

# カルシトニン遺伝子関連ペプチド欠損マウスの不安様行動評価

藤原 享志朗・米山 佳和・井上 翔太・橋川 直也・橋川 成美

岡山理科大学大学院理学研究科臨床生命科学専攻

(2022年9月30日受付、2022年12月5日受理)

## 1. 緒言

人における不安の症状として、動悸、息苦しさ、死への恐怖、感覚麻痺やしびれ、頻尿、のどの渇き、不眠、頭痛、強迫行為、人混みに対する恐怖など、さまざまな症状が現れる。また、不安障害は無数に存在するが大きく分類すると社会不安障害、パニック障害、全般性不安障害、強迫性障害の4つに分けることが出来る。不安が起こる原因として地震などの災害や友人や家族の死去などの急激な精神的衝撃、日常生活の中で生じる慢性的なストレス、家族関係の悪化などから生じる精神的葛藤、幼児期からの身の回りの環境の中で形成された性格の偏り、セロトニン(5-hydroxytryptamine: 5-HT) や  $\gamma$ -アミノ酪酸(gamma-aminobutyric acid; GABA) などの神経伝達物質の異常などが挙げられる。現在、不安の治療薬にはベンゾジアゼピン(BZD) 系の抗不安薬が用いられている。その作用機序は、脳内の神経細胞の細胞体と樹状突起に分布する GABA 受容体の1つである、GABA<sub>A</sub> 受容体存在している BZD 受容体に結合することでアゴニストとして作用し、神経活動を抑制に導く。GABA の神経伝達が亢進すればするほど催眠・鎮静作用などがあらわれる。BZD 受容体は、GABA<sub>A</sub> 受容体と複合体を形成していて、BZD 受容体が刺激されると GABA に関わる神経伝達が亢進し、脳の活動が抑制され眠気などがあらわれる。抑制性神経伝達物質である GABA の刺激によって Cl<sup>-</sup>の細胞内への通過性を高めて抗不安効果を発揮する<sup>1)</sup>。非ベンゾジアゼピン系の抗不安薬としてセロトニン作動性抗不安薬(タンドスピロン)が用いられている。セロトニンは脳内では神経興奮・抑制などに関わり、そのバランスが乱れると不安、抑うつ、睡眠障害などが引き起こされる。受容体には、5-HT<sub>1</sub> から 5-HT<sub>7</sub> までの7つのサブタイプがあり、さらに 5-HT<sub>1A</sub> や 5-HT<sub>1B</sub> などのサブタイプがある。5-HT<sub>1A</sub> 受容体はセロトニン神経細胞の細胞体や樹状突起やシナプス前膜・後膜共に存在している。タンドスピロンは前シナプスの 5-HT<sub>1A</sub> 受容体に作用し、セロトニンの放出を抑制し、神経伝達を阻害する。さらに後膜の 5-HT<sub>1A</sub> 受容体に結合すると、過分極を引き起こし、セロトニン神経活動を抑制するため、抗不安作用をあらわす。さらに、神経過敏による抑うつや恐怖

などを和らげる作用も示すことが報告されている<sup>1)</sup>。このように様々な薬が不安の治療薬として用いられているが、神経ペプチドの1種であるカルシトニン遺伝子関連ペプチド(calcitonin gene-related peptide; CGRP) をターゲットとした不安における影響についてはまだ不明な点が多い。CGRP はカルシトニン遺伝子の解析から推定され、同一遺伝子上にコードされている37個のアミノ酸からなる神経ペプチドの一種であり、1982年に発見された。CGRP は、心血管系を含め、中枢末梢に含まれており、cAMP を上昇させ、血管拡張、心拍数増加、心筋収縮力増大<sup>2)</sup>、片頭痛を誘発する等の作用がある<sup>3)</sup>。これまでに CGRP を脳室内投与することにより不安様行動が誘発されることを報告してきた<sup>4)</sup>。しかし、CGRP が恒常的に発現していないマウスの不安様行動への影響は明らかでない。そこで今回我々は、CGRP 欠損 (CGRP knock out; CGRP KO) マウスを用いて、行動試験を行い不安様行動に影響があるかどうか評価を行った。

