



Title	老化促進マウス Senescence-accelerated mouse prone 6 (SAMP6) の脳高次機能における加齢変化に関する研究
Author(s)	新美, 君枝
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	乙第6685号
Issue Date	2009-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r6685
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39038
Type	doctoral thesis
File Information	niimi_thesis.pdf



老化促進マウス Senescence-accelerated mouse prone 6
(SAMP6) の脳高次機能における加齢変化に関する研究

新美 君枝

目次

緒言	1
第 1 章 包括的行動解析試験を用いた SAMP6 の行動特性の検討	4
序	4
材料と方法	5
1. 動物	5
2. 自発運動活性計測試験	5
3. オープンフィールド試験	6
4. 高架式十字迷路試験	7
5. 明暗箱試験	7
6. ガラス玉覆い隠し試験	8
7. Y 字迷路試験	9
8. 牽引力試験	9
9. ワイヤーぶら下がり試験	10
10. 回転棒試験	11
11. 尾懸垂試験	11
12. 統計学的処理	12
結果	12
1. 自発運動活性計測試験	12
2. オープンフィールド試験	15
3. 高架式十字迷路試験	16
4. 明暗箱試験	18
5. ガラス玉覆い隠し試験	19
6. Y 字迷路試験	20
7. 牽引力試験	21
8. ワイヤーぶら下がり試験	22
9. 回転棒試験	23
10. 尾懸垂試験	25
考察	25
小括	31
第 2 章 SAMP6 で認められた高運動活性、低不安、短期記憶増加、運動協調性	

異常、および抗鬱に関わるモノアミンシステムの検討	33
序	33
材料と方法	34
1. 動物	34
2. 化合物	34
3. ウェスタンブロット解析	34
1) チロシン水酸化酵素およびトリプトファン水酸化酵素の発現量比較	34
2) ドーパミン受容体 1、2、3、およびドーパミントランスポーターの発現量比較	34
4. モノアミンおよびその代謝物濃度の計測	35
5. ドーパミン受容体 1 アゴニスト SKF82958 投与後運動活性計測試験	35
6. 統計学的処理	36
7. 組織学的検査	36
結果	36
1. ウェスタンブロット解析	36
1) チロシン水酸化酵素およびトリプトファン水酸化酵素の発現量比較	36
2) ドーパミン受容体 1、2、3、およびドーパミントランスポーターの発現量比較	37
2. モノアミンおよびその代謝物濃度の計測	39
3. SKF82958 投与後運動活性計測試験	39
4. 組織学的所見	41
考察	42
小括	47
第 3 章 SAMP6 で認められた短期記憶増加に関わる NMDA 型グルタミン酸受容体シグナルカスケードの検討	49
序	49
材料と方法	50
1. 動物	50
2. 化合物	50

3. NMDA 型グルタミン酸受容体アンタゴニスト CPP 投与後運動活性計 測試験	50
4. Y 字迷路試験	50
5. 新奇物体認識試験	51
6. ウェスタンブロット解析による NMDA 型グルタミン酸受容体の発現 量比較	52
7. 統計学的処理	52
結果	52
1. CPP 投与後運動活性計測試験	52
2. Y 字迷路試験	53
3. 新奇物体認識試験	55
4. ウェスタンブロット解析による NMDA 型グルタミン酸受容体の発現 量比較	56
考察	57
小括	59
総括	60
謝辞	63
参考文献	64
Summary	78

略語表

CPP : (±)-3-(2-carboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-phosphonic acid

D1 : ドーパミン受容体 1

D2 : ドーパミン受容体 2

D3 : ドーパミン受容体 3

DAT : ドーパミントランスポーター

NMDA 型グルタミン酸受容体 : *N*-methyl-D-aspartate 型グルタミン酸受容体

SAMP6 : Senescence-accelerated mouse prone 6

SAMR1 : Senescence-accelerated mouse resistant 1

SKF82958 : 6-chloro-7,8-dihydroxy-3-allyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1-phenyl-1H
-3-benzazepine hydrobromide

緒言

動物は生後成熟期を迎えた後、加齢に伴い、免疫機能、認知機能、筋力および運動能力などの生体機能が衰退する。近年我が国は、先進 7 ヶ国の中で最も急速に長寿化が進行し (Tuljapurkar et al., 2000)、今や高齢化率が 21%を超える超高齢社会に突入している。このため、健康寿命の延長や Quality of Life (QOL) 向上の観点から、加齢に伴って発症率が増加する、がん、アルツハイマー病やパーキンソン病、脳梗塞などによる脳機能障害、骨粗鬆症などの疾病の発症機序の解明、予防や治療法の開発などを目的とする加齢研究の必要性が増している。

加齢による機能障害への対処法に関する研究には、個体レベルはもちろんのこと、細胞・分子レベルの研究材料としてもモデル動物の利用が不可欠である。特に中枢神経系領域においては、その機能は複雑な神経回路ネットワークによって支えられているため、動物の利用が必須である。モデル動物の中でマウスは、寿命が 2 年程度であること、全ゲノム配列決定によりヒト遺伝子との関連が明らかになってきていること、などの理由から中心的役割を果たしている。

老化促進マウス (Senescence-accelerated mouse ; SAM) は、京都大学結核胸部疾患研究所病理学部門 (現京都大学再生医科学研究所) で維持繁殖されていた AKR/J より見出された白内障などの老化徴候や短寿命を指標に系統確立された自然発症老化モデルマウスである。SAM は、早期から老化徴候を示す促進老化を特徴とする SAMP (Senescence-accelerated mouse prone) と正常な老化を示す SAMR (Senescence-accelerated mouse resistant) の 2 群よりなる (Takeda et al., 1997)。SAMP には系統に特徴的な促進老化を示す 9 つの系統 (SAMP1 ~ SAMP11) があり (表 1)、50%の個体が死亡する 50%生存日数は平均で 291 日 (凡そ 10 ヶ月齢) である。一方 SAMR1 の 50%生存日数は 568 日 (凡そ 19 ヶ月齢) であり、SAMP のコントロールマウスとして用いられている (Chen et al., 2007、Miyamoto, 1994、Sanchez-Barcelo et al., 1997、Shimano, 1998)。加齢研究において、SAMP は同じ遺伝的背景を持った SAMR1 と比較して促進老化を示すため、寿命に至るまでの加齢変化を短期間で評価することが可能であり、その原因メカニズムの解析に用いられるのみならず、予防・治療法開発のための病態モデル動物としても幅広く用いられている。

表 1. SAM マウスの特徴

SAMP1	免疫機能不全、腎萎縮、聴覚障害、老年性肺過膨張
SAMP2	免疫機能不全、腎萎縮
SAMP3	顎関節の変形性骨関節症
SAMP6	骨粗鬆症、大腸炎
SAMP7	胸腺腫
SAMP8	学習・記憶障害、免疫機能不全、概日リズムの異常、情動障害
SAMP9	白内障
SAMP10	脳萎縮を伴う学習・記憶障害、情動障害
SAMP11	腎萎縮
SAMR1	正常老化

加齢に伴う中枢神経系疾患の発症メカニズムの解明などを目的とした研究において、SAMP8 および SAMP10 は、加齢に依存して学習記憶障害（Chen et al., 2004、Flood & Morley, 1998、Numata et al., 2002、Okuma et al., 2000、Shimada et al., 1993、Shimada, 1999）や情動障害（Chida et al., 2006、Miyamoto et al., 1986、Miyamoto et al., 1992、Miyamoto, 1997）を示すモデル動物として広く用いられている。SAMP6 は 4 ヶ月齢以降の骨量が加齢に伴って減少することから、骨粗鬆症モデル動物として利用されている（Matsushita et al., 1986）が、老化の指標として用いられている S100 β の発現量が、脳内で加齢に伴い増加していることが報告され（Griffin et al., 1998）中枢神経系領域における老化モデル動物としての可能性が注目されている。

中枢神経系の変化を検出するための手段の 1 つとして、動物の行動変化を評価する行動解析試験があり、脳高次機能の研究において幅広く用いられている。動物の行動試験によって得られたデータの解析を行うにあたり、混合要因を把握しておく必要がある。例えば、記憶学習試験として汎用されている水迷路試験の場合、本能行動である水泳能力に問題が無いこと予め確認しておくことが必須である。このような理由から、行動を通して中枢神経系の活動を理解しようとする際には、1 つの行動のみを追って結論を導き出すのではなく、運動活性、筋力、睡眠やリズム、情動、記憶、などさまざまな行動領域を解析する行動解析試験を組み合わせる包括的行動解析試験を行ない、その動物の行動特性全体を浮き彫りにした後に、詳細に行動特性を考察することが必要である。

動物が示す行動変化が明らかになった後、関連メカニズムを解析する手段として、候補分子の発現量比較や組織内の含有量比較などの分子生物学的手法や生化学的手法に加えて、作用点（ターゲットとなる分子）が明らかな化合物を投与し、その化合物への感受性の違いによって行動変化に関わるメカニズムを解析する薬理学的手法がある。

本研究では、SAMP6 の 50%生存日数が 8 ヶ月であることを考慮し、1 ヶ月齢を若齢期、4～6 ヶ月齢を成熟期、8～12 ヶ月齢を老齢期として、それぞれのライフステージにおける SAMP6 の包括的行動解析試験を行い、加齢に伴う行動特性の変化を把握（第 1 章）した後、認められた行動特性に関わる分子メカニズムを、生化学的手法および薬理学的手法を用いて検討（第 2 章および第 3 章）し、考察を行った。

本研究で行った動物実験は全て、理化学研究所和光研究所動物実験審査委員会で審議され、和光研究所長の承認の下に実施した。なお、本論文の大部分は既に公表済み（Niimi et al., 2008a, Niimi et al., 2008b, Niimi et al., 2009）あるいは印刷中（Niimi et al., 2008c）である。

第1章 包括的行動解析試験を用いた SAMP6 の行動特性の検討

序

動物の行動は、複雑な神経回路の機能によって制御されているため、1つの行動解析試験だけでは行動変化が検出できない、または誤った結論を導き出してしまふことがある。このため、複数の行動解析試験を組み合わせ、その動物の行動特性の全体像を把握した後に、個々の行動特性を評価することが重要である。創薬研究における候補化合物の *in vivo* スクリーニングやエチルニトロソウレア (ENU) ミュータジェネシスにおける変異体マウスのスクリーニングにおいて、運動活性、不安や鬱などの情動、記憶、運動協調性を評価する行動解析試験を複数組み合わせた包括的行動解析試験が標準プロトコールとして実施されている。本章では、SAMR1 と比較して SAMP6 がどのような行動特性を持つのかを検討するため、包括的行動解析試験を行った。行動解析試験の実施順については、強いストレスがその後の行動解析試験の結果に影響を与える可能性を考慮して、マウスへのストレス負荷の少ない試験を前半に、試験期間が比較的長期に渡る試験やストレス負荷の多い試験は後半に配置した。本章では、運動活性測定のための自発運動活性計測試験およびオープンフィールド試験、不安状態を評価する高架式十字迷路試験、明暗箱試験、およびガラス玉覆い隠し試験、記憶を評価する Y 字迷路試験、運動機能を評価する牽引力試験、ワイヤーぶら下がり試験、および回転棒試験、鬱状態を評価する尾懸垂試験の順番で実施した。異常が認められた項目については、別群のマウスを用いて再現性を確認した。

SAMP6 を含む SAMP 系統は正常な成長過程の後、被毛粗雑、脱毛、眼周囲病変、皮膚病変などの老化特性が現れる促進老化の性質を有し (Okuma & Nomura, 1998、竹田, 1996)。その中でも、SAMP6 は4ヶ月齢をピークに以降骨密度の低下を示す老年性骨粗鬆症のモデル動物である (Jilka et al., 1996、Kasai et al., 2004)。このことから、1ヶ月齢 (若齢期)、4~6ヶ月齢 (成熟期)、8~12ヶ月齢 (老齢期) の SAMP6 および SAMR1 を用いて加齢に伴う行動特性の変化について検討した。また、行動解析の基本構成要素である運動活性については、SAM マウスのオリジナル系統である AKR/J も加えて検討を行った。

材料と方法

1. 動物

日本 SLC より購入した 1～12 ヶ月齢の雄の AKR/J、SAMR1 および SAMP6 を用いた。導入後、マウスは 12 時間ごとの明暗周期の照明下（8:00 点灯、20:00 消灯）で、マイクロアイソレーションケージ内で 1 週間以上個別飼育し、飼育環境へ馴化させた後にマウス系統を伏せて実験に使用した。自発運動活性計測試験以外の全ての行動解析実験は 10:00 から 16:00 の時間帯に実施した。

2. 自発運動活性計測試験

6 および 12 ヶ月齢の AKR/J、SAMR1 および SAMP6 をそれぞれ 10 匹ずつ使用した（図 1）。運動活性計測用ケージ内にマウスを入れ、運動活性計測センサー（LOCOMO LS-5、メルクエスト、富山、日本）（図 2）を横切った回数を 30 分間ごとに積算し、比較した。計測は午後 6 時 30 分に開始し、72 時間計測した。

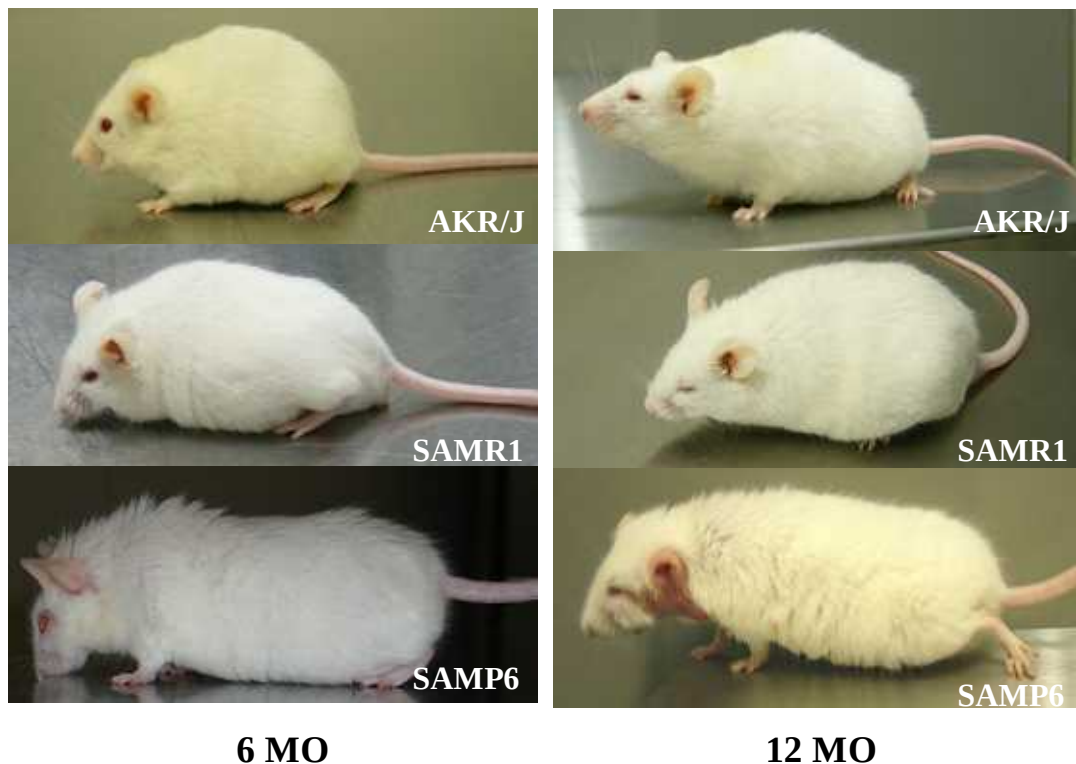


図 1. 6 および 12 ヶ月齢の AKR/J、SAMR1、SAMP6 の外観的特徴



図 2. 自発運動活性測定装置

3. オープンフィールド試験

1、4、8 ヶ月齢の SAMR1 および SAMP6 をそれぞれ 12、10、10 匹ずつ使用した。マウスをオープンフィールド装置 (60 (幅) × 60 (奥行) × 50 (高さ) cm、Image OF4、小原産業、東京、日本) (図 3) の中に入れ、70 lux の照明下で 5 分ごとの総移動距離を 25 分間計測した。



