

代謝型グルタミン酸受容体拮抗薬及び
Ketamine の抗うつ作用の機序に関する研究

**Studies on the mechanisms of the antidepressant effects of
the metabotropic glutamate receptor antagonists and
an *N*-methyl-*D*-aspartate receptor antagonist, Ketamine**

2016年3月

福本 健一

目次

緒言	1
第 1 章 新奇環境摂食抑制試験における代謝型グルタミン酸 5 受容体拮抗薬の作用 とその作用機序の検討	7
1-1 序論	7
1-2 実験材料・方法	8
1-2-1 動物	8
1-2-2 試薬	8
1-2-3 新奇環境摂食抑制試験	8
1-2-4 脳室内投与	9
1-2-5 統計	9
1-3 結果	10
1-3-1 新奇環境摂食抑制試験における Diazepam 及び Fluvoxamine の作用	10
1-3-2 新奇環境摂食抑制試験における mGlu5 受容体拮抗薬の抗うつ様作用	11
1-3-3 mGlu5 受容体拮抗薬、Diazepam 及び Fluvoxamine の 摂餌量に及ぼす作用	12
1-3-4 mGlu5 受容体拮抗薬の抗うつ様作用発現における タンパク質合成の関与	13
1-3-5 mGlu5 受容体拮抗薬の抗うつ様作用発現における mTOR シグナルの関与	14
1-3-6 Ketamine の抗うつ様作用発現における mTOR シグナルの関与	15
1-3-7 Ketamine の摂餌量に及ぼす作用	16
1-3-8 mGlu5 受容体拮抗薬の抗うつ様作用発現における TrkB の関与	16
1-4 考察	17
第 2 章 新奇環境摂食抑制試験における代謝型グルタミン酸受容体拮抗薬 及び Ketamine の作用に対するセロトニン神経系の関与	20
2-1 序論	20
2-2 実験材料・方法	22
2-2-1 動物	22
2-2-2 試薬	22
2-2-3 新奇環境摂食抑制試験	22
2-2-4 セロトニン遊離促進薬誘発首振り行動試験	22
2-2-5 セロトニン量測定	23
2-2-6 統計	23
2-3 結果	24
2-3-1 mGlu5 受容体拮抗薬の抗うつ様作用発現における AMPA 受容体の関与	24

2-3-2	mGlu2/3 受容体拮抗薬の抗うつ様作用発現における AMPA 受容体の関与	25
2-3-3	Ketamine の抗うつ様作用発現における AMPA 受容体の関与	26
2-3-4	AMPA 受容体増強薬の抗うつ様作用発現における AMPA 受容体の関与	27
2-3-5	mGlu2/3 受容体拮抗薬及び AMPA 受容体増強薬の摂餌量に及ぼす作用	28
2-3-6	セロトニン枯渴薬のセロトニン量に及ぼす作用	28
2-3-7	セロトニン遊離促進薬誘発首振り行動試験における セロトニン枯渴薬の作用	29
2-3-8	mGlu5 受容体拮抗薬の抗うつ様作用発現におけるセロトニンの関与	30
2-3-9	mGlu2/3 受容体拮抗薬の抗うつ様作用発現におけるセロトニンの関与	31
2-3-10	Ketamine の抗うつ様作用発現におけるセロトニンの関与	32
2-3-11	AMPA 受容体増強薬の抗うつ様作用発現におけるセロトニンの関与	33
2-3-12	mGlu5 受容体拮抗薬の抗うつ様作用発現における 5-HT _{1A} 受容体及び 5-HT _{2A/2C} 受容体の関与	34
2-3-13	mGlu2/3 受容体拮抗薬の抗うつ様作用発現における 5-HT _{1A} 受容体及び 5-HT _{2A/2C} 受容体の関与	35
2-3-14	Ketamine の抗うつ様作用発現における 5-HT _{1A} 受容体及び 5-HT _{2A/2C} 受容体の関与	36
2-3-15	AMPA 受容体増強薬の抗うつ様作用発現における 5-HT _{1A} 受容体及び 5-HT _{2A/2C} 受容体の関与	37
2-3-16	5-HT _{1A} 受容体作動薬の作用	38
2-4	考察	39
第3章 代謝型グルタミン酸 2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ作用における		
	内側前頭前皮質－背側縫線核回路を介したセロトニン神経の関与	43
3-1	序論	44
3-2	実験材料・方法	44
3-2-1	動物	44
3-2-2	試薬	44
3-2-3	強制水泳試験	44
3-2-4	脳内微量注入法	44
3-2-5	自発運動量試験	45
3-2-6	免疫染色	45
3-2-7	統計	46
3-3	結果	47
3-3-1	強制水泳試験における Paroxetine の作用	47
3-3-2	強制水泳試験における mGlu2/3 受容体拮抗薬の作用	48
3-3-3	強制水泳試験における Ketamine の作用	48

3-3-4	Paroxetine の抗うつ作用発現におけるセロトニンの関与	49
3-3-5	mGlu2/3 受容体拮抗薬の抗うつ作用発現におけるセロトニンの関与	50
3-3-6	Ketamine の抗うつ作用発現におけるセロトニンの関与	51
3-3-7	mGlu2/3 受容体拮抗薬の内側前頭前皮質内投与による作用	52
3-3-8	Ketamine の内側前頭前皮質内投与による作用	53
3-3-9	mGlu2/3 受容体拮抗薬の内側前頭前皮質内投与による抗うつ作用発現 におけるセロトニンの関与	54
3-3-10	Ketamine の内側前頭前皮質内投与による抗うつ作用発現における セロトニンの関与	55
3-3-11	mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の自発運動量に及ぼす作用	56
3-3-12	mGlu2/3 受容体拮抗薬の抗うつ作用発現における AMPA 受容体の関与	58
3-3-13	Ketamine の抗うつ作用発現における AMPA 受容体の関与	59
3-3-14	mGlu2/3 受容体拮抗薬の抗うつ作用発現における 内側前頭前皮質の AMPA 受容体の関与	60
3-3-15	Ketamine の抗うつ作用発現における 内側前頭前皮質の AMPA 受容体の関与	61
3-3-16	mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の内側前頭前皮質内投与における 背側縫線核のセロトニン神経活性の関与	63
3-3-17	mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の全身投与における 背側縫線核のセロトニン神経活性の関与	66
3-4	考察	71
	総括	73
	引用文献	80

本学位論文は、下記の原著論文を基に作成され、東京薬科大学大学院薬学研究科に提出されたものである。

1. Kenichi Fukumoto, Michihiko Iijima and Shigeyuki Chaki., The Antidepressant Effects of an mGlu2/3 Receptor Antagonist and Ketamine Require AMPA Receptor Stimulation in the mPFC and Subsequent Activation of the 5-HT Neurons in the DRN., *Neuropsychopharmacology*, 41, 1046-1056 (2016)
2. Kenichi Fukumoto and Shigeyuki Chaki., Involvement of serotonergic system in the effect of a metabotropic glutamate 5 receptor antagonist in the novelty-suppressed feeding test., *J Pharmacol Sci*, 127, 57-61 (2015)
3. Kenichi Fukumoto, Michihiko Iijima and Shigeyuki Chaki., Serotonin-1A receptor stimulation mediates effects of a metabotropic glutamate 2/3 receptor antagonist, 2S-2-amino-2-(1S,2S-2-carboxycycloprop-1-yl)-3-(xanth-9-yl)propanoic acid (LY341495), and an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, ketamine, in the novelty-suppressed feeding test., *Psychopharmacology (Berl)*, 231, 2291-2298 (2014)
4. Michihiko Iijima, Kenichi Fukumoto and Shigeyuki Chaki., Acute and sustained effects of a metabotropic glutamate 5 receptor antagonist in the novelty-suppressed feeding test., *Behav Brain Res*, 235, 287-292 (2012)

本研究で用いた主な化合物の構造式と薬理作用

Compound	IUPAC name	Structural formula	Function
LY341495	2S-2-amino-2-(1S,2S-2-carboxycycloprop-1-yl)-3-(xanth-9-yl)propanoic acid		mGlu2/3 receptor antagonist
MPEP	2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine		mGlu5 receptor antagonist
Ketamine	(R)-2-(2-chlorophenyl)-2-(methylamino)cyclohexanone		NMDA receptor antagonist
CX546	(2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl)-1-piperidinylmethanone		AMPA receptor potentiator
Rapamycin	(3S,6R,7E,9R,10R,12R,14S,15E,17E,19E,21S,23S,26R,27R,34aS)-9,10,12,13,14,21,22,23,24,25,26,27,32,33,34,34a-hexadecahydro-9,27-dihydroxy-3-[(1R)-2-[(1S,3R,4R)-4-hydroxy-3-methoxycyclohexyl]-1-methylethyl]-10,21-dimethoxy-6,8,12,14,20,26-hexamethyl-23,27-epoxy-3H-pyrido[2,1-c][1,4]-oxazacyclohentacontine-1,5,11,28,29(4H,6H,31H)-pentone		mTOR inhibitor
Anisomycin	(2R,3S,4S)-2-[(4-methoxyphenyl)methyl]-3,4-pyrrolidinediol 3-acetate		Protein synthesis inhibitor
K252a	(9S,10R,12R)-2,3,9,10,11,12-hexahydro-10-hydroxy-9-methyl-1-oxo-9,12-epoxy-1H-diindolo[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pyrrolo[3,4-i][1,6]benzodiazocine-10-carboxylic acid methyl ester		Trk tyrosine kinase inhibitor
NBQX	2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide		AMPA receptor antagonist
PCPA	(S)-2-amino-3-(4-chlorophenyl)propanoic acid		Tryptophan hydroxylase inhibitor
WAY100635	N-[2-(4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl)ethyl]-N-(2-pyridyl)cyclohexanecarboxamide		5-HT _{1A} receptor antagonist
Ritanserin	6-[2-[4-[bis(4-fluorophenyl)methylidene]piperidin-1-yl]ethyl]-7-methyl-[1,3]thiazolo[2,3-b]pyrimidin-5-one		5-HT _{2A/2C} receptor antagonist

略語

AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid
BDI: Beck Depression Inventory
BDNF: brain-derived neurotrophic factor
BP: bipolar disorder
CGI-I: Clinical Global Impression-Improvement scale
ECT: electric convulsive therapy
eIF4B: eukaryotic initiation factor 4B
ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay
FST: forced swimming test、強制水泳試験
GABA: γ -aminobutyric acid
HAM-D: Hamilton Rating Scale for Depression
IN: intranasal
IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry
IV: intravenous
MADRS: Montgomery-Asberg Depression Rating Scale
MDD: major depressive disorder
Met: methionine
mGlu: metabotropic glutamate、代謝型グルタミン酸
mPFC: medial prefrontal cortex、内側前頭前皮質
mTOR: mammalian target of rapamycin
NMDA: *N*-methyl-D-aspartate
NPY: neuropeptide Y
NSFT: novelty-suppressed feeding test、新奇環境摂食抑制試験
PET: positron emission tomography
PFC: prefrontal cortex、前頭前皮質
PGI-I: Patient Global Impression-Improvement scale
p70S6K: 70-kDa ribosomal protein S6 kinase
QIDS-SR: Quick Inventory of Depressive Symptoms-Self-Report Version
QOL: quality of life
SI: suicidal ideation
SSI: Scale for Suicide Ideation
TRD: treatment resistant depression
TrkB: tropomyosin-related kinase B
TST: tail suspension test、尾懸垂試験
Val: valine

5-HT: 5-hydroxytryptamine、セロトニン

薬物 (本研究で用いた主な化合物の構造式と薬理作用で記載した薬物については含まない)

CHPG: (RS)-2-chloro-5-hydroxyphenylglycine

CPPG: (RS)- α -cyclopropyl-4-phosphonophenylglycine

DHPG: (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine

Diazepam: 7-chloro-1-methyl-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepin-2-one

DMSO: dimethyl sulfoxide

DOM: 2,5-dimethoxy-4-methylamphetamine

Fenobam: N-(3-chlorophenyl)-N-(4,5-dihydro-1-methyl-4-oxo-1H-imidazole-2-yl)urea

Fluvoxamine: Fluvoxamine maleate

GRN-529:

4-difluoromethoxy-3-(pyridine-2-ylethynyl)phenyl)5H-pyrrolo[3,4-b]pyridine-6(7H)-yl
methanone

Homo AMPA: (RS)-2-amino-4-(3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-yl)butyric acid

L-AP4: L-(+)-2-amino-4-phosphonobutyric acid

LY367385: (S)-(+)- α -amino-4-carboxy-2-methylbenzeneacetic acid

LY379268: (1R,4R,5S,6R)-4-amino-2-oxabicyclo[3.1.0]hexane-4,6-dicarboxylic acid

MC: methylcellulose

MGS0028: (1R,2S,5S,6S)-2-amino-6-fluoro-4-oxobicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylic acid

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

MK-801: (5S,10R)-(+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine
maleate

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

Paroxetine: paroxetine hydrochloride

PBS: phosphate-buffered saline

PCA: para-chloroamphetamine

PCPA: para-chlorophenylalanine

PFA: paraformaldehyde

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

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

8-OH-DPAT: (\pm)-8-hydroxy-2-dipropylaminotetralin hydrobromide

緒言

近年、我が国において、うつ病を含む気分障害の患者数は著しく増加しており、1999年には44.1万人であった患者数が2008年には104.1万人に達している(厚生労働省「患者調査」)。また、世界保健機関の世界精神保健調査によると、うつ病は、2030年には世界中で疾病により失われた生命及び生活の質の総合計の指標となる疾病負荷で第1位の疾患になると予測されており、社会的に大きな問題となっている。

現在、うつ病における薬物治療の第1選択薬として選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)又はセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬(SNRI)が使用されている。しかしながら、これらの薬剤は約40%の患者には治療効果を示さず、治療効果を発現するまでに服用開始から少なくとも3~4週間はかかるという問題点を有する(1)。また、既存の抗うつ薬は日中の眠気、倦怠感、消化管障害、性機能障害に加え、他害あるいは自殺関連行為の増加に繋がる可能性のある賦活症候群などの副作用を有し、薬物治療の継続を難しくしている(2)。従って、既存の抗うつ薬は有効性及び安全性の点で多くの課題を抱えており、上記のアンメットメディカルニーズを満たす新しい抗うつ薬の創製が求められている。

うつ病患者の臨床所見として、グルタミン酸神経の障害が数多く報告されている。即ち、うつ病患者の血清及び血漿中グルタミン酸濃度は健常人と比較して上昇していることが観察されており、血漿中グルタミン酸濃度の上昇はうつ病の重篤度と相関することも報告されている(3-5)。また、うつ病患者の脳内におけるグルタミン酸濃度の変化も報告されており、後頭皮質におけるグルタミン酸濃度の上昇や前帯状皮質におけるグルタミン酸及びGlx(グルタミンとグルタミン酸の総量)の低下が観察されている(6,7)。さらに、うつ病患者の死後脳では前側前頭前皮質におけるNMDA受容体を構成するGluN2A及びGluN2Bサブユニットの発現低下が報告されている(8)。同様に、うつ病患者の死後脳では前頭前皮質及び海馬においてGluN2AサブユニットをコードするGRIN2Aの過剰なメチル化が報告されている(9)。これらの報告から、グルタミン酸神経の異常がうつ病に関与する可能性が示されている。

近年、臨床において、解離性麻酔薬として使用されている非競合型NMDA受容体拮抗薬のKetamineがうつ病患者に対して抗うつ作用を示すことが注目されている。2000年に、うつ病患者を対象として実施されたプラセボ対照二重盲験試験において、Ketamineは単回の静脈内投与で240分後に有意な抗うつ作用を示し、その作用は投与72時間後まで持続することが初めて報告された(10)。その後、2006年に治療抵抗性うつ病患者(少なくとも2種類の抗うつ薬を十分量、十分な期間(4~6週間)用いても改善がみられない患者)を対象として実施されたプラセボ対照二重盲験試験において、Ketamineは単回の静脈内投与で110分後に有意な抗うつ作用を示し、その作用は1週間持続することが報告された(11)。さらに、これらのKetamineの効果は多くの医療機関で再現されていることから、Ketamineの抗うつ作用はうつ病研究における過去50年

以上の中で最も画期的な発見とされている (10-23, Table 1)。

これまでの研究から、Ketamine は前頭前皮質の錐体神経細胞の脱抑制を惹起し、グルタミン酸遊離を促進することにより AMPA 受容体を活性化し、抗うつ作用を発現する可能性が考えられている (24-26)。さらに、AMPA 受容体の活性化を介した mTOR シグナル活性化、それに続いて惹起される前頭前皮質におけるスパイン形成亢進及びシナプス伝達活性化が Ketamine の抗うつ作用発現に関与すると考えられている (27-29)。また、神経可塑性に関与する BDNF の 66 番目の valine (Val) が methionine (Met) に置換された遺伝子多型 (Val66Met) のノックインマウス及び BDNF の受容体である TrkB のコンディショナルノックアウトマウスにおいて、Ketamine の抗うつ作用が抑制されたことから、Ketamine の抗うつ作用発現には BDNF/TrkB シグナルの関与が推察されている (30-32)。これは、BDNF の Val66Met を有するうつ病患者 (Val/Met、Met/Met) において、Ketamine への反応性が低下するという臨床結果からも支持される (33)。加えて、最近、Ketamine により惹起されるラットのの前頭前皮質及び海馬における BDNF の発現上昇には AMPA 受容体の活性化が関与することが報告されている (34)。以上のことから、Ketamine はグルタミン酸遊離促進による AMPA 受容体の活性化とそれに続いて惹起される BDNF/TrkB シグナル及び mTOR シグナルの活性化を介した神経可塑的な変化により、抗うつ作用を発現する可能性が示されている (Fig. 1)。しかしながら、Ketamine は投与初期に観察される精神症状及び解離性症状、長期使用による依存性形成及び神経毒性などの副作用の懸念に加え、静脈内投与などの投与方法が問題となっており、その使用は制限されている (35-37)。そこで、Ketamine と同様の薬効を有し、Ketamine に見られる問題点を軽減した治療薬の創製が望まれている。

著者は、グルタミン酸神経系の中で、グルタミン酸神経機能に対して調節的な機能を有する代謝型グルタミン酸受容体 (mGlu 受容体) に着目した。mGlu 受容体は 7 回膜貫通型の構造を有する G タンパク質共役型受容体である。これまでに、mGlu 受容体は 8 つのサブタイプの存在が確認されており、アミノ酸配列の相同性や薬理的性質及びシグナル伝達機構の違いから 3 つのグループに分類される (グループ 1 : mGlu1 及び 5、グループ 2 : mGlu2 及び 3、グループ 3 : mGlu4、6、7 及び 8) (38)。これらの中でも、mGlu2/3 受容体及び mGlu5 受容体は中枢神経系において情動や意欲に関係し、うつ病との関連が報告されている大脳皮質、海馬、側坐核及び線条体などに強く発現している (39-43, Table 2)。また、うつ病患者の死後脳解析によると、前頭前皮質において、mGlu2/3 受容体及び mGlu5 受容体のタンパク質の発現変化が観察されている (44, 45)。これらのことから、mGlu2/3 受容体及び mGlu5 受容体はうつ病の病態において重要な役割を果たしている可能性があり、うつ病治療薬開発の新たな標的になり得る。そこで、本研究は抗うつ薬の新たな作用標的として mGlu 受容体に着目し、その作用と作用機序を明らかにし、mGlu 受容体標的薬物の臨床応用及び新規創薬標的について考察するために企画した。

これまでに、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び mGlu5 受容体拮抗薬は様々な動物モデルにお

いて抗うつ作用を示すことが報告されている (46-52)。また、著者らは mGlu2/3 受容体拮抗薬が Ketamine と同様に、AMPA 受容体の活性化とそれに続いて惹起される TrkB/mTOR シグナル活性化を介して抗うつ作用を発現する可能性を示してきた (29, 32)。その一方で、mGlu5 受容体拮抗薬の抗うつ作用の機序については未だに明らかにされていない。本研究の第 1 章では抗うつ作用の機序解析に使用されている新奇環境摂食抑制試験 (NSFT) (32) を用いて、mGlu5 受容体拮抗薬の作用及びその作用発現における TrkB/mTOR シグナルの関与について検討し、Ketamine のそれらと比較した。mGlu2/3 受容体拮抗薬、mGlu5 受容体拮抗薬及び Ketamine はラットの前頭前皮質において細胞外セロトニン量を増加させることが報告されている (53-55)。しかしながら、mGlu2/3 受容体拮抗薬、mGlu5 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ作用発現におけるセロトニン神経系の関与については明らかにされていない。そこで、第 2 章では NSFT を用いて mGlu2/3 受容体拮抗薬、mGlu5 受容体拮抗薬及び Ketamine の作用発現におけるセロトニン神経系の関与について検討した。さらに、第 3 章では mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ作用発現に関与するセロトニン神経の部位同定を試みた。

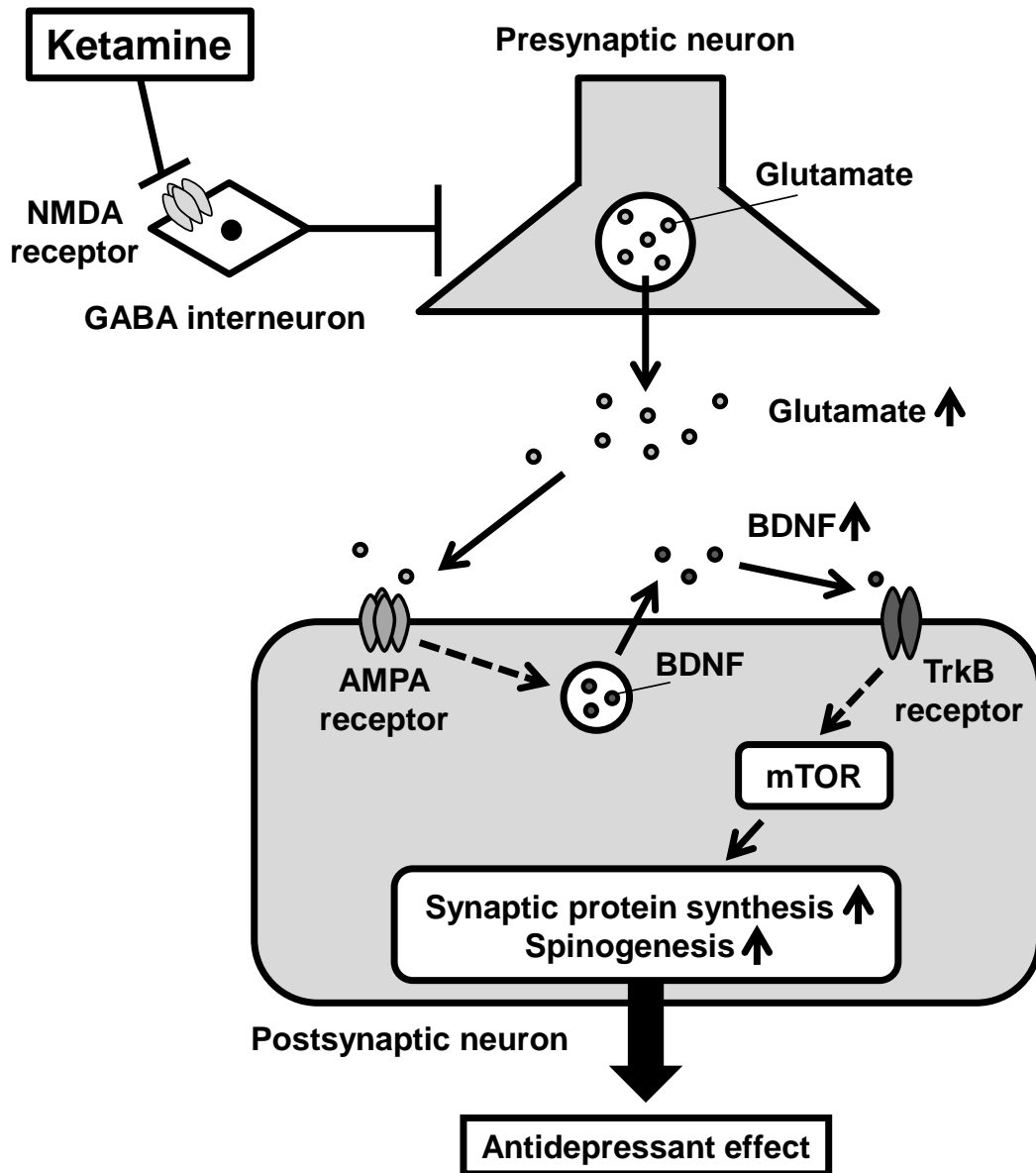


Fig. 1 The mechanisms of the antidepressant effect of Ketamine.

Ketamine inhibits the NMDA receptor on the GABAergic interneuron and increases the release of glutamate. The release of glutamate activates the AMPA receptor. Then, the activation of AMPA receptor induces the secretion of BDNF and the subsequent stimulation of the TrkB/mTOR signaling, leading to the facilitation of synaptic protein synthesis and spinogenesis and the elicitation of the antidepressant effect.

Table 1 The effects of Ketamine on mood disorder

Pathological condition	Treatment		Test design	N	Assessment	Efficacy (duration)	Reference	
	Frequency	Ketamine						
MDD	Single	0.5 mg/kg, IV	Randomized, Placebo-controlled, double-blinded trial	7	HAM-D	Improvement (230 min~72 h)	10	
TRD	Single	0.5 mg/kg, IV	Randomized, placebo-controlled, double-blinded trial	17	HAM-D	Improvement (110 min~1 week)	11	
		0.5 mg/kg, IV	Open-label trial	32	SSI MADRS HAM-D BDI	Improvement (SI; 40 min~230 min)	12	
		0.5 mg/kg, IV	Open-label trial (ECT non-responder)	17	MADRS	Improvement (40 min~230 min)	13	
		0.5 mg/kg, IV	Open-label trial	23		Improvement (40 min~230 min)		
		0.5 mg/kg, IV	Randomized, midazolam-controlled, double-blind trial	47	MADRS	Improvement (1 day~7 days)	14	
		50 mg, IN	Randomized, placebo-controlled, double-blinded trial	20	MADRS	Improvement (40 min~48 h)	15	
		0.5 mg/kg, IV	Open-label trial	26	MADRS-SI	Improvement (SI; 24 h)	16	
	Repeated	0.5 mg/kg, IV, six infusions over 12 days	Open-label trial	9	MADRS-SI	Improvement (SI; 12 days)		
		0.5 mg/kg, IV, six infusions over 12 days	Open-label trial	10	MADRS QIDS-SR	Improvement (120 min~12 days)	17	
		0.5 mg/kg, IV, six infusions over 12 days	Open-label trial	24	MADRS	Improvement (120 min~12 days, overall response rate: 70.8%)	18	
	Single	as the anesthetic during ECT	Open-label trial	31	HAM-D	Improvement (faster onset of action vs ECT only)	19	
		as the anesthetic during ECT	Retrospective study	42	HAM-D	Improvement (faster onset of action vs ECT only)	20	
	Repeated	0.5 mg/kg, IV, three infusions over 6 days	Open-label trial	18	HAM-D BDI	Improvement (24 h~9 days, faster onset of action vs ECT only)	21	
	BP I , II (treatment resistant)	Single	0.5 mg/kg, IV, single (add-on)	Randomized, placebo-controlled, double-blind trial	18	MADRS	Improvement (40 min~3 days)	22
			0.5 mg/kg, IV, single (add-on)	Randomized, placebo-controlled, double-blind trial	15	MADRS	Improvement (40 min~3 days)	23

Table 2 Distributions and properties of metabotropic glutamate receptors

		Distribution (brain)	Synaptic Localization	Signaling	Function	Ligand	
						Agonist	Antagonist
Group1	mGlu1	Cerebellum Hippocampus Olfactory bulb Thalamus	Postsynapse	Gq/11	Operates through PLC activation and potentiation of L-type Ca channels to increase neuronal excitation	DHPG	LY367385
	mGlu5	Cerebral cortex Hippocampus Nucleus accumbens Olfactory bulb Striatum				CHPG	MPEP MTEP
Group2	mGlu2	Amygdala Cerebral cortex Cerebellum Hippocampus Nucleus accumbens Olfactory bulb Striatum Thalamus	Presynapse	Gi/o	Reduces AC activity, reducing cAMP and neuronal excitability (except for mGlu6)	LY379268 MGS0028	LY341495 MGS0039
	mGlu3	Amygdala Cerebral cortex Cerebellum Hippocampus Nucleus accumbens Olfactory bulb Striatum Thalamus	Presynapse and postsynapse			LY379268 MGS0028	LY341495 MGS0039
Group3	mGlu4	Amygdala Cerebellum Olfactory bulb Thalamus Ventral pallidum	Presynapse			L-AP4	CPPG
	mGlu6	-	-			HomoAMPA	CPPG
	mGlu7	Amygdala Hypothalamus Nucleus accumbens Piriform cortex Hippocampus Spinal cord Striatum Superior colliculus	Presynapse	L-AP4	CPPG		
	mGlu8	Entorhinal cortex Olfactory bulbs Piriform cortex		L-AP4	CPPG		

第 1 章 新奇環境摂食抑制試験における代謝型グルタミン酸 5 受容体拮抗薬の作用とその作用機序の検討

1-1. 序論

mGlu5 受容体拮抗薬の MPEP 及び MTEP は強制水泳試験 (FST)、尾懸垂試験 (TST) 及び嗅球摘出モデルなどの様々な動物モデルにおいて抗うつ作用を示すことが報告されている (49-51)。また、mGlu5 受容体拮抗薬の GRN-529 は FST 及び TST における抗うつ作用だけでなく、抗不安作用及び鎮痛作用も示すことから、治療抵抗性うつ病にも有益な作用を示すと期待されている (52)。mGlu5 受容体ノックアウトマウスは、mGlu5 受容体拮抗薬を用いた薬理的検討の結果と一致し、FST において抗うつ様の行動表現型 (無動時間の短縮) を示す (56)。以上のことから、mGlu5 受容体の拮抗作用はうつ病治療の有用な手段になる可能性がある。

グループ 1 mGlu 受容体作動薬の DHPG は、ラット脳切片の海馬 CA1 の錐体細胞において、NMDA 受容体を介する電流を増強し、その作用は MPEP により拮抗されることが報告されている (57)。即ち、NMDA 受容体機能が mGlu5 受容体の拮抗作用により抑制される可能性が示されている。さらに、mGlu5 受容体拮抗薬の抗うつ作用が NMDA により拮抗されるという報告から、NMDA 受容体機能の抑制が mGlu5 受容体拮抗薬の抗うつ作用発現に関与する可能性が支持される (58)。加えて、MPEP の反復投与はラットの海馬において、BDNF mRNA の発現を上昇させることが報告されている (59)。これらの結果から、mGlu5 受容体拮抗薬の抗うつ作用発現には NMDA 受容体機能の抑制及び BDNF シグナルの活性化が関与し、Ketamine と一部類似した機序が関与することが示唆される。しかしながら、mGlu5 受容体拮抗薬が Ketamine と同様に神経可塑的变化を伴う持続的な作用を有するか否かについては十分に検討されていない。そこで、本章では抗うつ活性を有する化合物の作用機序解析に頻用されており、Ketamine の急性及び持続的な作用が確認されている新奇環境摂食抑制試験 (NSFT) (32) を用い、mGlu5 受容体拮抗薬 (MPEP) の作用及びその作用機序について検討し、Ketamine のそれらと比較した。