## 2. 実験材料および実験方法

### 2-1 実験動物

実験動物には、12週齢の CGRP KO マウスおよび、対照群として同週齢の C57BL/6J 雄性マウスを WT マウスとして用いた。動物はケージ内に3~5匹ずつ分けて飼育を行った。自由給餌法にて飼育し、飲料水は水道水を与えた。

### 2-2 行動試験による評価

#### (i) Open field test

四角形の箱たて37 cm×よこ37 cm×高さ33 cmの中央に置きマウスを置き、3分間の行動を観察した。測定項目は中央滞在時間と総移動距離の2つを行った。中央滞在時間が短ければ短いほど不安を感じていると考えられる。また、総移動距離が長ければ長いほど自発行動量が増加していると考えられる。行動を解析するにあたって、マウスの行動をビデオで撮影し、その後ビデオトラッキングソフトウェア「ANY-Maze」(Stoelting Co., Chicago, IL, USA) を用いて評価した。

## (ii) Plus maze test

本試験によりマウスの不安を測定した。高架式十字迷路は 15 cm×5 cm の 2 つのオープンプラットフォームが 15 cm の壁に囲まれた同じ面積の 2 つのプラットフォームと水平に十字に交差しており、床から 35 cm の高さに設置されている。マウスを十字の迷路中央に鼻先が Open arms の方に向くように置き、5 分間オープンアームとクローズドアームに入った回数と滞在時間とオープンアームに入った割合を測定した。オープンアームに滞在または入った回数が多ければ不安を感じていないと考えられる。行動の解析はビデオトラッキングソフトウェア「ANY-Maze」を用いて評価した。

## (iii) Hole board test

本試験では、実験動物を穴が空いた四方形 50 cm×50 cm のオープンフィールドに入れ、マウスが穴を覗く行動(head dipping)を観察することによって不安の評価を行う。本実験装置の床にはマウスの頭部が入る程度の直径 3 cm の穴を中央から等距離に 4 ヶ所設ける。装置内を自由に探索行動させ、最初に穴を覗くまでの時間と穴を覗いた回数を測定する。動物の不安状態が低いほど head dipping 行動は増加し、不安状態が高いほど抑制される。

## 2-3 統計学的解析

Graph Pad Prism 9 ソフトウェア(Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA)を用いて統計解析を行った。得られたデータ値を平均値±標準誤差(Mean ± S.E.M)で表した。また Welch's t-test を用いて統計的処理を行い、いずれも有意水準 5 %以下を有意差ありと判定した。

## 3. 結果

## 3-1 Open field test

CGRP KO マウスではWTマウスと比較して総移動距離が有意に低下しており自発行動量が低下したことが分かる (Fig. 1 A)。さらに CGRO KO マウスにおいて中央滞在時間の有意な延長が見られたことから、壁際にいることにこだわりがなく、特に不安を感じていないことが分かる (Fig. 1 B)。