図 3. オープンフィールド試験装置

4. 高架式十字迷路試験

1、4、8ヶ月齢の SAMR1 および SAMP6 をそれぞれ 12、16、12 匹ずつ使用した。マウスを壁のないアーム（5（幅）×30（長さ）cm）2 本と壁のあるアーム（5（幅）×30（長さ）×15（高さ）cm）2 本が中央部のプラットフォーム（5（幅）×5（奥行）cm）から四方向へ分岐した地上 45cm の高さの装置（図 4）内の、壁のないアーム上に、頭を中央部のプラットフォームに向けて置き、15～20 lux の照明下で、アームへの総進入回数、壁のないアームへの進入回数および壁のないアーム上での滞在時間を 10 分間計測した。



図 4. 高架式十字迷路試験装置

5. 明暗箱試験

1、4、8ヶ月齢の SAMR1 および SAMP6 をそれぞれ 11、10、10 匹ずつ使用した。マウスを暗いトンネル（7（幅）×10（奥行）×4.5（高さ）cm）によって連結された明箱（20（幅）×15（奥行）×20（高さ）cm、100 lux）と暗箱（10（幅）×15（奥行）×20（高さ）cm、5 lux）からなる装置（図 5）内へ入れ、箱間の総移動回数および明箱内の滞在時間を 10 分間計測した。



図 5. 明暗箱試験装置

6. ガラス玉覆い隠し試験

1、4、8 ヶ月齢の SAMR1 および SAMP6 をそれぞれ 12、10、10 匹ずつ使用した。5cm の厚さにおがくずを入れ、25 個のガラス玉（直径 2.5cm）を並べた箱（30（幅）×30（奥行）×30（高さ）cm）（図 6）の中にマウスを入れ、2/3 以上おがくずで覆い隠されたガラス玉の数と、覆い隠し行動の時間を 25 分間計測した。



図 6. ガラス玉覆い隠し試験装置

7. Y字迷路試験

1、4、8ヶ月齢の SAMR1 および SAMP6 をそれぞれ 12、9、8 匹ずつ使用した。3 (幅) × 40 (奥行) × 25 (高さ) cm のアームがそれぞれ 120° の角度で連結した Y 字型の装置 (図 7) 内にマウスを入れ、10 分間装置内を自由に探索させた。実験は 35lux の照明下で実施した。3 本の足がアームに入った状態をアーム進入と定義し、そのアーム進入の順序を記録した。連続して異なる 3 本のアームを選択した回数を交替行動回数とし、 $\text{交替行動回数} / (\text{総移動回数} \cdot 2) \times 100$ の計算式により自発的交替行動率を求め、短期記憶の指標とした。



図 7. Y字迷路試験装置

8. 牽引力試験

1、4、8ヶ月齢の SAMR1 をそれぞれ 10、8、8 匹ずつ、1、4、8ヶ月齢の SAMP6 をそれぞれ 8 匹ずつ使用した。牽引力測定器 (小原産業) (図 8) にマウスを前肢で捕まらせた後、尾を持ってゆっくりと後ろに引き、マウスが前肢を離れた時の数値を牽引力の指標とした。

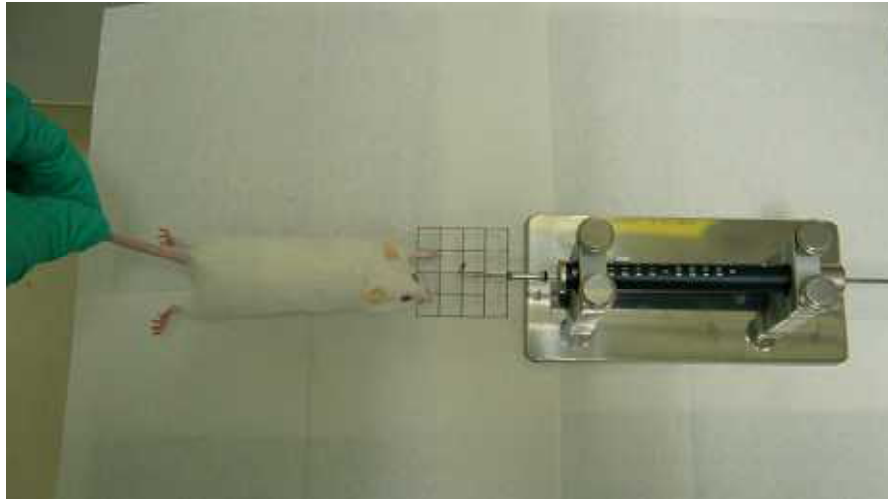


図 8. 牽引力試験装置

9. ワイヤーぶら下がり試験

1、4、8 ヶ月齢の SAMR1 および SAMP6 をそれぞれ 10 匹ずつ使用した。地上 37cm の高さに張った直径 1.2mm のワイヤー（図 9）にマウスを前肢だけで捕まらせ、30 秒間で落下するまでの時間の計測し、マウスの行動を次のようなスコアで評価した。0：落下、1：両前肢でワイヤーに捕まる、2：両前肢でワイヤーに捕まり、ワイヤーによじ上ろうとする、3：両前肢でワイヤーに捕まり、片方もしくは両方の後脚をワイヤー近辺まで持ち上げる、4：四肢でワイヤーに捕まり、尾をワイヤーに巻きつける、5：四肢でワイヤーに捕まり、尾をワイヤーに巻きつけワイヤーを伝って脱出する。



図 9. ワイヤーぶら下がり試験装置

10. 回転棒試験

1、4、8 ヶ月齢の SAMR1 および SAMP6 をそれぞれ 10 匹ずつ使用した。マウスを装置 (Ugo Basile RotaRod Treadmills Model 7650、UGO BASILE S.R.L.、Comerio、イタリア)(図 10) の静止した棒に乗せ、マウスが棒の上に乗っていた時間を 120 秒を上限として計測した。同じ試験を 3 回繰り返した。3rpm の速度においても同様に実施した。各試験は 20 分の間隔で行った。次に、3rpm から 30rpm まで一定の割合で加速する棒にマウスに乗せ、マウスが棒の上に乗っていた時間を 420 秒を上限として計測した。同じ試験を 1 日に 3 回繰り返し、5 日間連続して実施した。各試験は 1 時間の間隔で行った。



図 10. 回転棒試験装置

11. 尾懸垂試験

1、4、8 ヶ月齢の SAMR1 をそれぞれ 9、8、8 匹、1、4、8 ヶ月齢の SAMP6 をそれぞれ 10、8、8 匹ずつ使用した。地上 21cm の高さに 4cm のフックを取り付けた箱 (15 (幅) × 16 (奥行) × 25 (高さ) cm)(図 11) に、先端から 2cm の部位に粘着テープを貼ったマウスを 8 分間つり下げ、2~7 分の不動化時間を計測した。



図 11. 尾懸垂試験装置

12. 統計学的処理

データは平均値 ± 標準誤差で表す。統計解析ソフトは Excel Statistics 2006 (SSRI、東京、日本) を用いた。データは Student の t 検定もしくは one-、two-、および three-way ANOVA で有意差検定を行い、Bonferroni 補正法もしくは Tukey 多重比較法により群間の比較を行った。

結果

1. 自発運動活性計測試験

AKR/J、SAMR1、および SAMP6 の 6 および 12 ヶ月齢において、72 時間の計測期間全体を通じて明らかなサーカディアンリズムの乱れは認められなかった (図 12)。また、全ての個体群において、照明点灯時 (午前 8 時) および消灯時 (午後 8 時) に一過性の高運動活性が認められた (図 12)。1 日目および 3 日目の 24 時間積算カウント数において、月齢効果 ($F(1, 108) = 105.94, P < 0.001$)、日効果 ($F(1, 108) = 63.03, P < 0.001$)、および系統 × 月齢交互作用 ($F(2, 108) = 25.63, P < 0.001$) が認められた。1 日目 (図 13A) および 3 日目 (図 13B) の両方において、全ての系統で 6 ヶ月齢の個体に比べて 12 ヶ月齢の個体のカウント数が有意に減少していた (1 日目および 3 日目ともに AKR/J; $P < 0.05$ 、SAMR1; $P < 0.05$ 、SAMP6; $P < 0.01$ 、Tukey 多重比較法)。また、1 日目 (図 13A) および 3 日目 (図 13B) の両方において、6 ヶ月齢の SAMP6 は同月齢の AKR/J および SAMR1 に比べて有意にカウント数が多かった (1 日目および 3 日目ともに AKR/J versus SAMP6; $P < 0.05$ 、SAMR1 versus SAMP6; $P < 0.05$ 、Tukey 多重比較法)。

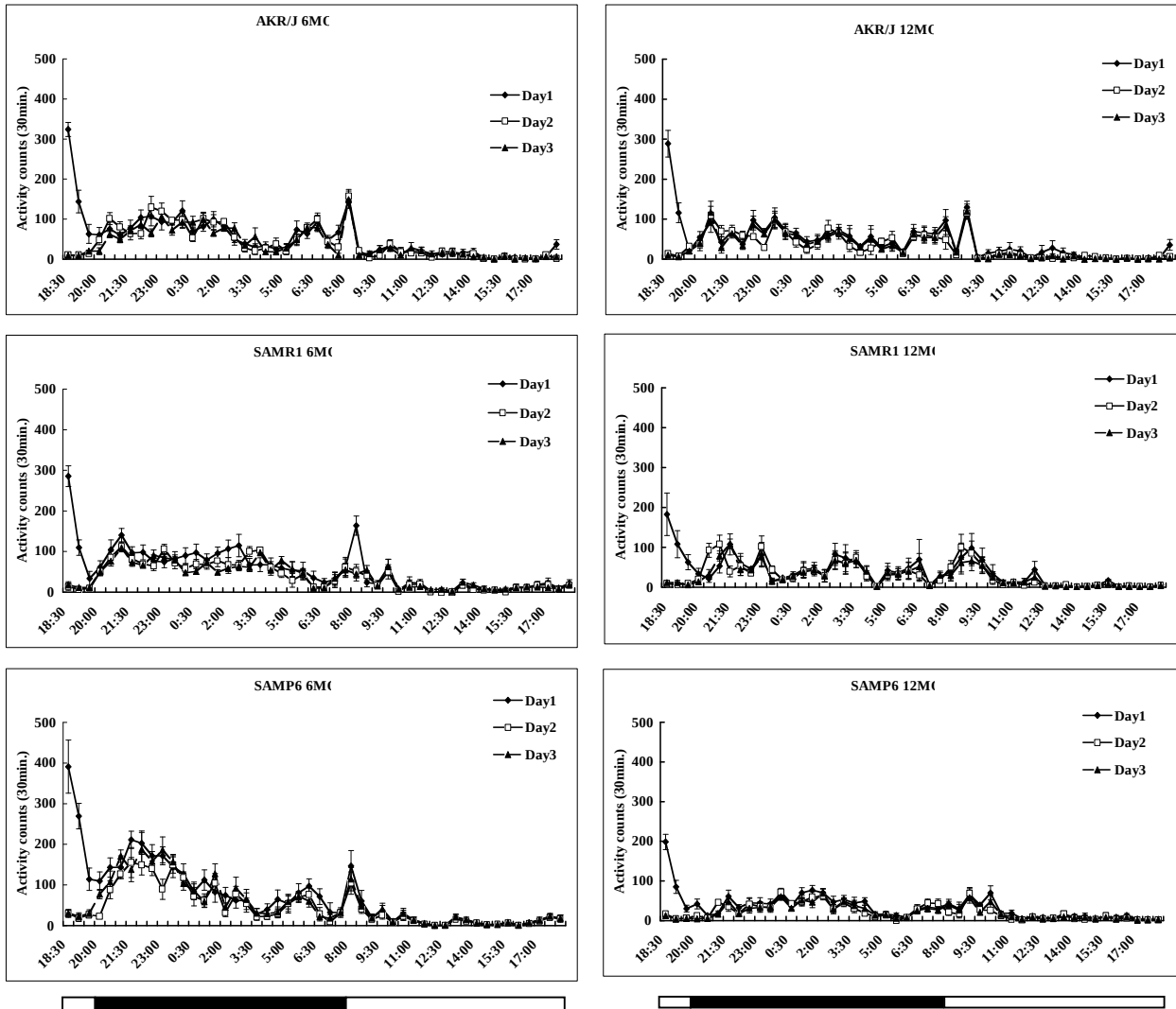
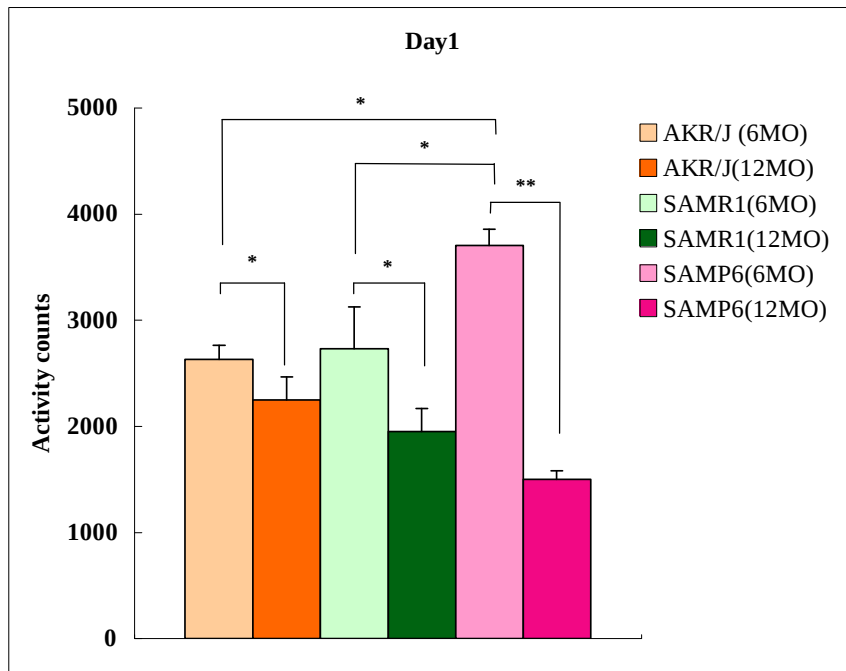


図 12. 自発運動活性計測試験

6 および 12 ヶ月齢の AKR/J、SAMR1 および SAMP6 をそれぞれ 10 匹ずつ使用した。3 日間の運動活性を 30 分ごとに示す。図下の明暗の線はそれぞれ明期（8:00-20:00）および暗期間（20:00-8:00）を表す。データは平均値 ± 標準誤差で示した。