1-2. 実験材料・方法

1-2-1. 動物

動物は9週齢のC57BL/6J系雄性マウス(Charles River Laboratories, Yokohama, Japan)を使用した。動物は室温 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50\pm 20\%$ 、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。実験動物の飼育及び実験操作は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従って行なわれた。

1-2-2. 試薬

(全身投与) MPEP (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) は0.5% methylcellulose (MC) に溶解し、薬液を調製した。Ketamine (50 mg/ml, 動物用ケタラール 50, Sankyo Yell Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) は生理食塩液で希釈し、薬液を調製した。Diazepam (Sigma-Aldrich Co.) は0.5% MC に懸濁し、薬液を調製した。Fluvoxamine (Sigma-Aldrich Co.) は生理食塩液に溶解し、薬液を調製した。Anisomycin (EMD Biosciences, Inc., La Jolla, CA, USA) は2 M HCl に溶解した後、生理食塩液で希釈し、pH 7.4 となるように1M NaOH を添加して薬液を調製した。全身投与に使用する薬液の投与容量は10 ml/kg とした。

(脳室内投与) Rapamycin (EMD Biosciences, Inc.) 及び K252a (Sigma-Aldrich Co.) はDMSO に溶解し、薬液を調製した。

1-2-3. 新奇環境摂食抑制試験

試験前日に餌(ペレット)を取り除き、水の摂取可能な状態でマウスを絶食させた。絶食開始から24時間後に飼育室から移動し、6匹/ケージで実験室に馴化させた。試験には上部吹き抜けの白色プラスチックボックス(横45 cm、縦45 cm、高さ20 cm)を用いた。白色プラスチックボックスを防音箱に入れ、防音箱内の照度は約1000 lux とした。白色プラスチックボックスには床敷きを約1 cm 敷き、中央に直径11 cm の円形の白色濾紙を置き、その中心に餌を置いた。マウスをボックスの隅から入れ、摂食までの潜時を測定した。防音箱内の上部に設置したカメラによりマウスの行動を録画し、摂食までの潜時をストップウォッチで測定した。摂食までの潜時の短縮は抗うつ様作用の発現を示す。尚、測定時間のカットオフは5分とした。同様の絶食条件において、絶食24時間後のマウスの摂餌量を測定した。ホームケージにおいて餌を提示し、5分間の摂餌量を測定した。摂餌量は餌重量の減少分をマウスの個体体重で除することで、算出した。

MPEP (1, 3 mg/kg) は試験の60分前又は24時間前に腹腔内投与した。Ketamine (30 mg/kg) は試験の30分前又は24時間前に腹腔内投与した。Diazepam (0.3 mg/kg) 及び

Fluvoxamine (30 mg/kg) は試験の 30 分前及び 60 分前にそれぞれ腹腔内投与した。慢性投与のために、Fluvoxamine (30 mg/kg) は 1 日 1 回 28 日間腹腔内投与し、最終投与から 60 分後に試験を行なった。Anisomycin (100 mg/kg) は試験の 90 分前又は 24.5 時間前に腹腔内投与した。

1-2-4. 脳室内投与

脳室内投与はマウスを保定し、Paxinos and Franklin の脳図譜に従って bregma から尾側方向に 0.2 mm、側方に 1 mm の位置にポリエチレンカテーテルを介してマイクロシリンジ (Hamilton Co., Reno, NV, USA) に接続した 28G の注射針 (Terumo Co., Tokyo, Japan) の先端が片側の側脳室に位置するように、脳組織の表面から腹側へ 2 mm 刺入することにより実施した。Rapamycin (0.2 nmol/2 μ l) 及び K252a (2.0 nmol/2 μ l) は 1.0 μ l/min の速度で 2.0 μ l を片側に投与した。投与終了後、注射針を 2 分間留置した。Rapamycin 及び K252a は試験の 24.5 時間前に投与した。

1-2-5. 統計

結果は全て平均値 \pm 標準誤差で示した。多群間比較の場合は、一元配置分散分析 (one-way analysis of variance: one-way ANOVA) 又は二元配置分散分析 (two-way ANOVA) を用いて解析した後、*post-hoc* 解析として Dunnett's test 又は LSD test を実施した。2 群の場合は Student's *t*-test を用いた。有意水準は何れも 5%未満とした。全ての統計解析には SAS 9.2 (SAS Institute Japan Ltd., Tokyo, Japan) を用いた。

1-3. 結果

1-3-1. 新奇環境摂食抑制試験における Diazepam 及び Fluvoxamine の作用

Diazepam (0.3 mg/kg, i.p.) は投与 30 分後に、摂食までの潜時を短縮し、急性の抗うつ様作用を発揮した (Fig. 2A)。Fluvoxamine (30 mg/kg, i.p.) は急性投与では摂食までの潜時に影響を及ぼさず、28 日間の反復投与により、摂食までの潜時を短縮した (Fig. 2B, C)。

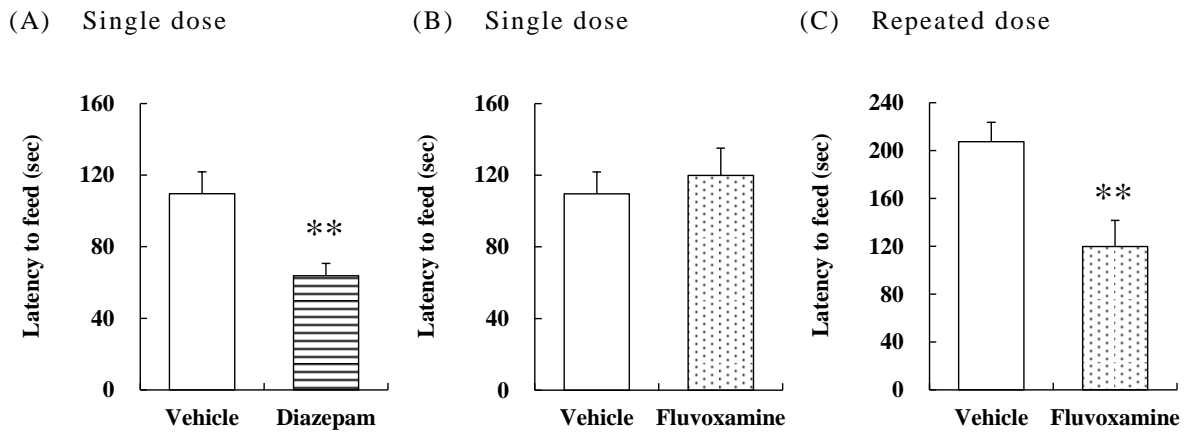


Fig. 2 Effects of Diazepam and Fluvoxamine in the NSFT in mice.

(A) Diazepam (0.3 mg/kg, i.p.) was administered 30 min prior to the test. (B) Fluvoxamine (30 mg/kg, i.p.) was administered 60 min prior to the test. (C) Fluvoxamine (30 mg/kg, i.p.) was administered once daily for 28 days, and the test was performed 60 min after the final treatment. Values indicate the mean \pm S.E.M. ((A): $n = 12$, (B): $n = 12$, (C): $n = 12$). ** $p < 0.01$ compared with Vehicle (Student's t -test).

1-3-2. 新奇環境摂食抑制試験における mGlu5 受容体拮抗薬の抗うつ様作用

MPEP (3 mg/kg, i.p.) は投与 60 分後に、摂食までの潜時を短縮した (急性作用) (Fig. 3A)。さらに、MPEP (1, 3 mg/kg, i.p.) は投与 24 時間後でも、摂食までの潜時を短縮した (持続性作用) (Fig. 3B)。

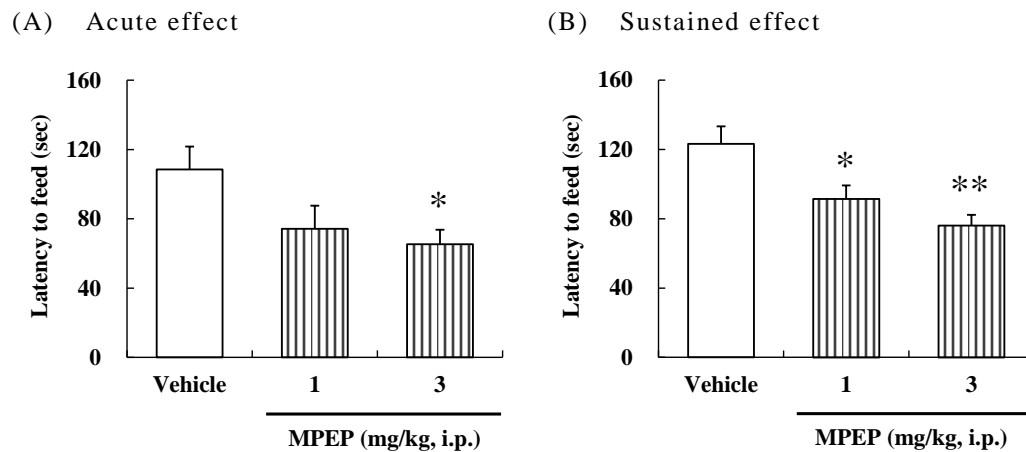


Fig. 3 Effects of MPEP in the NSFT in mice.

(A) MPEP (1, 3 mg/kg, i.p.) was administered 60 min prior to the test. (B) MPEP (1, 3 mg/kg, i.p.) was administered 24 h prior to the test. Values indicate the mean \pm S.E.M. ((A): $n = 11-12$, (B): $n = 12$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with Vehicle (Dunnett's-test).

1-3-3. mGlu5 受容体拮抗薬、Diazepam 及び Fluvoxamine の摂餌量に及ぼす作用

MPEP (3 mg/kg, i.p.) 及び Diazepam (0.3 mg/kg, i.p.) は投与 60 分後及び 30 分後に、それぞれ摂餌量に影響を及ぼさなかった (Table 3)。また、Fluvoxamine (30 mg/kg, i.p.) は 28 日間の反復投与により、摂餌量に影響を及ぼさなかった (Table 3)。これらのことから、これら薬物の摂食までの潜時を短縮する作用に摂食量は関与しないことが示された。

Table 3 Effects of MPEP, Diazepam and Fluvoxamine on food consumption in mice

Drugs	Food consumption (mg food / g of mouse)
Vehicle A (i.p.)	7.8 ± 0.9
MPEP (3 mg/kg, i.p.)	7.9 ± 0.8
Vehicle A (i.p.)	6.5 ± 0.4
Diazepam (0.3 mg/kg, i.p.)	7.1 ± 0.7
Vehicle B (i.p.)	4.6 ± 0.5
Fluvoxamine (30 mg/kg, i.p.)	5.9 ± 0.6

MPEP (3 mg/kg, i.p.) was administered 60 min prior to the test. Diazepam (0.3 mg/kg, i.p.) was administered 30 min prior to the test. Fluvoxamine (30 mg/kg, i.p.) was administered once daily for 28 days and the test was performed 60 min after the final treatment. Vehicle A: 0.5% MC, Vehicle B: Saline. Values indicate the mean ± S.E.M. (n = 6-12).

1-3-4. mGlu5 受容体拮抗薬の抗うつ様作用発現におけるタンパク質合成の関与

MPEP(3 mg/kg, i.p.)の急性作用はタンパク質合成阻害薬の Anisomycin(100 mg/kg, i.p.)により拮抗されなかった (Fig. 4A)。一方、MPEP (3 mg/kg, i.p.) の持続性作用は Anisomycin (100 mg/kg, i.p.) により拮抗された (Fig. 4B)。Anisomycin (100 mg/kg, i.p.) はそれ自体で摂食までの潜時に影響を及ぼさなかった (Fig. 4A, B)。

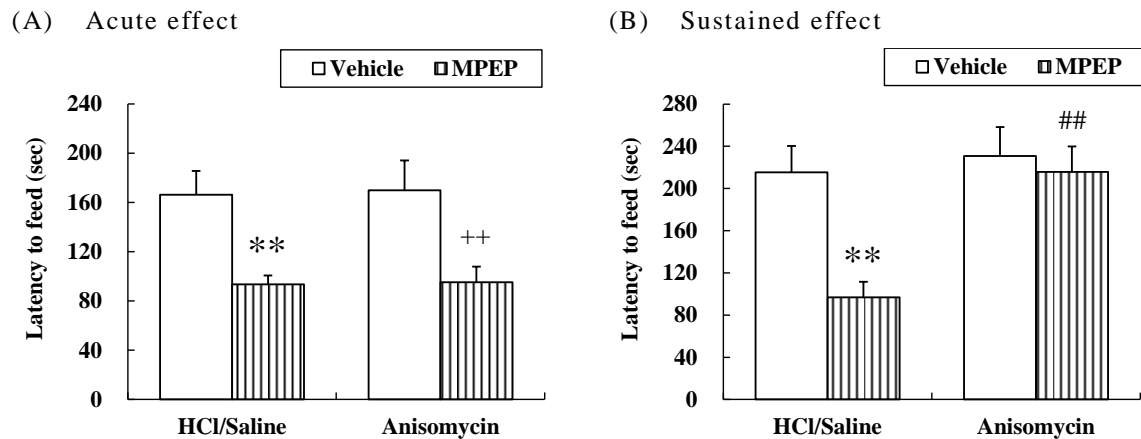


Fig. 4 Effects of a protein synthesis inhibitor on the action of MPEP in the NSFT in mice.

(A) MPEP (3 mg/kg, i.p.) was administered 60 min prior to the test. Anisomycin (100 mg/kg, i.p.) was administered 90 min prior to the test. (B) MPEP (3 mg/kg, i.p.) was administered 24 h prior to the test. Anisomycin (100 mg/kg, i.p.) was administered 24.5 h prior to the test. Values indicate the mean \pm S.E.M. ((A): $n = 11-12$, (B): $n = 11-12$). ** $p < 0.01$ compared with HCl/Saline-treated Vehicle, ++ $p < 0.01$ compared with Anisomycin-treated Vehicle, ## $p < 0.01$ compared with HCl/Saline-treated MPEP (LSD post-*hoc* test).

1-3-5. mGlu5 受容体拮抗薬の抗うつ様作用発現における mTOR シグナルの関与

MPEP (3 mg/kg, i.p.) の急性作用は mTOR 阻害薬の Rapamycin (0.2 nmol/2 μ l, i.c.v.) により拮抗されなかった (Fig. 5A)。一方、MPEP (3 mg/kg, i.p.) の持続性作用は Rapamycin (0.2 nmol/2 μ l, i.c.v.) により部分的 (42%) に拮抗された (Fig. 5B)。Rapamycin (0.2 nmol/2 μ l, i.c.v.) はそれ自体で摂食までの潜時に影響を及ぼさなかった (Fig. 5A, B)。

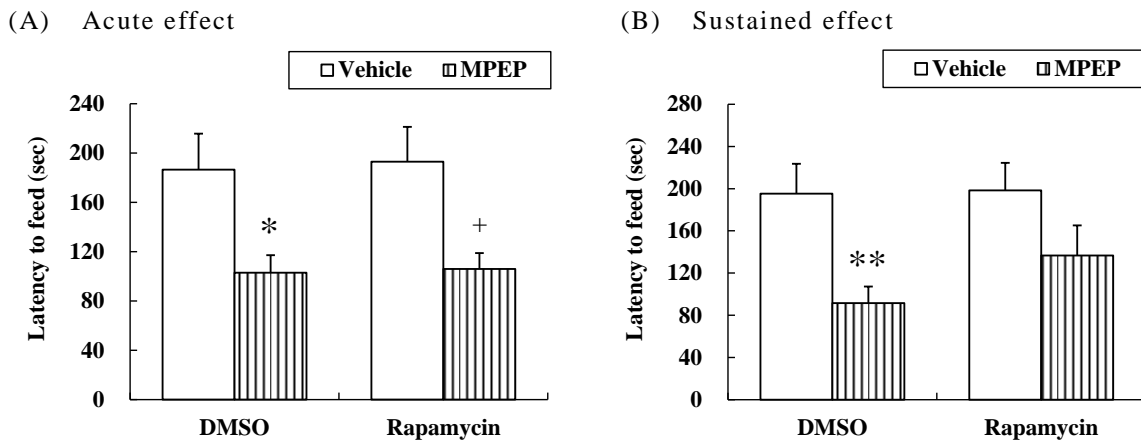


Fig. 5 Effects of an mTOR inhibitor on the action of MPEP in the NSFT in mice.

(A) MPEP (3 mg/kg, i.p.) was administered 60 min prior to the test. Rapamycin (0.2 nmol/2 μ l, i.c.v.) was administered 90 min prior to the test. (B) MPEP (3 mg/kg, i.p.) was administered 24 h prior to the test. Rapamycin (0.2 nmol/2 μ l, i.c.v.) was administered 24.5 h prior to the test. Values indicate the mean \pm S.E.M. ((A): n = 11-12, (B): n = 11-12). *p < 0.05, **p < 0.01 compared with DMSO-treated Vehicle, +p < 0.05 compared with Rapamycin-treated Vehicle (LSD post-hoc test).

1-3-6. Ketamine の抗うつ様作用発現における mTOR シグナルの関与

Ketamine (30 mg/kg, i.p.) は投与 30 分後に、摂食までの潜時を短縮し (急性作用)、その作用は Rapamycin (0.2 nmol/2 μ l, i.c.v.) により拮抗されなかった (Fig. 6A)。一方、Ketamine (30 mg/kg, i.p.) は投与 24 時間後に、摂食までの潜時を短縮し (持続性作用)、その作用は Rapamycin (0.2 nmol/2 μ l, i.c.v.) により拮抗された (Fig. 6B)。

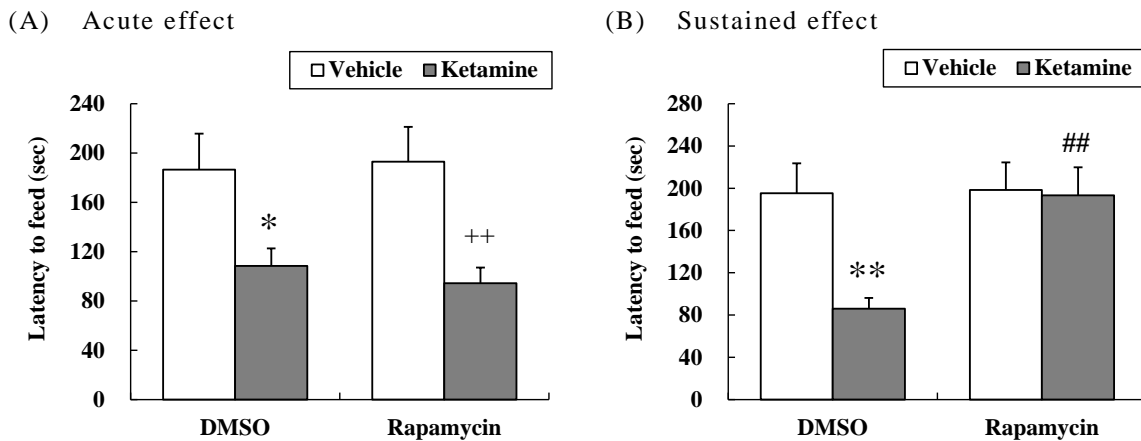


Fig. 6 Effects of an mTOR inhibitor on the action of Ketamine in the NSFT in mice.

(A) Ketamine (30 mg/kg, i.p.) was administered 30 min prior to the test. Rapamycin (0.2 nmol/2 μ l, i.c.v.) was administered 60 min prior to the test. (B) Ketamine (30 mg/kg, i.p.) was administered 24 h prior to the test. Rapamycin (0.2 nmol/2 μ l, i.c.v.) was administered 24.5 h prior to the test. Values indicate the mean \pm S.E.M. ((A): n = 11-12, (B): n = 10-12). *p < 0.05, **p < 0.01 compared with DMSO-treated Vehicle, ++p < 0.01 compared with Rapamycin-treated Vehicle, ##p < 0.01 compared with DMSO-treated Ketamine (LSD post-hoc test).

1-3-7. Ketamine の摂餌量に及ぼす作用

Ketamine (30 mg/kg, i.p.) は投与 30 分後の摂餌量に影響を及ぼさなかった (Table 4)。このことから、Ketamine の摂食までの潜時を短縮する作用に摂食量は関与しないことが示された。

Table 4 Effect of Ketamine on food consumption in mice

Drugs	Food consumption (mg food / g of mouse)
Vehicle (i.p.)	3.7 ± 0.8
Ketamine (30 mg/kg, i.p.)	4.6 ± 0.3

Ketamine (30 mg/kg, i.p.) was administered 30 min prior to the test. Values indicate the mean ± S.E.M. (n = 5-6).

1-3-8. mGlu5 受容体拮抗薬の抗うつ様作用発現における TrkB の関与

MPEP (3 mg/kg, i.p.) の持続性作用は Trk チロシンキナーゼ阻害薬の K252a (2.0 nmol/2 μl, i.c.v.) により拮抗されなかった (Fig. 7)。K252a (2.0 nmol/2 μl, i.c.v.) はそれ自体で摂食までの潜時に影響を及ぼさなかった (Fig. 7)。

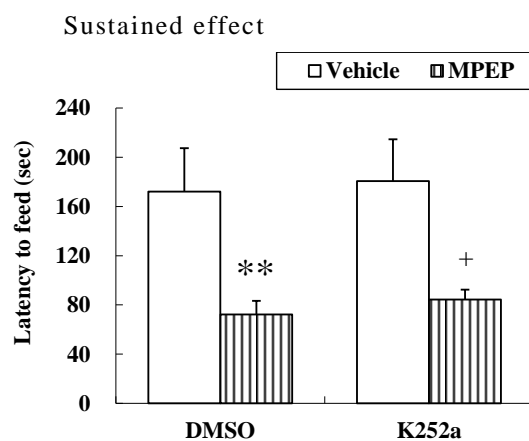


Fig. 7 Effect of a Trk tyrosine kinase inhibitor on the action of MPEP in the NSFT in mice.

MPEP (3 mg/kg, i.p.) was administered 24 h prior to the test. K252a (2.0 nmol/2 μl, i.c.v.) was administered 24.5 h prior to the test. Values indicate the mean ± S.E.M. (n = 8-9). **p < 0.01 compared with DMSO-treated Vehicle, +p < 0.05 compared with K252a-treated Vehicle (LSD post-hoc test).

1-4. 考察

本章では NSFT を用いて mGlu5 受容体拮抗薬である MPEP の作用及びその作用機序を Ketamine のそれらと比較し、検討した。

NSFT は抗不安薬の急性投与による作用及び SSRI や三環系抗うつ薬の反復投与による作用を検出可能とする試験系である (60, 61)。本研究において、抗不安薬の Diazepam (0.3 mg/kg, i.p.) は急性投与により摂食までの潜時を短縮し、SSRI の Fluvoxamine (30 mg/kg, i.p.) は急性投与ではなく、28 日間の反復投与により摂食までの潜時を短縮した。また、本研究で用いた Diazepam 及び Fluvoxamine の用量は摂餌量に影響を及ぼさなかったことから、NSFT におけるこれら薬物の作用は非特異的な作用によるものではないことが示された。これらの結果は先行研究とも一致したため (60, 62)、本研究で用いられた NSFT の条件は、既存の抗不安薬及び抗うつ薬の作用を評価する妥当な試験系であることが示された。

本研究において、MPEP は Ketamine と同様に、摂餌量に影響を及ぼさない用量で急性の抗うつ様作用を示した。Ketamine の急性作用は Rapamycin により拮抗されなかったことから、その急性作用発現には mTOR シグナルが関与しないと示唆された。また、著者らは、既に NSFT における Ketamine の急性抗うつ様作用発現に BDNF/TrkB シグナルが関与しないことを報告している (32)。BDNF/TrkB シグナルはシナプスタンパク質合成促進などの神経可塑性の変化に関与することから、Ketamine の急性作用発現には新規タンパク質の合成が関与しないと考えられた (27, 32)。同様に、本研究の MPEP の急性作用はタンパク質合成阻害薬の Anisomycin 及び mTOR 阻害薬の Rapamycin により拮抗されなかったことから、mGlu5 受容体拮抗薬の急性作用発現には Ketamine と同様に新規タンパク質の合成及び mTOR シグナルが関与しないと示唆された。

さらに、本研究において、MPEP は Ketamine と同様に持続性の抗うつ様作用を示した。MPEP の脳内における mGlu5 受容体占有率は投与 5 分後に 100% に達し、投与後 2 時間以内にベースラインレベルまで戻ることが C57BL/6J マウスにおいて報告されている (63)。このことから、本研究における MPEP の持続性作用発現には、mGlu5 受容体拮抗作用自体ではなく、その後に惹起される二次的な変化が関与していると考えられた。これは、シナプス形成促進などの変化を介して持続的な抗うつ作用を発現すると考えられている Ketamine の結果からも支持される (27)。本研究において、Ketamine の持続性作用は Rapamycin により拮抗された。従って、この持続性作用は他のうつ病モデルにおける Ketamine の持続性作用と同様に mTOR シグナルの活性化を介していると考えられた (27-29)。なお、うつ病患者の死後脳において、mTOR 並びにその下流のシグナル因子である p70S6K 及び eIF4B のタンパク質発現低下が報告されていることから、臨床においても Ketamine は mTOR シグナルの活性化を介して抗うつ作用を惹起する可能性が提唱されている (64)。一方、本研究において、MPEP の持続性作用は Anisomycin によ

り拮抗されたが、Rapamycin による拮抗作用は部分的であった。これらの結果から、mGlu5 受容体拮抗薬は新規タンパク質の合成を惹起し、持続性の抗うつ様作用を発現するが、この作用発現には Ketamine と異なり mTOR シグナルが部分的に関与していることが示唆された。

これまでに、Ketamine の抗うつ作用には BDNF/TrkB シグナルが関与する可能性が示されている。即ち、Ketamine の抗うつ作用は BDNF (Val66Met) ノックインマウス、誘導型 BDNF ノックアウトマウス及び TrkB コンディショナルノックアウトマウスにおいて抑制される (30, 31)。著者らも、NSFT における Ketamine の持続性作用が Trk チロシンキナーゼ阻害薬の K252a により抑制されることを報告している (32)。一方、本研究において、MPEP の持続性作用は K252a により拮抗されなかった。本研究で用いた K252a の用量は NSFT における Ketamine の持続性作用及び FST における BDNF の抗うつ作用を完全に拮抗する用量である (32, 65)。従って、NSFT における mGlu5 受容体拮抗薬の持続性作用発現には BDNF/TrkB シグナルが関与しないことから、Ketamine とは異なる機序が関与する可能性が考えられる。これまでに、MPEP は投与 6 時間後に扁桃体における NPY の発現を上昇させることが報告されている (66)。NPY は心的外傷後ストレス障害モデルラットにおいて、その投与 2 時間後に抗うつ作用及び抗不安作用を示し、その作用は投与 48 時間後まで持続する (67)。これらのことから、mGlu5 受容体拮抗薬の持続性の抗うつ様作用は NPY の発現上昇に起因する可能性が考えられる。しかしながら、mGlu5 受容体拮抗薬による持続性抗うつ様作用の分子的機序に関しては不明な点が多く、今後の重要な検討課題である。

本章では、mGlu5 受容体拮抗薬が Ketamine と同様に NSFT において急性及び持続性の抗うつ様作用を示すことを明らかにした。mGlu5 受容体拮抗薬の急性抗うつ様作用発現には、Ketamine と同様に新規タンパク質の合成及び mTOR シグナルが関与しないと示唆された (Fig. 8)。一方、mGlu5 受容体拮抗薬の持続性抗うつ様作用発現には新規タンパク質の合成が関与するものの、mTOR シグナルの関与は Ketamine と異なり部分的であり、BDNF/TrkB シグナルは関与しないと示唆された (Fig. 8)。即ち、mGlu5 受容体拮抗薬の NSFT における持続性抗うつ様作用は、Ketamine と異なる機序を介する可能性が示された。

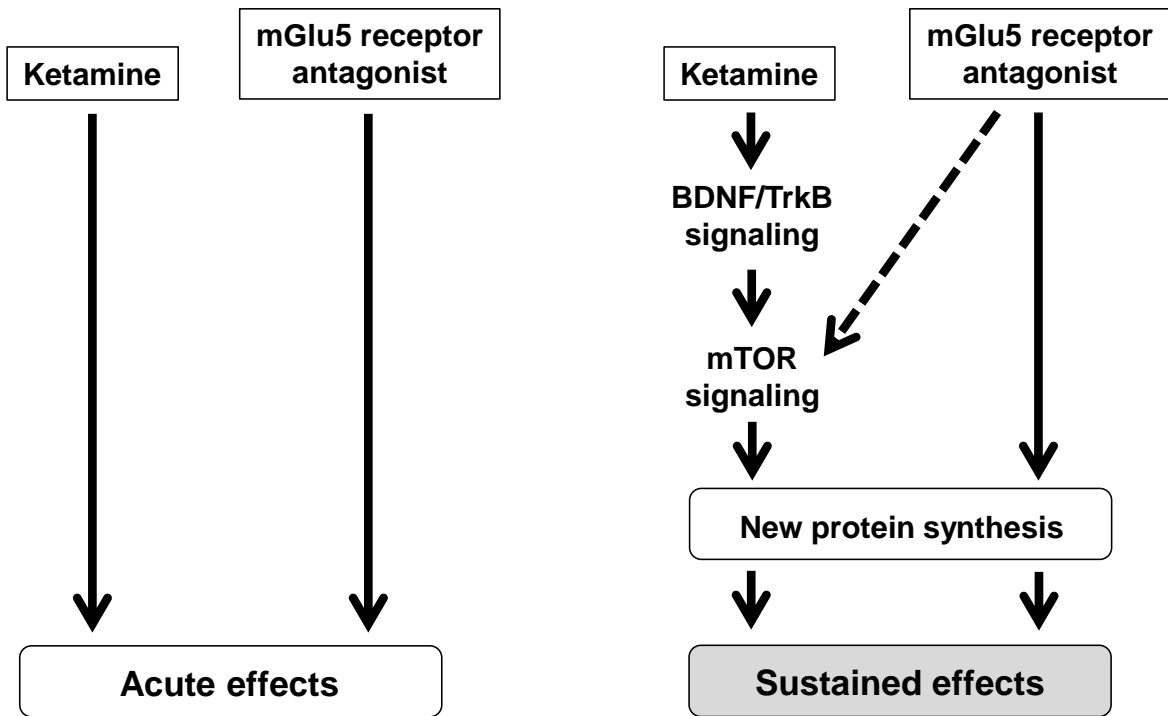


Fig. 8 Proposed mechanisms of the effects of Ketamine and the mGlu5 receptor antagonist.

Ketamine and the mGlu5 receptor antagonist induce the acute effects. Ketamine activates BDNF/TrkB signaling and subsequently stimulates mTOR signaling, leading to the elicitation of the sustained effect. The mGlu5 receptor antagonist induces the sustained effect through the new protein synthesis, partly via mTOR signaling but not via BDNF/TrkB signaling.