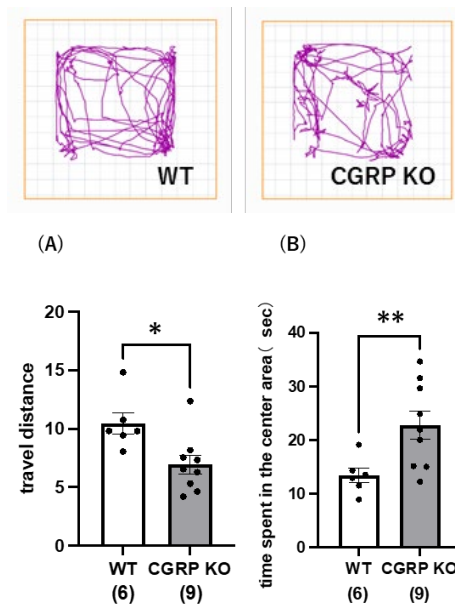


Fig 1. CGRP KO マウスにおける Open field test WT マウス、CGRP KO マウスそれぞれの代表的な軌跡。(A)総移動距離 (B)中央滞在時間。括弧内の数字はマウスの匹数を表す。WT: wild-type mouse, CGRP KO: CGRP knock out mouse \* $p < 0.05$ , Welch's t-test. \*\* $p < 0.01$ , t-test.

## 3-2 Plus maze test

CGRP KO マウスとWTマウスを比較して、総エントリー回数、オープンアームへの滞在時間およびオープンアームに入った割合のいずれにおいても有意な変化が見られなかったことから、Plus maze test においては CGRP 欠損による行動の影響は見られなかった(Fig. 2A, B, C)。

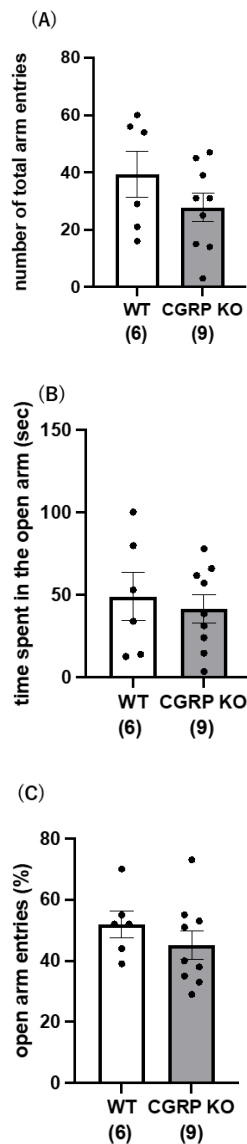


Fig 2. CGRP KO マウスにおける Plus maze test (A)総エントリー回数 (B)オープンアームへの滞在時間 (C)オープンアームに入った割合。括弧内の数字はマウスの匹数を表す。WT: wild-type mouse, CGRP KO: CGRP knock out mouse.

### 3-3 Hole board test

マウスが最初に穴を覗くまでの時間とマウスが穴を覗いた回数においてどちらも有意な差は見られなかった (Fig. 3A, B)。

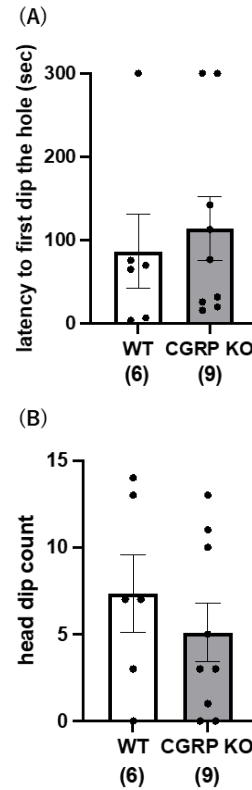


Fig 3. CGRP KO マウスにおける Hole board test (A)最初に穴を覗くまでの時間 (B)穴を覗いた回数。括弧内の数字はマウスの匹数を表す。WT: wild-type mouse, CGRP KO: CGRP knock out mouse.

## 4. 考察

本実験では、12週齢の雄性C57BL/6Jマウスおよび、同週齢のCGRP KOマウスを用いてCGRPの欠損がマウスの不安様行動に関係しているか検討するために、3種類の行動試験を行った。一般行動試験としてOpen field testを行い、マウスの自発行動量を評価した。Open field testにおいて自発行動量の減少と中央滞在時間の有意な延長が見られた。さらに、不安様行動の試験として、Plus maze testとHole board testを行った。CGRP KOマウスでPlus maze testおよびHole board testのいずれにおいても不安様行動を示す結果は見られなかった。CGRP KOマウスにおいて総移動距離が減少した理由として、CGRP欠損により、周囲の環境に順応しやすく、探索行動が减弱した可能性が考えられる。その結果WTマウスより中央滞在時間の増加が見られたと考えられる。我々の以前の研究結果においてもCGRPを脳室内投与することで不安様行動が観察された<sup>4)</sup>。また、マウスにCGRPの受容体拮抗薬であるBIBN4096あるいはCGRP8-37を脳室内投与するとPlus maze testにおいて不安様行動の改善が見られたという報告が挙げられている<sup>5)</sup>。さらに、BIBN4096とニ