A



B

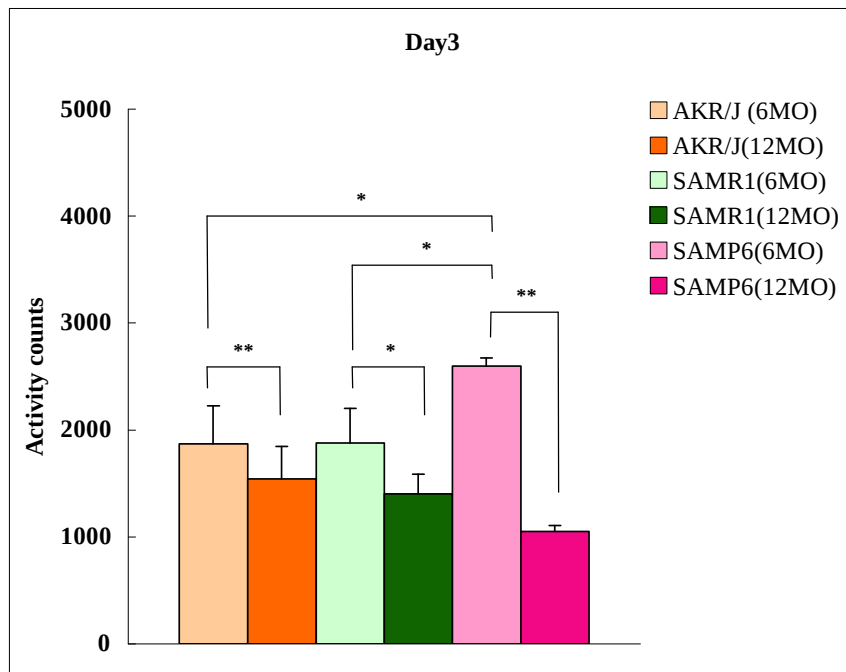


図 13. 自発運動活性計測試験における 24 時間ごとの総運動活性

6 および 12 ヶ月齢の AKR/J、SAMR1 および SAMP6 をそれぞれ 10 匹ずつ使用した。

(A) 1 日目の総運動活性。(B) 3 日目の総運動活性。データは平均値 ± 標準誤差で示した。*; $P < 0.05$ 、**; $P < 0.01$

2. オープンフィールド試験

1、4、8ヶ月の全ての月齢において、25分間の計測期間を通じて SAMR1 に比べて SAMP6 の移動距離が多かった(系統効果: 1ヶ月齢: $F(1, 118)=6.49$, $P=0.012$ 、4ヶ月齢: $F(1, 73)=37.71$, $P<0.001$ 、8ヶ月齢: $F(1, 98)=16.38$, $P<0.001$)(図 14A)、また、SAMP6 の総移動距離は 1ヶ月齢に比べて 4、および 8ヶ月齢で有意に高かった(月齢効果: $F(2, 37)=22.63$, $P<0.001$ 、1ヶ月齢 versus 4ヶ月齢: $P<0.05$ 、1ヶ月齢 versus 8ヶ月齢: $P<0.05$ 、Bonferroni 補正法)(図 14B)。

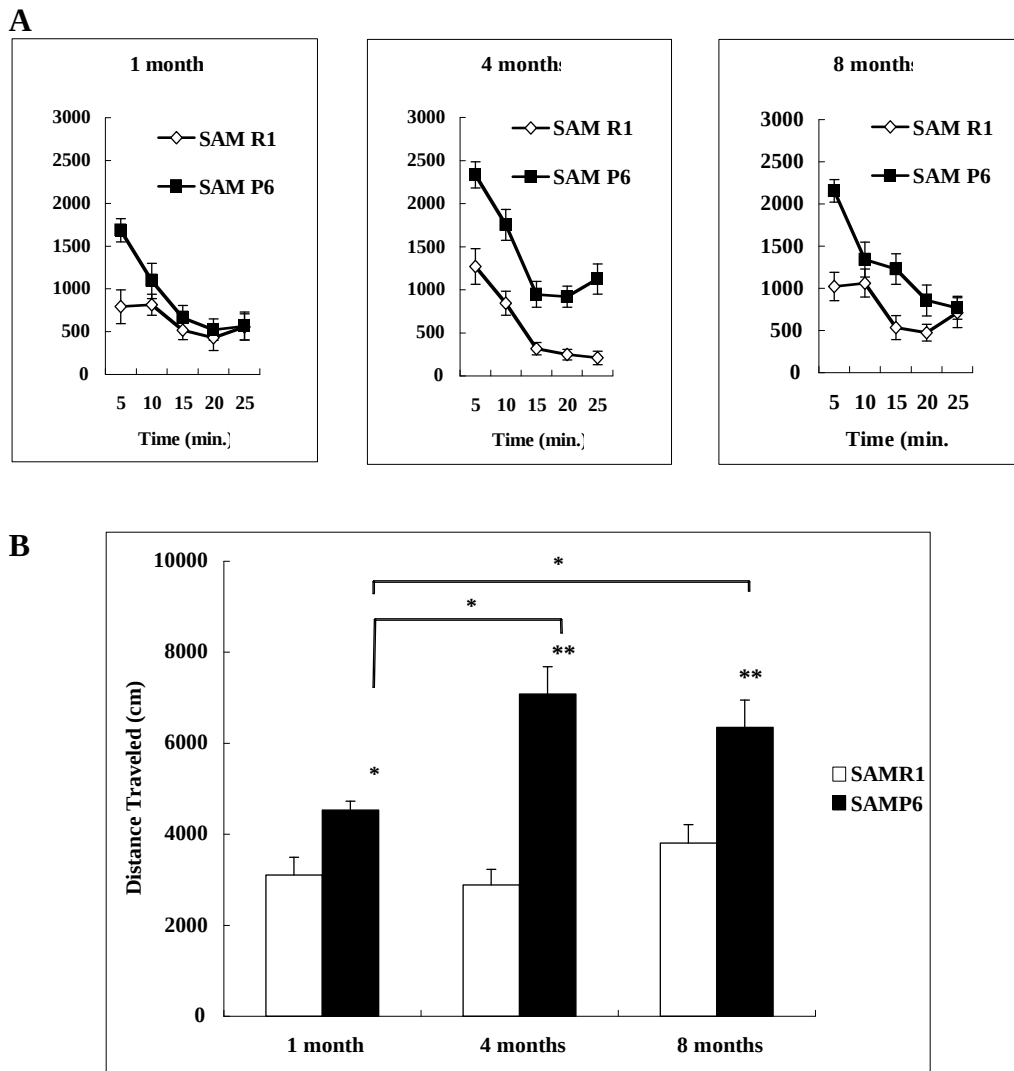


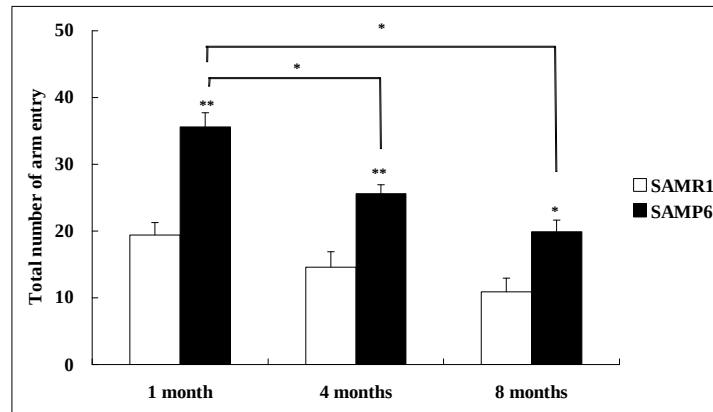
図 14. オープンフィールド試験

1、4、8ヶ月齢の SAMR1 および SAMP6 をそれぞれ 12、10、10 匹ずつ使用した。(A) 5 分ごとの移動距離の推移。(B) 25 分間の総移動距離。データは平均値 ± 標準誤差で示した。*: $P<0.01$ 、*: $P<0.05$

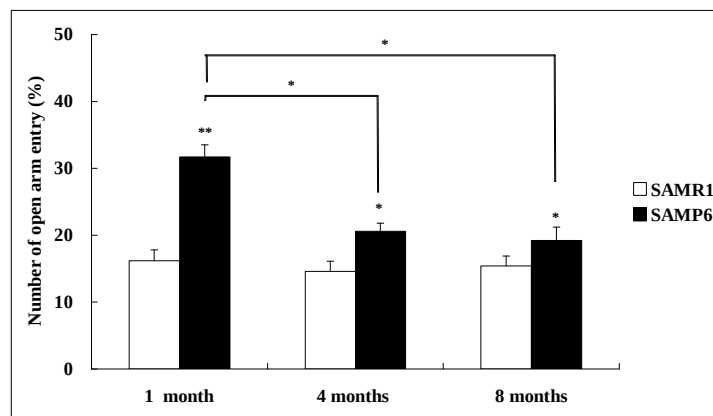
3. 高架式十字迷路試験

1、4、8 ヶ月の全ての月齢において、SAMR1 に比べて SAMP6 のアームへの総進入回数が有意に多かった (系統効果: 1 ヶ月齢; $F(1, 22) = 61.44$, $P < 0.001$ 、4 ヶ月齢; $F(1, 30) = 12.65$, $P = 0.001$ 、8 ヶ月齢; $F(1, 22) = 5.19$, $P = 0.033$)。また、SAMP6 のアームへの総進入回数は加齢によって減少した (月齢効果; $F(2, 37) = 22.63$, $P < 0.001$) (1 ヶ月齢 versus 4 ヶ月齢; $P < 0.05$ 、1 ヶ月齢 versus 8 ヶ月齢; $P < 0.05$ 、Bonferroni 補正法) (図 15A)。全ての月齢において、SAMR1 に比べて SAMP6 の壁のないアームへの進入回数は有意に多かった (系統効果: 1 ヶ月齢; $F(1, 22) = 39.99$, $P < 0.001$ 、4 ヶ月齢; $F(1, 30) = 4.19$, $P = 0.048$ 、8 ヶ月齢; $F(1, 22) = 4.40$, $P = 0.048$) (図 15A)。また、SAMP6 の壁のないアームへの進入回数は加齢によって減少した (月齢効果: $F(2, 37) = 8.61$, $P < 0.001$ 、1 ヶ月齢 versus 4 ヶ月齢; $P < 0.05$ 、1 ヶ月齢 versus 8 ヶ月齢; $P < 0.05$ 、Bonferroni 補正法) (図 15B)。全ての月齢において、SAMR1 に比べて SAMP6 の壁のないアーム上での滞在時間は有意に長かった (系統効果: 1 ヶ月齢; $F(1, 22) = 52.82$, $P < 0.001$ 、4 ヶ月齢; $F(1, 30) = 4.88$, $P = 0.035$ 、8 ヶ月齢; $F(1, 22) = 12.44$, $P = 0.002$) (図 15C)。また、SAMP6 の壁のないアーム上での滞在時間は加齢によって減少した (月齢効果: $F(2, 37) = 26.39$, $P = 0.033$ 、1 ヶ月齢 versus 4 ヶ月齢; $P < 0.05$ 、4 ヶ月齢 versus 8 ヶ月齢; $P < 0.05$ 、1 ヶ月齢 versus 8 ヶ月齢; $P < 0.05$) (図 15C)。

A



B



C

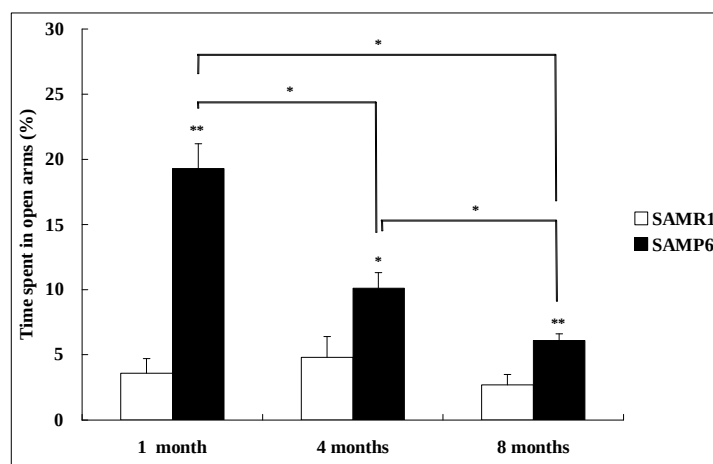


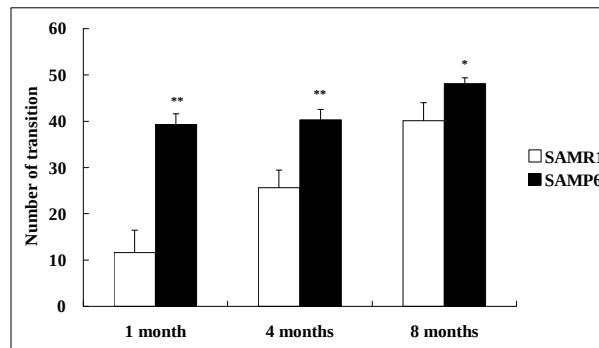
図 15. 高架式十字迷路試験

1、4、8 ヶ月齢の SAMR1 および SAMP6 をそれぞれ 12、16、12 匹ずつ使用した。(A) アームの総進入回数。(B) 壁のないアームへの進入回数。アームの総進入回数に対する比率(%)で示す。(C) 壁のないアーム上での滞在時間。試験時間に対する比率(%)で示す。データは平均値 ± 標準誤差で示した。**: P<0.01、*: P<0.05

4. 明暗箱試験

1、4、8ヶ月の全ての月齢において、SAMR1 に比べて SAMP6 の箱間の移動回数が有意に多かった（系統効果: 1ヶ月齢; $F(1, 20) = 26.46$, $P < 0.001$ 、4ヶ月齢; $F(1, 18) = 8.83$, $P = 0.008$ 、8ヶ月齢; $F(1, 18) = 7.81$, $P = 0.048$ ）（図 16A）。また、SAMR1 および SAMP6 の箱間の移動回数は加齢によって増加した（SAMR1: 月齢効果; $F(2, 28) = 10.67$, $P < 0.001$ 、1ヶ月齢 versus 8ヶ月齢; $P < 0.05$ 、Bonferroni 補正法）（SAMP6: 月齢効果; $F(2, 28) = 5.05$, $P = 0.013$ 、4ヶ月齢 versus 8ヶ月齢; $P < 0.05$ 、1ヶ月齢 versus 8ヶ月齢; $P < 0.05$ 、Bonferroni 補正法）（図 16A）。全ての月齢において、SAMR1 に比べて SAMP6 の明箱内の滞在時間は有意に長かった SAMR1（系統効果: 1ヶ月齢; $F(1, 20) = 90.49$, $P < 0.001$ 、4ヶ月齢; $F(1, 18) = 31.41$, $P < 0.001$ 、8ヶ月齢; $F(1, 18) = 53.54$, $P < 0.001$ ）（図 16B）。

A



B

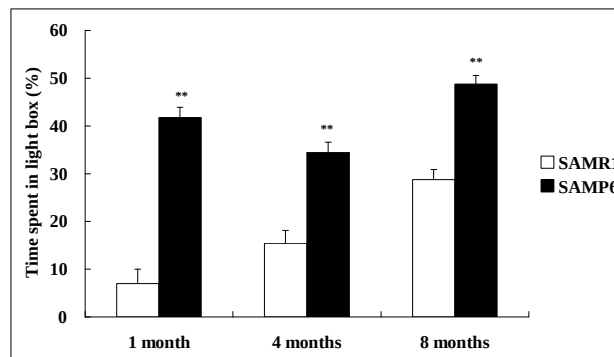


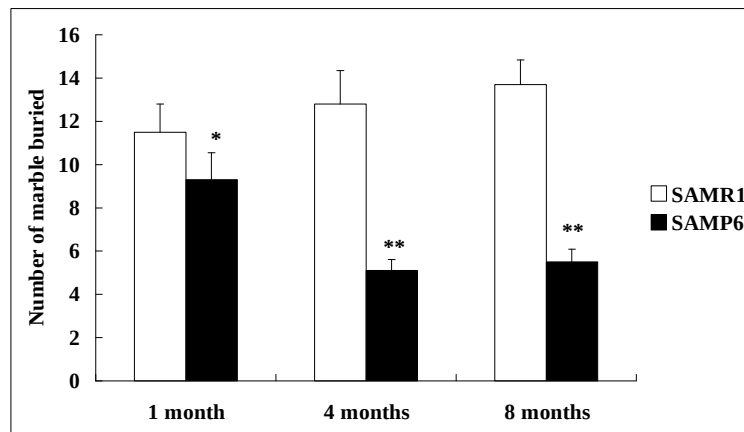
図 16. 明暗箱試験

1、4、8ヶ月齢の SAMR1 および SAMP6 をそれぞれ 11、10、10 匹ずつ使用した。（A）箱間の総移動回数。（B）明箱内の滞在時間。試験時間に対する比率（%）で示す。データは平均値 ± 標準誤差で示した。**: $P < 0.01$ 、*: $P < 0.05$

