかんによって社会性行動に障害をきたしている可能性が考えられた。本研究で行った一連の行動薬理学試験の結果から、PTZ キンドリングマウスは、てんかんの主症状であるけいれん発作だけでなく、協調運動障害、認知機能の低下、不穏症状及び社会性障害などの情動機能障害が生じていることが考えられ、臨床上的てんかん患者における精神医学的合併症を反映している有用なモデルであることが示唆された。

3. てんかん誘発情動機能障害に対する治療薬の探索

筆者は、前述した行動薬理学試験の結果より、PTZ キンドリングモデルがてんかんによる精神医

学的合併症の治療薬を探索できると考え、てんかん誘発の情動機能障害に対する治療薬の検討を行った。てんかん患者は、自閉症や ADHD を併発している割合が高いことは、既にいくつか報告されており、近年 ADHD の治療薬として $\alpha 4\beta 2$ ニコチン受容体作動薬の治験が行われており、その有効性が報告されている。^{7,8)} また、自閉症患者の研究において、皮質下において $\alpha 4$ 受容体の発現低下も報告されている。⁹⁾ そこで、本研究では PTZ キンドリングモデルの情動機能障害に対する $\alpha 4\beta 2$ ニコチン受容体作動薬である ABT-418 の影響を検討した。RRT 試験で検討したところ、PTZ キンドリングモデルの落下時間の短縮は、ABT-418 により用量依存的

Fig. 4. Effect of PTZ Kindling on the Expression of the α 4 Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit and Neuroligin (NLG) 3 in Brain Sections

A, Expression of the α 4 subunit in the piriform cortex. B, Expression of NLG3 in the piriform cortex. Arrows indicate NLG3-positive cells. Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. of 4–5 mice. * p < 0.05, *** p < 0.001 vs. vehicle.

かつ有意に改善された (Fig. 1). また, 興味深いことに臨床, 精神症状に対して使用される薬剤であるセロトニン 2A (5-HT_{2A}) 受容体拮抗薬であるトラゾドン及びドパミン再取り込み阻害作用を有するメチルフェニデートを PTZ キンドリングに投与しても, 落下時間の短縮は改善されなかった (Fig. 1). このことから, ABT-418 がてんかん誘発情動機能障害に対して改善を示す可能性が考えられ, 続いて EPMT を用いて評価を行った. その結果, PTZ キンドリングは vehicle 群に比して open arm への滞在時間が延長していたが, ABT-418 の投与により, 滞在時間の延長が改善された (Fig. 2). 一方, 抗てんかん作用のあるジアゼパム投与では, PTZ キンドリングによる滞在時間の延長は改善されなかった (Fig. 2). 次に, TCST を用いて ABT-418 の影響を検討したところ, PTZ キンドリングモデルによる社会性行動の障害は, ABT-418 の投与により前述した test 1 及び test 2 のいずれにおいても改善された. すなわち, ABT-418 により test 1 では stranger 1 のいる部屋に滞在し, test 2 においては stranger 2 マウスのいる部屋に長時間滞在するという, 健常なマウスが行う社会性行動を示した (Fig. 3). 以上の研究結果から, α 4 β 2 ニコチン受容体作動薬は, PTZ キンドリングモデルの情動機能障害に対して有効であることが認められ, てんかん患者における精神医学的合併症に対する新た

な治療薬となることが示唆された. そこで次に, 筆者は PTZ キンドリングモデルの情動機能障害のメカニズムを解明するために, 免疫組織学的検討を行った. てんかんは脳全体の興奮をきたす疾患のため, 様々な脳部位の影響が考えられるが, 既知の報告より PTZ キンドリングモデルにおいて脳内の機能的活性を評価マーカーである c-Fos の変化が活発であり, キンドリングの形成に重要な部位と考えられている梨状皮質を用いて, ニコチン受容体 α 4 サブユニットを染色した.¹⁰⁾ その結果, PTZ キンドリングでは vehicle 群に比ベ有意な α 4 サブユニットの発現低下が確認された (Fig. 4). シナプス機能の変化を検討する目的で, シナプス前・後終末を架橋し, シナプスの形成や機能面での修飾を担うシナプス接着因子の 1 つである neuroligin3 (NLG3) を染色した.¹¹⁾ その結果, PTZ キンドリング群において有意な NLG3 の増加が認められた (Fig. 4). NLG3 の欠損や点変異マウスは, 社会性行動の低下を示し, ヒトの自閉症モデルとして報告されている.^{12,13)} また, てんかん患者において自閉症や ADHD を併発率が高いことから, PTZ キンドリングによる情動機能障害にも NLG3 の増大による, 過剰な神経ネットワークの構築が関与していると考えられる.^{14,15)} さらに, 筆者は他のモノアミン関連物質の変化を検討する目的で, 前述した FST 試験のブプロピオンとアトモキセチンの実験結果を踏ま