第 2 章 新奇環境摂食抑制試験における代謝型グルタミン酸受容体拮抗薬及び Ketamine の作用に対するセロトニン神経系の関与

2-1. 序論

第 1 章では、mGlu5 受容体拮抗薬が Ketamine と同様に即効性、かつ持続的な抗うつ様作用を発現することを示した。加えて、その機序は Ketamine のそれと一部異なることを明らかにした。mGlu 受容体に作用する薬物の中では、mGlu5 受容体拮抗薬の他に mGlu2/3 受容体拮抗薬の抗うつ作用及びその作用機序の検討が行なわれている。これまで、mGlu2/3 受容体拮抗薬の MGS0039 及び LY341495 は、強制水泳試験 (FST)、尾懸垂試験 (TST)、学習性無力モデル、嗅球摘出モデル及び社会的隔離モデルなどの様々な動物モデルにおいて抗うつ作用を示すことが報告されている (46, 47, 68, 69)。また、既存の抗うつ薬が奏功しない corticosterone 反復投与モデルにおいても LY341495 は Ketamine と同様に抗うつ作用を示したことから、mGlu2/3 受容体拮抗薬は治療抵抗性うつ病にも有用であることが示唆されている (48)。さらに、既存の抗うつ薬が抗うつ作用を発現するまでに数週間を要する慢性予測不能ストレスモデルにおいても、LY341495 は Ketamine と同様に投与 24 時間後又は 48 時間後に抗うつ作用を示し、その作用は投与 10 日後まで持続することが報告されている (28, 70)。従って、mGlu2/3 受容体拮抗薬は即効性及び持続性の抗うつ作用を併せ持つことが示唆される。

mGlu2/3 受容体拮抗薬は抗うつ作用の機序においても、Ketamine のそれと一部共有することが示されている。即ち、mGlu2/3 受容体拮抗薬の抗うつ作用発現には Ketamine と同様に、グルタミン酸遊離促進による AMPA 受容体の活性化を介した TrkB/mTOR シグナルの活性化、それに続いて惹起される前頭前皮質におけるシナプスタンパク質の合成促進などの神経可塑的な変化が関与すると示唆されている (24, 26, 27, 29, 32, 69, 71-74)。

最近、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine は AMPA 受容体の活性化を介してラットの内側前頭前皮質の細胞外セロトニン量を増加させることが報告された (53, 55)。また、PET 試験において、Ketamine は AMPA 受容体を介してアカゲザルの側坐核及び腹側淡蒼球における 5-HT_{1B} 受容体の結合を上昇させることが報告されている (75)。さらに、セロトニン神経系とグルタミン酸神経系の相互作用もうつ病の病態に関与することが示唆されている (76-78)。これらのことから、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ作用発現には AMPA 受容体を介したセロトニン神経系の変化が重要な役割を果たすと考えられる (Fig. 9)。しかしながら、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ作用発現におけるセロトニン神経系の関与は未だ不明な点が多い。一方、mGlu5 受容体拮抗薬の MTEP もラットの前頭前皮質において細胞外セロトニン量を増加させることが報告されている (54) (Fig. 9)。さらに、MTEP の TST における抗うつ作用はセロトニン枯渇薬の PCPA 及び 5-HT_{2A/2C} 受容体拮抗薬の Ritanserin により拮抗されること

が報告されている (79)。これらのことから、mGlu5 受容体拮抗薬の抗うつ作用発現にもセロトニン神経系が関与することが推測される。しかしながら、NSFT において、mGlu5 受容体拮抗薬の抗うつ様作用発現におけるセロトニン神経系の関与及びその機序は明らかにされていない。そこで、第2章では NSFT を用いて mGlu2/3 受容体拮抗薬、mGlu5 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ様作用発現におけるセロトニン神経系の関与について検討した。

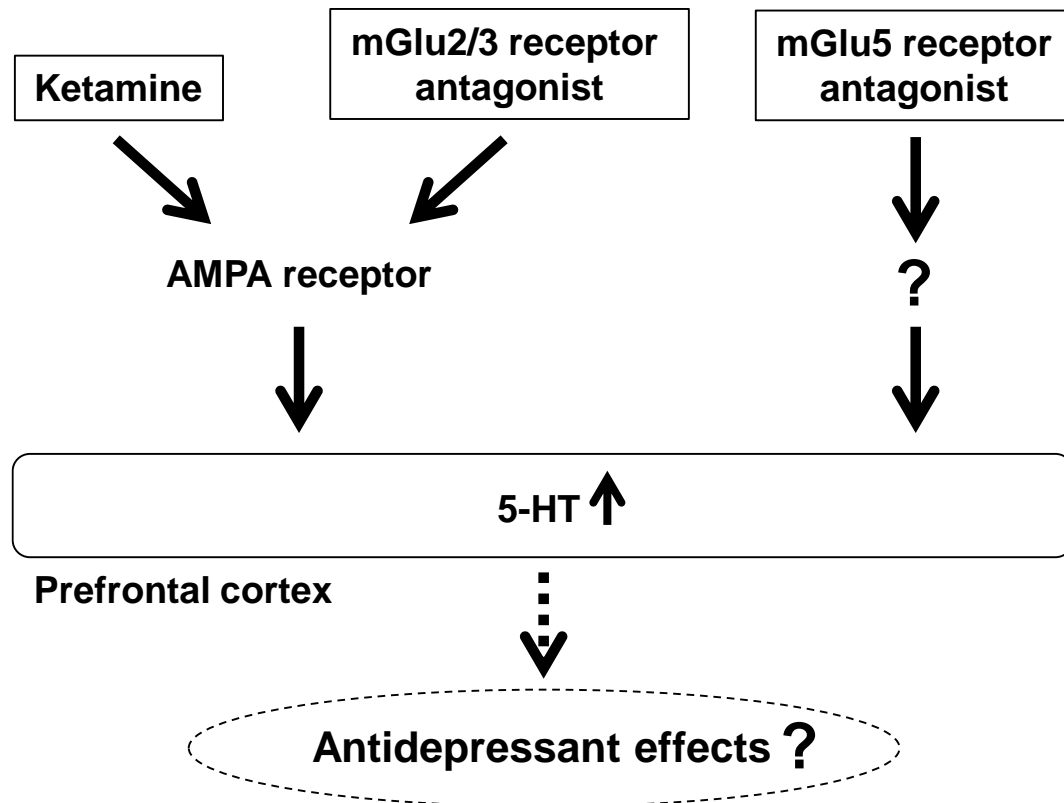


Fig. 9 Proposed mechanisms of the release of 5-HT in the prefrontal cortex induced by Ketamine, mGlu2/3 receptor antagonist and mGlu5 receptor antagonist.

Ketamine and mGlu2/3 receptor antagonist increase the release of 5-HT in the prefrontal cortex via the stimulation of AMPA receptor. The mGlu5 receptor antagonist increases the release of 5-HT in the prefrontal cortex via an unidentified mechanisms.

2-2. 実験材料・方法

2-2-1. 動物

動物は 7-9 週齢の C57BL/6J 系雄性マウス (Charles River Laboratories, Yokohama, Japan) を使用した。動物は室温 $23 \pm 3^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 20\%$ 、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。実験動物の飼育及び実験操作は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従って行なわれた。

2-2-2. 試薬

LY341495 (Tocris Cookson Ltd., Bristol, UK) は 1/15 M phosphate buffer (pH 8.0) に溶解し、薬液を調製した。Ketamine は生理食塩液で希釈し、薬液を調製した。MPEP 及び Ritanserin (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) は 0.5% MC に溶解し、薬液を調製した。CX546 (Tocris Cookson Ltd.) は 10% hydroxypropyl- β -cyclodextrin に溶解し、薬液を調製した。8-OH-DPAT (Research Biochemicals Inc., Natick, MA, USA) 及び WAY100635 (Sigma-Aldrich Co.) は生理食塩液に溶解し、薬液を調製した。NBQX (Tocris Cookson Ltd.) は生理食塩液に懸濁し、薬液を調製した。PCPA (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka) は 0.5% MC に懸濁し、薬液を調製した。PCA (Sigma-Aldrich Co.) は注射用水に溶解し、薬液を調製した。全ての薬液の投与容量は 10 ml/kg とした。

2-2-3. 新規環境摂食抑制試験

第 1 章 1-2-3 と同様の方法で実施した。本試験で使用した Ketamine 及び MPEP は検討した用量において摂餌量に影響を及ぼさないことが確認されている (Table 3, Table 4)。また、本試験で使用した WAY100635 及び Ritanserin の用量は *in vivo* において 5-HT_{1A} 受容体及び 5-HT_{2A/2C} 受容体を拮抗するのに十分な投与量であることが確認されている (80-82)。

Ketamine (30 mg/kg) 及び LY341495 (1 mg/kg) は試験の 30 分前に腹腔内投与した。MPEP (3 mg/kg) は試験の 60 分前に腹腔内投与した。CX546 (10 mg/kg) 及び 8-OH-DPAT (0.1, 0.3, 1, 3 mg/kg) は試験の 30 分前に皮下投与した。NBQX (1, 3, 10 mg/kg) は試験の 35 分前又は 65 分前に皮下投与した。WAY100635 (0.3, 1, 3 mg/kg) は試験の 60 分前又は 90 分前に皮下投与した。Ritanserin (0.125, 0.25, 0.5 mg/kg) は試験の 60 分前又は 90 分前に腹腔内投与した。PCPA (300 mg/kg) は試験前日まで 3 日間、1 日 2 回腹腔内投与し、試験は PCPA 最終投与の 18 時間後以降に行なった。

2-2-4. セロトニン遊離促進薬誘発首振り行動試験

試験日にマウスを飼育室から移動し、1 匹/ケージの状態、実験室に馴化させた。

PCA (10 mg/kg) を腹腔内投与し、投与 10 分後から 52 分後まで、18 分間隔で 2 分間ずつ (合計 3 回) の首振り行動の回数を測定した。首振り行動の回数は 2 分間の首振り行動を 3 回分合計することにより算出した。

2-2-5. セロトニン量測定

PCPA (300 mg/kg, i.p.) の最終投与 18 時間後に断頭し、脳を素早く摘出し、氷上で前頭皮質を分画した。前頭皮質は使用するまで -80℃ で保存した。前頭皮質は氷冷した 0.1M 過塩素酸溶液中でホモジナイズし、4℃、17,360×g で遠心分離した。上清中のセロトニン量は ELISA キット (Labor Diagnostika Nord, Nordhorn, Germany) を用いて測定した。

2-2-6. 統計

結果は全て平均値±標準誤差で示した。多群間比較の場合は、一元配置分散分析 (one-way analysis of variance: one-way ANOVA) 又は二元配置分散分析 (two-way ANOVA) を用いて解析した後、post-hoc 解析として Dunnett's test 又は LSD test を実施した。2 群比較の場合は Student's *t*-test を用いた。有意水準は何れも 5%未満とした。全ての統計解析には SAS 9.2 (SAS Institute Japan Ltd., Tokyo, Japan) を用いた。

2-3. 結果

2-3-1. mGlu5 受容体拮抗薬の抗うつ様作用発現における AMPA 受容体の関与

MPEP (3 mg/kg, i.p.) は摂食までの潜時を短縮し、その作用は AMPA 受容体拮抗薬の NBQX (1, 3, 10 mg/kg, s.c.) により拮抗されなかった (Fig. 10)。

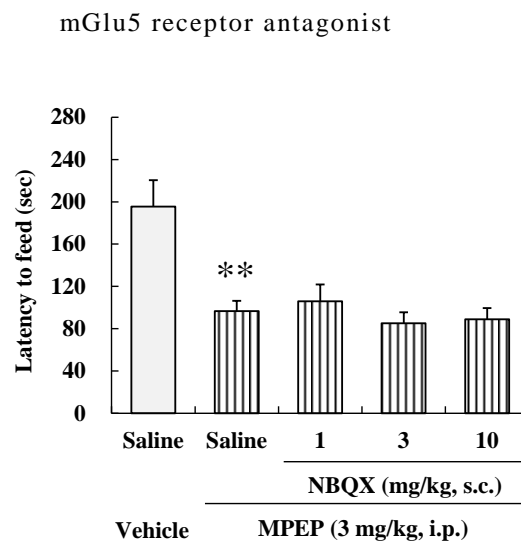


Fig. 10 Effect of an AMPA receptor antagonist on the action of MPEP in the NSFT in mice.

MPEP (3 mg/kg, i.p.) was administered 60 min prior to the test. NBQX (1, 3, 10 mg/kg, s.c.) was administered 65 min prior to the test. Values indicate the mean \pm S.E.M. ($n = 11-12$). ** $p < 0.01$ compared with Saline-treated Vehicle (Student's t -test).

2-3-2. mGlu2/3 受容体拮抗薬の抗うつ様作用発現における AMPA 受容体の関与

LY341495 (1 mg/kg, i.p.) は摂食までの潜時を短縮し、その作用は NBQX (10 mg/kg, s.c.) により拮抗された (Fig. 11)。NBQX (10 mg/kg, s.c.) はそれ自体で摂食までの潜時に影響を及ぼさなかった (Fig. 11)。

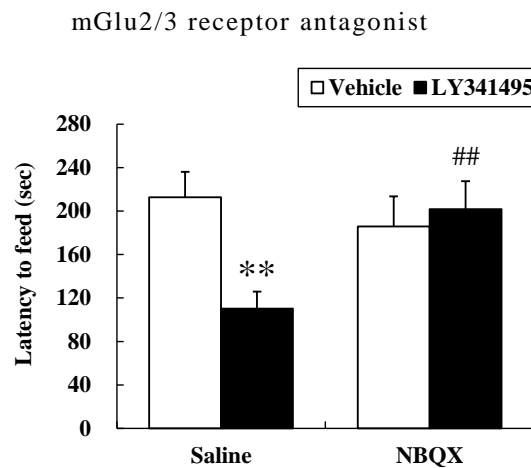


Fig. 11 Effect of an AMPA receptor antagonist on the action of LY341495 in the NSFT in mice.

LY341495 (1 mg/kg, i.p.) was administered 30 min prior to the test. NBQX (10 mg/kg, s.c.) was administered 35 min prior to the test. Values indicate the mean \pm S.E.M. ($n = 11-12$). ** $p < 0.01$ compared with Saline-treated Vehicle, ## $p < 0.01$ compared with Saline-treated LY341495 (LSD post *hoc* test).

2-3-3. Ketamine の抗うつ様作用発現における AMPA 受容体の関与

Ketamine (30 mg/kg, i.p.) は摂食までの潜時を短縮し、その作用は NBQX (10 mg/kg, s.c.) により拮抗された (Fig. 12)。

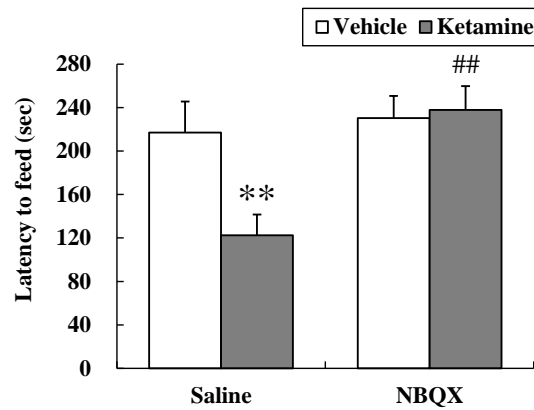


Fig. 12 Effect of an AMPA receptor antagonist on the action of Ketamine in the NSFT in mice.

Ketamine (30 mg/kg, i.p.) was administered 30 min prior to the test. NBQX (10 mg/kg, s.c.) was administered 35 min prior to the test. Values indicate the mean \pm S.E.M. (n = 11-12). **p < 0.01 compared with Saline-treated Vehicle, ##p < 0.01 compared with Saline-treated Ketamine (LSD post *hoc* test).

2-3-4. AMPA 受容体増強薬の抗うつ様作用発現における AMPA 受容体の関与

AMPA 受容体増強薬の CX546 (10 mg/kg, s.c.) は摂食までの潜時を短縮し、その作用は NBQX (10 mg/kg, s.c.) により拮抗された (Fig. 13)。

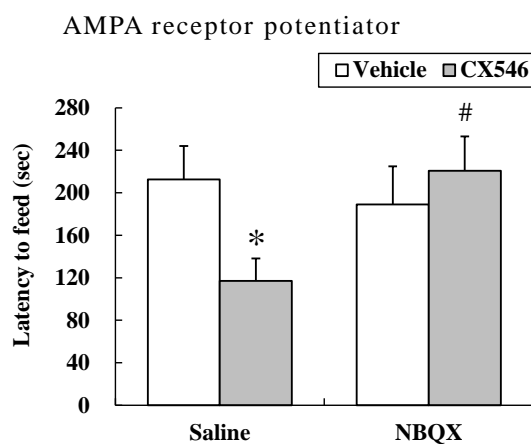


Fig. 13 Effect of an AMPA receptor antagonist on the action of CX546 in the NSFT in mice.

CX546 (10 mg/kg, s.c.) was administered 30 min prior to the test. NBQX (10 mg/kg, s.c.) was administered 35 min prior to the test. Values indicate the mean \pm S.E.M. ($n = 9-12$). * $p < 0.05$ compared with Saline-treated Vehicle, # $p < 0.05$ compared with Saline-treated CX546 (LSD post *hoc* test).

2-3-5. mGlu2/3 受容体拮抗薬及び AMPA 受容体増強薬の摂餌量に及ぼす作用

LY341495 (1 mg/kg, i.p.) 及び CX546 (10 mg/kg, s.c.) は投与 30 分後に、摂餌量に影響を及ぼさなかった (Table 5)。このことから、これら薬物の摂食までの潜時を短縮する作用に摂食量は関与しないことが示された。

Table 5 Effects of LY341495 and CX546 on food consumption in mice

Drugs	Food consumption (mg food / g of mouse)
Vehicle A (i.p.)	4.4 ± 0.3
LY341495 (1 mg/kg, i.p.)	5.3 ± 0.8
Vehicle B (s.c.)	4.0 ± 1.0
CX546 (10 mg/kg, s.c.)	3.8 ± 0.4

LY341495 (1 mg/kg, i.p.) or CX546 (10 mg/kg, s.c.) was administered 30 min prior to the test. Vehicle A: 1/15 M phosphate buffer, Vehicle B: 10% hydroxypropyl-β-cyclodextrin. Values indicate the mean ± S.E.M. (n = 4-6).

2-3-6. セロトニン枯渇薬のセロトニン量に及ぼす作用

セロトニン枯渇薬の PCPA の投与条件が脳内のセロトニンを枯渇させるのに十分であるかを ELISA により検討した。セロトニン枯渇薬の PCPA (300 mg/kg, i.p., twice daily for 3 days) は 0.5% MC 投与群と比較して、マウスの前頭皮質におけるセロトニン含有量を 74.8% 抑制した (Table 6)。このことから、今回用いた PCPA の投与条件は脳内のセロトニンを枯渇させるのに十分であることが免疫学的に示された。

Table 6 Effect of PCPA on 5-HT content in the frontal cortex in mice

Drugs	5-HT content (ng/mg tissue)	Percent change
0.5% MC	4.33 ± 0.80	—
PCPA	1.09 ± 0.24**	74.8

PCPA (300 mg/kg, i.p.) was administered twice daily for 3 consecutive days until the day before the test. Values represent as the mean ± S.E.M. (n = 4). **p < 0.01 compared with 0.5% MC (Student's *t*-test).

2-3-7. セロトニン遊離促進薬誘発首振り行動試験におけるセロトニン枯渇薬の作用

セロトニン枯渇薬の PCPA の投与条件が脳内のセロトニンを枯渇させるのに十分であるかをセロトニン遊離促進薬誘発首振り行動試験により検討した。セロトニン遊離促進薬の PCA (10 mg/kg, i.p.) は首振り行動の回数を増加させ、その作用はセロトニン枯渇薬の PCPA (300 mg/kg, i.p., twice daily for 3 days) により拮抗された (Fig. 14)。PCPA (300 mg/kg, i.p., twice daily for 3 days) はそれ自体で首振り行動の回数に影響を及ぼさなかった (Fig. 14)。このことから、今回用いた PCPA の投与条件は脳内のセロトニンを枯渇させるのに十分であることが行動薬理的に示された。

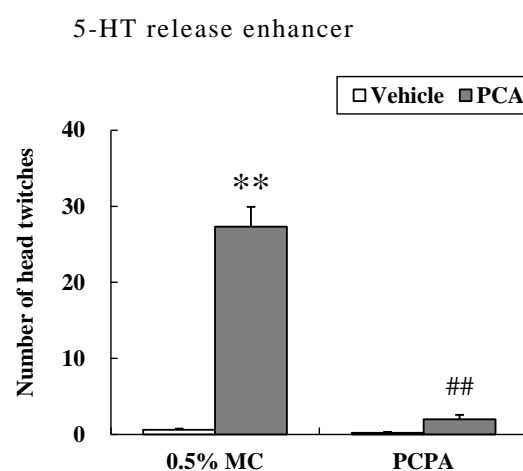


Fig. 14 Effect of 5-HT depletion on PCA-induced head twitch response in mice.

Mice were treated with PCPA (300 mg/kg, i.p.) twice daily for 3 consecutive days until the day before the test, and head twitch responses induced by injection of PCA (10 mg/kg, i.p.) were counted. Values indicate the mean \pm S.E.M. (n = 10). **p < 0.01 compared with 0.5% MC-treated Vehicle, ##p < 0.01 compared with 0.5% MC-treated PCA (LSD post hoc test).

2-3-8. mGlu5 受容体拮抗薬の抗うつ様作用発現におけるセロトニンの関与

MPEP (3 mg/kg, i.p.) は摂食までの潜時を短縮し、その作用はセロトニン枯渇薬の PCPA (300 mg/kg, i.p., twice daily for 3 days) により拮抗された (Fig. 15)。PCPA (300 mg/kg, i.p., twice daily for 3 days) はそれ自体で摂食までの潜時に影響を及ぼさなかった (Fig. 15)。

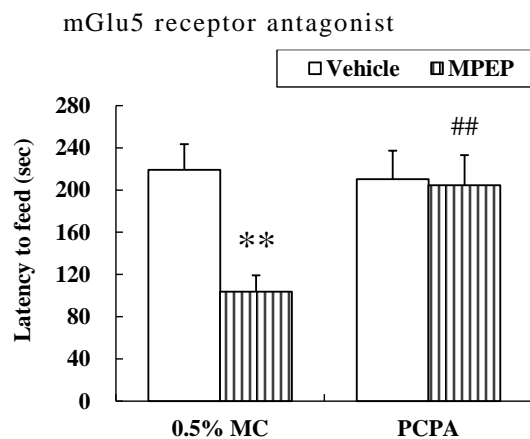


Fig. 15 Effect of 5-HT depletion on the action of MPEP in the NSFT in mice.

MPEP (3 mg/kg, i.p.) was administered 60 min prior to the test. PCPA (300 mg/kg, i.p.) was administered twice daily for 3 consecutive days until the day before the test. Values indicate the mean \pm S.E.M. (n = 10-12). **p < 0.01 compared with 0.5% MC-treated Vehicle, ##p < 0.01 compared with 0.5% MC-treated MPEP (LSD post hoc test).

2-3-9. mGlu2/3 受容体拮抗薬の抗うつ様作用発現におけるセロトニンの関与

LY341495 (1 mg/kg, i.p.) は摂食までの潜時を短縮し、その作用はセロトニン枯渇薬の PCPA (300 mg/kg, i.p., twice daily for 3 days) により拮抗された (Fig. 16)。

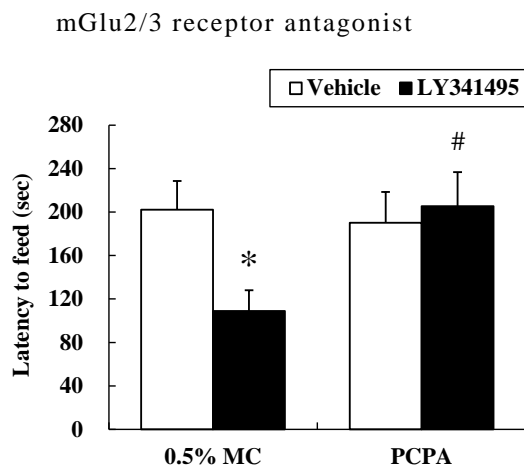


Fig. 16 Effect of 5-HT depletion on the action of LY341495 in the NSFT in mice.

LY341495 (1 mg/kg, i.p.) was administered 30 min prior to the test. PCPA (300 mg/kg, i.p.) was administered twice daily for 3 consecutive days until the day before the test. Values indicate the mean \pm S.E.M. (n = 12). *p < 0.05 compared with 0.5% MC-treated Vehicle, #p < 0.05 compared with 0.5% MC-treated LY341495 (LSD post *hoc* test).

2-3-10. Ketamine の抗うつ様作用発現におけるセロトニンの関与

Ketamine (30 mg/kg, i.p.) は摂食までの潜時を短縮し、その作用はセロトニン枯渇薬の PCPA (300 mg/kg, i.p., twice daily for 3 days) により拮抗された (Fig. 17)。

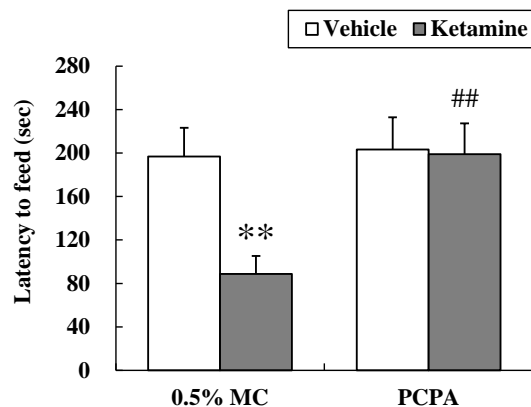


Fig. 17 Effect of 5-HT depletion on the action of Ketamine in the NSFT in mice.

Ketamine (30 mg/kg, i.p.) was administered 30 min prior to the test. PCPA (300 mg/kg, i.p.) was administered twice daily for 3 consecutive days until the day before the test. Values indicate the mean \pm S.E.M. (n = 11-12). **p < 0.01 compared with 0.5% MC-treated Vehicle, ##p < 0.01 compared with 0.5% MC-treated Ketamine (LSD post hoc test).

2-3-11. AMPA 受容体増強薬の抗うつ様作用発現におけるセロトニンの関与

CX546 (10 mg/kg, i.p.) は摂食までの潜時を短縮し、その作用はセロトニン枯渇薬の PCPA (300 mg/kg, i.p., twice daily for 3 days) により拮抗された (Fig. 18)。

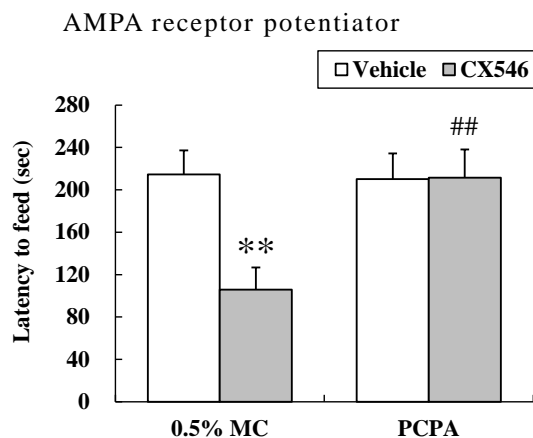


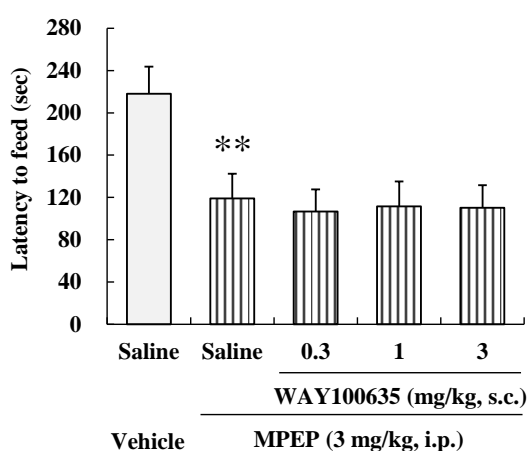
Fig. 18 Effect of 5-HT depletion on the action of CX546 in the NSFT in mice.

CX546 (10 mg/kg, s.c.) was administered 30 min prior to the test. PCPA (300 mg/kg, i.p.) was administered twice daily for 3 consecutive days until the day before the test. Values indicate the mean \pm S.E.M. (n = 11-12). **p < 0.01 compared with 0.5% MC-treated Vehicle, ##p < 0.01 compared with 0.5% MC-treated CX546 (LSD post *hoc* test).

2-3-12. mGlu5 受容体拮抗薬の抗うつ様作用発現における 5-HT_{1A} 受容体及び 5-HT_{2A/2C} 受容体の関与

MPEP (3 mg/kg, i.p.) は摂食までの潜時を短縮し、その作用は 5-HT_{1A} 受容体拮抗薬の WAY100635 (1, 3, 10 mg/kg, s.c.) により拮抗されなかった (Fig. 19A)。一方、MPEP の作用は 5-HT_{2A/2C} 受容体拮抗薬の Ritanserin (0.5 mg/kg, i.p.) により拮抗された (Fig. 19B)。

(A) 5-HT_{1A} receptor



(B) 5-HT_{2A/2C} receptor

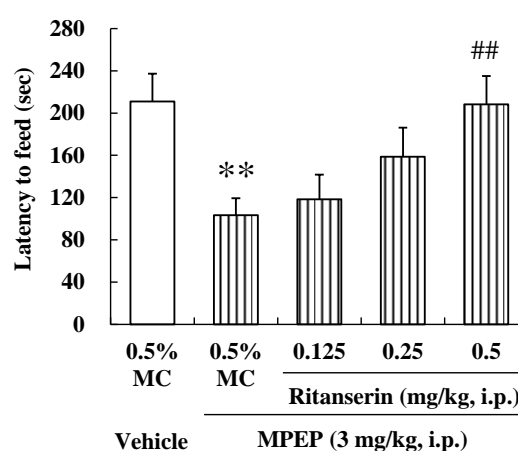


Fig. 19 Effects of a 5-HT_{1A} receptor antagonist or a 5-HT_{2A/2C} receptor antagonist on the action of MPEP in the NSFT in mice.

MPEP (3 mg/kg, i.p.) was administered 60 min prior to the test. (A) WAY100635 (0.3, 1, 3 mg/kg, s.c.) was administered 90 min prior to the test. ***p* < 0.01 compared with Saline-treated Vehicle (Student's *t*-test). (B) Ritanserin (0.125, 0.25, 0.5 mg/kg, i.p.) was administered 90 min prior to the test. ***p* < 0.01 compared with 0.5% MC-treated Vehicle (Student's *t*-test), ##*p* < 0.01 compared with 0.5% MC-treated MPEP (Dunnett's test). Values indicate the mean ± S.E.M. ((A): *n* = 11-12, (B): *n* = 12).