5. ガラス玉覆い隠し試験

1、4、8 ヶ月の全ての月齢において、SAMR1 に比べて SAMP6 が覆い隠したガラス玉の数は有意に少なかった（系統効果: 1 ヶ月齢; $F(1, 20) = 5.24$, $P = 0.033$ 、4 ヶ月齢; $F(1, 18) = 22.56$, $P < 0.001$ 、8 ヶ月齢; $F(1, 18) = 41.28$, $P < 0.001$ ）（図 17A）。また、全ての月齢において、SAMR1 に比べて SAMP6 のガラス玉覆い隠し行動の時間が有意に減少していた（系統効果: 1 ヶ月齢; $F(1, 20) = 5.08$, $P = 0.036$ 、4 ヶ月齢; $F(1, 18) = 20.53$, $P < 0.001$ 、8 ヶ月齢; $F(1, 18) = 25.65$, $P < 0.001$ ）（図 17B）。

A



B

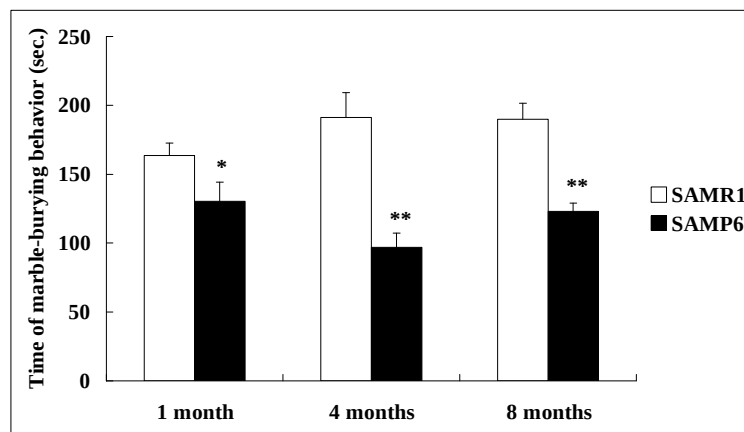


図 17. ガラス玉覆い隠し試験

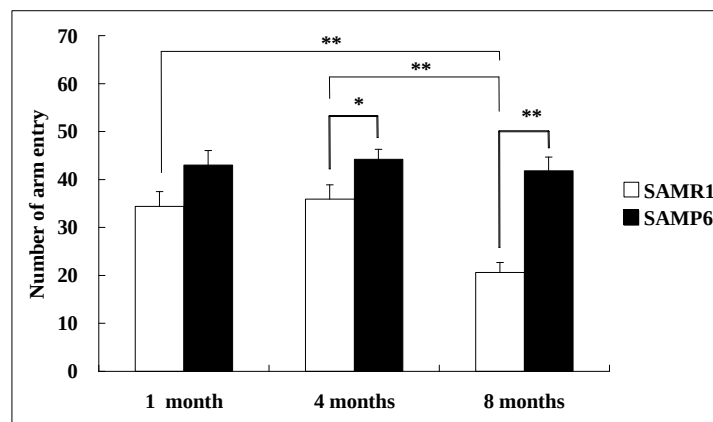
1、4、8 ヶ月齢の SAMR1 および SAMP6 をそれぞれ 12、10、10 匹ずつ使用した。（A）覆い隠されたガラス玉数。（B）ガラス玉覆い隠し行動の時間。データは平均値 ± 標準誤差で示した。

**; $P < 0.01$, *; $P < 0.05$

6. Y 字迷路試験

4 および 8 ヶ月齢の SAMP6 はそれぞれ同じ月齢の SAMR1 に比べて有意にアームの進入回数が多かった(4 ヶ月齢; $F(1, 16) = 5.46, P = 0.033$ 、8 ヶ月齢; $F(1, 14) = 35.63, P < 0.001$)(図 18A)。また、8 ヶ月齢の SAMR1 のアーム進入回数は 1 および 4 ヶ月齢の SAMR1 に比べて有意に少なかった($F(2, 52) = 4.10, P = 0.022$ 、1 ヶ月齢 versus 8 ヶ月齢; $P < 0.01$ 、4 ヶ月齢 versus 8 ヶ月齢; $P < 0.01$ 、Bonferroni 補正法)(図 18A)。4 および 8 ヶ月齢の SAMP6 の自発的交替行動率は、それぞれ同じ月齢の SAMR1 に比べて有意に高かった(4 ヶ月齢; $F(1, 16) = 7.54, P = 0.014$ 、8 ヶ月齢; $F(1, 14) = 5.09, P = 0.041$)(図 18B)。どちらの系統においても、自発的交替行動率に月齢依存的な変化は認められなかった。

A



B

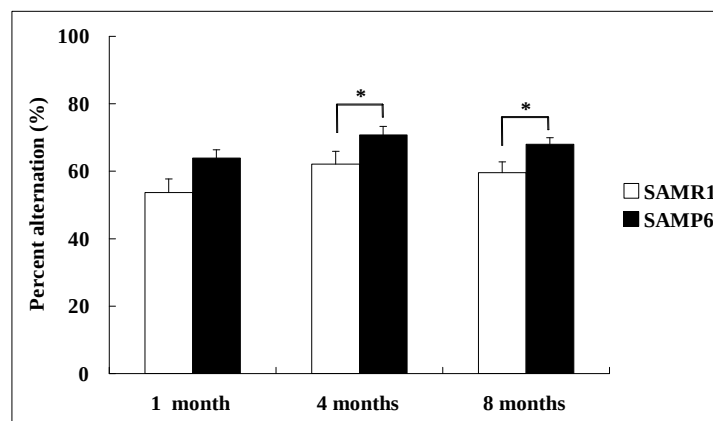


図 18. Y 字迷路試験

1、4、8 ヶ月齢の SAMR1 および SAMP6 をそれぞれ 12、9、8 匹ずつ使用した。(A) アームの総進入回数。(B) 自発的交替行動率。データは平均値 ± 標準誤差で示した。**: $P < 0.01$ 、*: $P < 0.05$

7. 牽引力試験

牽引力について、月齢効果 ($F(2, 44) = 57.18, P < 0.001$) は認められたが、系統効果 ($F(1, 44) = 0.01, P = 0.940$) および系統 $\times$ 月齢交互作用 ($F(2, 44) = 0.46, P = 0.632$) は認められなかった (図 19)。

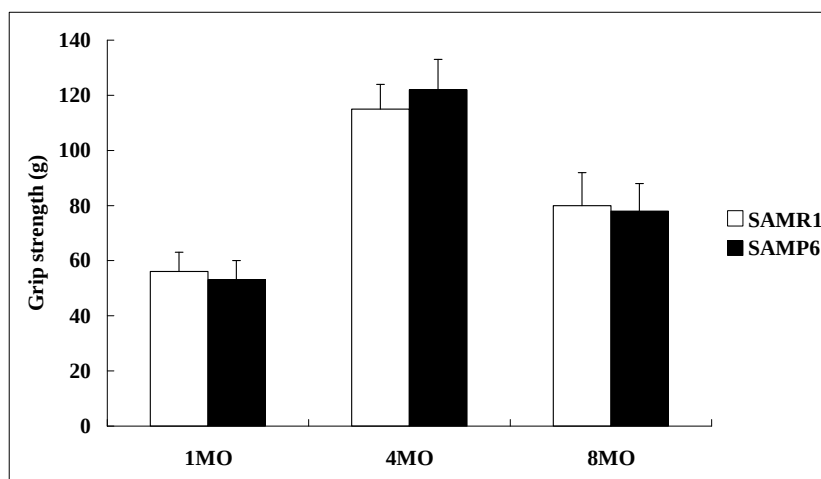


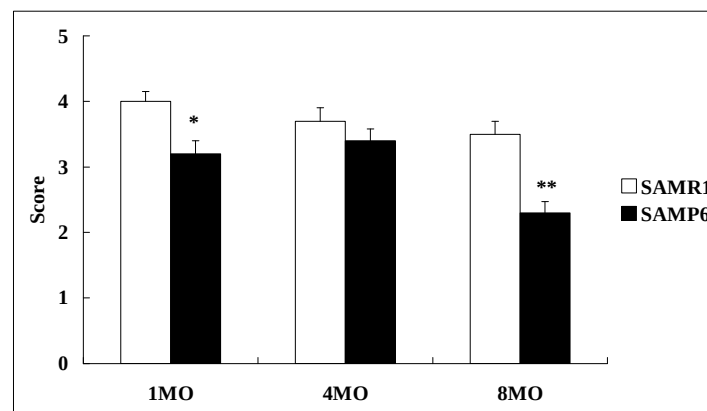
図 19. 牽引力試験

1、4、8ヶ月齢の SAMR1 をそれぞれ 10、8、8 匹、1、4、8ヶ月齢の SAMP6 をそれぞれ 8 匹ずつ使用した。データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。

8. ワイヤーぶら下がり試験

スコアにおいて系統効果 ($F(1, 174) = 25.53, P = 0.051$)、月齢効果 ($F(2, 174) = 8.85, P < 0.001$) が認められたが、系統 $\times$ 月齢交互作用 ($F(2, 174) = 3.02, P = 0.051$) は認められなかった。1 および 8 ヶ月齢で SAMR1 に比べて SAMP6 で有意にスコアが低かった (1 ヶ月齢; $P < 0.05$, 8 ヶ月齢; $P < 0.01$, Bonferroni 補正法) (図 20A)。落下するまでの時間において、系統効果 ($F(1, 174) = 2.52, P = 0.084$) は認められたが、月齢効果 ($F(2, 174) = 2.14, P = 0.121$) および系統 $\times$ 月齢交互作用 ($F(2, 174) = 2.52, P = 0.084$) は認められなかった。1 および 8 ヶ月齢で SAMR1 に比べて SAMP6 で有意に落下するまでの時間が短かった (1 ヶ月齢; $P < 0.01$, 8 ヶ月齢; $P < 0.01$, Bonferroni 補正法) (図 20B)。

A



B

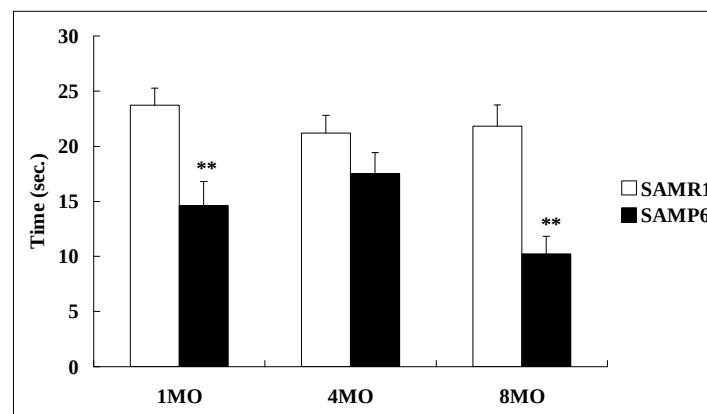


図 20. ワイヤーぶら下がり試験

1、4、8 ヶ月齢の SAMR1 および SAMP6 をそれぞれ 10 匹ずつ使用した。(A) スコア。(B) 落下するまでの時間。データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。**, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$

9. 回転棒試験

静止した棒上に乗っていた時間において、系統効果 ($F(1, 162) = 21.18, P < 0.001$)、試行効果 ($F(2, 162) = 3.51, P = 0.032$)、系統 $\times$ 試行交互作用 ($F(2, 162) = 8.29, P = 0.032$)、月齢 $\times$ 試行交互作用 ($F(4, 162) = 4.55, P = 0.002$) および系統 $\times$ 月齢 $\times$ 試行交互作用 ($F(4, 162) = 4.55, P = 0.002$) が認められた。1 ヶ月齢において 1 回目の試行で、SAMP6 が静止した棒上に乗っていた時間は SAMR1 に比べて有意に短かった ($P < 0.001$ 、Bonferroni 補正法) (図 21A)。3rpm で回転する棒上に乗っていた時間において、系統効果 ($F(1, 162) = 35.36, P < 0.001$) および月齢効果 ($F(2, 162) = 3.63, P = 0.029$) が認められた (図 21B)。3rpm から 30rpm まで加速する棒上に乗っていた時間において、系統効果 ($F(1, 870) = 1060.16, P < 0.001$)、月齢効果 ($F(2, 870) = 18.05, P < 0.001$)、日効果 ($F(4, 870) = 18.94, P < 0.001$)、系統 $\times$ 月齢交互作用 ($F(2, 870) = 22.18, P < 0.001$)、系統 $\times$ 日交互作用 ($F(4, 870) = 13.72, P < 0.001$)、月齢 $\times$ 日交互作用 ($F(8, 870) = 2.64, P = 0.007$)、系統 $\times$ 月齢 $\times$ 日交互作用 ($F(8, 870) = 2.71, P = 0.006$) が認められた (図 21C)。また、1、4、および 8 ヶ月齢の全ての試行において、SAMP6 は SAMR1 に比べて有意に早く落下した ($P < 0.001$ 、Bonferroni 補正法) (図 21C)。

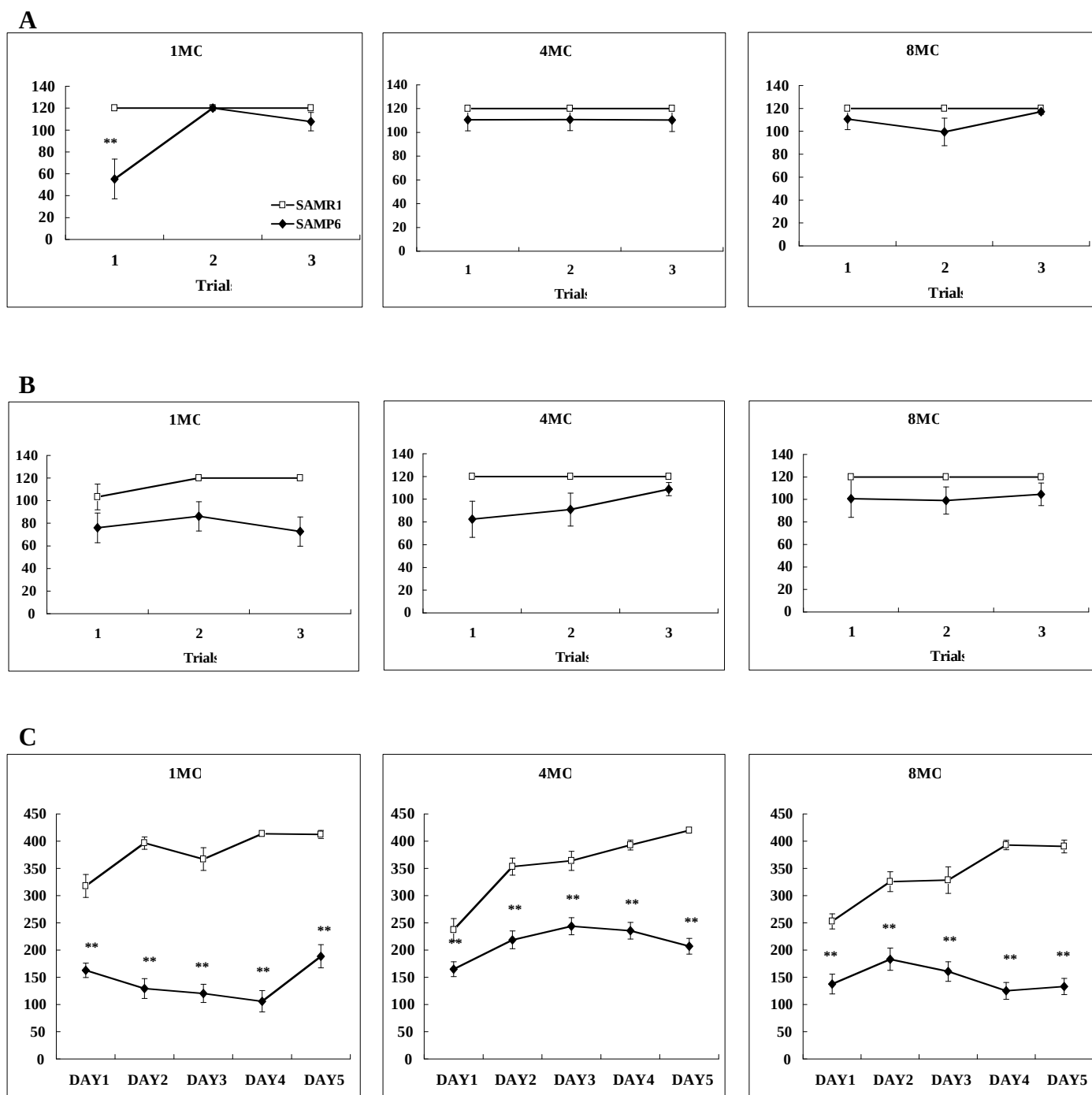


図 21. 回転棒試験

1、4、8ヶ月齢の SAMR1 (□) および SAMP6 (●) をそれぞれ 10 匹ずつ使用した。(A) 静止した棒に乗っていた時間。(B) 3 rpm で回転する棒に乗っていた時間。(C) 3rpm から 30rpm に加速する棒に乗っていた時間。データは平均値 ± 標準誤差で示した。**, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$