え, DAT 及び NET の免疫染色を行った. PTZ キンドリングモデルでは, DAT の発現変化はみとめられなかったが, NET は皮質下において発現が増加していることが分かった.⁶⁾ 以上のことから, てんかんはこれまで, 抑制系の神経系である GABA 神経系と興奮系の神経系であるグルタミン酸神経系のアンバランスによって生じていることは周知の事実であるが, 本研究によって, 情動機能障害の発症においては, ニコチン受容体の変化や過剰なシナプスネットワークの構築あるいは NET などのトランスポーターの発現変化が係わって生じていることが示唆された. さらに, 本研究で確認された情動機能障害は, キンドリング形成による $\alpha 4$ サブユニットの発現低下が原因の 1 つと考えられるが, ABT-418 は脳内の $\alpha 4\beta 2$ 受容体を刺激することによって, $\alpha 4\beta 2$ 受容体の作用を高めることにより情動機能に対する改善効果を示したと考えられた.

4. 結論

本研究結果から, てんかんモデル動物においても, ADHD や自閉症に似た情動機能障害が誘発されることが確認された. その精神症状は, 既存の精神疾患に対する治療薬では治療コントロールが難しいが, ニコチン受容体作動薬が新規治療薬となることが示唆された. 今後更なる検討が必要ではあるが, キンドリングなどのてんかんモデル動物のけいれん発作以外の症状を評価指標として研究を進めていくことは, これまでにないユニークな次世代の抗てんかん薬が開発される可能性が考えられ, 本研究成果は, てんかん患者の QOL に対する新たな薬物療法の開発に貢献できるものと考えられる.

謝辞 本研究を遂行するにあたり, 終始ご指導を賜りました徳島大学大学院医歯薬学研究部臨床薬理学分野 石澤啓介教授, 並びに臨床試験管理センター 楊河宏章センター長, 愛媛大学 荒木博陽名誉教授に謹んで感謝の意を表します. 以上の先生方を始め, 共同研究者の皆様に深く感謝いたします.

利益相反 開示すべき利益相反はない.

REFERENCES

- 1) Brooks-Kayal A. R., Bath K. G., Berg A. T., Galanopoulou A. S., Holmes G. L., Jensen F.

- E., Kanner A. M., O'Brien T. J., Whittemore V. H., Winawer M. R., Patel M., Scharfman H. E., *Epilepsia*, **54** (Suppl. 4), 44–60 (2013).
- 2) Hernan A. E., Alexander A., Jenks K. R., Barry J., Lenck-Santini P. P., Isaeva E., Holmes G. L., Scott R. C., *Neurobiol. Dis.*, **63**, 25–34 (2014).
- 3) Selassie A. W., Wilson D. A., Martz G. U., Smith G. G., Wagner J. L., Wannamaker B. B., *Epilepsy Res.*, **108**, 305–315 (2014).
- 4) Karouni M., Arulthas S., Larsson P. G., Rytter E., Johannessen S. I., Landmark C. J., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **66**, 1151–1160 (2010).
- 5) Takechi K., Suemaru K., Kawasaki H., Araki H., *Yakugaku Zasshi*, **132**, 179–182 (2012).
- 6) Takechi K., Suemaru K., Kawasaki H., Araki H., *Eur. J. Pharmacol.*, **673**, 33–39 (2011).
- 7) Wilens T. E., Biederman J., Spencer T. J., Bostic J., Prince J., Monuteaux M. C., Soriano J., Fine C., Abrams A., Rater M., Polisner D., *Am. J. Psychiatry*, **156**, 1931–1937 (1999).
- 8) Bain E. E., Robieson W., Pritchett Y., Garimella T., Abi-Saab W., Apostol G., McGough J. J., Saltarelli M. D., *Neuropsychopharmacology*, **38**, 405–413 (2013).
- 9) Martin-Ruiz C. M., Lee M., Perry R. H., Baumann M., Court J. A., Perry E. K., *Mol. Brain Res.*, **123**, 81–90 (2004).
- 10) Pollock E., Everest M., Brown A., Poulter M. O., *Neurobiol. Dis.*, **70**, 21–31 (2014).
- 11) Maćkowiak M., Mordalska P., Wedzony K., *Pharmacol. Rep.*, **66**, 830–835 (2014).
- 12) Radyushkin K., Hammerschmidt K., Boretius S., Varoqueaux F., El-Kordi A., Ronnenberg A., Winter D., Frahm J., Fischer J., Brose N., Ehrenreich H., *Genes Brain Behav.*, **8**, 416–425 (2009).
- 13) Ellegood J., Lerch J. P., Henkelman R. M., *Autism Res.*, **4**, 368–376 (2011).
- 14) Han S., Tai C., Westenbroek R. E., Yu F. H., Cheah C. S., Potter G. B., Rubenstein J. L., Scheuer T., de la Iglesia H. O., Catterall W. A., *Nature*, **489**, 385–390 (2012).
- 15) Lugo J. N., Swann J. W., Anderson A. E., *Exp. Neurol.*, **256**, 74–80 (2014).