2-3-13. mGlu2/3 受容体拮抗薬の抗うつ様作用発現における 5-HT_{1A} 受容体及び 5-HT_{2A/2C} 受容体の関与

LY341495 (1 mg/kg, i.p.) は摂食までの潜時を短縮し、その作用は 5-HT_{1A} 受容体拮抗薬の WAY100635 (1, 3 mg/kg, s.c.) により拮抗された (Fig. 20A)。一方、LY341495 の作用は 5-HT_{2A/2C} 受容体拮抗薬の Ritanserin (0.5 mg/kg, i.p.) により拮抗されなかった (Fig. 20B)。

(A) 5-HT_{1A} receptor

(B) 5-HT_{2A/2C} receptor

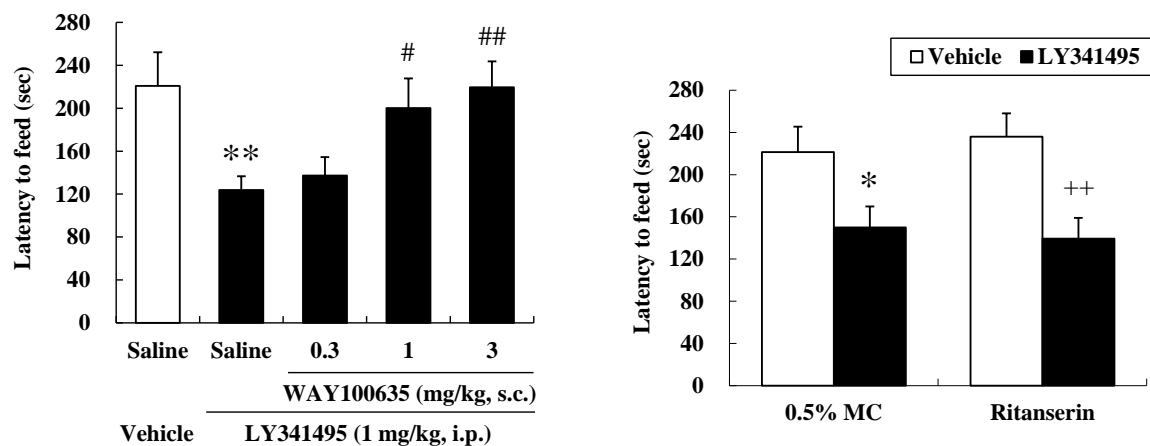


Fig. 20 Effects of a 5-HT_{1A} receptor antagonist or a 5-HT_{2A/2C} receptor antagonist on the action of LY341495 in the NSFT in mice.

LY341495 (1 mg/kg, i.p.) was administered 30 min prior to the test. (A) WAY100635 (0.3, 1, 3 mg/kg, s.c.) was administered 60 min prior to the test. ** $p < 0.01$ compared with Saline-treated Vehicle (Student's *t*-test), # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ compared with Saline-treated LY341495 (Dunnett's test). (B) Ritanserin (0.5 mg/kg, i.p.) was administered 60 min prior to the test. * $p < 0.05$ compared with 0.5% MC-treated Vehicle (LSD post *hoc* test), ++ $p < 0.01$ compared with Ritanserin-treated Vehicle (LSD post *hoc* test). Values indicate the mean \pm S.E.M. ((A): $n = 12$, (B): $n = 11-12$).

2-3-14. Ketamine の抗うつ様作用発現における 5-HT_{1A} 受容体及び 5-HT_{2A/2C} 受容体の関与

Ketamine (30 mg/kg, i.p.) は摂食までの潜時を短縮し、その作用は 5-HT_{1A} 受容体拮抗薬の WAY100635 (3 mg/kg, s.c.) により拮抗された (Fig. 21A)。一方、Ketamine の作用は 5-HT_{2A/2C} 受容体拮抗薬の Ritanserin (0.5 mg/kg, i.p.) により拮抗されなかった (Fig. 21B)。

(A) 5-HT_{1A} receptor

(B) 5-HT_{2A/2C} receptor

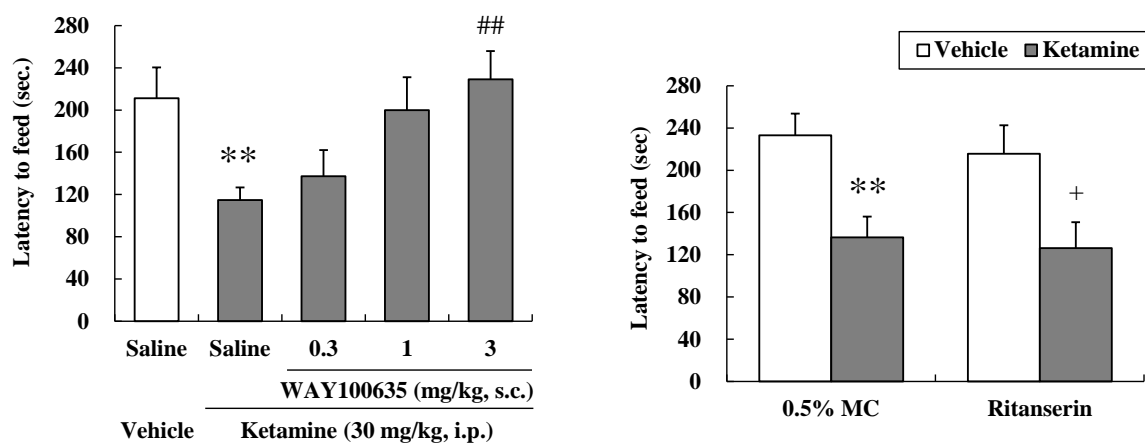


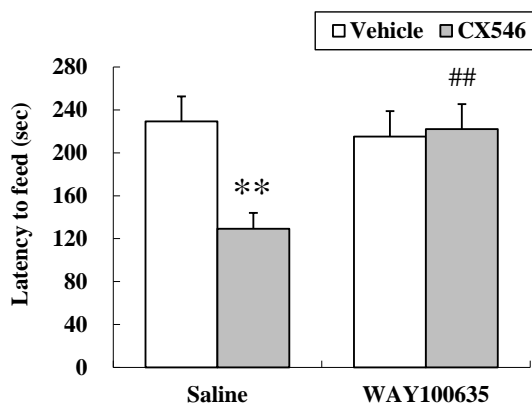
Fig. 21 Effects of a 5-HT_{1A} receptor antagonist or a 5-HT_{2A/2C} receptor antagonist on the action of Ketamine in the NSFT in mice.

Ketamine (30 mg/kg, i.p.) was administered 30 min prior to the test. (A) WAY100635 (0.3, 1, 3 mg/kg, s.c.) was administered 60 min prior to the test. ** $p < 0.01$ compared with Saline-treated Vehicle (Student's t -test), ## $p < 0.01$ compared with Saline-treated Ketamine (Dunnett's test). (B) Ritanserin (0.5 mg/kg, i.p.) was administered 60 min prior to the test. ** $p < 0.01$ compared with 0.5% MC-treated Vehicle (LSD post hoc test), + $p < 0.05$ compared with Ritanserin-treated Vehicle (LSD post hoc test). Values indicate the mean \pm S.E.M. ((A): $n = 11-12$, (B): $n = 10-12$).

2-3-15. AMPA 受容体増強薬の抗うつ様作用発現における 5-HT_{1A} 受容体及び 5-HT_{2A/2C} 受容体の関与

CX546 (10 mg/kg, s.c.) は摂食までの潜時を短縮し、その作用は 5-HT_{1A} 受容体拮抗薬の WAY100635 (3 mg/kg, s.c.) により拮抗された (Fig. 22A)。一方、CX546 の作用は 5-HT_{2A/2C} 受容体拮抗薬の Ritanserin (0.5 mg/kg, i.p.) により拮抗されなかった (Fig. 22B)。WAY100635 (3 mg/kg, s.c.) 及び Ritanserin (0.5 mg/kg, i.p.) はそれ自体で摂食までの潜時に影響を及ぼさなかった (Fig. 22A, B)。

(A) 5-HT_{1A} receptor



(B) 5-HT_{2A/2C} receptor

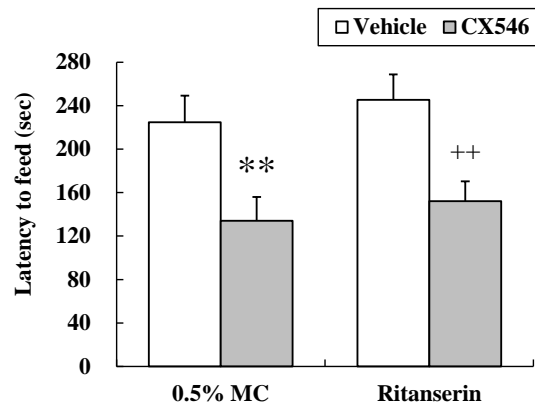


Fig. 22 Effects of a 5-HT_{1A} receptor antagonist or a 5-HT_{2A/2C} receptor antagonist on the action of CX546 in the NSFT in mice.

CX546 (10 mg/kg, s.c.) was administered 30 min prior to the test. (A) WAY100635 (3 mg/kg, s.c.) was administered 60 min prior to the test. ** $p < 0.01$, compared with Saline-treated Vehicle, ## $p < 0.01$, compared with Saline-treated CX546 (LSD post *hoc* test). (B) Ritanserin (0.5 mg/kg, i.p.) was administered 60 min prior to the test. ** $p < 0.01$, compared with 0.5% MC-treated Vehicle, ++ $p < 0.01$ compared with Ritanserin-treated Vehicle (LSD post *hoc* test). Values indicate the mean \pm S.E.M. ($n = 12$).

2-3-16. 5-HT_{1A} 受容体作動薬の作用

8-OH-DPAT (0.1, 0.3, 1, 3 mg/kg, i.p.) は摂食までの潜時に影響を及ぼさなかった (Fig. 23)。

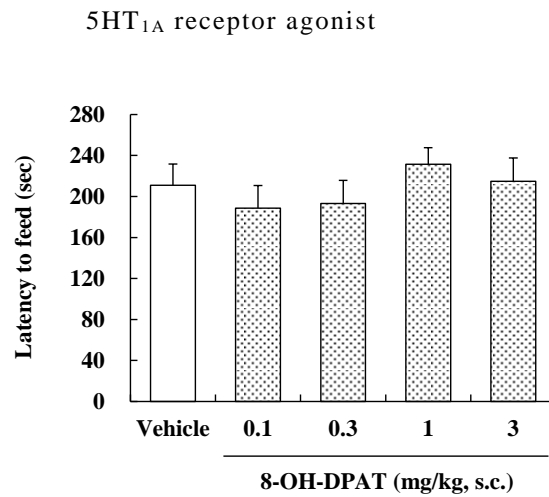


Fig. 23 Effect of 8-OH-DPAT in the NSFT in mice.

8-OH-DPAT (0.1, 0.3, 1, 3 mg/kg, s.c.) was administered 30 min prior to the test. Values indicate the mean \pm S.E.M. (n = 8).

2-4 考察

本章では NSFT を用いて mGlu2/3 受容体拮抗薬である LY341495、mGlu5 受容体拮抗薬である MPEP 及び Ketamine の抗うつ様作用発現におけるセロトニン神経系の関与について検討した。

NSFT における LY341495 及び Ketamine の抗うつ様作用は AMPA 受容体拮抗薬である NBQX により拮抗された。NBQX はそれ自体では摂食までの潜時に影響を及ぼさなかった。また、本研究で用いた LY341495、MPEP 及び Ketamine の用量はそれ自体で摂餌量に影響を及ぼさなかったことから、これら薬物の抗うつ様作用は非特異的な作用ではないことが示された。これらの結果から、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine は AMPA 受容体の活性化を介して抗うつ様作用を発現することが示唆された。このことは AMPA 受容体増強薬である CX546 が本モデルにおいて抗うつ様作用を発揮し、その作用が NBQX により拮抗された結果からも支持される。本章の結果は、他の動物モデルにおける結果とも一致する (26, 29, 53)。さらに、mGlu2/3 受容体拮抗薬がグルタミン酸作動性神経終末の自己受容体を抑制することにより、前頭前皮質でのグルタミン酸遊離を促進することが報告されている (72)。また、Ketamine は前頭前皮質の錐体神経細胞の脱抑制を惹起し、グルタミン酸遊離を促進することが示唆されている (24)。これらのことから、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine は、前頭前皮質においてグルタミン酸遊離を促進し、ポストシナプスの AMPA 受容体の活性化を介して抗うつ様作用を発現している可能性が考えられた。一方、MPEP の抗うつ様作用は NBQX により拮抗されず、この AMPA 受容体を介さない作用は、FST における報告とも一致する (79)。従って、mGlu5 受容体拮抗薬は AMPA 受容体の活性化を介さずに抗うつ様作用を発現することが示された。

LY341495、MPEP 及び Ketamine の抗うつ様作用はセロトニン枯渇薬である PCPA により拮抗された。PCPA はそれ自体では摂食までの潜時に影響を及ぼさなかった。これらの結果から、NSFT における mGlu2/3 受容体拮抗薬、mGlu5 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ様作用にはセロトニン神経系が関与していることを本研究は初めて示した。また、PCPA はマウスの前頭皮質におけるセロトニン量を 74.8%減少させ、セロトニン遊離促進薬である PCA により惹起される首振り行動を抑制したことから、本実験で用いた PCPA の投与条件は脳内のセロトニンを枯渇させるのに十分であることが示された。さらに、AMPA 受容体増強薬である CX546 の抗うつ様作用は PCPA により拮抗された。これまでの結果を勘案すると、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine は AMPA 受容体の活性化により惹起されるセロトニン遊離促進を介して抗うつ様作用を発現したと考えられた。mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine が AMPA 受容体の活性化を介してラットの内側前頭前皮質の細胞外セロトニン量を増加させることが報告されており (53, 55)、本研究結果と仮説を支持するものである。さらに、MTEP はラットの前頭前皮質におい

て細胞外セロトニン量を増加させることが報告されている (54)。従って、mGlu5 受容体拮抗薬も同様にセロトニン遊離促進を介して抗うつ様作用を発現していると考えられた。一方、mGlu5 受容体拮抗薬の抗うつ様作用は NBQX により拮抗されなかったことから、mGlu5 受容体拮抗薬は AMPA 受容体非依存的な機序を介してセロトニン遊離を促進することにより、抗うつ様作用を発現している可能性が考えられた。これまで、セロトニン神経系が mGlu 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ様作用発現に重要な役割を果たしていることを示してきた。そこで、次にセロトニン受容体に着目し、抗うつ様作用発現に関与するそのサブタイプについて検討した。

セロトニン受容体サブタイプの中でも、5-HT_{1A} 受容体及び 5-HT_{2A/2C} 受容体は情動に関与する皮質及び海馬などの脳領域において多く発現しており、抗うつ作用及び抗不安作用において重要な役割を果たすとされている (83-85)。そこで、5-HT_{1A} 受容体及び 5-HT_{2A/2C} 受容体の関与についてそれぞれの 5-HT 受容体拮抗薬を用いて検討した。その結果、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine は 5-HT_{1A} 受容体の活性化を介して抗うつ様作用を発現することが示された。同様に、AMPA 受容体増強薬である CX546 の抗うつ様作用も 5-HT_{1A} 受容体の活性化を介して発現することが示された。これらのことから、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine は AMPA 受容体を活性化することによりセロトニン遊離を促進し、その結果、5-HT_{1A} 受容体を活性化して抗うつ様作用を発現する可能性が考えられた。一方、5-HT_{1A} 受容体作動薬である 8-OH-DPAT は作用を示さなかった。これまで、8-OH-DPAT は全身投与あるいは背側縫線核への局所投与により、前頭前皮質においてセロトニン遊離を抑制することから、5-HT_{1A} 受容体作動薬はプレシナプスの自己受容体の活性化を介して前頭前皮質のセロトニン遊離を抑制することが示唆されている (81, 86, 87)。これに対し、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine は前頭前皮質のセロトニン遊離を促進することが報告されていることから、プレシナプスの 5-HT_{1A} 自己受容体には作用しない可能性が考えられる。これらのことを考慮すると、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine はポストシナプスの 5-HT_{1A} 受容体を選択的に活性化することにより作用を発現している可能性が考えられた。加えて、うつ病患者の前頭前皮質において、5-HT_{1A} 受容体のタンパク質が低下していること (88, 89)、及びラットの海馬においては三環系抗うつ薬の Imipramine 及び SSRI の Paroxetine の長期反復投与によりポストシナプスの 5-HT_{1A} 受容体の機能が亢進されることが報告されている (90, 91)。さらに、抗うつ薬は長期反復投与することにより抗うつ作用を発現することから、ポストシナプスの 5-HT_{1A} 受容体の活性化が抗うつ作用発現に密接に関係すると推測されている (90, 91)。これらの報告は mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine が三環系抗うつ薬及び SSRI とは異なり、単回投与で選択的にポストシナプスの 5-HT_{1A} 受容体の活性化を介して、抗うつ様作用を発現している可能性を支持するものである。

一方、mGlu5 受容体拮抗薬は 5-HT_{2A/2C} 受容体の活性化を介して抗うつ様作用を発現することが示唆された。この結果は TST 及び Vogel 型葛藤飲水試験における結果と一致している (54, 79)。本研究において、mGlu5 受容体拮抗薬の抗うつ様作用発現にはセロ

トニン遊離の促進が関与する可能性が示されたこと、さらに、MPEP がセロトニン受容体に対する親和性を有していないことを考慮すると (92)、MPEP はセロトニン遊離を促進し、間接的に 5-HT_{2A/2C} 受容体を活性化して作用を発現する可能性が考えられる。本研究においては、mGlu5 受容体拮抗薬の抗うつ様作用発現にセロトニン遊離の促進が関与していることを示唆したが、セロトニン受容体サブタイプの関与については mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine と異なることが明らかとなった。興味深いことに、mGlu5 受容体ノックアウトマウスにおいて、5-HT_{2A} 受容体作動薬の DOM に対する運動量の反応性が上昇することが報告されている (93)。即ち、mGlu5 受容体の遮断により 5-HT_{2A} 受容体の感受性が増大することが示唆されている。さらに、5-HT₂ 受容体は GABA 神経に局在し、5-HT_{2A/2C} 受容体作動薬である DOI は前頭前皮質において GABA 遊離を促進することが報告されている (94, 95)。うつ病患者において GABA 神経系が障害されていることを考慮すると (96)、5-HT₂ 受容体を介した GABA 神経系の調節が本研究で観察された mGlu5 受容体拮抗薬の抗うつ様作用発現に関与している可能性が考えられた。

本章において、mGlu2/3 受容体拮抗薬、mGlu5 受容体拮抗薬及び Ketamine の NSFT における抗うつ様作用発現にはセロトニン神経系が関与することを初めて明らかにした。さらに、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine は AMPA 受容体の活性化を介して前頭前皮質のセロトニン遊離を促進し、その結果、5-HT_{1A} 受容体を活性化することにより抗うつ様作用を発現している可能性が示された (Fig. 24)。一方、mGlu5 受容体拮抗薬は AMPA 受容体非依存的に前頭前皮質のセロトニン遊離を促進し、5-HT_{2A/2C} 受容体を活性化することにより抗うつ様作用を発現している可能性が示された (Fig. 24)。

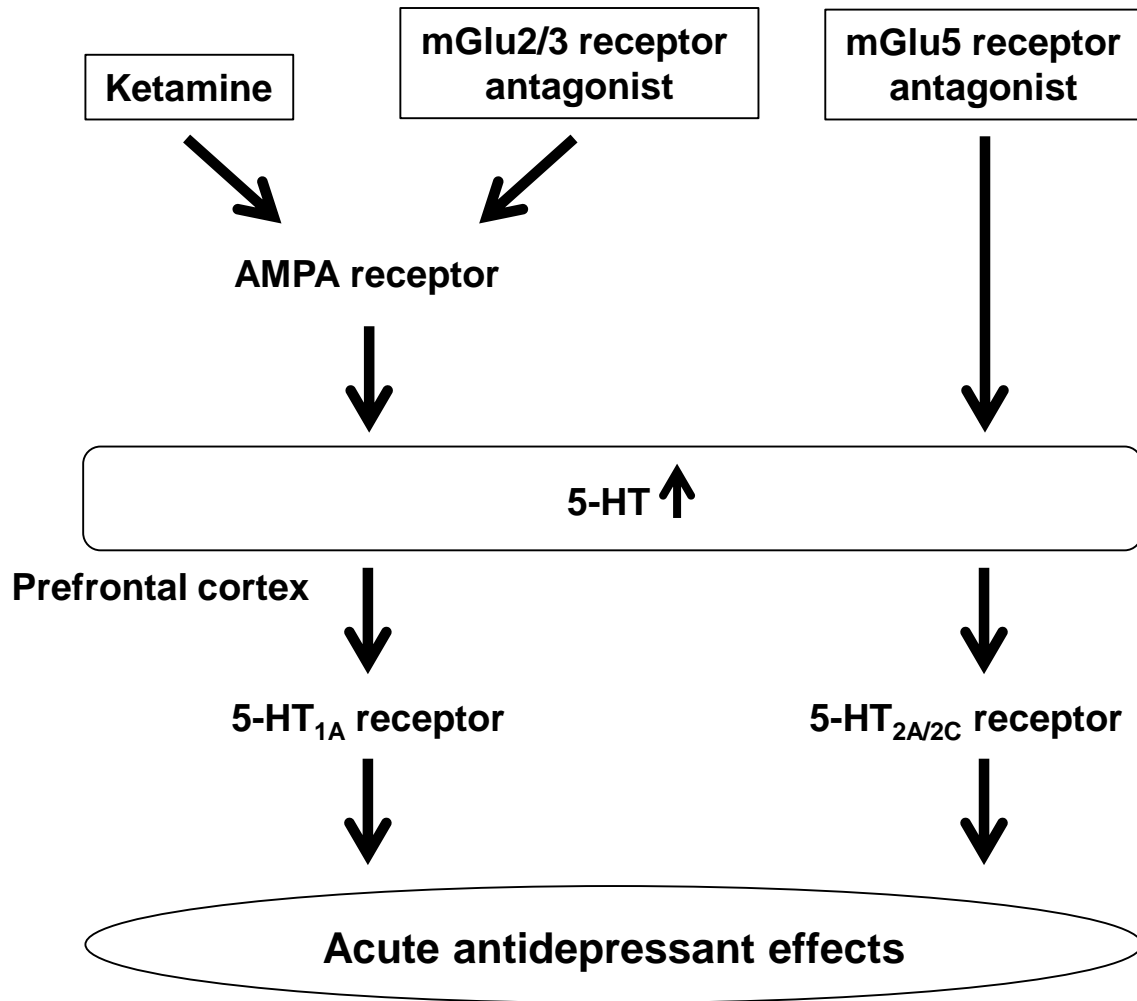


Fig. 24 Proposed mechanisms of the acute effects of Ketamine, mGlu2/3 receptor antagonist and mGlu5 receptor antagonist in the NSFT.

Ketamine and mGlu2/3 receptor antagonist increase the release of 5-HT in the prefrontal cortex via the stimulation of AMPA receptor and subsequently activate the 5-HT_{1A} receptor, leading to the acute effects in the NSFT. The mGlu5 receptor antagonist increases the release of 5-HT in the prefrontal cortex and subsequently activate the 5-HT_{2A/2C} receptor, leading to the acute effect in the NSFT.

第3章 代謝型グルタミン酸 2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ作用における内側前頭前皮質－背側縫線核回路を介したセロトニン神経の関与

3-1. 序論

第2章において、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の NSFT における抗うつ様作用発現には何れも共通するセロトニン神経系の活性化が関与することが明らかとなった。セロトニン神経は背側縫線核に神経核を有し、このセロトニン神経は前頭前皮質、外側手綱核、線条体、尾側淡蒼球、視床、視床下部及び扁桃体などからの神経投射によりその活性が制御されている (97)。最近、内側前頭前皮質からのグルタミン酸神経により制御されている背側縫線核の神経をオプトジェネティクスにより選択的に刺激すると強制水泳試験 (FST) において抗うつ作用が発現し、内側前頭前皮質及び背側縫線核の神経全体の刺激では抗うつ作用は発現しないと報告された (98)。このことから、内側前頭前皮質から背側縫線核に投射しているグルタミン酸神経により選択的に活性化されるセロトニン神経が抗うつ作用の発現において重要な役割を果たしている可能性が考えられる。また、この仮説は、内側前頭前皮質の脳深部刺激による抗うつ作用がセロトニン枯渇により拮抗されることから支持される (99)。これまでに、著者らは、mGlu2/3 受容体拮抗薬が背側縫線核のセロトニン神経発火を促進すること、及び AMPA 受容体の活性化を介して内側前頭前皮質における細胞外セロトニン量を増加させることを報告している (53, 100)。また、NMDA 受容体拮抗薬の MK-801 は内側前頭前皮質の AMPA 受容体活性化を介して内側前頭前皮質における細胞外セロトニン量を増加させることも報告されている (101)。従って、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine は内側前頭前皮質の AMPA 受容体の活性化を介して背側縫線核のセロトニン神経発火を促進させ、内側前頭前皮質におけるセロトニン遊離を増加させている可能性が考えられる。さらに、第2章において、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ様作用発現には、AMPA 受容体を介したセロトニン神経系の活性化が関与することを示唆した。これらのことから、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ作用発現には内側前頭前皮質の AMPA 受容体の活性化を介して調節される背側縫線核のセロトニン神経の活性化が関与している可能性が考えられる。しかしながら、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ作用発現に内側前頭前皮質－背側縫線核回路のグルタミン酸神経を介したセロトニン神経の活性が関与するか否かについては明らかにされていない。そこで、第3章では、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ作用発現における内側前頭前皮質－背側縫線核回路により制御されるセロトニン神経の関与について最も一般的な抗うつ活性の評価方法である FST、脳内微量注入法及び免疫組織化学的手法を用い検討した。

3-2. 実験材料・方法

3-2-1. 動物

動物は 7-9 週齢の C57BL/6J 系雄性マウス (Charles River Laboratories, Yokohama, Japan) を使用した。動物は室温 $23 \pm 3^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 20\%$ 、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。実験動物の飼育及び実験操作は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従って行なわれた。

3-2-2. 試薬

(全身投与) LY341495 は 1/15 M phosphate buffer (pH 8.0) に溶解し、薬液を調製した。Ketamine は生理食塩液で希釈し、薬液を調製した。Paroxetine (Toronto Research Chemicals Inc., NORTH YORK, ON, Canada) は生理食塩液に溶解し、薬液を調製した。NBQX は生理食塩液に懸濁し、薬液を調製した。PCPA は 0.5% MC に懸濁し、薬液を調製した。全身投与に使用する薬液の投与容量は 10 ml/kg とした。

(局所投与) LY341495 は 1/15 M phosphate buffer (pH 8.0) に溶解し、リンゲル液 (147 mM NaCl, 4 mM KCl, 2.4 mM CaCl_2) で 1000 又は 10000 倍希釈して、薬液を調製した。Ketamine (50 mg/ml) はリンゲル液で 7 又は 70 倍希釈して、薬液を調整した。NBQX は DMSO に溶解し、リンゲル液で 10 倍希釈して、薬液を調製した。

3-2-3. 強制水泳試験

試験前日にマウスを飼育室から移動し、8 匹/ケージで実験室に馴化させた。試験には水温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ の水を水深 13 ± 1 cm になるように入れたアクリル製無色透明の円筒 (内径 17 cm、高さ 24 cm) を使用した。マウスを円筒の水中に静かに入れ、6 分間強制的に水泳させた (プレ試験)。水泳後、動物を取り出し、ホームケージに戻した。プレ試験終了の 24.5 時間後に、マウスを再び 6 分間強制的に水泳させた (試験)。試験時には円筒の前方に設置されたビデオカメラによりマウスの行動を録画した。無動の基準は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とした。無動時間の測定にはストップウォッチを使用した。無動時間の短縮は抗うつ作用の発現を示す。

Ketamine (3, 10, 30 mg/kg)、LY341495 (0.1, 0.3, 1 mg/kg) 及び Paroxetine (1, 3, 10 mg/kg) は試験の 30 分前に腹腔内投与した。NBQX (1, 3, 10 mg/kg) は試験の 35 分前に皮下投与した。PCPA (300 mg/kg) はプレ試験前日まで 3 日間、1 日 2 回腹腔内投与し、プレ試験は PCPA 最終投与の 18 時間後以降に行なった。

3-2-4. 脳内微量注入法

ガイドカニューレの埋め込み

マウスをペントバルビタールナトリウム (ソムノペンチル、50 mg/kg, i.p.,

Kyoritsuiseiyaku Co., Tokyo, Japan) で麻酔後、脳定位固定装置 (SR-5N, Narishige Co., Tokyo, Japan) に固定した。手術用メスで頭皮を切開し、頭蓋を露出させ、Paxinos and Franklin の脳図譜に従って歯科用ドリルで、bregma から吻側方向に 2.0 mm、側方に 1.4 mm の位置に直径 1 mm 程度の孔をあけた。ガイドカニューレ (AG-4, Eicom Co., Kyoto, Japan) の先端が内側前頭前皮質に位置するように、20° の角度をつけ、脳組織の表面から腹側へ 2.3 mm 刺入した。尚、ガイドカニューレ挿入位置より後方の任意の位置にアンカービスを埋め込み、歯科用セメント (GC UNIFAST, GC Co., Tokyo, Japan) を用いてガイドカニューレを両側に固定した。手術後、ダミーカニューレ (AD-4, Eicom Co.) をガイドカニューレに挿入し、キャップナット (AC-1, Eicom Co.) で固定した。内側前頭前皮質への薬液投与は手術 2 日目以降に実施した。

内側前頭前皮質内投与

内側前頭前皮質内投与はポリエチレンカテーテルを介してマイクロシリンジ (Hamilton Co., Reno, NV, USA) に接続したマイクロインジェクションカニューレ (AMI-4.5, Eicom Co.) をガイドカニューレに挿入することにより実施した。LY341495 (0.003, 0.03 pmol/0.1 µl/side)、Ketamine (0.3, 3 nmol/0.1 µl/side) 及び NBQX (0.01, 0.03 nmol/0.1 µl/side) はシリンジポンプ (HARVARD APPARATUS Co., Holliston, MA, USA) を用いて 0.05 µl/min の速度で 0.1 µl を両側に投与した。投与終了後、マイクロインジェクションカニューレを 2 分間留置した。LY341495 及び Ketamine は試験 30 分前に投与し、NBQX は試験開始の 35 分前に投与した。試験終了後、薬液の投与部位を確認するため、Methylene blue (0.1 µl, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) を投与した。Methylene blue はシリンジポンプを用いて 0.05 µl/min の速度で 0.1 µl を両側に投与した。投与終了後、マイクロインジェクションカニューレを 2 分間留置した。留置後、断頭して素早く脳を摘出した後、冠状切片を作製し、実体顕微鏡下で刺入部位を確認した。

3-2-5. 自発運動量試験

試験前日にマウスを飼育室から移動し、8 匹/ケージで実験室に馴化させた。試験にはアクリル製無色透明の円筒 (内径 30 cm、高さ 30 cm) を防音箱の中に入れて使用した。マウスを円筒の中に静かに入れ、自発運動量を SCANET apparatus (Neuroscience Inc., Tokyo, Japan) を用いて 60 分間測定した。

3-2-6. 免疫染色

灌流固定

灌流固定は LY341495 (0.003, 0.03 pmol/0.1 µl/side, 1 mg/kg, s.c.) 及び Ketamine (0.3, 3 nmol/0.1 µl/side, 30 mg/kg, s.c.) の投与 90 分後並びに NBQX (0.03 nmol/0.1 µl/side) の投与 95 分後に行った。これらの薬物の投与時間は先行研究を参考にした (102)。マウスを吸入麻酔 (Isoflurane; Mylan Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) 後、開腹、開

胸し、心臓を露出させた。次に、右心耳を切り、その切除部位から左心室にゾンデを挿入し、氷冷 0.1 M PBS (pH 7.4) を 10 ml 灌流させた後、氷冷 4% PFA を 20 ml 灌流させた。灌流固定後、脳を摘出し、4% PFA で一晩浸漬固定 (4°C) した後、凍結保護のために、30%スクロースに脳が沈むまで浸した。その後、厚さ 2 mm の冠状切片 (bregma から尾側方向に 4 mm~6 mm、背側縫線核) を作製し、O.C.T.コンパウンド (Sakura, Tokyo, Japan) で包埋し、液体窒素で凍結させた。

二重蛍光免疫染色法

クリオスタットを用いて、bregma から -4.48 mm から -4.84 mm の間 (背側縫線核) で 120 μm 毎に 40 μm の凍結冠状切片を 2 枚作製し、スライドガラスにマウントした後、風乾した。風乾後、PBS で 3 分間ずつ 3 回洗浄し、PBS/0.3% Triton X-100/5% 正常ロバ血清を加えて 1 時間室温でブロッキングした。その後、PBS で 10 分間ずつ 3 回洗浄し、1 次抗体である rabbit anti-c-Fos antibody (1:500, Abcam Inc., Cambridge, MA, USA) 及び goat anti-TPH2 antibody (1:500, Abcam Inc.) を加えて 4°C で一晩インキュベートした。PBS で 3 分間ずつ 3 回洗浄した後、2 次抗体である fluorescent 594 donkey anti-rabbit IgG secondary antibody (1:200, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA) 及び 488 donkey anti-goat IgG secondary antibody (1:200, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) を加えて 2 時間室温でインキュベートした。その後、PBS で 3 分間ずつ 3 回洗浄し、退色防止剤を滴下してカバーガラスで封入した。

画像解析及び定量方法

切片の背側縫線核において、セロトニン陽性細胞数並びにセロトニン及び c-Fos で二重標識された細胞数を共焦点顕微鏡 (Leica TCS SP5, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) を用いて 200 倍及び 400 倍の倍率で観察した。細胞数は ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて、投与条件をマスクした状態でカウントした。細胞におけるセロトニンと c-Fos の共局在は共焦点顕微鏡の 400 倍の倍率で同定した。

3-2-7. 統計

結果は全て平均値±標準誤差で示した。多群間比較の場合は、一元配置分散分析 (one-way analysis of variance: one-way ANOVA) 又は二元配置分散分析 (two-way ANOVA) を用いて解析した後、post-hoc 解析として Dunnett's test 又は LSD test を実施した。2 群の場合は Student's *t*-test を用いた。有意水準は何れも 5%未満とした。全ての統計解析には SAS 9.2 (SAS Institute Japan Ltd., Tokyo, Japan) を用いた。

3-3. 結果

3-3-1. 強制水泳試験における Paroxetine の無動時間に及ぼす作用

Paroxetine (10 mg/kg, i.p.) は FST における無動時間を短縮し、抗うつ作用を示した (Fig. 25)。Paroxetine は臨床において、抗うつ薬として用いられている。従って、今回用いた FST の条件は抗うつ作用を評価するために妥当であることが示された。

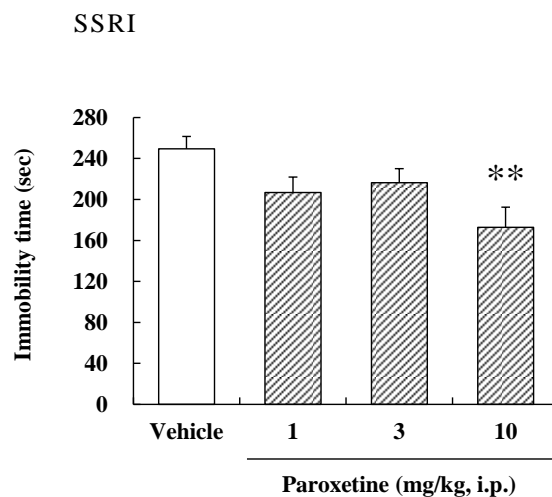


Fig. 25 Effect of Paroxetine in the FST in mice.