10. 尾懸垂試験

不動化時間において、系統効果 ($F(1, 45) = 29.78, P < 0.001$) および月齢効果 ($F(2, 45) = 6.58, P = 0.003$) が認められたが、系統 × 月齢交互作用 ($F(2, 45) = 0.93, P = 0.402$) は認められなかった (図 22)。1 および 4 ヶ月齢の SAMP6 の不動化時間は SAMR1 に比べて有意に短かった (1 ヶ月齢; $P < 0.001$ 、4 ヶ月齢; $P < 0.05$ 、Bonferroni 補正法) (図 22)。

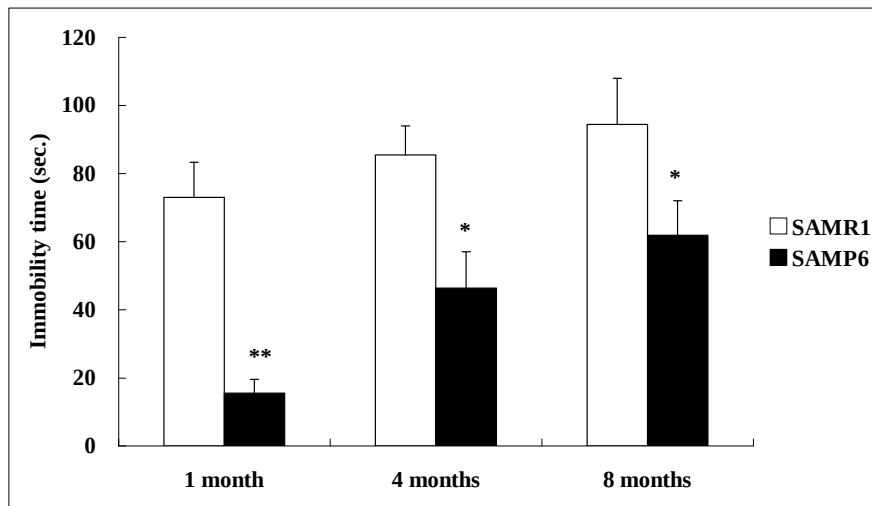


図 22. 尾懸垂試験

1、4、8 ヶ月齢の SAMR1 をそれぞれ 9、8、8 匹、1、4、8 ヶ月齢の SAMP6 をそれぞれ 10、8、8 匹ずつ使用した。データは平均値 ± 標準誤差で示した。**: $P < 0.01$ 、*: $P < 0.05$

考察

SAMP6 の運動活性を評価するために、馴化した環境下での運動活性を計測する自発運動活性計測試験と、新奇環境下での運動活性を計測するオープンフィールド試験を実施した。運動活性は行動解析の基本的な構成要素であり、加齢によって変化することが知られている (Fetsko et al., 2005、Lhotellier et al., 1993)。また、運動活性を含めて行動特性はマウス系統ごとに異なることが知られている (Bolivar et al., 2000、Bothe et al., 2005、Brooks et al., 2005、Logue et al., 1997、Owen et al., 1997、Thifault et al., 2002、Upchurch & Wehner, 1988、van Gaalen & Steckler, 2000、Volkmar et al., 2001)。このため、SAMR1、SAMP6、およびそのオリジナル系統である AKR/J を用いて、行動解析の基本となる運動活性を指標に、それぞれの系統の特徴と加齢による変化について検討した。それぞれの系統の 6

および 12 ヶ月齢のマウスを用いて連続して 72 時間の運動活性を計測したところ、3 日間の計測期間を通じて全ての個体群において明らかなサーカディアンリズムの乱れは認められなかった。全ての個体群で、明期に比べて暗期の運動活性が高く、これまでに報告があるように、照明点灯時および消灯時に運動活性の増加が認められた (Crawley, 2000)。また全ての系統において、6 ヶ月齢に比べて 12 ヶ月齢の方が運動活性における明期 / 暗期の二相性が不明瞭になる傾向が認められた。新奇環境内での 1 日目はマウスが環境に馴化していないと考えられるため (Rubinstein et al., 1997)、1 日目の運動活性を新奇環境下での運動活性、3 日目の運動活性を馴化した環境下での運動活性と考え、性質の異なる 1 日目と 3 日目のそれぞれの運動活性を系統ごとに比較したところ、全ての系統で共通して 3 日目の運動活性が 1 日目に比べて低値を示した。1 および 3 日目の両方において、6 ヶ月齢の SAMP6 は同月齢の AKR/J および SAMR1 よりも有意に運動活性が高く、逆に 12 ヶ月齢の SAMP6 は同月齢の AKR/J および SAMR1 よりも運動活性が低い傾向が認められた。このことから、SAMP6 の運動活性は 6 ヶ月齢頃をピークとする促進老化パターンを示すことが示唆された。一方、計測期間を通じて、6 および 12 ヶ月齢のどちらの月齢においてもオリジナル系統である AKR/J と SAMR1 はほぼ同様の結果を示し、加齢による運動活性低下が同程度であることから、SAMP6 で認められた促進老化パターンを示す運動活性の変化は、SAMP6 系統を確立するために低骨量を指標にして行った選抜交配の過程で、低骨量に関与する遺伝子 (群) とともに固定された遺伝子 (群) によって支配されているものと考えられた。行動解析の基本的な構成要素である自発運動活性において AKR/J と SAMR1 に明らかな相違が認められないため、以降の行動解析試験は SAMP 系統を用いた他の多くの行動解析試験の報告 (Chen et al., 2007、Miyamoto, 1994、Sanchez-Barcelo et al., 1997、Shimano, 1998) と同様に、SAMR1 をコントロール系統として実施した。

オープンフィールド試験では、1、4、8 ヶ月齢の全てにおいて SAMP6 の 25 分間の総移動距離が SAMR1 に比べて有意に長かった。また、実験に用いた 3 つの月齢のうち、4 ヶ月齢に比べて 8 ヶ月齢で SAMP6 の運動活性が低下する傾向が認められ、72 時間の自発運動活性計測試験の結果と考え合わせると、SAMP6 の高運動活性は 1 ヶ月齢の時点で認められることから、生得的に高運動活性となるメカニズム異常が存在すると考えられた。その後 SAMP6 の運動活性は 4 ~ 6 ヶ月齢頃にピーク値を示し、以降加齢に伴って減少するため、促進老化様行動

特性であると考えられた。一方、1、4、8ヶ月齢全てにおいて、高架式十字迷路試験ではアームの総進入回数が、明暗箱試験では箱間の移動回数が SAMR1 に比べて SAMP6 で有意に多く、これらの試験においても SAMP6 の高運動活性が確認された。また、Y 字迷路試験においても、4 および 8 ヶ月齢の SAMP6 は SAMR1 に比べて有意にアームの進入回数が多く、SAMP6 の高運動活性が確認された。しかしながら、Y 字迷路試験では SAMP6 の加齢に伴う運動活性変化は明瞭ではなく、高架式十字迷路試験および明暗箱試験では 1 ヶ月齢をピークとする加齢依存的な運動活性の減少が認められた。これは、ホームケージ内やオープンフィールドにおける運動活性とは異なり、Y 字迷路のような通常の飼育環境とは大きく異なる環境下での探索行動であったり、高さや明るさといった恐怖要因を含む環境下での運動活性であるため、情動変化が運動活性に大きく影響を与えた結果、促進老化パターンを示さなかった可能性が考えられた。

SAMP6 の不安状態を評価するために、高架式十字迷路試験、明暗箱試験、およびガラス玉覆い隠し行動試験を実施した。高架式十字迷路では、全ての月齢において SAMP6 のオープンアームへの進入回数およびオープンアーム内の滞在時間が同月齢の SAMR1 に比べて有意に多く、SAMR1 に比べて低不安であることが示された。明暗箱試験では、全ての月齢において SAMP6 の明るい箱内の滞在時間が同月齢の SAMR1 よりも有意に長く、ガラス玉覆い隠し行動試験では、全ての月齢において SAMR1 に比べて SAMP6 の覆い隠したガラス玉の数および覆い隠し行動時間が有意に少なく、SAMP6 の低不安が示された。しかしながら、高架式十字迷路で認められた SAMP6 の低不安が 1 ヶ月齢をピークに加齢に伴って減少するのに対し、明暗箱試験およびガラス玉覆い隠し行動試験で認められた SAMP6 の低不安には明らかな加齢の影響は認められなかった。高架式十字迷路試験は、明暗箱試験で評価される明 / 暗の影響を受ける探索本能に加えて、アームの壁の有無および高さという 2 つの不安要素が加わったパラダイムであり、明暗箱試験より不安要素の強い行動試験であると考えられる (Crawley, 2000)。このため、高架式十字迷路試験における不安行動には、明暗箱試験での不安行動に関わるメカニズムに加えてさらに異なるメカニズムが関与している可能性が考えられる。また、ガラス玉覆い隠し行動試験は不安行動以外にも刺激対象物に対する防御的行動が含まれた実験系であり (Pinel & Treit, 1978, Pinel et al., 1980)、不安状態の評価だけではなく強迫性障害の実験モデルとしても用いられている (Abe et al., 1998, Ichimaru et al., 1995, Londei et al., 1998)。このことから、

ガラス玉覆い隠し行動試験において不安状態の指標としたガラス玉を覆い隠す行動には、不安行動に関わるメカニズムとはさらに異なるメカニズムが関与している可能性も考えられた。これら 3 つの行動解析試験に共通して 1 ヶ月齢の時点から SAMP6 の低不安が認められるため、SAMP6 には生得的に低不安となるメカニズム異常が存在すると考えられた。さらに、高さなどのような強い不安要因が加わることによって加齢の影響が認められたことから、SAMP6 の低不安は加齢依存的変化を伴う行動特性であると考えられた。

SAMP6 の記憶について評価するために、Y 字迷路試験を実施した。Y 字迷路試験では、4 および 8 ヶ月齢の SAMP6 において自発的交替行動率が SAMR1 に比べて有意に高く、SAMP6 の短期記憶増加が示唆された。一方、SAMP6 のモリス水迷路試験における短期記憶が SAMR1 に比べて減少しているとの報告 (Liu et al., 2006) もある。しかしながら、水迷路試験と Y 字迷路試験は異なる行動実験であるため、それぞれの結果を直接比較することはできない。Y 字迷路試験は選択アームの交替というマウスの生得的な性質に基づいた短期記憶評価パラダイムであるのに対して、水迷路試験は忌避行動に基づくストレス負荷の大きい記憶評価パラダイムである (Crawley, 2000, Deacon et al., 2002)。本章で認められた SAMP6 の低不安という性質が、これらの 2 つの記憶評価パラダイムにおいて、異なる方向に影響を与えている可能性が考えられる。Y 字迷路試験において SAMP6 の低不安は、探索行動を増加させるという意味で正の影響を与えているかもしれない。一方、水迷路試験では嫌悪刺激を記憶の強化因子としているため、SAMP6 の低不安は嫌悪刺激からの逃避行動に負の影響を与えた可能性が考えられる。本章では、統計学的な有意差こそなかったものの、1 ヶ月齢の SAMP6 の自発的交替行動率も SAMR1 に比べて高い傾向が認められたことから、SAMP6 には生得的に短期記憶増加に関わるメカニズム異常が存在すると考えられた。また SAMP6 の短期記憶には明らかな加齢の影響は認められなかったことから、非加齢依存的行動特性であると考えられた。

SAMP6 の運動機能について評価するため、牽引力試験、ワイヤーぶら下がり試験、および回転棒試験を実施した。牽引力試験では、実験を行った全ての月齢において、SAMR1 と SAMP6 の牽引力に明らかな違いは認められなかったことから、筋力に相違がないことが示された。ワイヤーぶら下がり試験におけるスコアおよび落下するまでの時間について、1 および 8 ヶ月齢の SAMP6 は同月齢の SAMR1 に比べて有意に成績が悪かった。4 ヶ月齢では有意差は認められな

かった。回転棒試験では、1ヶ月齢の SAMP6 は 0rpm の 1 回目の試行で SAMR1 に比べて有意に早く落下したが、2 回目以降の試行では SAMR1 と同様に 0rpm の回転棒上に留まることができた。このことから、1ヶ月齢の SAMP6 は静止した棒上に留まる方法を学習できたと考えられた。3rpm では全ての月齢において SAMR1 に比べて SAMP6 が回転棒上に滞在できた時間が短い傾向が認められた。特に、1 および 8 ヶ月齢では 3rpm の 3 回の試行を通じて SAMP6 の滞在時間が短い傾向は変化しなかったため、1 および 8 ヶ月齢の SAMP6 は運動協調性に異常を有し、かつ 3rpm の回転棒上に留まる方法を学習できないことが示唆された。一方、4 ヶ月齢では、3rpm の回転棒上での滞在時間の差が試行ごとに減少する傾向が認められ、4 ヶ月齢の SAMP6 は SAMR1 に比べて運動協調性に異常を有するが、3rpm の回転棒上に留まる方法を学習できることが示唆された。3rpm から 30rpm まで加速する棒上の滞在時間においては、全ての月齢の全ての試行において SAMP6 は SAMR1 に比べて有意に短かった。全ての月齢において SAMP6 は 3rpm 以上の速度で回転する棒上に滞在できる時間が SAMR1 に比べて短く、またその方法を学習することができないと考えられた。SAMP6 と SAMR1 で牽引力に相違が認められないことから、筋力および運動協調性が必要なワイヤーぶら下がり試験および回転棒試験 (Crawley, 2000) で認められた SAMP6 の行動異常は、筋力の低下によるものではなく、神経系の異常による運動協調性の異常であると考えられた。ワイヤーぶら下がり試験および回転棒試験における SAMP6 の行動異常は 1 ヶ月齢の時点から認められるため、SAMP6 の運動協調性異常には生得的なメカニズム異常が関わっていると考えられた。しかしながら、SAMP6 が運動協調性異常を示す中にも、ワイヤーぶら下がり試験におけるスコアおよび落下するまでの時間において、4 ヶ月齢の SAMP6 は SAMR1 と同程度の成績を示し、また回転棒試験において 4 ヶ月齢の SAMP6 は 3rpm の回転棒上に留まる方法を学習出来たことなどから、4 ヶ月齢をピークとする促進老化様行動特性であると考えられた。