ューロキニン 1(NK1) 受容体拮抗薬をマウスの腹腔内に同時に投与すると、Plus maze test において不安様行動の改善が見られたという報告が挙げられている<sup>6)</sup>。これらの報告は CGRP が恒常的に発現していないマウスでは不安様行動は観察されなかった今回の研究結果を支持している。

我々は3種類の行動試験を行ったが、不安様行動を評価するテストには明暗探索(Light/dark test) やガラス玉覆い隠し試験(Marble-burying test) など様々な試験がある。明暗探索試験とは、明るい部屋と暗い部屋の2部屋から構成された装置を使用する。測定指標としては、各部屋における動物の探索行動や滞在時間を測定する。装置に入れられたマウスは暗い場所を好み、明るい場所を嫌う習性があるため、明室での探索行動や滞在時間が減少する。この特性を活用して不安様行動の評価を行う<sup>7)</sup>。ガラス玉覆い隠し試験とは、マウスなどの小動物は、恐怖や嫌悪を感じる対象や新奇で奇異な異物に対して埋め隠し行動を示す習性を利用した試験である<sup>7)</sup>。そのほかにも実験的ストレスを負荷、あるいは分子生物学的・薬理学的操作などを施して実験動物に影響を与えることによって作製される条件付け行動による評価を行うための試験として、コンフリクト試験(Conflict test) や文脈的恐怖条件付け試験(Contextual fear conditioning test) がある。コンフリクト試験とは、BZD系の抗不安薬など、多くの薬物に対して信頼性の高い評価が可能である。コンフリクト試験とは、摂餌制限または絶飲条件を加えて飼育したマウスにレバー押し行動を習得させテスト前日に訓練を実施する。一定数のレバー押し行動に対して電撃ショックを与え、マウスを条件付けさせると、レバー押し行動は著しく減少する。このように餌や水を得たいという欲求と電撃ショックという罰に対する不安・恐怖からコンフリクト状態が惹起される。この状況下で薬を投与し、被ショック回数、餌・水の摂取回数およびレバー押し回数を評価指標として測定する。文脈的恐怖条件付け試験とは、一定の環境下で回避不可能な電撃ショックを実験箱の床から負荷する。実験箱に条件付けを行い、再びマウスを同じ実験箱に入れる操作によって引き起こされる心理的ストレス反応を測定することで評価される。この心理的ストレス反応の一つとして、電撃ショックを与えなくても呼吸運動以外の体動を示さない無動状態のまま身体をすくませるといった防御反応としてすくみ行動(Freezing)を示す。Freezingは恐怖や不安の指標とされ、Freezingが多く出現するほど程度は強く、少ないほど弱いと考えられる。Freezing以外にも脱糞やFreezing中の心拍数の増加などが条件恐怖ストレス反応の指標として用いられる。また、コンフリクト試験や文脈的恐怖条件付け試験で

はBZD系の抗不安薬以外にもセロトニン作動性抗不安薬に対して感受性があり、薬物を投与すると不安様行動を改善したという報告が挙げられている<sup>7)</sup>。