Paroxetine (1, 3, 10 mg/kg, i.p.) was administered 30 min prior to the test. Values indicate the mean \pm S.E.M. (n = 8). **p < 0.01 compared with Vehicle (Dunnett's test).

3-3-2. 強制水泳試験における mGlu2/3 受容体拮抗薬の無動時間に及ぼす作用

LY341495 (1 mg/kg, i.p.) は無動時間を短縮し、抗うつ作用を示した (Fig. 26)。

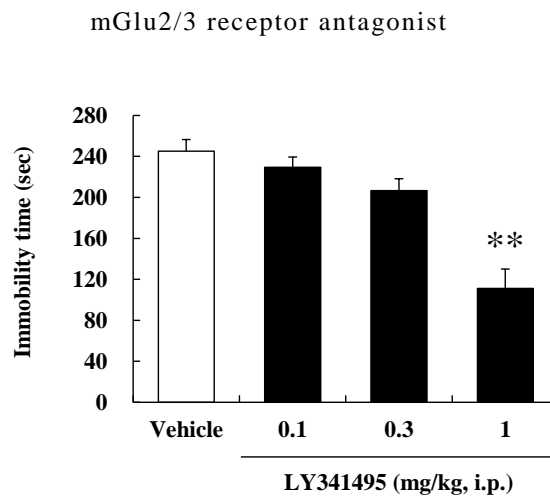


Fig. 26 Effect of LY341495 in the FST in mice.

LY341495 (0.1, 0.3, 1 mg/kg, i.p.) was administered 30 min prior to the test. Values indicate the mean \pm S.E.M. (n = 8). **p < 0.01 compared with Vehicle (Dunnett's test).

3-3-3. 強制水泳試験における Ketamine の無動時間に及ぼす作用

Ketamine (30 mg/kg, i.p.) は無動時間を短縮し、抗うつ作用を示した (Fig. 27)。

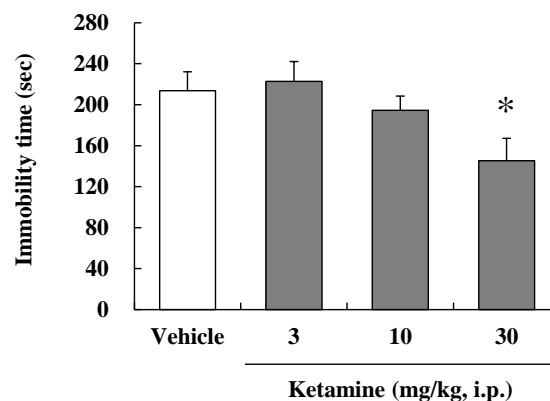


Fig. 27 Effect of Ketamine in the FST in mice.

Ketamine (3, 10, 30 mg/kg, i.p.) was administered 30 min prior to the test. Values indicate the mean \pm S.E.M. (n = 8). *p < 0.05 compared with Vehicle (Dunnett's test).

3-3-4. Paroxetine の抗うつ作用発現におけるセロトニンの関与

Paroxetine (10 mg/kg, i.p.) の抗うつ作用はセロトニン枯渇薬の PCPA (300 mg/kg, i.p., twice daily for 3 days) により拮抗された (Fig. 28)。従って、今回用いた PCPA の投与条件はセロトニン神経系を調節する薬物の抗うつ作用を消失させるのに十分であることが示された。

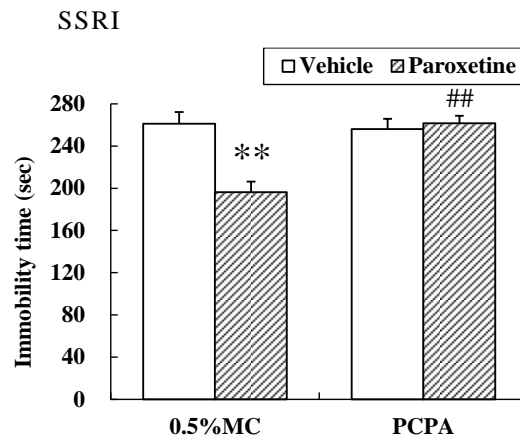


Fig. 28 Effect of 5-HT depletion on the antidepressant effect of Paroxetine in the FST in mice.

Paroxetine (10 mg/kg, i.p.) was administered 30 min prior to the test. PCPA (300 mg/kg, i.p.) was administered twice daily for 3 consecutive days until the day before the pretest. Values indicate the mean \pm S.E.M. (n = 9-10). **p < 0.01 compared with 0.5% MC-treated Vehicle, ##p < 0.01 compared with 0.5% MC-treated Paroxetine (LSD post hoc test).

3-3-5. mGlu2/3 受容体拮抗薬の抗うつ作用発現におけるセロトニンの関与

LY341495 (1 mg/kg, i.p.) の抗うつ作用はセロトニン枯渇薬の PCPA (300 mg/kg, i.p., twice daily for 3 days) により拮抗された (Fig. 29)。

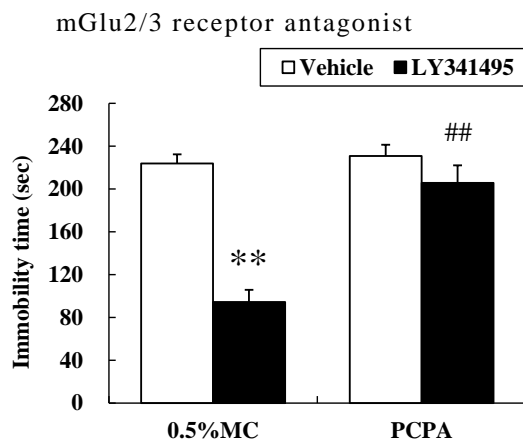


Fig. 29 Effect of 5-HT depletion on the antidepressant effect of LY341495 in the FST in mice.

LY341495 (1 mg/kg, i.p.) was administered 30 min prior to the test. PCPA (300 mg/kg, i.p.) was administered twice daily for 3 consecutive days until the day before the pretest. Values indicate the mean \pm S.E.M. (n = 10). **p < 0.01 compared with 0.5% MC-treated Vehicle, ##p < 0.01 compared with 0.5% MC-treated LY341495 (LSD post hoc test).

3-3-6. Ketamine の抗うつ作用発現におけるセロトニンの関与

Ketamine (30 mg/kg, i.p.) の抗うつ作用はセロトニン枯渇薬の PCPA (300 mg/kg, i.p., twice daily for 3 days) により拮抗された (Fig. 30)。

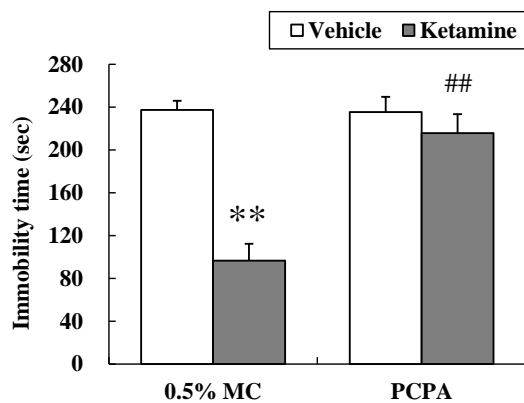


Fig. 30 Effect of 5-HT depletion on the antidepressant effect of Ketamine in the FST in mice.

Ketamine (30 mg/kg, i.p.) was administered 30 min prior to the test. PCPA (300 mg/kg, i.p.) was administered twice daily for 3 consecutive days until the day before the pretest. Values indicate the mean \pm S.E.M. (n = 10). **p < 0.01 compared with 0.5% MC-treated Vehicle, ##p < 0.01 compared with 0.5% MC-treated Ketamine (LSD post hoc test).

3-3-7. mGlu2/3 受容体拮抗薬の内側前頭前皮質内投与による作用

LY341495 (0.03 pmol/side) の内側前頭前皮質内投与は無動時間を短縮し、抗うつ作用を示した (Fig. 31A)。なお、解析に用いた個体毎の Vehicle 及び LY341495 の内側前頭前皮質内における投与位置を Fig. 31B に示す。

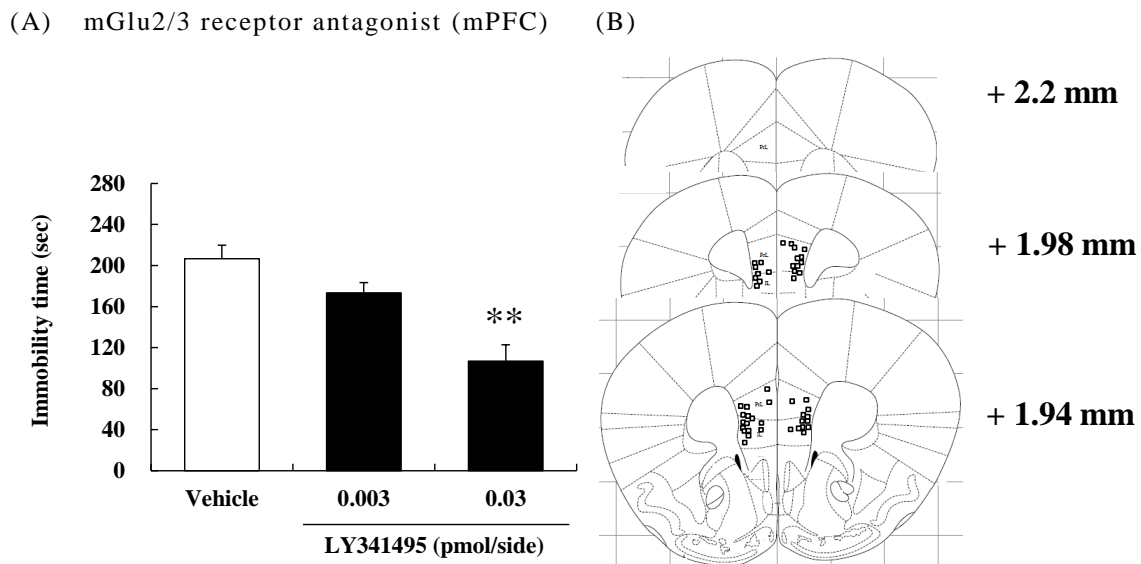


Fig. 31 Effect of microinjection of LY341495 into the mPFC in the FST in mice.

(A) LY341495 (0.003, 0.03 pmol/side) was administered into the mPFC 30 min prior to the test. (B) Location of the microinjection cannula tips in the mPFC included in the analyses of the data illustrated in (A). The line drawings are from Paxinos and Franklin (1997). The numbers to the right are the millimeters from the bregma. The open square represents the location of the microinjection cannula tips. IL: infralimbic, PrL: prelimbic. Values indicate the mean \pm S.E.M. ($n = 8$). ** $p < 0.01$ compared with Vehicle (Dunnett's test).

3-3-8. Ketamine の内側前頭前皮質内投与による作用

Ketamine (3 nmol/side) の内側前頭前皮質内投与は無動時間を短縮し、抗うつ作用を示した (Fig. 32A)。なお、解析に用いた個体毎の Vehicle 及び Ketamine の内側前頭前皮質内における投与位置を Fig. 32B に示す。

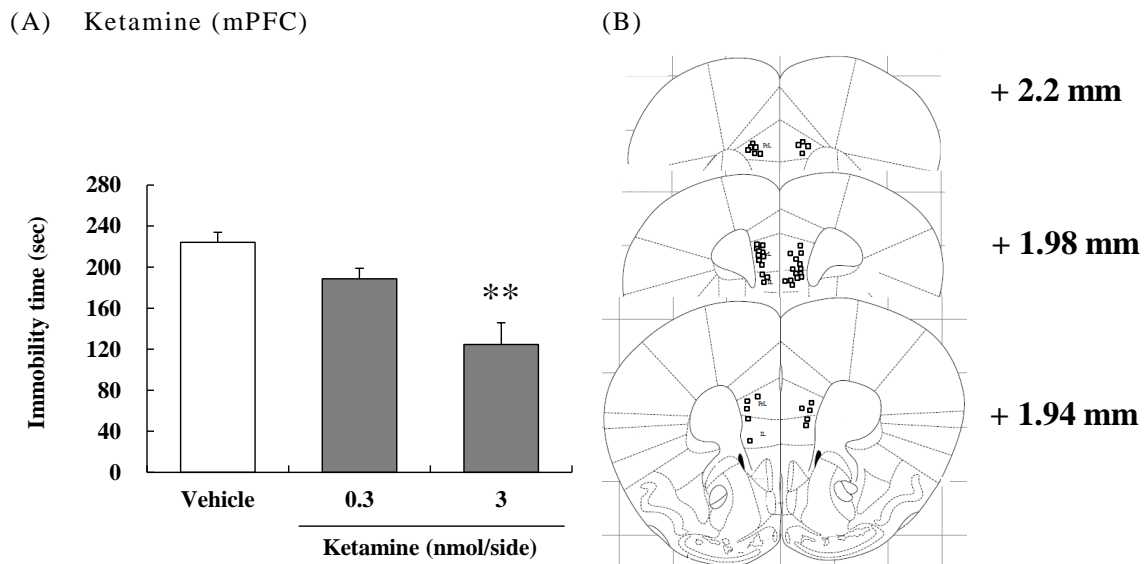


Fig. 32 Effect of microinjection of Ketamine into the mPFC in the FST in mice.

(A) Ketamine (0.3, 3 nmol/side) was administered into the mPFC 30 min prior to the test. (B) Location of the microinjection cannula tips in the mPFC included in the analyses of the data illustrated in (A). The line drawings are from Paxinos and Franklin (1997). The numbers to the right are the millimeters from the bregma. The open square represents the location of the microinjection cannula tips. IL: infralimbic, PrL: prelimbic. Values indicate the mean \pm S.E.M. (n = 7-8). **p < 0.01 compared with Vehicle (Dunnett's test).

3-3-9. mGlu2/3 受容体拮抗薬の内側前頭前皮質内投与による抗うつ作用発現におけるセロトニンの関与

LY341495 (0.03 pmol/side) の内側前頭前皮質内投与による抗うつ作用はセロトニン枯渇薬の PCPA (300 mg/kg, i.p., twice daily for 3 days) により拮抗された (Fig. 33A)。なお、解析に用いた個体毎の Vehicle 及び LY341495 の内側前頭前皮質内における投与位置を Fig. 33B に示す。

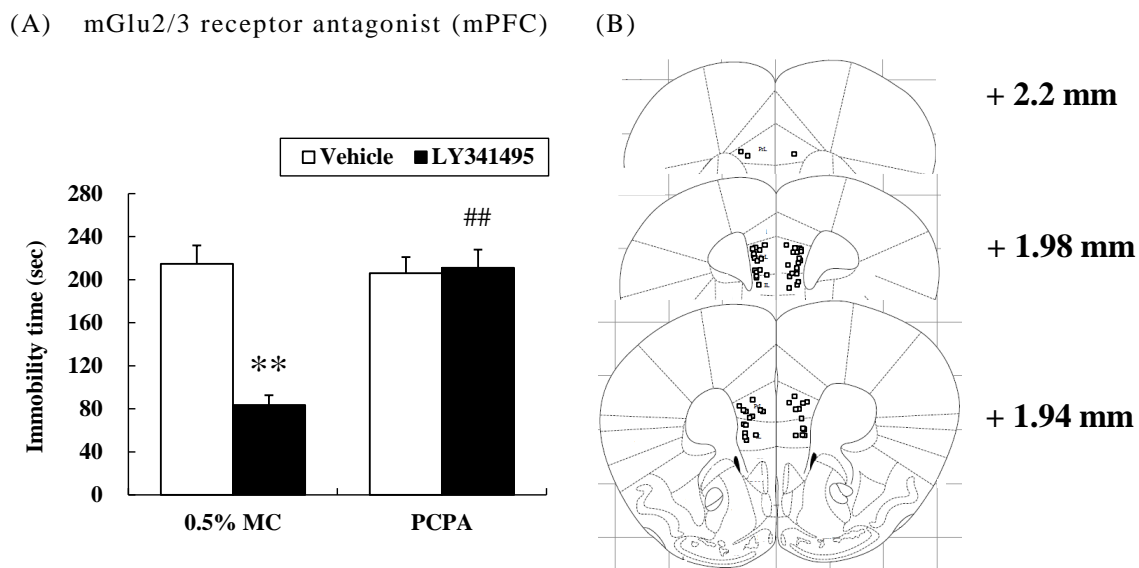


Fig. 33 Effect of 5-HT depletion on the antidepressant effect of microinjection of LY341495 into the mPFC in the FST in mice.

(A) LY341495 (0.03 pmol/side) was administered into the mPFC 30 min prior to the test. PCPA (300 mg/kg, i.p.) was administered twice daily for 3 consecutive days until the day before the pretest. (B) Location of the microinjection cannula tips in the mPFC included in the analyses of the data illustrated in (A). The line drawings are from Paxinos and Franklin (1997). The numbers to the right are the millimeters from the bregma. The open square represents the location of the microinjection cannula tips. IL: infralimbic, PrL: prelimbic. Values indicate the mean \pm S.E.M. (n = 8). **p < 0.01 compared with 0.5% MC-treated Vehicle, ##p < 0.01 compared with 0.5% MC-treated LY341495 (LSD post hoc test).

3-3-10. Ketamine の内側前頭前皮質内投与による抗うつ作用発現におけるセロトニンの関与

Ketamine (3 nmol/side) の内側前頭前皮質内投与による抗うつ作用はセロトニン枯渇薬の PCPA (300 mg/kg, i.p., twice daily for 3 days) により拮抗された (Fig. 34A)。なお、解析に用いた個体毎の Vehicle 及び Ketamine の内側前頭前皮質内における投与位置を Fig. 34B に示す。

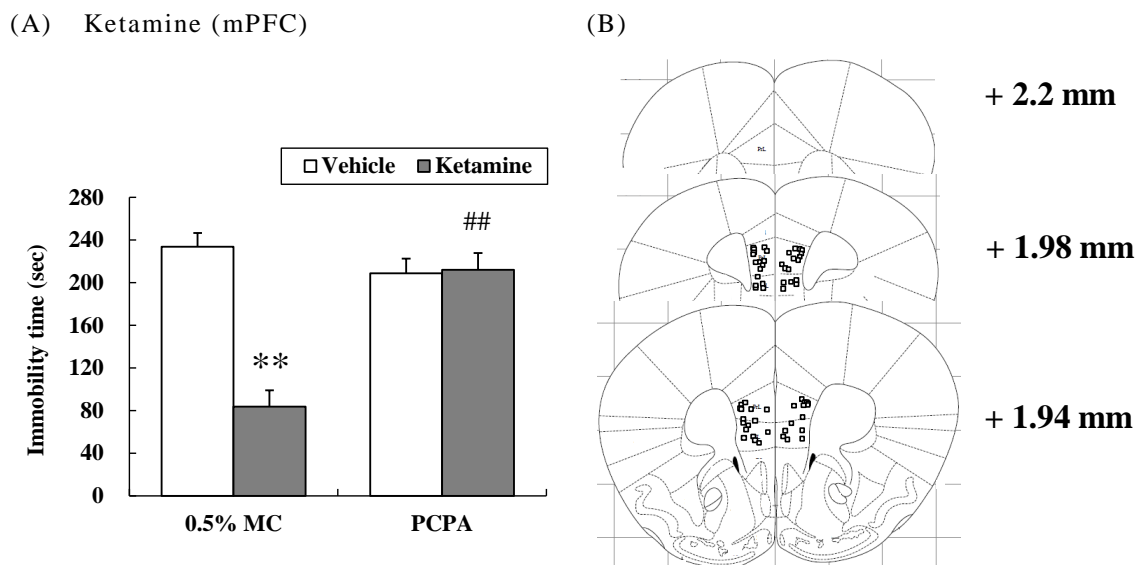


Fig. 34 Effect of 5-HT depletion on the antidepressant effect of microinjection of LY341495 or Ketamine into the mPFC in the FST in mice.

(A) Ketamine (3 nmol/side) was administered into the mPFC 30 min prior to the test. PCPA (300 mg/kg, i.p.) was administered twice daily for 3 consecutive days until the day before the pretest. (B) Location of the microinjection cannula tips in the mPFC included in the analyses of the data illustrated in (A). The line drawings are from Paxinos and Franklin (1997). The numbers to the right are the millimeters from the bregma. The open square represents the location of the microinjection cannula tips. IL: infralimbic, PrL: prelimbic. Values indicate the mean \pm S.E.M. (n = 7-8). **p < 0.01 compared with 0.5% MC-treated Vehicle, ##p < 0.01 compared with 0.5% MC-treated Ketamine (LSD post hoc test).

3-3-11. mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の自発運動量に及ぼす作用

LY341495 (1 mg/kg, i.p, 0.03 pmol/side) 及び Ketamine (30 mg/kg, i.p., 3 nmol/side) の全身投与及び内側前頭前皮質内投与は自発運動量に影響を及ぼさなかった (Table 7)。なお、解析に用いた個体毎の Vehicle C、LY341495 及び Ketamine の内側前頭前皮質内における投与位置を Fig. 35 に示す。このことから、これら薬物の抗うつ作用に運動量は関与しないことが示された。

Table 7 Effects of LY341495 or Ketamine on the spontaneous locomotor activity

Drugs	Locomotor counts (60 min)
Vehicle A (i.p.)	13096.7 ± 1198.2
LY341495 (1 mg/kg, i.p.)	10666.5 ± 797.2
Vehicle B (i.p.)	10407.3 ± 685.1
Ketamine (30 mg/kg, i.p.)	12741.0 ± 1645.3
Vehicle C (0.1 µl/side)	13845.8 ± 917.9
LY341495 (0.03 pmol/side)	13758.8 ± 2225.4
Ketamine (3 nmol/side)	13763.5 ± 1193.4

For systemic administration, LY341495 (1 mg/kg, i.p.) or Ketamine (30 mg/kg, i.p.) was administered 30 min prior to the test. For microinjection, LY341495 (0.03 pmol/side) or Ketamine (3 nmol/side) was administered into the mPFC 30 min prior to the test. Vehicle A: 1/15 M phosphate buffer, Vehicle B: Saline, Vehicle C: Ringer's solution. Values indicate the mean ± S.E.M. (n = 6).

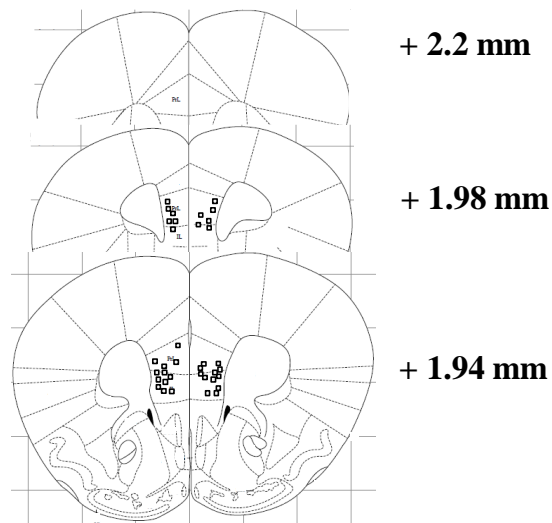


Fig. 35 Location of the microinjection cannula tips in the mPFC included in the analyses of the data illustrated in Table 7.

The line drawings are from Paxinos and Franklin (1997). The numbers to the right are the millimeters from the bregma. The open square represents the location of the microinjection cannula tips of the Vehicle C, LY341495 and Ketamine-microinjection group. IL: infralimbic, PrL: prelimbic.

3-3-12. mGlu2/3 受容体拮抗薬の抗うつ作用発現における AMPA 受容体の関与

LY341495(1 mg/kg, i.p.)の抗うつ作用は AMPA 受容体拮抗薬の NBQX(10 mg/kg, s.c.)により拮抗された (Fig. 36A)。また、NBQX (10 mg/kg, s.c.) はそれ自体で無動時間に影響を及ぼさなかった (Fig. 36B)。

(A) mGlu2/3 receptor antagonist

(B) AMPA receptor antagonist

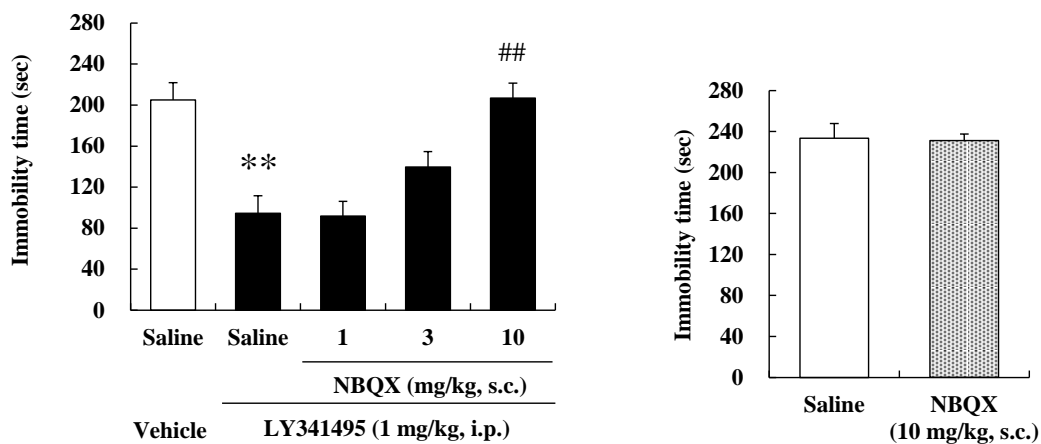


Fig. 36 Effect of an AMPA receptor antagonist on the antidepressant effect of LY341495 in the FST in mice.

(A) LY341495 (1 mg/kg, i.p.) was administered 30 min prior to the test. NBQX (1, 3, 10 mg/kg, s.c.) was administered 35 min prior to the test. (B) NBQX (10 mg/kg, s.c.) was administered into the mPFC 35 min prior to the test. Values indicate the mean \pm S.E.M. ((A): n = 8, (B): n = 8). ** $p < 0.01$ compared with Saline-treated Vehicle (Student's t -test), ## $p < 0.01$ compared with Saline-treated LY341495 (Dunnett's test).

3-3-13. Ketamine の抗うつ作用発現における AMPA 受容体の関与

Ketamine (30 mg/kg, i.p.) の抗うつ作用は AMPA 受容体拮抗薬の NBQX (3, 10 mg/kg, s.c.) により拮抗された (Fig. 37)。

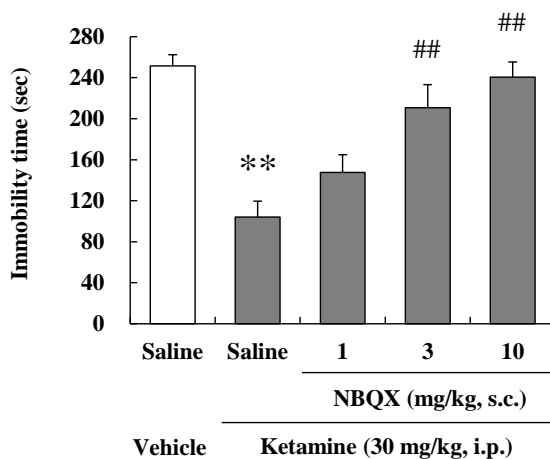


Fig. 37 Effect of an AMPA receptor antagonist on the antidepressant effect of Ketamine in the FST in mice.

Ketamine (30 mg/kg, i.p.) was administered 30 min prior to the test. NBQX (1, 3, 10 mg/kg, s.c.) was administered 35 min prior to the test. Values indicate the mean \pm S.E.M. (n = 7-9). **p < 0.01 compared with Saline-treated Vehicle (Student's *t*-test), ##p < 0.01 compared with Saline-treated Ketamine (Dunnett's test).