SAMP6 の鬱状態について評価するため、尾懸垂試験を実施した。尾懸垂試験では、全ての月齢において SAMR1 に比べて SAMP6 の不動化時間は有意に短いことから、SAMP6 の抗鬱が示唆された。SAMP6 の抗鬱は 1 ヶ月齢の時点から認められるため、生得的なメカニズム異常が存在すると考えられた。1 ヶ月齢をピークに以降加齢に伴って SAMP6 の不動化時間が延長していることから、SAMP6 の抗鬱は加齢依存的变化を伴う行動特性であると考えられた。

SAMP6 系統の包括的行動解析試験によって、SAMP6 の高運動活性、低不安、短期記憶増加、運動協調性異常、および抗鬱が明らかになった。これらの SAMP6 の行動特性は 1 ヶ月齢の時点から認められることから、SAMP6 に生得的なメカニズム異常が存在すると考えられた。また、SAMR1 と相違の認められたこれらの行動特性を、加齢の影響について次のような 3 つのカテゴリーに分類した(表 2)。すなわち、(1) 骨密度の変化と同様に 4~6 ヶ月齢でピークを迎え以降加齢に伴って変化する、促進老化パターンを示す行動特性(促進老化様行動特性)、(2) 1 ヶ月齢をピークとして以降月齢が進むにつれてコントロールマウスとの差が減少する、促進老化とは異なるパターンの加齢の影響を受ける行動特性(加齢依存的変化を伴う行動特性)、(3) 明らかな加齢の影響が認められない行動特性(非加齢依存的行動特性) の 3 つである。

表 2 SAMP6 の行動特性の加齢の影響による分類

	促進老化様行動特性	加齢依存的変化を伴う行動特性	非加齢依存的行動特性
高運動活性	○		
運動協調性異常	○		
低不安		○	
抗鬱		○	
短期記憶増加			○

小括

本章では、SAMP6 の行動特性について明らかにするために、包括的行動解析を行い、次のような結果を得た。

1. 72 時間の運動活性計測試験、オープンフィールド試験、高架式十字迷路試験におけるアーム進入回数、明暗箱試験における箱間の移動回数、および Y 字迷路試験におけるアーム進入回数において、1 ヶ月齢の時点から SAMP6 は SAMR1 に比べて高運動活性を示し、運動活性に関わる生得的メカニズム異常の存在が示唆された。また、自発運動活性計測試験およびオープンフィールド試験で認められた SAMP6 の高運動活性は、促進老化様行動特性であると考えられた。
2. 高架式十字迷路試験、明暗箱試験、およびガラス玉覆い隠し試験において、1 ヶ月齢の時点から SAMP6 は SAMR1 に比べて低不安を示し、不安に関わる生得的メカニズム異常の存在が示唆された。不安要素の多い高架式十字迷路試験で認められた SAMP6 の低不安は、加齢依存的变化を伴う行動特性であると考えられた。
3. Y 字迷路試験において、1 ヶ月齢の時点から SAMP6 は SAMR1 に比べて短期記憶増加を示し、短期記憶に関わる生得的なメカニズム異常が示唆された。SAMP6 の短期記憶増加は非加齢依存の行動特性であると考えられた。
4. 牽引力試験において SAMP6 と SAMR1 の筋力に明らかな相違がないことが示された。ワイヤーぶら下がり試験および回転棒試験において、1 ヶ月齢の時点から SAMP6 は SAMR1 に比べて運動協調性異常を示し、運動協調性に関わる生得的なメカニズム異常が示唆された。また両試験において、4 ヶ月齢で SAMP6 と SAMR1 の運動協調性の差が減少し、8 ヶ月齢で再び SAMP6 の運動協調性の悪化が認められたことから、SAMP6 の運動協調性異常は、促進老化様行動特性であると考えられた。
5. 尾懸垂試験において、1 ヶ月齢の時点から SAMP6 は SAMR1 に比べて抗鬱

の性質を示し、鬱に関わる生得的なメカニズム異常が示唆された。SAMP6 の抗鬱は、加齢依存的変化を伴う行動特性であると考えられた。

6. 高架式十字迷路試験、明暗箱試験、ガラス玉覆い隠し試験などの複数の行動解析試験を組み合わせたことにより、SAMP6 の低不安の加齢依存的変化を検出することが出来た。また、牽引力試験によって SAMP6 と SAMR1 の間で筋力に相違がないことが示されたことにより、ワイヤーぶら下がり試験および回転棒試験で認められた SAMP6 の行動異常が、筋力の異常によるものではないことが示された。複数の行動解析試験を組み合わせることは、1つの行動解析試験だけでは不十分または明らかにならなかった行動特性を捉えることが出来る為、動物の行動特性を評価する上で包括的行動解析試験は必須であると考えられた。

第2章 SAMP6 で認められた高運動活性、低不安、短期記憶増加、運動協調性異常、および抗鬱に関わるモノアミンシステムの検討

序

前章では、SAMP6 は同じ月齢の SAMR1 に比べて、高運動活性、低不安、短期記憶増加、運動協調性異常、および抗鬱の行動特性を有していることが明らかになった。本章では、SAMP6 で認められたこれらの行動特性に関わるメカニズムについて検討した。

ドーパミンやセロトニンが運動機能、情動行動、短期記憶に関与していることは良く知られている (Brozoski et al., 1979, Clarke et al., 2004, Gainetdinov et al., 1999, Karakuyu et al., 2007, Luine et al., 1990, Rodgers et al., 1994, Sahakian et al., 1985, Takahashi et al., 2008, Zhou & Palmiter, 1995, Zhuang et al., 1999) ため、SAMP6 でこれらのモノアミンシステムに変化が認められるかどうかを検討することにした。最初に、ドーパミンの合成酵素 (チロシン水酸化酵素) セロトニンの合成酵素 (トリプトファン水酸化酵素) およびその活性化状態であるそれぞれのリン酸化フォームの発現量を 1 ヶ月齢 (若齢期) の SAMP6 と SAMR1 で比較し、ドーパミン量またはセロトニン量の変化が SAMP6 の行動特性に関わる生得的メカニズム異常である可能性について検討した。次に 6 ヶ月齢 (成熟期) の SAMP6 を用いて、脳の部位ごとにこれらのモノアミン含有量を同月齢の SAMR1 と比較し、SAMP6 の行動特性とこれらのモノアミン含有量との関係を考察した。さらに、前章で認められた SAMP6 の行動特性のうち、促進老化様行動特性である高運動活性および運動協調性異常の関連メカニズムについて、運動能力に関わることで良く知られているドーパミンに焦点を絞って検討を行った。促進老化様行動特性のピーク時 (成熟期) である 5 ヶ月齢の SAMP6 を用いてドーパミン受容体 1 (D1)、2 (D2)、3 (D3)、ドーパミントランスポーターの発現量について同月齢の SAMR1 と比較し、シナプス間隙に放出された後のドーパミンシステムの変化を検討した。また D1、D2、D3 ドーパミン受容体のうち、運動活性調節に関わるとされる D1 に着目し、6 ヶ月齢 (成熟期) および 12 ヶ月齢 (老齢期) のマウスに D1 受容体特異的作動薬を投与し、D1 受容体の感受性について加齢による変化を検討した。また、5 ヶ月齢 (成熟期) の脳のパラフィン切片を作成し、脳組織の構造についても SAMP6 と SAMR1 間で比較した。

材料と方法

1. 動物

日本 SLC より購入した 1、4～6、および 12 ヶ月齢の雄の SAMR1 および SAMP6 を用いた。導入後、マウスは 12 時間ごとの明暗周期の照明下（8:00 点灯、20:00 消灯）で、マイクロアイソレーションケージ内で 1 週間以上個別飼育し、飼育環境へ馴化させた後に実験に使用した。行動解析実験は、マウス系統を伏せて 10:00 から 16:00 の時間帯に実施した。

2. 化合物

ドーパミン受容体 1 (D1) 作動薬

6-chloro-7,8-dihydroxy-3-allyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1-phenyl-1H-3-benzazepine hydrobromide (SKF82958, Sigma, St. Louis, IL, アメリカ) を滅菌水で希釈し、0.3、1.0、および 5.0mg/kg の用量で腹腔内投与を行った。

3. ウエスタンブロット解析

1) チロシン水酸化酵素およびトリプトファン水酸化酵素の発現量比較

1 ヶ月齢の SAMR1 および SAMP6 をそれぞれ 5 匹ずつ使用した。マウスから線条体、側坐核、脳幹、および肝臓を摘出し、バッファー (PRO-PREPTM Protein Extraction Solution, iNtRON Biotechnology, Inc., Gyeonggi, 韓国) 中でホモジナイズした。20 µg の各サンプルを 10%SDS-polyacrylamide gel で分離し、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) メンブレン (Immobilon-P, Millipore, Billerica, MA, アメリカ) へ転写した。チロシン水酸化酵素 (Chemicon International Inc., Billerica, MA, アメリカ)、リン酸化チロシン水酸化酵素 (Chemicon International Inc.)、トリプトファン水酸化酵素 (Abcam, Cambridge, MA, アメリカ)、およびリン酸化トリプトファン水酸化酵素 (BIOMOL, Plymouth Meeting, PA, アメリカ) を特異的に認識する抗体を用いて発現量を比較した。タンパク濃度は抗アクチン抗体 (Chemicon International Inc.) を用いて補正した。タンパク量はシグナル処理ソフト (ImageJ, NIH, Bethesda, MD, アメリカ) を用いてシグナルの強度を数値化し、アクチン量に対する比を求め、SAMR1 と SAMP6 の各タンパク量を比較した。

2) ドーパミン受容体 1、2、3、およびドーパミントランスポーターの発現量比

較

5 ヶ月齢の SAMR1 および SAMP6 をそれぞれ 5 匹ずつ使用した。マウスから線条体、側坐核、小脳、および肝臓を摘出し、protease inhibitors (Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets、Roche、Indianapolis、IN、アメリカ) を含むバッファー (320 mM sucrose、5 mM HEPES) 中でホモジナイズし、1400 × g で遠心分離後、上清をさらに 12000 × g で遠心分離し、沈殿物を 5mM Tris 緩衝液に懸濁し (P2 分画) サンプルとした。40 μg の各サンプルを上記と同様に泳動、分離し、メンブレンへ転写した。D1 (Chemicon International Inc.)、D2 (Chemicon International Inc.)、D3 (Alpha Diagnostic International、San Antonio、TX、アメリカ) および DAT (Chemicon International Inc.) を特異的に認識する抗体を用いて発現量を比較した。タンパク量はシグナル処理ソフト (ImageJ、NIH、Bethesda、MD、アメリカ) を用いてシグナルの強度を数値化し、アクチン量に対する比を求め、SAMR1 と SAMP6 の各タンパク量を比較した。

4. モノアミンおよびその代謝物濃度の計測

6 ヶ月齢の SAMR1 および SAMP6 をそれぞれ 5 匹ずつ使用した。マウスから線条体、側坐核、脳幹、および小脳を摘出し、100 μM EDTA2Na および isoproterenol を内部標準物質として含む 0.2M perchloric acid 中でホモジナイズし、20000 × g で遠心分離し、上清を 0.45 μm のメンブレンフィルターで濾過し、サンプルとした。サンプルは微量生体試料分析システム (HTEC-500、エイコム、京都、日本) を用いて検出し、モノアミンおよびその代謝物の濃度は解析ソフト (PowerChrom、Bio Research Center、愛知、日本) を用いて算出した。

5. ドーパミン受容体 1 アゴニスト SKF82958 投与後運動活性計測試験

6、12 ヶ月齢の SAMR1 および SAMP6 へ vehicle のみ、0.3、1.0、および 5.0mg/kg の用量の SKF82958 を各系統 10 匹ずつに投与し、実験に使用した。運動活性計測センサー (LOCOMO LS-5) (図 2) を横切った回数を運動活性の指標とした。運動活性計測用ケージ内にマウスを入れ、2 時間ケージ内を自由に探索させ、環境に馴化させた。滅菌水を腹腔内投与後 1 時間後に SKF82958 投与を行った。薬剤投与したマウスを再び運動活性計測用ケージ内に戻し、運動活性を 2 時間計測した。

6. 統計学的処理

データは平均値 ± 標準誤差で表す。統計解析ソフトは Excel Statistics 2006 (SSRI、東京、日本)を用いた。データは Student の t 検定もしくは two-、および three-way ANOVA で有意差検定を行い、Bonferroni 補正法もしくは Tukey 多重比較法により群間の比較を行った。

7. 組織学的検査

5 ヶ月齢の SAMR1 および SAMP6 をそれぞれ 5 匹ずつ使用した。マウスに過剰量の Avertin (2,2,2-tribromoethanol、Sigma-Aldrich、St.Louis、IL、アメリカ)を投与し、生理食塩水、および 4% paraformaldehyde 溶液で灌流し、脳を摘出後、4% paraformaldehyde 溶液で後固定し、パラフィンに包埋後、5 μm の厚さで薄切し、ヘマトキシリン-エオジン染色を行った。

結果

1. ウエスタンブロット解析

1) チロシン水酸化酵素およびトリプトファン水酸化酵素の発現量比較

線条体および側坐核において、SAMR1 に比べて SAMP6 のチロシン水酸化酵素およびそのリン酸化フォーム (セリン 40) の発現量が有意に多かった (全て $P < 0.001$ 、t 検定) (図 23A、23C)。また、脳幹において、SAMR1 に比べて SAMP6 のトリプトファン水酸化酵素およびそのリン酸化フォーム (セリン 58) の発現量が有意に多かった (ともに $P < 0.01$ 、t 検定) (図 23B、23C)。