今回我々が行った不安様行動試験は、明暗探索試験やガラス玉覆い隠し試験などと同様に罰刺激や学習訓練の実施を必要としない生得的・潜在的な行動による評価を行うための試験となっている。さらに、今回行った試験はいずれにおいてもBZD系の抗不安薬に感受性があり、薬物を投与すると不安様行動を改善したという報告が挙げられている<sup>7)</sup>。本実験の結果は、CGRP KOマウスにおいて、GABA神経系への変化による不安様行動への影響はみられないことを示唆している。しかし前述したように、非ベンゾジアゼピン系薬物に感受性のある他の不安様行動試験を行っておらず、CGRP欠損がセロトニン神経系への影響を及ぼしているかどうかは、未だ不明であり更なる今後の研究が必要である。

本実験の結果より、CGRP KOマウスではOpen field testにおいて中央滞在時間の有意な増加と総移動距離の有意な低下が見られた。さらに、Plus maze testとHole board testにおいて有意な変化が見られなかった。以上のことから、これまでに我々がCGRP脳室内投与による不安様行動の誘発について報告を上げている通り、CGRPが不安様行動の誘発に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

#### 参考文献

- 1) 辻 敬一郎、田島 治:抗不安薬日本臨牀,70,1,pp42-46(2012)
- 2) 白井 孝:薬学図書館, 38,1,pp1-7(1993)
- 3) Lassen LH, Haderslev PA, Jacobsen VB, et al. CGRP may play a causative role in migraine. *Cephalalgia*, 22,pp54-61(2002)
- 4) 第140回 日本薬理学会 近畿部会(2021)
- 5) Schorscher-Petcu A, Austin JS, Mogil JS, Quirion R. Role of central calcitonin gene-related peptide (CGRP) in locomotor and anxiety- and depression-like behaviors in two mouse strains exhibiting a CGRP-dependent difference in thermal pain sensitivity. *J Mol Neurosci*.39,1-2,pp125-136(2009). doi: 10.1007/s12031-009-9201-z. Epub 2009 Apr 18. PMID: 19381879.
- 6) Kim MS, Kim BY, Saghetlians A, Zhang X, Okida T, Kim SY. Anti-nociceptive effects of dual neuropeptide antagonist therapy in mouse model of neuropathic and inflammatory pain. *Korean J Pain*.35,2,pp173182(2022).doi:10.3344/kjp.2022.35.2.173. PMID: 35354680; PMCID: PMC8977203.
- 7) 山口 拓, 吉岡 充弘:不安関連行動の評価法日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.)130,pp105-111(2007)

# Evaluation of anxiety-like behavior in calcitonin gene-related peptide KO mice

Kyoshiro FUJIWARA, Yoshikazu YONEYAMA, Shota INOUE,

Naoya HASHIKAWA, and Narumi HASHIKAWA-HOBARA

*Graduate School of science, Okayama University of science*

*1-1Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan*

(Received September 30, 2022; accepted December 5, 2022)

**Background:** Anxiety is a disorder in which a person becomes afraid of being the center of attention or being embarrassed in front of others and feels intense pain not only when talking to people but also when there are several people around. We previously reported that intracerebroventricular injection of calcitonin gene-related peptide (CGRP) induced anxiety-like behavior in mice. However, the effect of CGRP on anxiety-like behavior in mice lacking constitutive expression is unclear. In this study, we investigated whether CGRP-deficient mice exhibit anxiety-like behavior.

**Methods:** We subjected 12-week-old C57BL/6J mice or CGRP-deficient (KO) mice to an open field test, a plus maze test, and a hole board test to evaluate anxiety-like behavior.

**Results:** There was a significant decrease in the total distance traveled by CGRP KO mice in the open field test, indicating a decrease in the amount of spontaneous activity, compared with WT mice. Furthermore, there was a significant increase in the median residence time in CGRP KO mice. The results of the plus maze test and hole board test showed no significant differences between CGRP KO and WT mice. These findings suggest that anxiety-like behavior is not induced in CGRP KO mice due to decreased spontaneous activity and increased central dwell time.

Keywords: CGRP; CGRP KO; Anxiety; Anxiety-like behavior.