3-3-14. mGlu2/3 受容体拮抗薬の抗うつ作用発現における
内側前頭前皮質の AMPA 受容体の関与

LY341495 (1 mg/kg, i.p.) の抗うつ作用は AMPA 受容体拮抗薬である NBQX (0.01, 0.03 nmol/side) の内側前頭前皮質内投与により拮抗された (Fig. 38A)。なお、解析に用いた個体毎の Vehicle A 及び NBQX の内側前頭前皮質内における投与位置を Fig. 38B に示す。

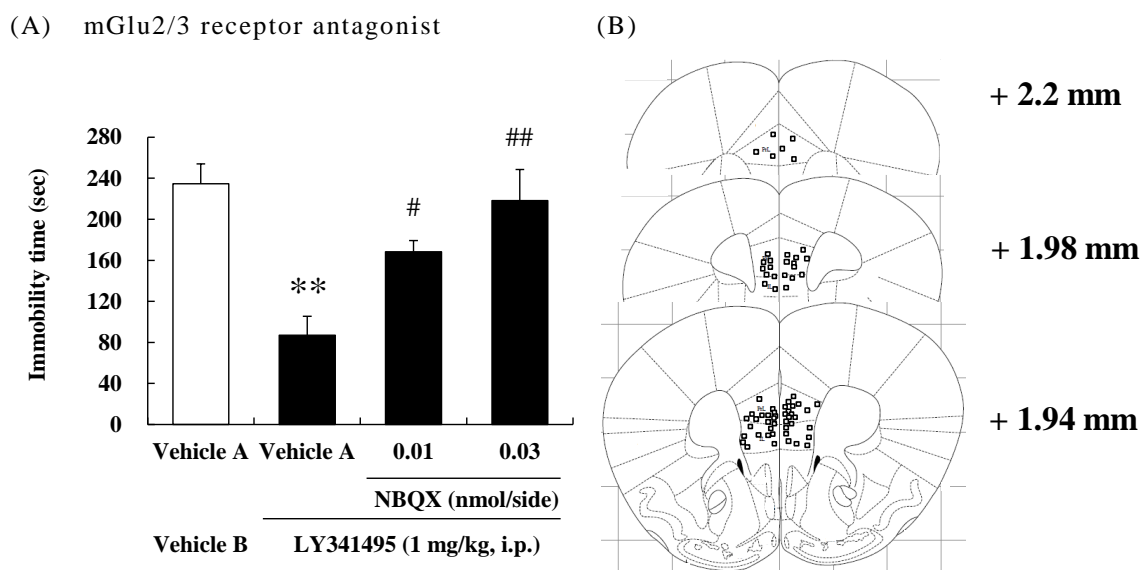


Fig. 38 Effect of microinjection of an AMPA receptor antagonist into the mPFC on the antidepressant effect of LY341495 in the FST in mice.

(A) LY341495 (1 mg/kg, i.p.) was administered 30 min prior to the test. NBQX (0.01, 0.03 nmol/side) was administered into the mPFC 35 min prior to the test. Vehicle A: 10% DMSO in Ringer's solution, Vehicle B: 1/15 M phosphate buffer. (B) Location of the microinjection cannula tips in the mPFC included in the analyses of the data illustrated in (A). The line drawings are from Paxinos and Franklin (1997). The numbers to the right are the millimeters from the bregma. The open square represents the location of the microinjection cannula tips. IL: infralimbic, PrL: prelimbic. Values indicate the mean \pm S.E.M. ($n = 8$). ** $p < 0.01$ compared with Vehicle A-treated Vehicle B (Student's t -test), # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ compared with Vehicle A-treated LY341495 (Dunnett's test).

3-3-15. Ketamine の抗うつ作用発現における内側前頭前皮質の AMPA 受容体の関与

Ketamine (30 mg/kg, i.p.) の抗うつ作用は AMPA 受容体拮抗薬である NBQX (0.03 nmol/side) の内側前頭前皮質内投与により拮抗された (Fig. 39A)。また、NBQX (0.03 nmol/side) の内側前頭前皮質内投与はそれ自体で無動時間に影響を及ぼさなかった (Fig. 39B)。なお、解析に用いた個体毎の Vehicle A 及び NBQX の内側前頭前皮質内における投与位置を Fig. 39C に示す。

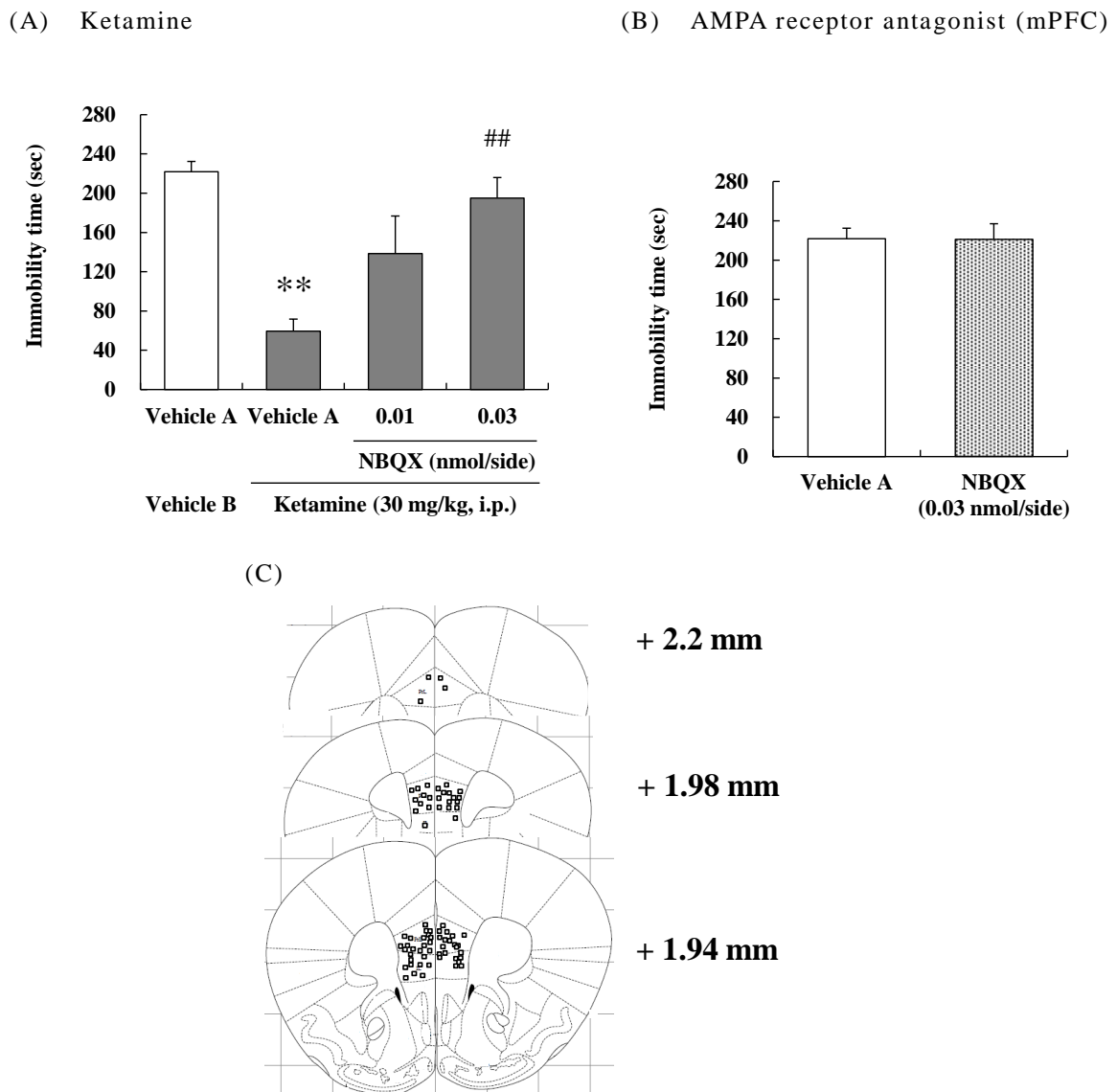


Fig. 39 Effect of microinjection of an AMPA receptor antagonist into the mPFC on the antidepressant effect of Ketamine in the FST in mice.

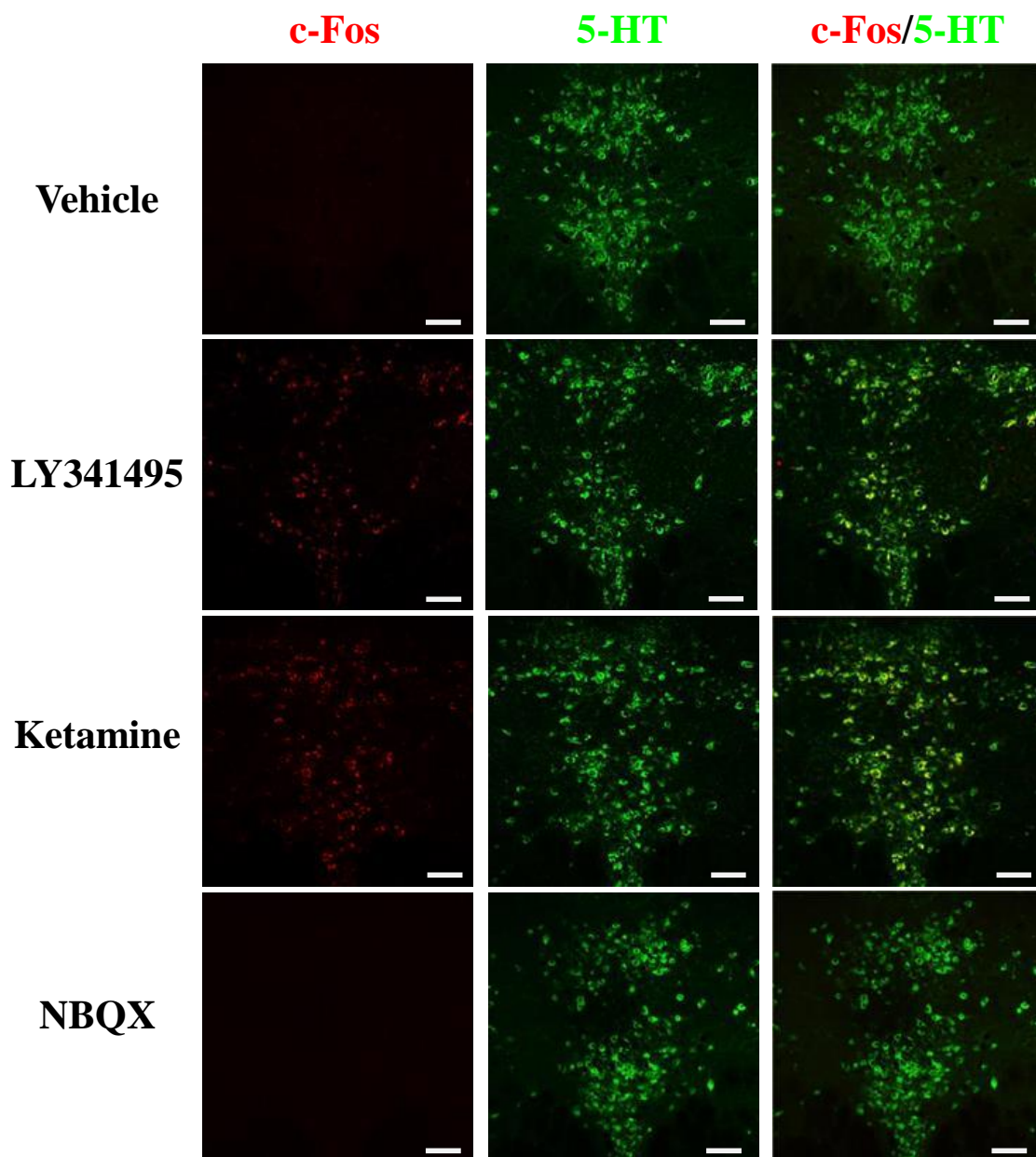
(A) Ketamine (30 mg/kg, i.p.) was administered 30 min prior to the test. NBQX (0.01, 0.03 nmol/side) was administered into the mPFC 35 min prior to the test. Vehicle A: 10% DMSO in Ringer's solution, Vehicle B: Saline. (B) NBQX (0.03 nmol/side) was administered into the

mPFC 35 min prior to the test. Vehicle A: 10% DMSO in Ringer's solution. (C) Location of the microinjection cannula tips in the mPFC included in the analyses of the data illustrated in (A, B). The line drawings are from Paxinos and Franklin (1997). The numbers to the right are the millimeters from the bregma. The open square represents the location of the microinjection cannula tips. IL: infralimbic, PrL: prelimbic. Values indicate the mean \pm S.E.M. ((A): n = 7-8, (B): n = 7-8). **p < 0.01 compared with Vehicle A-treated Vehicle B (Student's *t*-test), ##p < 0.01 compared with Vehicle A-treated Ketamine (Dunnett's test).

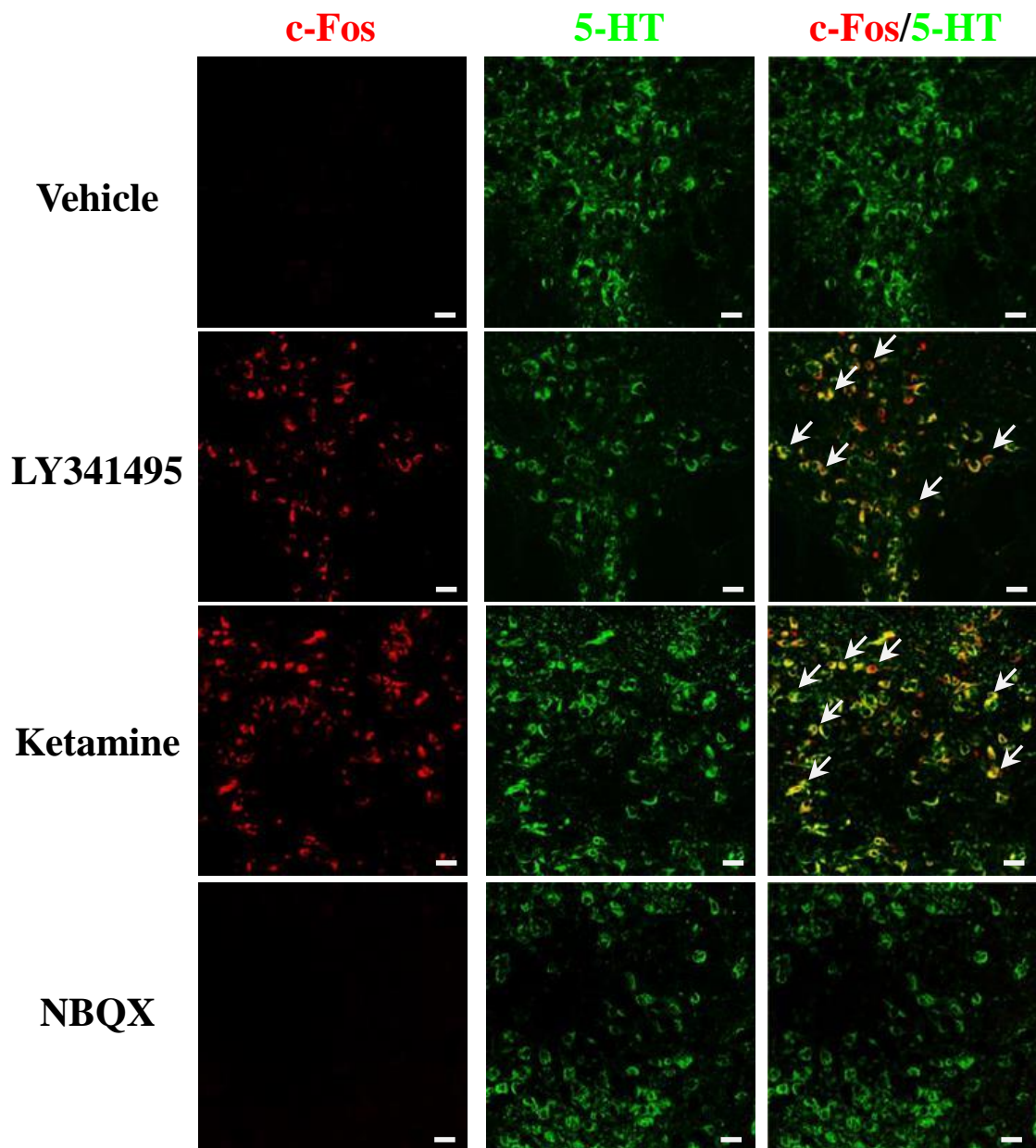
3-3-16. mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の内側前頭前皮質内投与における
背側縫線核のセロトニン神経活性の関与

LY341495 (0.03 pmol/side) 及び Ketamine (3 nmol/side) の内側前頭前皮質内投与は
背側縫線核において c-Fos を発現するセロトニン神経細胞の割合を増加させた (Fig. 40A,
B, C)。一方、AMPA 受容体拮抗薬である NBQX (0.03 nmol/side) の内側前頭前皮質内
投与はそれ自体で背側縫線核において c-Fos を発現するセロトニン神経細胞の割合に影
響を及ぼさなかった (Fig. 40A, B, C)。

(A)



(B)



(C) mPFC

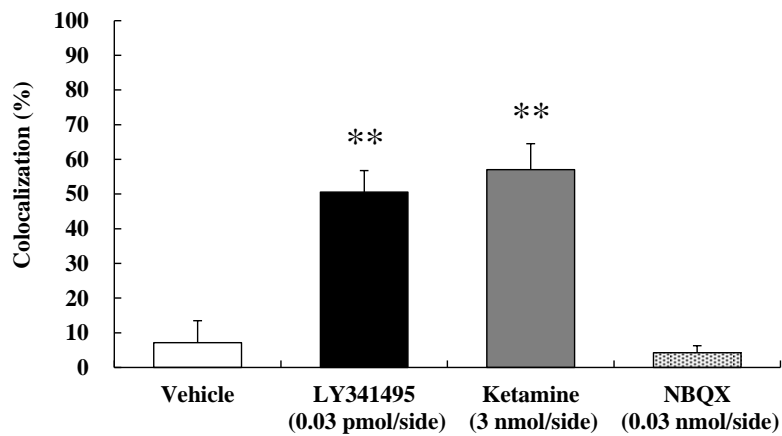


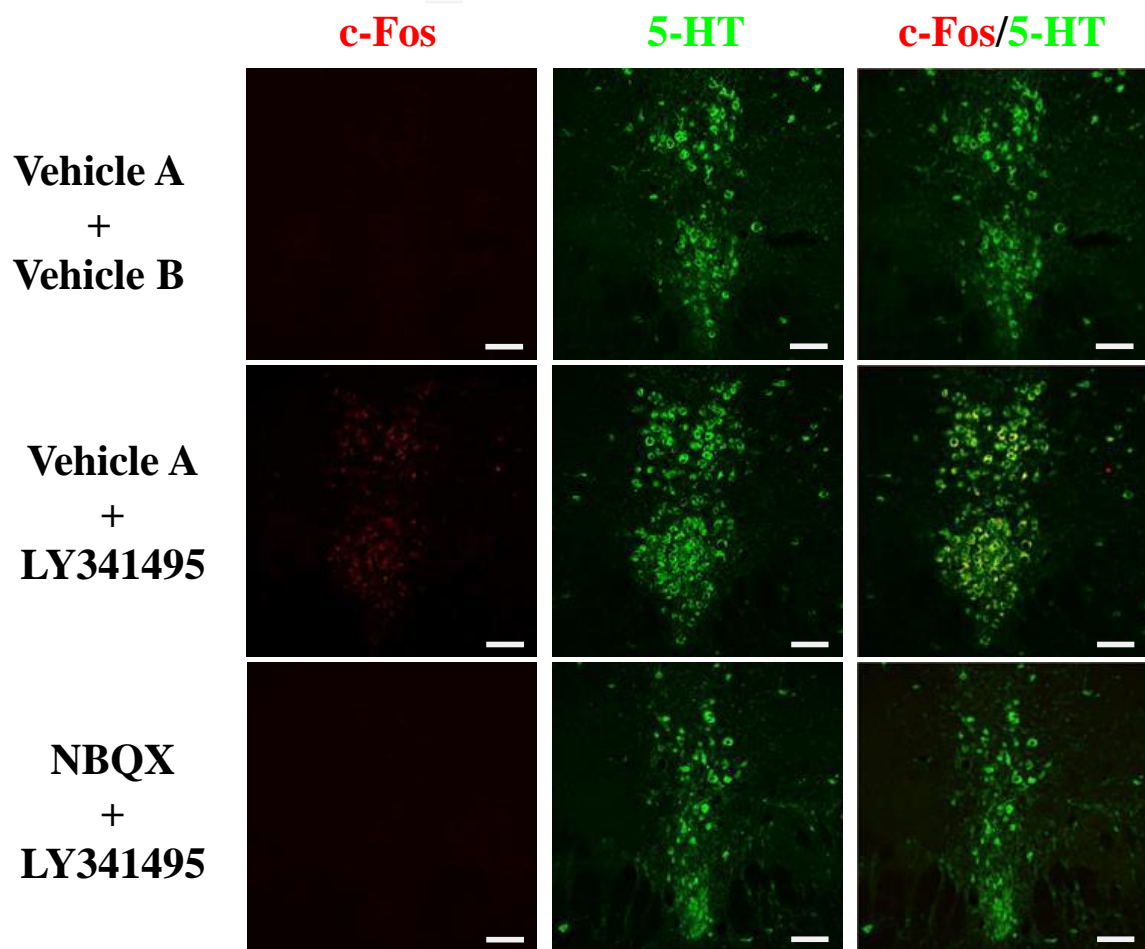
Fig. 40 Effect of microinjection of LY341495 or Ketamine on the c-Fos immunoreactivity colocalized with 5-HT neuron cells in the dorsal raphe nucleus.

(A, B) Confocal images of c-Fos (red), 5-HT cells (green) and double (5-HT-c-Fos, colocalization) immunoreactivities in the DRN at around -4,72 mm from bregma (Scale bar: (A) 100 μ m, (B) 20 μ m). Arrows represent the double (5-HT-c-Fos, colocalization) immunoreactivities. (C) Percentages of c-Fos/5-HT colocalization in the DRN at around -4,72 mm from bregma. LY341495 (0.03 pmol/side) or Ketamine (3 nmol/side) was administered into the mPFC 90 min prior to the test. NBQX (0.03 nmol/side) was administered into the mPFC 95 min prior to the test. Vehicle: Ringer's solution. Values indicate the mean \pm S.E.M. (n = 6). **p < 0.01 compared with Vehicle (Student's *t*-test).

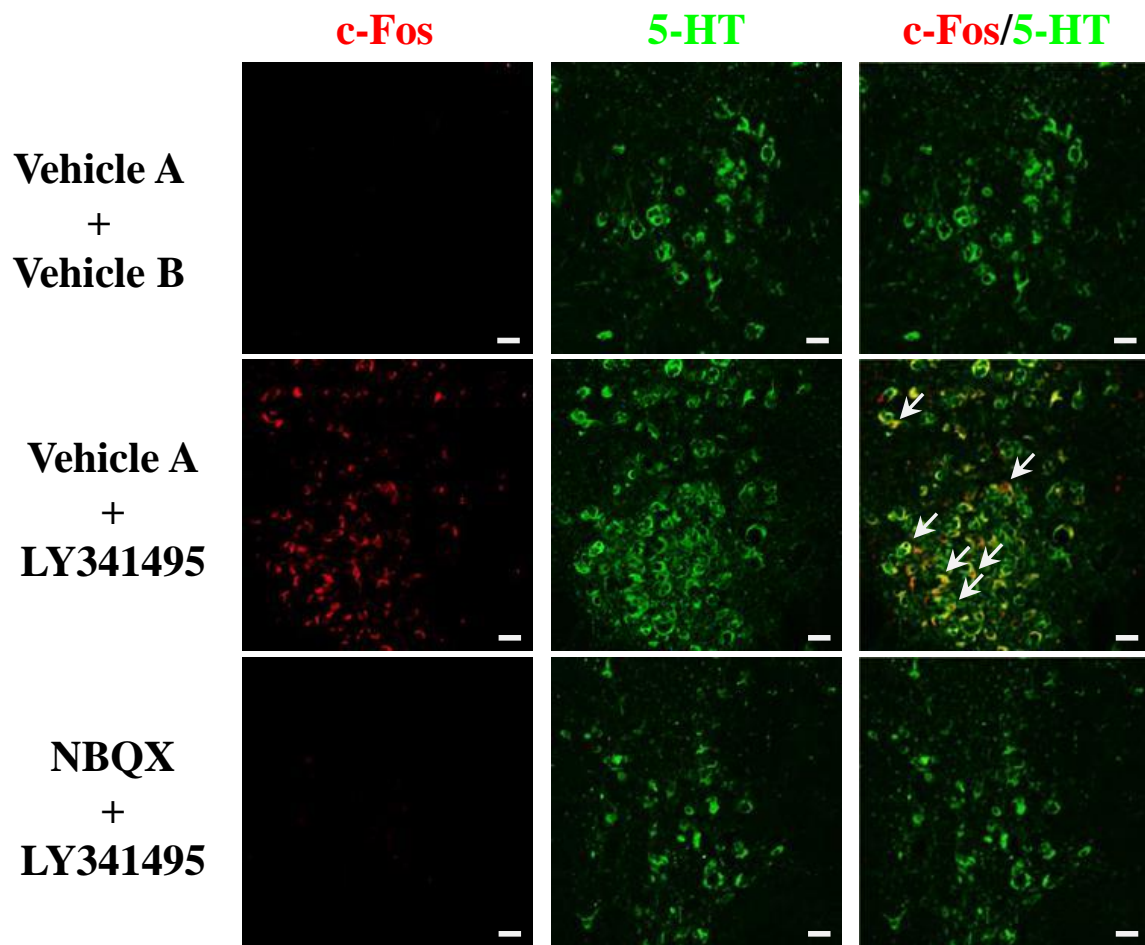
3-3-17. mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の全身投与における
背側縫線核のセロトニン神経活性の関与

LY341495 (1 mg/kg, i.p.) は背側縫線核において c-Fos を発現するセロトニン神経細胞の割合を増加させ、その増加は AMPA 受容体拮抗薬である NBQX (0.03 nmol/side) の内側前頭前皮質内投与により拮抗された (Fig. 41A, B, E)。同様に、Ketamine (30 mg/kg, i.p.) は背側縫線核において c-Fos を発現するセロトニン神経細胞の割合を増加させ、その増加は NBQX (0.03 nmol/side) の内側前頭前皮質内投与により拮抗された (Fig. 41C, D, F)。

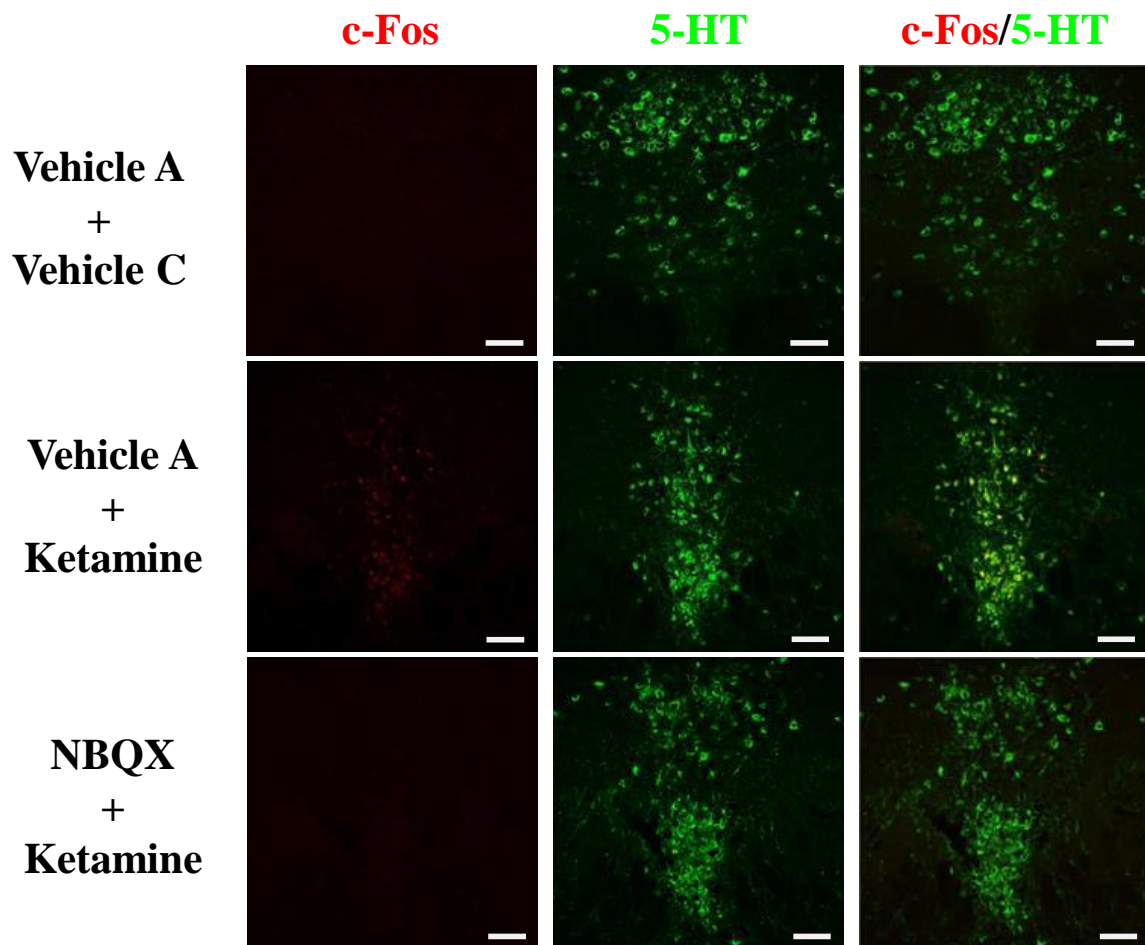
(A)



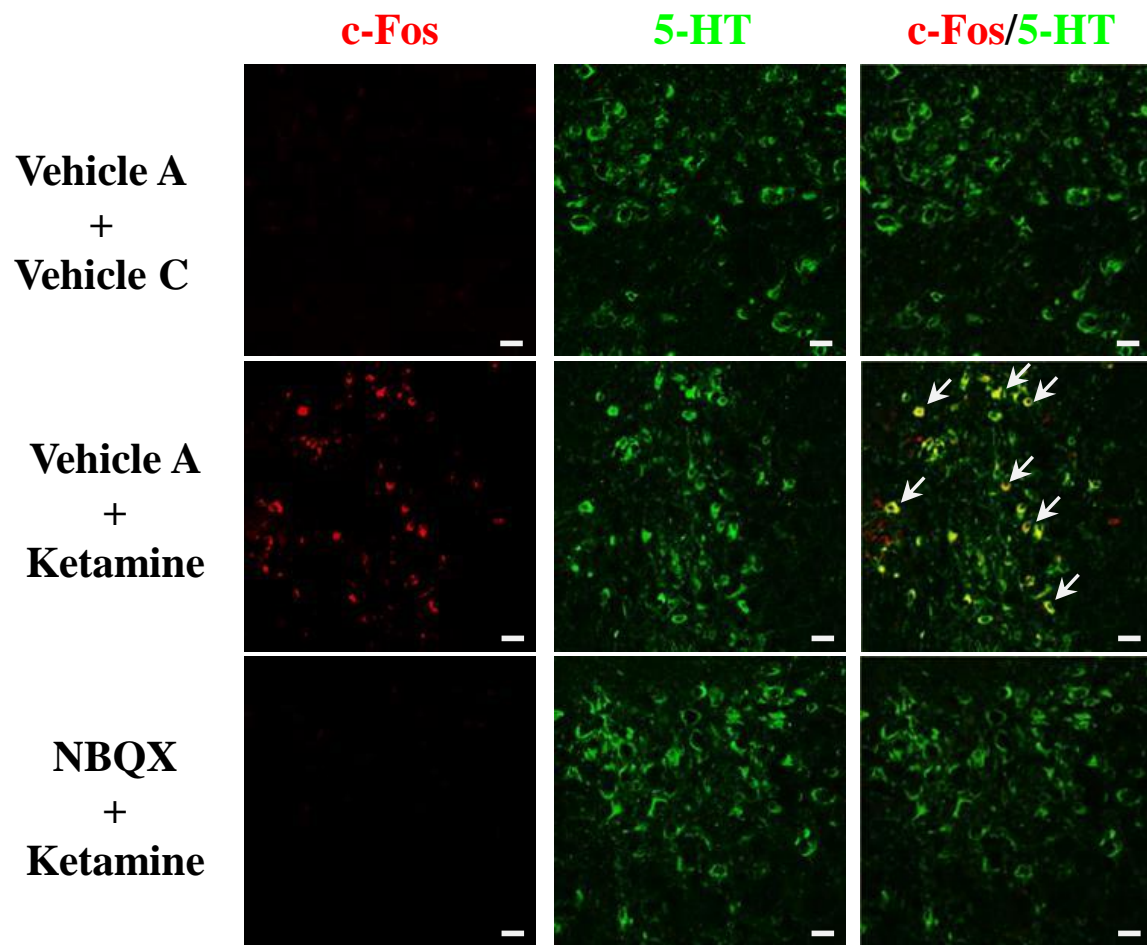
(B)



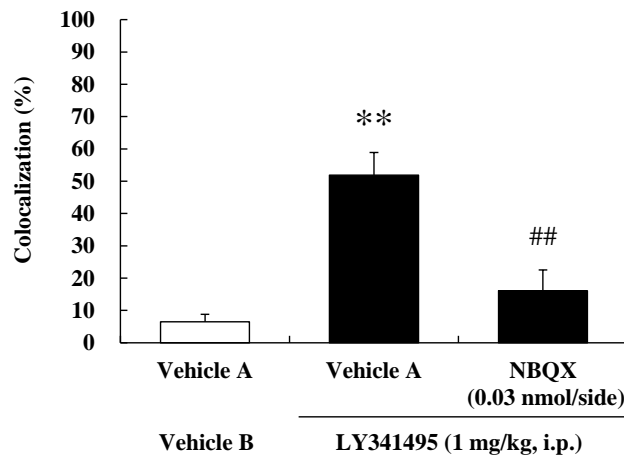
(C)



(D)



(E) mGlu2/3 receptor antagonist



(F) Ketamine

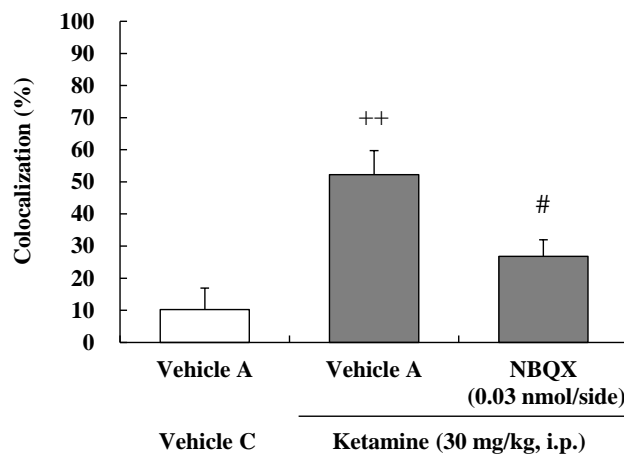


Fig. 41 Effects of microinjection of an AMPA receptor antagonist on LY341495 or Ketamine-induced c-Fos immunoreactivity colocalized with 5-HT neuron cells in the dorsal raphe nucleus.