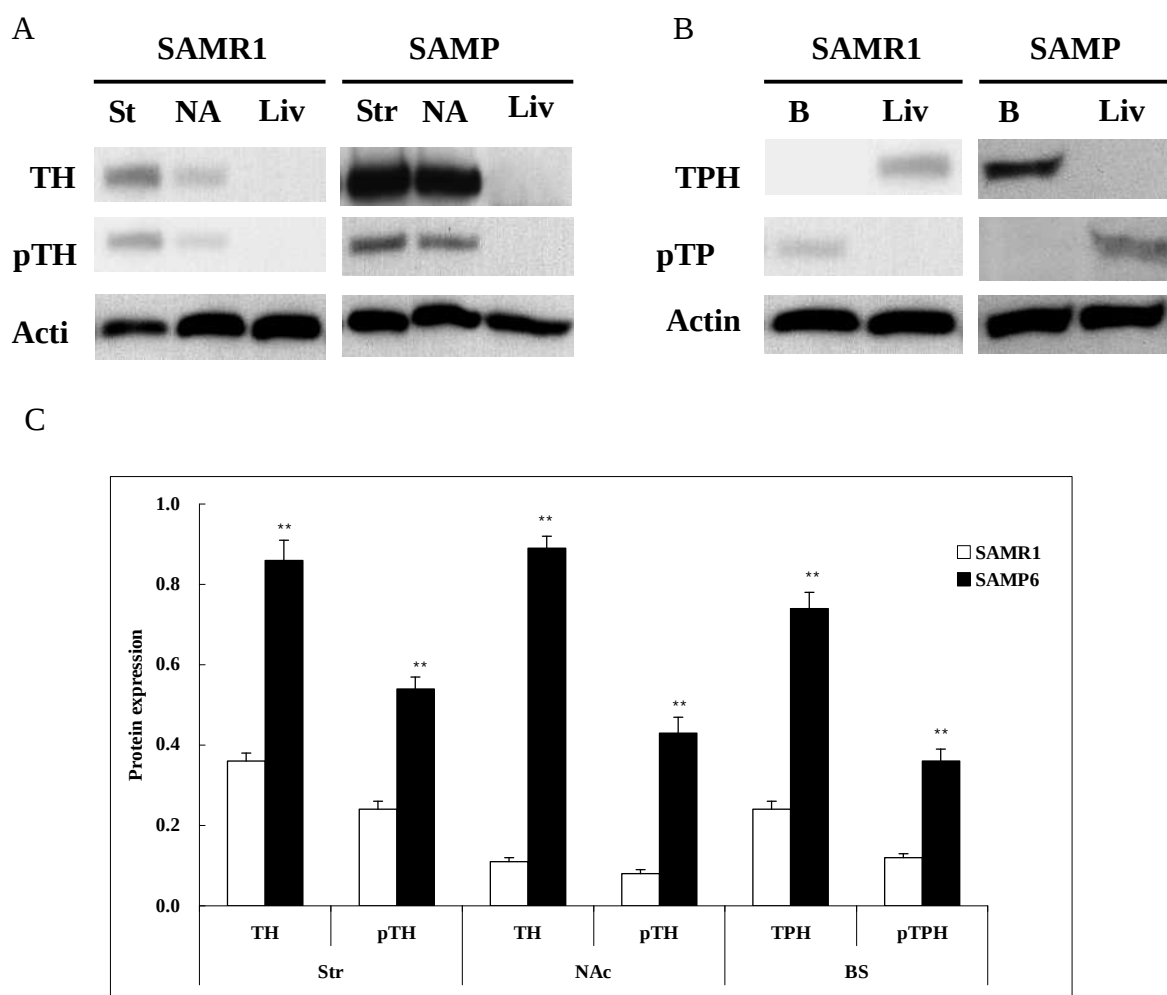


図 23. チロシン水酸化酵素 (TH) およびトリプトファン水酸化酵素 (TPH) のウエスタンブロット解析

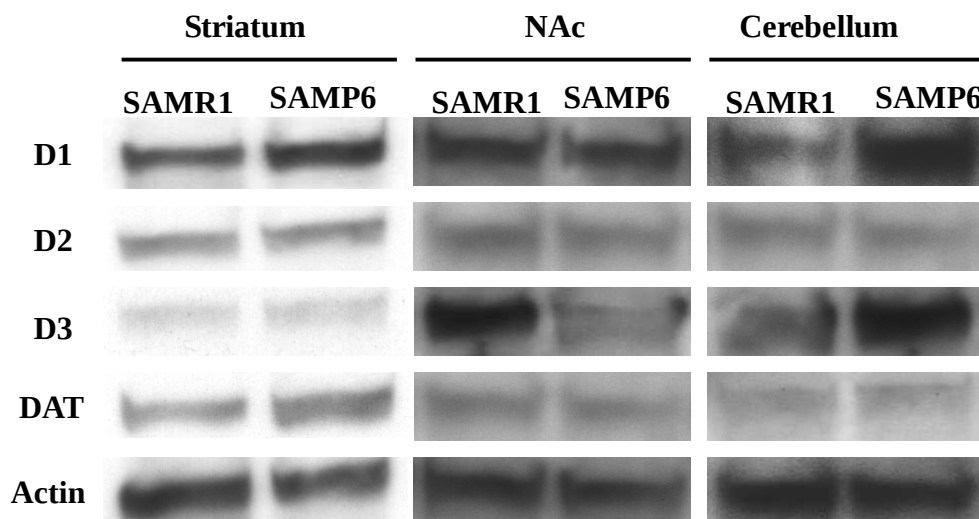
1 ヶ月齢の SAMR1 および SAMP6 をそれぞれ 5 匹ずつ使用した。(A) 線条体および側坐核における TH およびそのリン酸化フォーム (セリン 40) の発現。アクチンは泳動タンパク量の指標とした。肝臓は陰性コントロールとした。(B) 脳幹における TPH およびそのリン酸化フォーム (セリン 58) の発現。アクチンは泳動タンパク量の指標とした。肝臓は陰性コントロールとした。(C) タンパク発現量の定量。アクチンタンパク量に対する比で示す。データは平均値 ± 標準誤差で示した。**, $P < 0.01$ 、*, $P < 0.05$ Str: 線条体、NAc: 側坐核、BS: 脳幹、Liv: 肝臓

2) ドーパミン受容体 1、2、3、およびドーパミントランスポーターの発現量比較

線条体において D1 ($P < 0.01$, t 検定) および DAT ($P < 0.001$, t 検定) の発現量が、側坐核において D3 ($P < 0.01$, t 検定) の発現量が、小脳において D1 ($P < 0.01$ 、

t 検定)および D3($P<0.01$, t 検定)の発現量が、それぞれ SAMR1 に比べて SAMP6 で有意に多かった (図 24A、24B)。

A



B

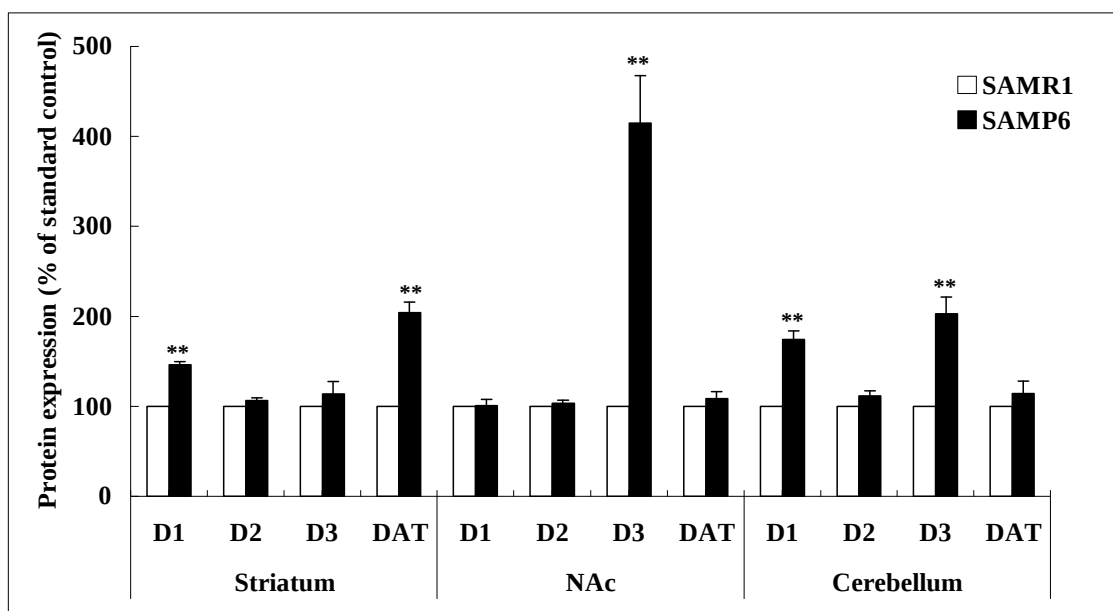


図 24. ドーパミン受容体 1(D1)、2(D2)、3(D3) およびドーパミントランスポーター(DAT) のウェスタンブロット解析

5 ヶ月齢の SAMR1 および SAMP6 をそれぞれ 5 匹ずつ使用した。(A) 線条体、側坐核、および小脳における D1、D2、D3、および DAT の発現。アクチンは泳動タンパク量の指標とした。(B) タンパク発現量の定量。アクチンタンパク量に対する比で示す。データは平均値±標準誤差で示した。**, $P<0.01$ NAc: 側坐核

2. モノアミンおよびその代謝物濃度の計測

SAMR1 に比べて SAMP6 の大脳皮質で、ドーパミン (P<0.05、t 検定) およびその代謝物である homovanillic acid (HVA) (P<0.05、t 検定) の有意な増加、セロトニン (P<0.05、t 検定) およびその代謝物である 5-hydroxy indole acetic acid (5-HIAA) の有意な増加 (P<0.01、t 検定) が認められた。海馬では 5-HIAA の有意な増加 (P<0.01、t 検定) が認められた。線条体では HVA (P<0.01、t 検定) および 5-HIAA (P<0.05、t 検定) の有意な増加が、側坐核ではドーパミン (P<0.01、t 検定) HVA (P<0.01、t 検定) 3-methoxy tyramine (3-MT) (P<0.05、t 検定) セロトニン (P<0.05、t 検定) の有意な増加が、小脳ではドーパミン (P<0.01、t 検定) HVA (P<0.01、t 検定) セロトニン (P<0.01、t 検定) 5-HIAA (P<0.01、t 検定) の有意な増加が、脳幹では HVA (P<0.01、t 検定) 5-HIAA (P<0.01、t 検定) の有意な減少が認められた (表 3)。

表 3. モノアミンおよびその代謝物濃度

Region	dopamine (ng/g tissue)		DOPAC (ng/g tissue)		HVA (ng/g tissue)	
	SAMR1	SAMP6	SAMR1	SAMP6	SAMR1	SAMP6
cortex	78.94±13.04	189.70±38.22*	34.51±2.97	36.16±7.40	49.03±3.49	78.16±10.77*
hippocampus	9.71±3.05	8.99±1.19	9.78±2.32	11.02±0.68	9.74±2.16	10.81±1.30
striatum	2970.74±206.82	2672.13±264.84	677.58±54.96	551.19±38.93	252.55±10.90	353.50±26.24**
Nucleus Accumbens	339.23±90.00	772.49±58.90**	3.69±1.57	4.06±0.99	58.31±9.42	136.9±2.35**
brain stem	54.75±5.00	62.02±10.37	27.86±2.71	29.39±3.17	52.09±3.77	33.53±2.14**
cerebellum	1.38±0.12	2.64±0.20**	0.74±0.09	0.91±0.18	3.28±0.35	8.12±0.89**

Region	3-MT (ng/g tissue)		5-HT (ng/g tissue)		5-HIAA (ng/g tissue)	
	SAMR1	SAMP6	SAMR1	SAMP6	SAMR1	SAMP6
cortex	77.39±11.57	68.69±14.78	249.11±17.64	337.98±23.00*	428.121±32.016	634.85±42.97**
hippocampus	4.43±1.18	3.26±0.70	193.30±18.85	220.03±18.68	777.90±46.55	1090.00±64.74**
striatum	507.46±42.51	582.66±77.35	325.12±19.14	329.93±38.28	738.92±55.83	1099.21±100.69*
Nucleus Accumbens	47.33±17.77	167.14±33.19*	285.94±35.44	440.91±32.19*	1194.36±68.35	1284.98±161.26
brain stem	27.90±2.64	33.98±3.59	481.84±40.00	451.00±16.12	1423.29±95.18	922.33±39.30**
cerebellum	1.22±0.19	1.35±0.31	33.11±1.03	46.39±3.04**	83.23±5.66	196.83±12.27**

6 ヶ月齢の SAMR1 および SAMP6 をそれぞれ 5 匹ずつ使用した。データは平均値 ± 標準誤差で示した。**, P<0.01、*, P<0.05

3. SKF82958 投与後運動活性計測試験

滅菌水投与後 60 分間の運動活性は、全ての個体群において滅菌水投与前の運動活性と同様であった (データ示さず)。SKF82958 投与後 2 時間の運動活性を図 25 に示した。系統効果 (F (1, 144) = 82.26, P<0.001) 月齢効果 (F (1, 144) = 93.00, P<0.001) 用量効果 (F (3, 144) = 134.73, P<0.001) 系統 × 月齢交互作用 (F (1,

144) = 48.04, $P < 0.001$) 系統 × 用量交互作用 ($F(3, 144) = 8.33$, $P < 0.001$) 月齢 × 用量交互作用 ($F(3, 144) = 7.53$, $P < 0.001$) および系統 × 月齢 × 用量交互作用 ($F(3, 144) = 8.25$, $P < 0.001$) が認められた。Vehicle 投与以外の全ての用量において、6 ヶ月齢の SAMP6 の運動活性は同月齢の SAMR1 に比べて有意に高かった (vehicle 投与以外の全ての用量で $P < 0.01$ 、Tukey 多重比較法) (図 25) Vehicle 投与群において、6 ヶ月齢の SAMP6 の運動活性は同月齢の SAMR1 に比べて高い傾向が認められたが、有意ではなかった (図 25)。一方、12 ヶ月齢の SAMR1 と SAMP6 では、全ての用量において運動活性の有意な差は認められなかった。また、SAMR1 ではいずれの用量においても 6 ヶ月齢と 12 ヶ月齢で有意差は認められなかったが、SAMP6 では vehicle 投与以外の全ての用量において 12 ヶ月齢の方が 6 ヶ月齢に比べて有意に運動活性が低かった (vehicle 投与以外の全ての用量で $P < 0.01$ 、Tukey 多重比較法) (図 25)。

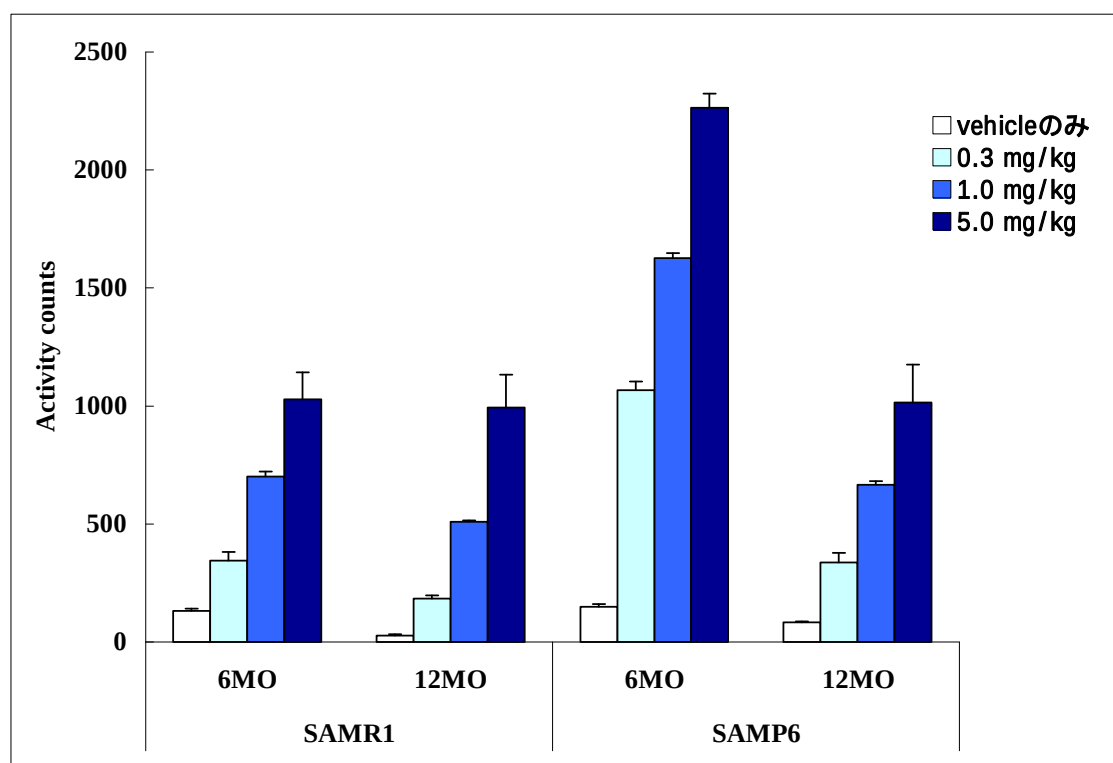


図 25. SKF82958 投与後運動活性計測試験

6、12 ヶ月齢の SAMR1 および SAMP6 へ vehicle のみ、0.3、1.0、および 5.0 mg/kg の用量の SKF82958 をそれぞれ 10 匹ずつに投与し、実験に使用した。120 分間の総運動活性を示す。データは平均値 ± 標準誤差で示した。