(A, B, C, D) Confocal images of c-Fos (red), 5-HT cells (green) and double (5-HT-c-Fos, colocalization) immunoreactivities in the DRN at around -4,72 mm from bregma (Scale bar: (A, C) 100 μ m, (B, D) 20 μ m). Arrows represent the double (5-HT-c-Fos, colocalization) immunoreactivities. (E, F) Percentages of c-Fos/5-HT colocalization in the DRN at around -4,72 mm from bregma following LY341495 (E) or Ketamine (F) administration. LY341495 (1 mg/kg, i.p.) or Ketamine (30 mg/kg, i.p.) was administered 90 min prior to the test. NBQX (0.03 nmol/side) was administered into the mPFC 95 min prior to the test. Vehicle A: 10% DMSO in Ringer's solution, Vehicle B: 1/15 M phosphate buffer, Vehicle C: Saline. Values indicate the mean \pm S.E.M. ((E): n = 6, (F): n = 6). **p < 0.01 compared with Vehicle A-treated Vehicle B, ++p < 0.01 compared with Vehicle A-treated Vehicle C, #p < 0.05 compared with Vehicle A-treated Ketamine, ##p < 0.01 compared with Vehicle A-treated LY341495 (Student's *t*-test).

3-4. 考察

本章では、FST を用いて mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ作用発現における内側前頭前皮質－背側縫線核回路により調節されるセロトニン神経の関与について検討した。

LY341495 及び Ketamine は全身投与により、運動量に影響を及ぼさずに抗うつ作用を示したことから、これらの薬物の抗うつ作用は非特異的な作用ではないことが示された。さらに、第 2 章の NSFT 及び本章の FST において、LY341495 及び Ketamine の抗うつ作用はセロトニン枯渇薬の PCPA により拮抗されたことから、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ作用発現にはセロトニン神経系が関与していることが示唆された。

これまでに、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine は内側前頭前皮質に作用し、BDNF-mTOR シグナルを介してシナプスタンパク質の合成を促進することで抗うつ作用を発現すると示唆されている (27, 73)。本研究は、脳内微量注入法を用い、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine が内側前頭前皮質に作用し、セロトニン神経系の調節を介して抗うつ作用を発現することを明らかにした。

背側縫線核に神経核を有するセロトニン神経は、前頭前皮質を含む様々な領域からの神経投射によりその活性が制御されている (97)。この中で、内側前頭前皮質の錐体細胞に発現する AMPA 受容体を活性化すると、投射先の背側縫線核に存在するセロトニン神経が活性化されると示唆されている (103)。また、AMPA 受容体の活性化は mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine により惹起される内側前頭前皮質におけるセロトニン遊離の促進及び抗うつ作用発現に関与することが報告されている (26, 29, 53, 55)。さらに、LY341495 はグルタミン酸神経末端の自己受容体を抑制し、Ketamine は前頭前皮質における錐体細胞を脱抑制することにより、それぞれ前頭前皮質におけるグルタミン酸遊離を促進することが報告されている (24, 72)。これらのことから、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine はグルタミン酸遊離の促進を介して、内側前頭前皮質の AMPA 受容体を刺激しセロトニン神経を活性化することで、抗うつ作用を発現する可能性が考えられた。本研究で、LY341495 及び Ketamine の抗うつ作用は NBQX の内側前頭前皮質内投与により拮抗されたことは、この可能性を支持するものである。

さらに、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine が内側前頭前皮質の AMPA 受容体の活性化を介して背側縫線核のセロトニン神経を活性化するか否かについて、神経活動の指標として c-Fos の発現を利用した二重蛍光免疫染色法を用い検討した。その結果、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine は内側前頭前皮質に作用して背側縫線核のセロトニン神経を活性化した。加えて、この背側縫線核のセロトニン神経活性化は内側前頭前皮質の AMPA 受容体活性化を介していることが示された。ここまでの結果と先行研究の結果を総合すると、内側前頭前皮質の AMPA 受容体活性化により調節される背側縫線核のセロトニン神経の活性化が、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ作用

発現に関与することが考えられた (98, 99)。最近、単シナプスのグルタミン酸神経が前頭前皮質から背側縫線核のセロトニン神経に直接入力していることが報告された (97)。また、前頭前皮質の特定の部位から投射するグルタミン酸神経は背側縫線核の GABA 神経よりもセロトニン神経を主に制御していることが報告された (104)。さらに、前頭前皮質の特定部位から背側縫線核に投射しているグルタミン酸神経終末をオプトジェネティクスにより活性化すると、背側縫線核のセロトニン神経において興奮性シナプス後電流が GABA 神経のそれと比較して約 2 倍惹起されることが報告された (104)。これらのことから、内側前頭前皮質からの神経投射により選択的に活性化される背側縫線核のセロトニン神経が mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ作用発現において重要な役割を果たしていると考えられる。

本研究の結果から、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ作用発現には内側前頭前皮質における AMPA 受容体の活性化を介した背側縫線核のセロトニン神経の活性化が関与する可能性が初めて示された (Fig. 42)。

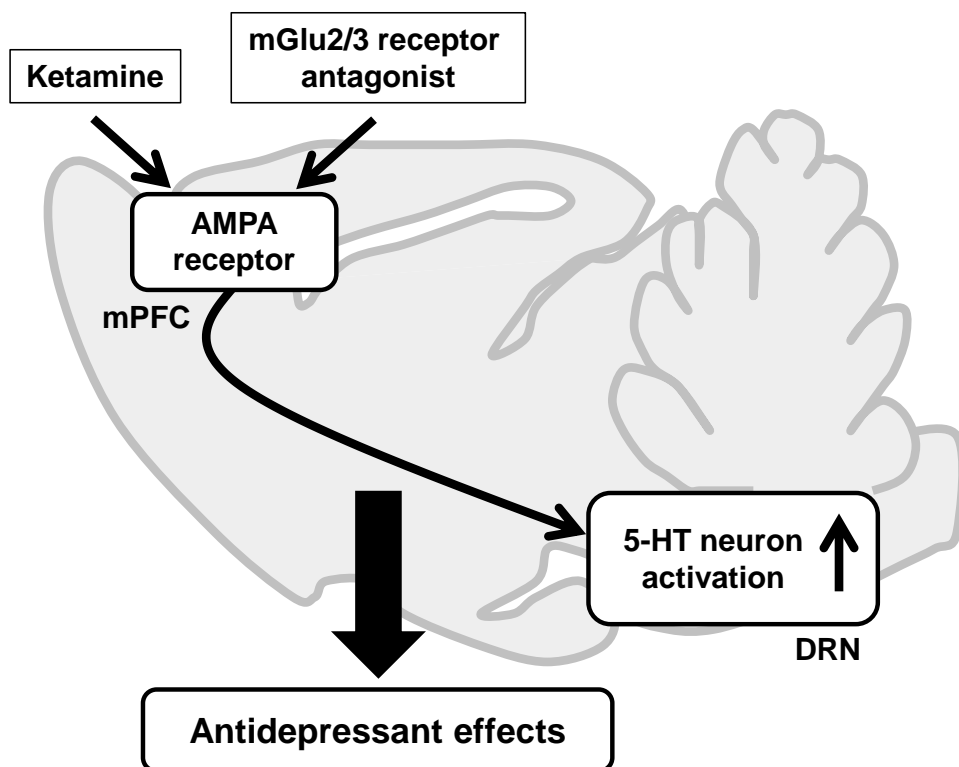


Fig. 42 Proposed neural mechanisms of the antidepressant effects of Ketamine and mGlu2/3 receptor antagonist in the FST.

Ketamine and mGlu2/3 receptor antagonist induce the antidepressant effects through the activation of a subset of 5-HT neurons in the DRN modulated by AMPA receptor stimulation in the mPFC.

総括

本研究の第1章及び第2章では、NSFTを用いて mGlu 受容体拮抗薬の抗うつ様作用及びその作用機序の検討を行い、Ketamine のそれらと比較した。とりわけ、第2章ではセロトニン神経系の関与に着目し検討した。第3章では、FSTを用いて mGlu 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ作用発現に寄与するセロトニン神経の部位同定を試みた。これらの検討の結果、以下の点を明らかにした。

NSFT における mGlu5 受容体拮抗薬の抗うつ様作用とその作用機序の検討

- ・ mGlu5 受容体拮抗薬は Ketamine と同様に急性及び持続性の抗うつ様作用を示すことを明らかにした。
- ・ mGlu5 受容体拮抗薬の急性抗うつ様作用発現には、新規タンパク質の合成及び mTOR シグナルが関与しないことを明らかにした。
- ・ mGlu5 受容体拮抗薬の持続性抗うつ様作用発現には、Ketamine と同様に新規タンパク質の合成が関与することを明らかにした。一方、Ketamine と異なり、mTOR シグナルの関与は部分的であり、BDNF/TrkB シグナルは関与しないことを明らかにした。

NSFT における mGlu2/3 受容体拮抗薬、mGlu5 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ様作用発現に対するセロトニン神経系の関与

- ・ mGlu2/3 受容体拮抗薬、mGlu5 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ様作用発現には、セロトニン神経系が関与することを初めて明らかにした。
- ・ mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine は AMPA 受容体の活性化を介してセロトニン遊離を促進し、5-HT_{1A} 受容体を刺激することにより抗うつ様作用を発現する可能性を示した。
- ・ mGlu5 受容体拮抗薬は AMPA 受容体非依存的な機序を介してセロトニン遊離を促進し、5-HT_{2A/2C} 受容体を刺激することにより抗うつ様作用を発現する可能性を示した。

mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ作用における内側前頭前皮質－背側縫線核回路を介したセロトニン神経の関与

- ・ mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の全身投与及び内側前頭前皮質内投与による抗うつ作用発現には、セロトニン神経系が関与することを明らかにした。
- ・ mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の全身投与による抗うつ作用発現には、内側前頭前皮質における AMPA 受容体の活性化が関与することを明らかにした。
- ・ mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine は内側前頭前皮質の AMPA 受容体の活性化を介して背側縫線核のセロトニン神経を活性化することを明らかにした。

以上の結果から、NSFT において、mGlu5 受容体拮抗薬は Ketamine と同様に急性及び持続性の抗うつ様作用を発現するが、その作用機序は Ketamine のそれとは異なることが示された (Fig. 43)。また、NSFT において、mGlu2/3 受容体拮抗薬、mGlu5 受容体拮抗薬及び Ketamine の急性抗うつ様作用発現には何れもセロトニン神経系が関与していることが示された。一方、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ様作用発現には AMPA 受容体活性化を介したセロトニン神経活性化の関与が示唆されたのに対して、mGlu5 受容体拮抗薬の抗うつ様作用発現には AMPA 受容体非依存的なセロトニン神経活性化の関与が示唆された (Fig. 44)。さらに、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ作用発現には内側前頭前皮質における AMPA 受容体の活性化を介した背側縫線核のセロトニン神経の活性化が関与する可能性が示された (Fig. 45)。

今回得られたこれらの結果と先行研究結果を併せて、代謝型グルタミン酸受容体拮抗薬の抗うつ薬としての可能性について考察する。

< mGlu5 受容体拮抗薬の抗うつ薬としての可能性 >

臨床において、持続性の抗うつ作用は薬物の服用回数の減少及び副作用の軽減などにより、患者の QOL 向上に繋がることが期待される。これまでに、著者らは、セロトニン遊離促進が Ketamine の急性 (投与 30 分後) だけではなく持続性 (投与 24 時間後) の抗うつ作用にも関与することを示している (105, Fig. 44)。また、本研究において、mGlu5 受容体拮抗薬の急性抗うつ様作用発現にはセロトニン遊離の促進が関与することを見出した。これらのことから、mGlu5 受容体拮抗薬はセロトニン遊離促進を介して持続性の抗うつ作用を発現する可能性が考えられた (Fig. 44)。さらに、mGlu5 受容体拮抗薬である Basimglurant 及び GRN-529 は覚醒促進作用を有することが報告されているため、mGlu5 受容体拮抗薬は既存の抗うつ薬の副作用を回避するだけでなく、日中の眠気及び傾眠などのうつ病の症状に対しても効果を発現すると期待される (52,

106-108)。一方、Basimglurant は慢性予測不能ストレスモデルにおいて、Ketamine と異なり抗うつ作用を発現するまでに、2週間以上の反復投与が必要であることが報告された (28, 106)。これらのことから、mGlu5 受容体拮抗薬は既存の抗うつ薬の副作用の一部を回避する可能性があるものの、Ketamine とは異なり即効性の抗うつ作用を有さない可能性がある。

本研究において、mGlu5 受容体拮抗薬は Ketamine と異なる機序を介して抗うつ様作用を発現したため、Ketamine 様の副作用を呈さない可能性が考えられる。実際、mGlu5 受容体拮抗薬の MPEP はラットの大脳皮質において、NMDA 受容体拮抗薬の MK-801 とは異なり、神経毒性を発現しないことが報告されている (109)。また、Basimglurant は臨床試験において、その安全性が確認されている (110)。加えて、mGlu5 受容体拮抗薬の Dipraglurant もパーキンソン病患者を対象に行なわれたプラセボ対照二重盲験試験において、その安全性と忍容性の高さが確認されている (111)。しかしながら、mGlu5 受容体拮抗薬の Fenobam は 6 つの臨床試験うちの 1 試験において、副作用として精神症状 (幻覚) が観察されたことから、mGlu5 受容体拮抗薬にも Ketamine と同様に精神症状が発現する懸念は残されている (112)。以上のことから、mGlu5 受容体拮抗薬の抗うつ薬としての有用性に関しては、臨床試験においてさらに検証される必要がある。

< mGlu2/3 受容体拮抗薬の抗うつ薬としての可能性 >

mGlu2/3 受容体拮抗薬は Ketamine と共通の神経シグナル伝達及び前頭前皮質における神経可塑的な変化を介して抗うつ作用を発現することが示唆されている (24, 26, 27, 29, 32, 69, 71-74, Fig. 43)。また、本研究から、mGlu2/3 受容体拮抗薬は Ketamine と共通した神経回路を介して急性の抗うつ作用を発現することが示唆された (Fig. 44, 45)。これまでに、著者らは、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の持続的な抗うつ作用 (投与 24 時間後の作用) にもセロトニン遊離促進が関与することを示唆している (105)。しかしながら、内側前頭前皮質におけるセロトニン遊離促進は mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の投与後 20 分及び 10 分にそれぞれ惹起され、1 時間及び 3 時間後には消失するという報告があることから、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の持続性の抗うつ作用発現時 (投与 24 時間後) にはセロトニン遊離促進は直接関与していないと推察される (53, 55)。これまでに、セロトニン遊離促進がポストシナプスの 5-HT_{1A} 受容体の活性化を介して、前頭前皮質において神経可塑的な変化に関与する BDNF の発現を上昇させることが示唆されている (113, 114)。そこで、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ作用において、共通する神経可塑的な変化及び神経回路の関与を考え合わせると、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine は内側前頭前皮質の AMPA 受容体を活性化し、投射先の背側縫線核のセロトニン神経を活性化することにより、内側前頭前皮質でのセロトニン遊離を促進し、5-HT_{1A} 受容体の刺激を介して急性の抗うつ作用を発現すると考えられる。さらに、それに続いて惹起される神経可塑的な変化を介して

持続性の抗うつ作用を発現する可能性が考えられる (Fig. 45)。この仮説を証明するには、オプトジェネティクスを用いて以下の項目について検証する必要がある。①内側前頭前皮質から背側縫線核のセロトニン神経に投射するグルタミン酸神経を選択的に抑制することにより、mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine による抗うつ作用、並びに内側前頭前皮質におけるセロトニン遊離促進と神経可塑的な変化が拮抗されるか否か、②内側前頭前皮質から背側縫線核のセロトニン神経に投射するグルタミン酸神経を選択的に活性化することにより、抗うつ作用、並びに内側前頭前皮質におけるセロトニン遊離促進、5-HT_{1A} 受容体の活性化及び神経可塑的な変化などが惹起されるか否か、などについてである。臨床において優れた効果を有する Ketamine の新たな作用機序を解明することは、有望な創薬標的の発見に繋がる可能性がある。また、mGlu2/3 受容体拮抗薬については抗うつ作用の機序において Ketamine との共通性を見出すことにより、臨床において Ketamine 様の効果を期待することができるようになる。これらのことから、上記仮説は重要な検討課題である。

Ketamine はその効果の面で既存の抗うつ薬よりも優れた治療薬としての可能性を有するものの、様々な有害事象を考慮しなくてはならないため、その使用が制限されており、Ketamine と共通の作用機序を有する mGlu2/3 受容体拮抗薬も同様の副作用が発現すると危惧される (10-21, 35-37)。この点について、mGlu2/3 受容体拮抗薬の MGS0039 のプロドラッグである BCI-838 の第 1 相試験では、Ketamine 様の精神症状が観察されなかったことからその安全性と良好な忍容性が確認されている (115)。さらに、mGlu2/3 受容体拮抗薬は動物モデルにおいて、Ketamine 様の副作用を発現しないことが確認されている (data not shown)。このことから、mGlu2/3 受容体拮抗薬は Ketamine よりも安全性の高い化合物であることが示唆されている。

さらに、mGlu2/3 受容体拮抗薬にはヒトとの外挿性の高い神経生理学的なバイオマーカーが存在することが示唆されている。即ち、BCI-838 は用量依存的に脳波を変化させることが報告されている (115)。また、mGlu2/3 受容体拮抗薬の LY341495 についても用量依存的にレム睡眠及びノンレム睡眠を抑制することにより覚醒期を延長させ、ノンレム睡眠及び覚醒期の皮質における高周波の脳波 (20-50 Hz) を増強しており、これらの作用は mGlu2/3 受容体の拮抗作用を介していることが報告されている (116)。加えて、LY341495 が脳波の変化を惹起する用量は抗うつ作用を発現する用量に近似することから、脳波の変化は薬効予測のバイオマーカーとして有用であると考えられる (46)。このことから、上記のバイオマーカーを用いることにより、臨床試験において mGlu2/3 受容体拮抗薬の抗うつ作用が妥当に評価されることが期待される (117)。

《まとめ》

以上のことから、mGlu5 受容体拮抗薬は持続性があり Ketamine 様の副作用を軽減した治療薬となる可能性が示されたものの、その有効性を支持する結果は臨床において得られていない。一方、本研究は mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ作用発現

にセロトニン神経系が関与することを初めて明らかにし、それらの作用機序は神経回路レベルにおいても共通していることを示唆した。また、mGlu2/3 受容体拮抗薬は臨床において、Ketamine と同様に即効性及び持続性の抗うつ作用を示し、かつ、Ketamine よりも安全性の高い治療薬となる可能性が示された。これらのことから、本研究は mGlu2/3 受容体拮抗薬が既存の抗うつ薬のアンメットメディカルニーズを満たす新しい抗うつ薬となる可能性を提示した。今後は mGlu2/3 受容体拮抗薬及び Ketamine の抗うつ作用の機序において提唱した新たな仮説を検証していくことにより、有望な創薬標的の発見及び mGlu2/3 受容体拮抗薬の臨床効果予測に繋げていく必要がある。

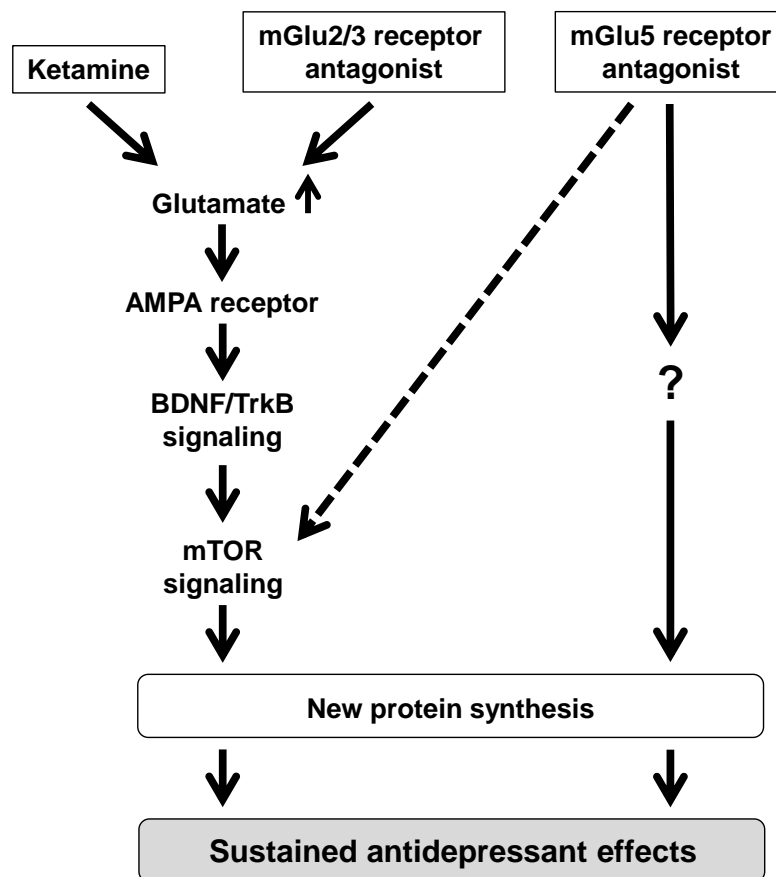


Fig. 43 Proposed mechanisms of the sustained antidepressant effects of Ketamine, mGlu2/3 receptor antagonist and mGlu5 receptor antagonist.

Ketamine and the mGlu2/3 receptor antagonist indirectly activate AMPA receptor and subsequently stimulate the BDNF/TrkB and mTOR signaling, leading to the elicitation of the sustained antidepressant effects. The mGlu5 receptor antagonist induces the sustained antidepressant effect through the new protein synthesis, partly via mTOR signaling but not via BDNF/TrkB signaling.

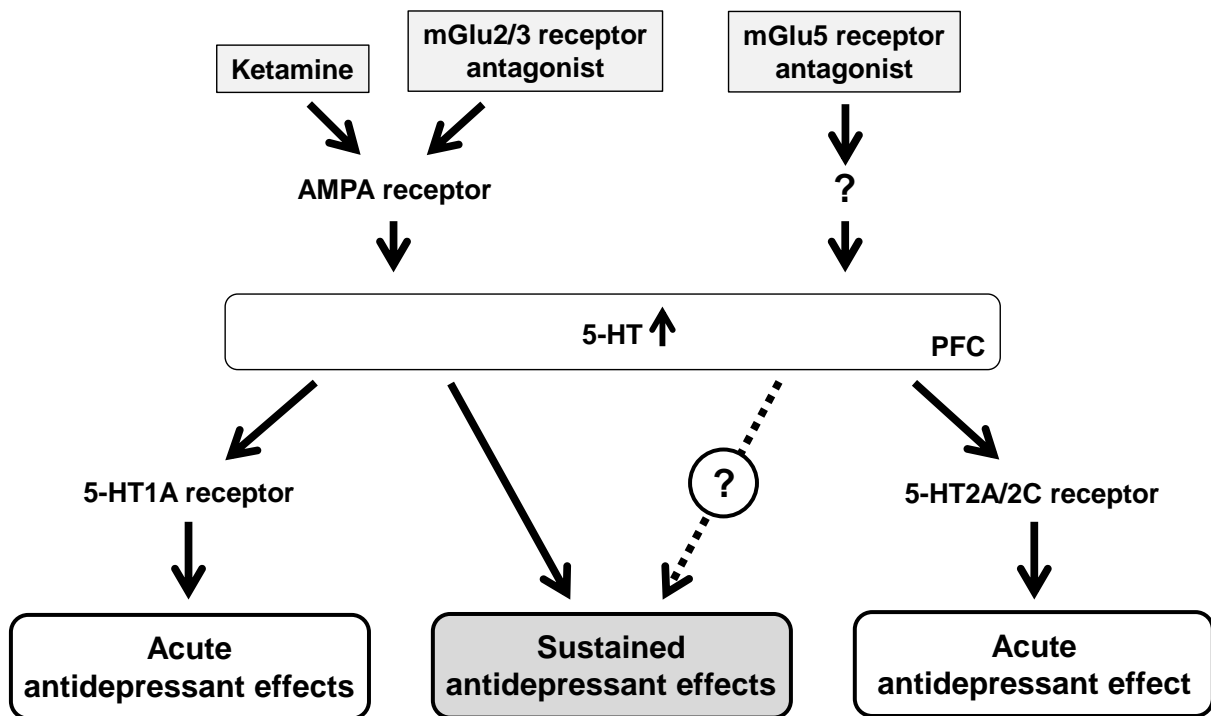


Fig. 44 Proposed mechanisms of the acute and sustained antidepressant effects of Ketamine, mGlu2/3 receptor antagonist and mGlu5 receptor antagonist.

Ketamine and mGlu2/3 receptor antagonist increase the release of 5-HT in the prefrontal cortex via the stimulation of AMPA receptor and subsequently activate the 5-HT_{1A} receptor, leading to the acute antidepressant effects. Ketamine and mGlu2/3 receptor antagonist induce the sustained effects via the increase of the release of 5-HT in the prefrontal cortex. The mGlu5 receptor antagonist increases the release of 5-HT in the prefrontal cortex and subsequently activate the 5-HT_{2A/2C} receptor, leading to the acute antidepressant effect. The mGlu5 receptor antagonist may induce the sustained effect via the increase of the release of 5-HT in the prefrontal cortex.

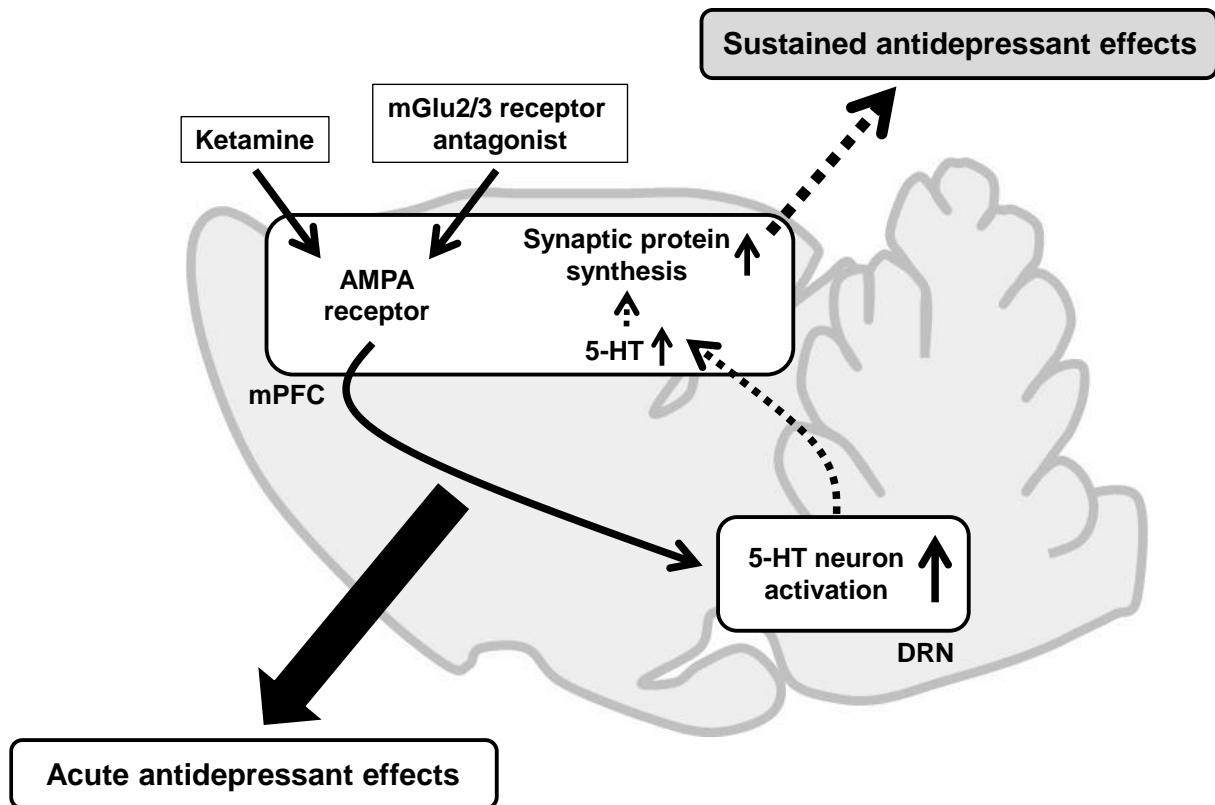


Fig. 45 Proposed neural mechanisms of the antidepressant effects of Ketamine and mGlu2/3 receptor antagonist.

Ketamine and mGlu2/3 receptor antagonist induce the acute antidepressant effects through the activation of a subset of 5-HT neurons in the DRN modulated by AMPA receptor stimulation in the mPFC. Then, the above-mentioned neuronal pathway may induce the increase of the release of 5-HT and the facilitation of synaptic protein synthesis, leading to the elicitation of the sustained antidepressant effects.

引用文献

1. Gartlehner G, Hansen RA, Morgan LC, Thaler K, Lux LJ, Van Noord M, Mager U, Gaynes BN, Thieda P, Strobelberger M, Lloyd S, Reichenpfader U, Lohr KN., Second-Generation Antidepressants in the Pharmacologic Treatment of Adult Depression: An Update of the 2007 Comparative Effectiveness Review., Agency for Healthcare Research and Quality (US), Report No.: 12-EHC012-EF (2011)
2. Goodman WK, Murphy TK, Storch EA., Risk of adverse behavioral effects with pediatric use of antidepressants., *Psychopharmacology (Berl)*, 191, 87-96 (2007)
3. Kim JS, Schmid-Burgk W, Claus D, Kornhuber HH., Increased serum glutamate in depressed patients., *Arch Psychiatr Nervenkr*, 232, 299-304 (1982)
4. Mauri MC, Ferrara A, Boscati L, Bravin S, Zamberlan F, Alecci M, Invernizzi G., Plasma and platelet amino acid concentrations in patients affected by major depression and under fluvoxamine treatment., *Neuropsychobiology*, 37, 124-129 (1998)
5. 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*, 30, 1155-1158 (2006)
6. 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*, 61, 705-713 (2004)
7. Luykx JJ, Laban KG, van den Heuvel MP, Boks MP, Mandl RC, Kahn RS, Bakker SC., Region and state specific glutamate downregulation in major depressive disorder: a meta-analysis of (1)H-MRS findings., *Neurosci Biobehav Rev*, 36, 198-205 (2012)
8. Feyissa AM, Chandran A, Stockmeier CA, Karolewicz B., Reduced levels of NR2A and NR2B subunits of NMDA receptor and PSD-95 in the prefrontal cortex in major depression., *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 33, 70-75 (2009)
9. Kaut O, Schmitt I, Hofmann A, Hoffmann P, Schlaepfer TE, Wüllner U, Hurlmann R., Aberrant NMDA receptor DNA methylation detected by epigenome-wide analysis of hippocampus and prefrontal cortex in major depression., *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*,

(2015) [Epub ahead of print]

10. Berman RM, Cappiello A, Anand A, Oren DA, Heninger GR, Charney DS, Krystal JH., Antidepressant effects of ketamine in depressed patients., *Biol Psychiatry*, 47, 351-354 (2000)

11. Zarate CA Jr, Singh JB, Carlson PJ, Brutsche NE, Ameli R, Luckenbaugh DA, Charney DS, Manji HK., A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression., *Arch Gen Psychiatry*, 63, 856-864 (2006)

12. DiazGranados N, Ibrahim LA, Brutsche NE, Ameli R, Henter ID, Luckenbaugh DA, Machado-Vieira R, Zarate CA Jr., Rapid resolution of suicidal ideation after a single infusion of an N-methyl-D-aspartate antagonist in patients with treatment-resistant major depressive disorder., *J Clin Psychiatry*, 71, 1605-1611 (2010)

13. Ibrahim L, Diazgranados N, Luckenbaugh DA, Machado-Vieira R, Baumann J, Mallinger AG, Zarate CA Jr., Rapid decrease in depressive symptoms with an N-methyl-D-aspartate antagonist in ECT-resistant major depression., *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 35, 1155-1159 (2011)

14. Murrough JW, Iosifescu DV, Chang LC, Al Jurdi RK, Green CE, Perez AM, Iqbal S, Pillemer S, Foulkes A, Shah A, Charney DS, Mathew SJ., Antidepressant efficacy of ketamine in treatment-resistant major depression: a two-site randomized controlled trial., *Am J Psychiatry*, 170, 1134-1142 (2013)

15. Lapidus KA, Levitch CF, Perez AM, Brallier JW, Parides MK, Soleimani L, Feder A, Iosifescu DV, Charney DS, Murrough JW., A randomized controlled trial of intranasal ketamine in major depressive disorder., *Biol Psychiatry*, 76, 970-976 (2014)

16. Price RB, Nock MK, Charney DS, Mathew SJ., Effects of intravenous ketamine on explicit and implicit measures of suicidality in treatment-resistant depression., *Biol Psychiatry*, 66, 522-526 (2009)

17. aan het Rot M, Collins KA, Murrough JW, Perez AM, Reich DL, Charney DS, Mathew SJ., Safety and efficacy of repeated-dose intravenous ketamine for treatment-resistant depression., *Biol Psychiatry*, 67, 139-145 (2010)

18. Murrough JW, Perez AM, Pillemer S, Stern J, Parides MK, aan het Rot M, Collins KA,

Mathew SJ, Charney DS, Iosifescu DV., Rapid and longer-term antidepressant effects of repeated ketamine infusions in treatment-resistant major depression., *Biol Psychiatry*, 74, 250-256 (2013)

19. Okamoto N, Nakai T, Sakamoto K, Nagafusa Y, Higuchi T, Nishikawa T., Rapid antidepressant effect of ketamine anesthesia during electroconvulsive therapy of treatment-resistant depression: comparing ketamine and propofol anesthesia., *J ECT*, 26, 223-227 (2010)

20. Kranaster L, Kammerer-Ciernioch J, Hoyer C, Sartorius A., Clinically favourable effects of ketamine as an anaesthetic for electroconvulsive therapy: a retrospective study., *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 261, 575-582, (2011)

21. Ghasemi M, Kazemi MH, Yoosefi A, Ghasemi A, Paragomi P, Amini H, Afzali MH., Rapid antidepressant effects of repeated doses of ketamine compared with electroconvulsive therapy in hospitalized patients with major depressive disorder., *Psychiatry Res*, 215, 355-361 (2014)

22. Diazgranados N, Ibrahim L, Brutsche NE, Newberg A, Kronstein P, Khalife S, Kammerer WA, Quezado Z, Luckenbaugh DA, Salvatore G, Machado-Vieira R, Manji HK, Zarate CA Jr., A randomized add-on trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant bipolar depression., *Arch Gen Psychiatry*, 67, 793-802 (2010)

23. Zarate CA Jr, Brutsche NE, Ibrahim L, Franco-Chaves J, Diazgranados N, Cravchik A, Selter J, Marquardt CA, Liberty V, Luckenbaugh DA., Replication of ketamine's antidepressant efficacy in bipolar depression: a randomized controlled add-on trial., *Biol Psychiatry*, 71, 939-946 (2012)

24. Moghaddam B, Adams B, Verma A, Daly D., Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex., *J Neurosci*, 17, 2921-2927 (1997)

25. Lorrain DS, Baccei CS, Bristow LJ, Anderson JJ, Varney MA., Effects of ketamine and N-methyl-d-aspartate on glutamate and dopamine release in the rat prefrontal cortex: modulation by a group II selective metabotropic glutamate receptor agonist LY379268., *Neuroscienc*, 117, 697-706 (2003)

26. Maeng S, Zarate CA Jr, Du J, Schloesser RJ, McCammon J, Chen G., Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors., *Biol Psychiatry*, 63, 349-352 (2008)
27. Li N, Lee B, Liu RJ, Banasr M, Dwyer JM, Iwata M, Li XY, Aghajanian G, Duman RS., mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists., *Science*, 329, 959-964 (2010)
28. Li N, Liu RJ, Dwyer JM, Banasr M, Lee B, Son H, Li XY, Aghajanian G, Duman RS., Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure., *Biol Psychiatry*, 69, 754-761 (2011)
29. Koike H, Iijima M, Chaki S., Involvement of the mammalian target of rapamycin signaling in the antidepressant-like effect of group II metabotropic glutamate receptor antagonists., *Neuropharmacology*, 61, 1419-1423 (2011)
30. Liu RJ, Lee FS, Li XY, Bambico F, Duman RS, Aghajanian GK., Brain-derived neurotrophic factor Val66Met allele impairs basal and ketamine-stimulated synaptogenesis in prefrontal cortex., *Biological Psychiatry*, 71, 996-1005 (2012)
31. Autry AE, Adachi M, Nosyreva E, Na ES, Los MF, Cheng PF, Kavalali ET, Monteggia LM., NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses., *Nature*, 475, 91-95 (2011)
32. Koike H, Fukumoto K, Iijima M, Chaki S., Role of BDNF/TrkB signaling in antidepressant-like effects of a group II metabotropic glutamate receptor antagonist in animal models of depression., *Behav Brain Res*, 238, 48-52 (2013)
33. Laje G, Lally N, Mathews D, Brutsche N, Chemerinski A, Akula N, Kelmendi B, Simen A, McMahon FJ, Sanacora G, Zarate C Jr., Brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and antidepressant efficacy of ketamine in depressed patients., *Biol Psychiatry*, 72, e27-e28 (2012)
34. Zhou W, Wang N, Yang C, Li XM, Zhou ZQ, Yang JJ., Ketamine-induced antidepressant effects are associated with AMPA receptors-mediated upregulation of mTOR and BDNF in rat hippocampus and prefrontal cortex., *Eur Psychiatry*. 29, 419-423 (2014)

35. Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers MB Jr, Charney DS., Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses., *Arch Gen Psychiatry*, 51, 199-214 (1994)
36. Zarate CA Jr, Singh JB, Carlson PJ, Brutsche NE, Ameli R, Luckenbaugh DA, Charney DS, Manji HK., A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression., *Arch Gen Psychiatry*, 63, 856-864 (2006)
37. Green SM, Coté CJ., Ketamine and neurotoxicity: clinical perspectives and implications for emergency medicine., *Annals of Emergency Medicine*, 54, 181-190 (2009)
38. Pin JP, Duvoisin R., The metabotropic glutamate receptors: structure and functions., *Neuropharmacology*, 34, 1-26 (1995)
39. Wright, R.A., Johnson, B.G., Zhang, C., Salhoff, C., Kingston, A.E., Calligaro, D.O., Monn, J.A., Schoepp, D.D., Marek, G.J., CNS distribution of metabotropic glutamate 2 and 3 receptors: Transgenic mice and [3H]LY459477 autoradiography., *Neuropharmacology*, 66, 89-98 (2013)
40. Spooren WP, Gasparini F, Salt TE, Kuhn R., Novel allosteric antagonists shed light on mglu(5) receptors and CNS disorders., *Trends Pharmacol Sci*, 22, 331-337 (2001)
41. Daggett LP, Sacaan AI, Akong M, Rao SP, Hess SD, Liaw C, Urrutia A, Jachec C, Ellis SB, Dreessen J, Knöpfel T, Landwehrmeyer GB, Testa CM, Young AB, Varney M, Johnson EC, Veliçelebi G., Molecular and functional characterization of recombinant human metabotropic glutamate receptor subtype 5., *Neuropharmacology*, 34, 871-886 (1995)
42. Ferraguti F, Shigemoto R., Metabotropic glutamate receptors., *Cell Tissue Res*, 326, 483-504 (2006)
43. Drevets WC., Neuroimaging studies of mood disorders., *Biol Psychiatry*, 48, 813-829 (2000)
44. Feyissa AM, Woolverton WL, Miguel-Hidalgo JJ, Wang Z, Kyle PB, Hasler G, Stockmeier CA, Iyo AH, Karolewicz B., Elevated level of metabotropic glutamate receptor 2/3 in the

prefrontal cortex in major depression., *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 34, 279-283 (2010)

45. Deschwanden A, Karolewicz B, Feyissa AM, Treyer V, Ametamey SM, Johayem A, Burger C, Auberson YP, Sovago J, Stockmeier CA, Buck A, Hasler G., Reduced metabotropic glutamate receptor 5 density in major depression determined by [(11)C]ABP688 PET and postmortem study., *Am J Psychiatry*, 168, 727-734 (2011)

46. 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*, 46, 457-467 (2004)

47. 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)*, 186, 587-593 (2006)

48. Koike H, Iijima M, Chaki S., Effects of ketamine and LY341495 on the depressive-like behavior of repeated corticosterone-injected rats., *Pharmacol Biochem Behav*, 107, 20-23 (2013)

49. Belozertseva IV, Kos T, Popik P, Danysz W, Bessalov AY., Antidepressant-like effects of mGluR1 and mGluR5 antagonists in the rat forced swim and the mouse tail suspension tests., *Eur Neuropsychopharmacol*, 17, 172-179 (2007)

50. Pilc A, Kłodzińska A, Brański P, Nowak G, Pałucha A, Szewczyk B, Tatarczyńska E, Chojnacka-Wójcik E, Wierońska JM., Multiple MPEP administrations evoke anxiolytic- and antidepressant-like effects in rats., *Neuropharmacology*, 43, 181-187 (2002)

51. Pałucha A, Brański P, Szewczyk B, Wierońska JM, Kłak K, Pilc A., Potential antidepressant-like effect of MTEP, a potent and highly selective mGluR5 antagonist., *Pharmacol Biochem Behav*, 81, 901-906 (2005)

52. Hughes ZA, Neal SJ, Smith DL, Sukoff Rizzo SJ, Pulicicchio CM, Lotarski S, Lu S, Dwyer JM, Brennan J, Olsen M, Bender CN, Kouranova E, Andree TH, Harrison JE, Whiteside GT, Springer D, O'Neil SV, Leonard SK, Schechter LE, Dunlop J, Rosenzweig-Lipson S, Ring RH., Negative allosteric modulation of metabotropic glutamate receptor 5 results in broad

spectrum activity relevant to treatment resistant depression., *Neuropharmacology*, 66, 202-214 (2013)

53. 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*, 1042, 92-98 (2005)

54. Stachowicz K, Gołembiowska K, Sowa M, Nowak G, Chojnacka-Wójcik E, Pilc A., Anxiolytic-like action of MTEP expressed in the conflict drinking Vogel test in rats is serotonin dependent., *Neuropharmacology*, 53, 741-748 (2007)

55. Nishitani N, Nagayasu K, Asaoka N, Yamashiro M, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S., Raphe AMPA receptors and nicotinic acetylcholine receptors mediate ketamine-induced serotonin release in the rat prefrontal cortex., *Neuropsychopharmacol*, 17, 1321-1326 (2014)

56. 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*, 319, 254-259 (2006)

57. Mannaioni G, Marino MJ, Valenti O, Traynelis SF, Conn PJ., Metabotropic glutamate receptors 1 and 5 differentially regulate CA1 pyramidal cell function., *J Neurosci*, 21, 5925-5934 (2001)

58. Pomierny-Chamioło L, Poleszak E, Pilc A, Nowak G., NMDA but not AMPA glutamatergic receptors are involved in the antidepressant-like activity of MTEP during the forced swim test in mice., *Pharmacol Rep*, 62, 1186-90 (2010)

59. Legutko B, Szewczyk B, Pomierny-Chamioło L, Nowak G, Pilc A., Effect of MPEP treatment on brain-derived neurotrophic factor gene expression., *Pharmacol Rep*, 58, 427-430 (2006)

60. Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R., Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants., *Science*, 301, 805-809 (2003)

61. Surget A, Saxe M, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, Chalon S, Griebel G, Hen R, Belzung C., Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of

antidepressant reversal., *Biol Psychiatry*, 64, 293-301 (2008)

62. Bodnoff SR, Suranyi-Cadotte B, Aitken DH, Quirion R, Meaney MJ., The effects of chronic antidepressant treatment in an animal model of anxiety., *Psychopharmacology (Berl)*, 95, 298-302 (1988)

63. Anderson JJ, Bradbury MJ, Giracello DR, Chapman DF, Holtz G, Roppe J, King C, Cosford ND, Varney MA., In vivo receptor occupancy of mGlu5 receptor antagonists using the novel radioligand [3H]3-methoxy-5-(pyridin-2-ylethynyl)pyridine., *Eur J Pharmacol*, 473, 35-40 (2003)

64. Jernigan CS, Goswami DB, Austin MC, Iyo AH, Chandran A, Stockmeier CA, Karolewicz B., The mTOR signaling pathway in the prefrontal cortex is compromised in major depressive disorder., *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 35, 1774-1779 (2011)

65. Yamada N, Katsuura G, Ochi Y, Ebihara K, Kusakabe T, Hosoda K, Nakao K., Impaired CNS leptin action is implicated in depression associated with obesity., *Endocrinology*, 152, 2634-2643 (2011)

66. Wierońska JM, Smiałowska M, Brański P, Gasparini F, Kłodzińska A, Szewczyk B, Pałucha A, Chojnacka-Wójcik E, Pilc A., In the amygdala anxiolytic action of mGlu5 receptors antagonist MPEP involves neuropeptide Y but not GABAA signaling., *Neuropsychopharmacology*, 29, 514-521 (2004)

67. Serova LI, Laukova M, Alaluf LG, Pucillo L, Sabban EL., Intranasal neuropeptide Y reverses anxiety and depressive-like behavior impaired by single prolonged stress PTSD model., *Eur Neuropsychopharmacol*, 24, 142-147 (2014)

68. Kawasaki T, Ago Y, Yano K, Araki R, Washida Y, Onoe H, Chaki S, Nakazato A, Hashimoto H, Baba A, Takuma K, Matsuda T., Increased binding of cortical and hippocampal group II metabotropic glutamate receptors in isolation-reared mice., *Neuropharmacology*, 60, 397-404 (2011)

69. Pałucha-Poniewiera A, Wierońska JM, Brański P, Stachowicz K, Chaki S, Pilc A., On the mechanism of the antidepressant-like action of group II mGlu receptor antagonist, MGS0039., *Psychopharmacology (Berl)*, 212, 523-535 (2010)

70. Dwyer JM, Lepack AE, Duman RS., mGluR2/3 blockade produces rapid and long-lasting reversal of anhedonia caused by chronic stress exposure., *J Mol Psychiatry*, 1, 15 (2013)
71. Koike H, Iijima M, Chaki S., Involvement of AMPA receptor in both the rapid and sustained antidepressant-like effects of ketamine in animal models of depression., *Behav Brain Res*, 224, 107-111 (2011)
72. Hascup ER, Hascup KN, Stephens M, Pomerleau F, Huettl P, Gratton A, Gerhardt GA., Rapid microelectrode measurements and the origin and regulation of extracellular glutamate in rat prefrontal cortex., *J Neurochem*, 115, 1608-1620 (2010)
73. Dwyer JM, Lepack AE, Duman RS., mTOR activation is required for the antidepressant effects of mGluR2/3 blockade., *Int J Neuropsychopharmacol*, 15, 429-434 (2012)
74. Koike H, Chaki S., Requirement of AMPA receptor stimulation for the sustained antidepressant activity of ketamine and LY341495 during the forced swim test in rats., *Behav Brain Res*, 271, 111-115 (2014)
75. Yamanaka H, Yokoyama C, Mizuma H, Kurai S, Finnema SJ, Halldin C, Doi H, Onoe H., A possible mechanism of the nucleus accumbens and ventral pallidum 5-HT1B receptors underlying the antidepressant action of ketamine: a PET study with macaques., *Transl Psychiatry*, 4, e342 (2014)
76. Marek GJ, Wright RA, Schoepp DD, Monn JA, Aghajanian GK., Physiological antagonism between 5-hydroxytryptamine(2A) and group II metabotropic glutamate receptors in prefrontal cortex., *J Pharmacol Exp Ther*, 292, 76-87 (2000)
77. Kłodzinska A, Bijak M, Tokarski K, Pilc A., Group II mGlu receptor agonists inhibit behavioural and electrophysiological effects of DOI in mice., *Pharmacol Biochem Behav*, 73, 327-332 (2002)
78. Gigliucci V, O'Dowd G, Casey S, Egan D, Gibney S, Harkin A., Ketamine elicits sustained antidepressant-like activity via a serotonin-dependent mechanism., *Psychopharmacology (Berl)*, 228, 157-166 (2013)
79. Pałucha-Poniewiera A, Brański P, Wierońska JM, Stachowicz K, Sławińska A, Pilc A., The antidepressant-like action of mGlu5 receptor antagonist, MTEP, in the tail suspension test in

mice is serotonin dependent., *Psychopharmacology (Berl)*, 231, 97-107 (2014)

80. 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, 1028-1034 (2000)

81. 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*, 45, 1050-1056 (2003)

82. Dursun SM, Handley SL., Similarities in the pharmacology of spontaneous and DOI-induced head-shakes suggest 5HT_{2A} receptors are active under physiological conditions., *Psychopharmacology (Berl)*, 128, 198-205 (1996)

83. Filip M, Bader M., Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system., *Pharmacol Rep*, 61, 761-777 (2009)

84. Holick KA, Lee DC, Hen R, Dulawa SC., Behavioral effects of chronic fluoxetine in BALB/cJ mice do not require adult hippocampal neurogenesis or the serotonin 1A receptor., *Neuropsychopharmacology*, 33, 406-417 (2008)

85. Quesseveur G, Nguyen HT, Gardier AM, Guiard BP., 5-HT₂ ligands in the treatment of anxiety and depression., *Expert Opin Investig Drugs*, 21, 1701-1725 (2012)

86. Hjorth S, Sharp T., Effect of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT on the release of 5-HT in dorsal and median raphe-innervated rat brain regions as measured by in vivo microdialysis., *Life Sci*, 48, 1779-86 (1991)

87. Celada P, Puig MV, Casanovas JM, Guillazo G, Artigas F., Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: Involvement of serotonin-1A, GABA(A), and glutamate receptors., *J Neurosci*, 21, 9917-29 (2001)

88. Drevets WC, Thase ME, Moses-Kolko EL, Price J, Frank E, Kupfer DJ, Mathis C., Serotonin-1A receptor imaging in recurrent depression: replication and literature review., *Nucl Med Biol*, 34, 865-77 (2007)

89. Szewczyk B, Albert PR, Burns AM, Czesak M, Overholser JC, Jurjus GJ, Meltzer HY, Konick LC, Dieter L, Herbst N, May W, Rajkowska G, Stockmeier CA, Austin MC.,

Gender-specific decrease in NUDR and 5-HT1A receptor proteins in the prefrontal cortex of subjects with major depressive disorder., *Int J Neuropsychopharmacol.*, 12, 155-168 (2009)

90. Haddjeri N, Blier P, de Montigny C., Long-term antidepressant treatments result in a tonic activation of forebrain 5-HT1A receptors., *J Neurosci*, 18, 10150-10156 (1998)

91. Chaput Y, de Montigny C, Blier P., Presynaptic and postsynaptic modifications of the serotonin system by long-term administration of antidepressant treatments. An in vivo electrophysiologic study in the rat., *Neuropsychopharmacology*, 5, 219-229 (1991)

92. Heidbreder CA, Bianchi M, Lacroix LP, Faedo S, Perdoni E, Remelli R, Cavanni P, Crespi F., Evidence that the metabotropic glutamate receptor 5 antagonist MPEP may act as an inhibitor of the norepinephrine transporter in vitro and in vivo., *Synapse*, 50, 269-276 (2003)

93. Halberstadt AL, Lehmann-Masten VD, Geyer MA, Powell SB., Interactive effects of mGlu5 and 5-HT2A receptors on locomotor activity in mice., *Psychopharmacology (Berl)*, 215, 81-92 (2011)

94. Griffiths JL, Lovick TA., Co-localization of 5-HT 2A -receptor- and GABA-immunoreactivity in neurones in the periaqueductal grey matter of the rat., *Neurosci Lett*, 326, 151-154 (2002)

95. Abi-Saab WM, Bubser M, Roth RH, Deutch AY., 5-HT2 receptor regulation of extracellular GABA levels in the prefrontal cortex., *Neuropsychopharmacology*, 20, 92-96 (1999)

96. Sanacora G, Mason GF, Krystal JH., Impairment of GABAergic transmission in depression: new insights from neuroimaging studies., *Crit Rev Neurobiol*, 14, 23-45 (2000)

97. Pollak Dorocic I, Fürth D, Xuan Y, Johansson Y, Pozzi L, Silberberg G, Carlén M, Meletis K., A whole-brain atlas of inputs to serotonergic neurons of the dorsal and median raphe nuclei., *Neuron*, 83, 663-678 (2014)

98. Warden MR, Selimbeyoglu A, Mirzabekov JJ, Lo M, Thompson KR, Kim SY, Adhikari A, Tye KM, Frank LM, Deisseroth K., A prefrontal cortex-brainstem neuronal projection that controls response to behavioural challenge., *Nature*, 492, 428-432 (2012)

99. Hamani C, Diwan M, Macedo CE, Brandão ML, Shumake J, Gonzalez-Lima F, Raymond R, Lozano AM, Fletcher PJ, Nobrega JN., Antidepressant-like effects of medial prefrontal cortex deep brain stimulation in rats., *Biol Psychiatry*, 67, 117-124 (2010)
100. 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*, 378, 131-134 (2005)
101. López-Gil X, Babot Z, Amargós-Bosch M, Suñol C, Artigas F, Adell A., Clozapine and haloperidol differently suppress the MK-801-increased glutamatergic and serotonergic transmission in the medial prefrontal cortex of the rat., *Neuropsychopharmacology*, 32, 2087-2097 (2007)
102. Nowak K, Meyza K, Nikolaev E, Hunt MJ, Kasicki S., Local blockade of NMDA receptors in the rat prefrontal cortex increases c-Fos expression in multiple subcortical regions., *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 72, 207-218 (2012)
103. Martín-Ruiz R, Puig MV, Celada P, Shapiro DA, Roth BL, Mengod G, Artigas F., Control of serotonergic function in medial prefrontal cortex by serotonin-2A receptors through a glutamate-dependent mechanism., *J Neurosci*, 21, 9856-9866 (2001)
104. Weissbourd B, Ren J, DeLoach KE, Guenther CJ, Miyamichi K, Luo L., Presynaptic partners of dorsal raphe serotonergic and GABAergic neurons., *Neuron*, 83, 645-662 (2014)
105. Fukumoto K, Iijima M, Chaki S., The antidepressant effects of an mGlu2/3 receptor antagonist and ketamine require AMPA receptor stimulation in the mPFC and subsequent activation of the 5-HT neurons in the DRN., *Neuropsychopharmacology*, 41, 1046-1056 (2016)
106. Lindemann L, Porter RH, Scharf SH, Kuennecke B, Bruns A, von Kienlin M, Harrison AC, Paehler A, Funk C, Gloge A, Schneider M, Parrott NJ, Polonchuk L, Niederhauser U, Morairty SR, Kilduff TS, Vieira E, Kolczewski S, Wichmann J, Hartung T, Honer M, Borroni E, Moreau JL, Prinssen E, Spooren W, Wettstein JG, Jaeschke G., Pharmacology of basimglurant (RO4917523, RG7090), a unique metabotropic glutamate receptor 5 negative allosteric modulator in clinical development for depression., *J Pharmacol Exp Ther*, 353, 213-233 (2015)

107. Harvey BD, Siok CJ, Kiss T, Volfson D, Grimwood S, Shaffer CL, Hajós M., Neurophysiological signals as potential translatable biomarkers for modulation of metabotropic glutamate 5 receptors., *Neuropharmacology*, 75, 19-30 (2013)
108. Ahnaou A, Langlois X, Steckler T, Bartolome-Nebreda JM, Drinkenburg WH., Negative versus positive allosteric modulation of metabotropic glutamate receptors (mGluR5): indices for potential pro-cognitive drug properties based on EEG network oscillations and sleep-wake organization in rats., *Psychopharmacology (Berl)*, 232, 1107-1122 (2015)
109. Inta D, Filipovic D, Lima-Ojeda JM, Dormann C, Pfeiffer N, Gasparini F, Gass P., The mGlu5 receptor antagonist MPEP activates specific stress-related brain regions and lacks neurotoxic effects of the NMDA receptor antagonist MK-801: significance for the use as anxiolytic/antidepressant drug., *Neuropharmacology*, 62, 2034-2039 (2012)
110. J.A. Quiroz, P. Tamburri, D. Deptula, L. Banken, U. Beyer, P. Fontoura, L. Santarelli., Abstract of papers, 27th Congress of the European College of Neuropsychopharmacology, Berlin, October 2014, P.2.f.027.
111. Rascol O, Fox S, Gasparini F, Kenney C, Di Paolo T, Gomez-Mancilla B. Use of metabotropic glutamate 5-receptor antagonists for treatment of levodopa-induced dyskinesias., *Parkinsonism Relat Disord*, 20, 947-956 (2014)
112. Friedmann CTH, Davis LJ, Ciccone PE, and Rubin RT., Phase II double blind controlled study of a new anxiolytic, fenobam (McN-3377) vs placebo., *Curr Ther Res*, 27, 144-151 (1980)
113. Savitz J, Lucki I, Drevets WC., 5-HT(1A) receptor function in major depressive disorder., *Prog Neurobiol* Schroeder, 88, 17-31 (2009)
114. Schroeder FA, Lin CL, Crusio WE, Akbarian S., Antidepressant-like effects of the histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, in the mouse., *Biol Psychiatry*, 62, 55-64 (2007)
115. Gradient RA, Wedel PC, Frisbie VM, Leuchter AF, Targum SD, Truong CT, Hutchinson JH., Safety, pharmacokinetic and pharmacodynamics profile of BCI-632, a selective metabotropic glutamate 2/3 receptor antagonist, in healthy human subjects., *Abstr Neurosci Meeting*, 42(841):20 (2012)

116. Feinberg I, Schoepp DD, Hsieh KC, Darchia N, Campbell IG., The metabotropic glutamate (mGlu)2/3 receptor antagonist LY341495 [2S-2-amino-2-(1S,2S-2-carboxycyclopropyl-1-yl)-3-(xanth-9-yl)propanoic acid] stimulates waking and fast electroencephalogram power and blocks the effects of the mGlu2/3 receptor agonist LY379268 [(-)-2-oxa-4-aminobicyclo[3.1.0]hexane-4,6-dicarboxylate] in rats., *J Pharmacol Exp Ther*, 312, 826-833 (2005)

117. La Thangue NB, Kerr DJ., Predictive biomarkers: a paradigm shift towards personalized cancer medicine., *Nat Rev Clin Oncol*, 8, 587-596 (2011)