4. 組織学的所見

光学顕微鏡下では、脳の全体的な構造において SAMR1 と SAMP6 で違いは認められなかった（図 26）。

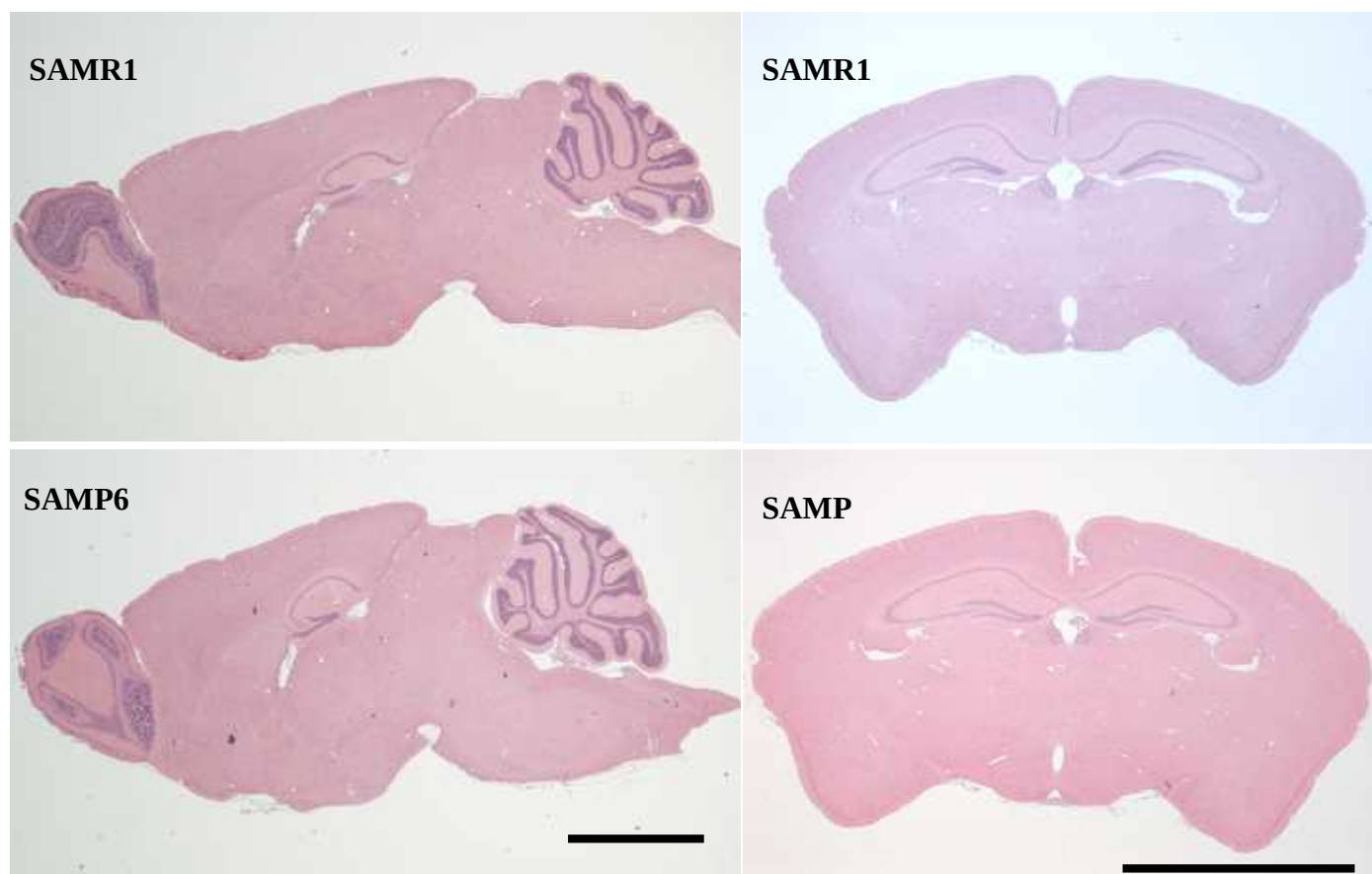


図 26. 組織学的所見

5 ヶ月齢の SAMR1 および SAMP6 をそれぞれ 5 匹ずつ使用した。スケールバーは 5mm を表す。

考察

ドーパミン合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素は、40 番目のセリンがリン酸化されることによって活性化状態となり、その結果ドーパミン合成が促進されることが知られている (Harada et al., 1996)。また、セロトニン合成の律速酵素であるトリプトファン水酸化酵素も、58 番目のセリンがリン酸化されることにより活性化され、セロトニン合成が促進することが知られている (Kuhn et al., 1997)。SAMP6 および SAMR1 の両律速酵素およびそれぞれのリン酸化フォームの発現量を比較したところ、SAMP6 の線条体および側坐核でチロシン水酸化酵素およびそのリン酸化フォームが SAMR1 に比べて増加していたことから、1 ヶ月齢の SAMP6 ではドーパミン量が増加していることが示唆された。また、SAMP6 の脳幹で、トリプトファン水酸化酵素およびそのリン酸化フォームが SAMR1 に比べて増加しており、1 ヶ月齢の SAMP6 でセロトニン量が増加していることが示唆された。このことから、SAMP6 のドーパミンまたはセロトニン量増加が、前章で示唆された若齢期から認められる SAMP6 の高運動活性、低不安、短期記憶増加、運動協調性異常、および抗鬱という行動特性に関わる生得的なメカニズム異常の 1 つである可能性が考えられた。

次に成熟期である 6 ヶ月齢の SAMP6 を用いて脳の各部位におけるドーパミンおよびセロトニンの含有量を同月齢の SAMR1 と比較したところ、SAMP6 の大脳皮質、側坐核、小脳でドーパミンおよびセロトニンの有意な増加が認められた。短期記憶に関わるとされる前頭前野 (Brozoski et al., 1979、Clarke et al., 2004、Karakuyu et al., 2007、Luine et al., 1990、Sahakian et al., 1985) を含む大脳皮質、不安や鬱、意欲などの情動行動や運動活性に関わるとされる側坐核 (Breese et al., 1987、Carvalho et al., 2005、De La Garza & Mahoney, 2004、Jackson et al., 1975、Lammers et al., 2000、Pijnenburg et al., 1976、Schwartz et al., 1998)、運動協調性に関わるとされる小脳 (Apps & Garwicz, 2005、Thach et al., 1992、Thach, 1998、Walter et al., 2006) において両モノアミンの有意な増加が認められたことで、前章で明らかになった SAMP6 の高運動活性、低不安、短期記憶増加、運動協調性異常、および抗鬱という行動特性とこれらのモノアミン量増加が関係している可能性が示唆された。

運動活性調節には、側坐核のドーパミンシステムが関わっていることが報告されている (Breese et al., 1987、Jackson et al., 1975、Pijnenburg et al., 1976) ため、成熟期の SAMP6 で認められた側坐核のドーパミン含有量増加が、成熟期の

SAMP6 の高運動活性に関わるメカニズムの 1 つである可能性が考えられた。

不安増加が認められるラットの側坐核のセロトニン量が減少していたとの報告 (Carvalho et al., 2005、De La Garza & Mahoney, 2004、Schwartz et al., 1998) などから、側坐核のセロトニン量が不安の程度に関わっていることが推察される。また、不安行動を示すラットの前頭前野のセロトニン量が減少していたとの報告 (Carvalho et al., 2005、De La Garza & Mahoney, 2004) もあり、前頭前野のセロトニン量もまた不安行動に関与している可能性が考えられる。これらのことから、成熟期の SAMP6 の大脳皮質および側坐核で認められたセロトニン含有量増加が、成熟期の SAMP6 の低不安に関わるメカニズムの 1 つである可能性が考えられた。

また、前脳のドーパミン量減少が短期記憶低下を誘起すること (Brozoski et al., 1979、Luine et al., 1990) 大脳皮質のドーパミン量が増加すると T 字迷路試験におけるエラーの頻度が低下すること (Sahakian et al., 1985) などの報告があることから、成熟期の SAMP6 の大脳皮質で認められたドーパミン含有量増加が成熟期の SAMP6 の短期記憶増加に関わるメカニズムの 1 つである可能性が考えられた。また、前頭前野のセロトニン量減少により短期記憶が低下すること (Clarke et al., 2004) 短期記憶を必要とする行動実験中に前頭前野のセロトニン放出量が増加すること (Karakuyu et al., 2007) などの報告があることから、成熟期の SAMP6 の大脳皮質におけるセロトニン含有量増加もまた、成熟期の SAMP6 の短期記憶増加に関わるメカニズムの 1 つである可能性が考えられた。

一方若齢期で、ドーパミン合成酵素であるチロシン水酸化酵素の発現量増加が明らかになった SAMP6 の線条体および、セロトニン合成酵素であるトリプトファン水酸化酵素の発現量増加が示された SAMP6 の脳幹において、成熟期ではどちらのモノアミン含有量においても SAMR1 と比べて有意差は認められず、幾つかの代謝物含有量にのみ有意差が認められた。このことから、成熟期の SAMP6 では、線条体におけるドーパミン合成量および脳幹におけるセロトニン合成量が SAMR1 と同程度まで減少したか、もしくは合成、放出された後の代謝経路が SAMR1 に比べて活性化しているかのどちらかの可能性が考えられた。

これらのモノアミンのうち、ドーパミンは運動活性を含め多様な行動様式をコントロールする主要な調節分子として良く知られているため (Zhou & Palmiter, 1995) ドーパミンのシグナルカスケードに注目し、シナプス間隙に放出されたドーパミンを再取り込みする DAT、および放出されたドーパミンを受け取る側

であるドーパミン受容体の発現量について検討することにした。前章で認められた SAMP6 の行動特性のうち、促進老化様行動特性である高運動活性および運動協調性異常に焦点を絞り、促進老化様行動特性のピーク時（成熟期）である 5 ヶ月齢の SAMP6 を用いて運動活性および運動協調性に関わる線条体、側坐核、および小脳(Apps & Garwicz, 2005、Ikemoto & Panksepp, 1999、Missale et al., 1998、Thach et al., 1992、Thach, 1998、Viggiano et al., 2003、Walter et al., 2006)における、ドーパミン受容体および DAT の発現量を比較した。ドーパミン受容体は G タンパク結合型受容体ファミリーに属する受容体であり、5 つのサブタイプを有し、それぞれによってマウスの行動様式が調節されている (Hiroi et al., 2002)。これら 5 つのサブタイプのうち、本研究では運動機能に関わるとされる D1、D2、および D3 受容体(Bishop & Walker, 2003、Breese et al., 1987、Jackson et al., 1975、Kamei & Saitoh, 1996、Kolasiewicz & Maj, 2001、McNamara et al., 2006、Pijnenburg et al., 1976、Schwarz et al., 1995、Shapovalova & Kamkina, 2008) について検討した。

成熟期の SAMP6 の線条体では D1 受容体が、側坐核では D3 受容体が、小脳では D1 および D3 受容体の発現量が、SAMR1 に比べて有意に多いことが明らかになった。D2 受容体の発現量は、本研究で用いた組織においては違いは認められなかった。また、SAMP6 の線条体において DAT の発現量増加が認められた。このことから、SAMP6 の線条体のドーパミン含有量に増加が認められなかったのは、DAT 発現量増加によってドーパミンの再取り込みおよび代謝が促進されたために、見かけ上ドーパミン含有量に変化が認められなかった可能性が考えられた。

線条体の D1 受容体が運動活性に重要な役割を果たすことが、D1 受容体特異的作動薬(Bishop & Walker, 2003)や D1 受容体特異的阻害剤(Shapovalova et al., 2008)を用いた実験で報告されている。このことから、成熟期の SAMP6 の線条体で認められた D1 受容体発現量増加が、成熟期の SAMP6 の高運動活性に関わるメカニズムの 1 つである可能性が示唆された。また、D2/D3 受容体作動薬を側坐核へ微量注入することで運動活性が増加したとの報告 (Barik & Beurepaire, 2005) から、側坐核の D3 受容体が運動活性に関わっている可能性も考えられるが、逆に、側坐核の D3 受容体の運動抑制作用についての報告 (Kamei & Saitoh, 1996、McNamara et al., 2006、Schwartz et al., 1995) もあり、この受容体の運動活性に関わる役割は完全に明らかにはなっていない。このため、本章で認められ

た成熟期の SAMP6 の側坐核における D3 受容体発現量増加が成熟期の SAMP6 の高運動活性に関与しているかどうかは不明である。過剰量のドーパミンが側坐核の D3 受容体発現増加を誘起すること (Fauchey et al., 2000、Levant, 1997) や、ドーパミン活性を調節するオートレセプターとしての D3 受容体の役割 (Levant, 1997、Zapata & Shippenberg, 2002) などの報告もあり、本章で認められた成熟期の SAMP6 の側坐核における D3 受容体発現量増加は、SAMP6 の大脳皮質、側坐核、小脳におけるドーパミン含有量増加に対する代償機構の可能性も考えられる。

中脳辺縁系がドーパミン刺激を受けると側坐核の D3 受容体発現量が増加し、それによって抗鬱作用が認められることが知られている (Lammers et al., 2000) 。このことから、成熟期の SAMP6 の側坐核における D3 受容体発現量増加が、前章で認められた成熟期の SAMP6 の抗鬱に関わるメカニズムの 1 つである可能性が考えられた。

小脳皮質のうち、D2 受容体が存在せず、D3 受容体の分布が認められる第 9 および第 10 小葉 (Barili et al., 2000) へ D2/D3 受容体作動薬を注入することによって回転棒試験における運動協調性が低下したとの報告がある (Kolasiewicz & Maj, 2001) 。このことから、成熟期の SAMP6 の小脳における D3 受容体発現量増加が、成熟期の SAMP6 の運動協調性異常に関わるメカニズムの 1 つである可能性が考えられる。げっ歯類の小脳にはドーパミン受容体の 5 つのサブタイプ全てが発現している (Barili et al., 2000、Bouthenet et al., 1991、Boyson et al., 1986、D'Souza et al., 1997) が、それぞれが運動機能について果たす役割については詳らかにされていない。このため、成熟期の SAMP6 の小脳で認められた D1 受容体の発現量増加が成熟期の SAMP6 の行動にどのような影響を及ぼしているかは、今後検討が必要である。

成熟期の SAMP6 で発現量増加が認められたドーパミン受容体のうち、運動活性への関与が良く知られている D1 受容体 (Desai et al., 2005、Mori et al., 1997、Ralph & Caine, 2005、Smith et al., 1998、Tran et al., 2005) に焦点を当て、促進老化パターンを示す SAMP6 の高運動活性との関連を検討した。D1 受容体特異的作動薬である SKF82958 投与による運動活性変化を指標に、成熟期および老齢期の SAMP6 を用いて、加齢による D1 受容体の感受性の変化を SAMR1 と比較した。Vehicle 投与以外の全ての用量において、成熟期の SAMP6 の運動活性が同月齢の SAMR1 に比べて有意に高かったことから、成熟期の SAMP6 における

D1 受容体感受性の増加もまた、成熟期の SAMP6 の高運動活性に関わるメカニズムの 1 つであることが示唆された。また、SAMR1 では何れの用量においても成熟期と老齢期で運動活性に有意差は認められなかったが、SAMP6 では vehicle 投与以外の全ての用量において老齢期の運動活性が成熟期に比べて有意に低かったことから、加齢に伴い SAMP6 の D1 受容体感受性が低下し、この加齢に伴う D1 受容体感受性の低下が老齢期の SAMP6 で認められる運動活性低下に関わるメカニズムの 1 つであることが示唆された。

成熟期の SAMP6 および SAMR1 の脳組織のパラフィン切片を作成し、全体的な構造を比較したが、光学顕微鏡下では明らかな違いは認められなかった。

以上、SAMP6 の高運動活性に関わる生得的なメカニズム異常として、SAMP6 の線条体および側坐核におけるドーパミン合成酵素の増加、成熟期の高運動活性に関わるメカニズムとして、側坐核におけるドーパミン含有量の増加、線条体における D1 受容体発現量増加、および D1 受容体の感受性増加が関わっている可能性が示唆された。また、SAMP6 で認められた促進老化パターンを示す運動活性の変化は、D1 受容体の感受性の変化によるものである可能性が示唆された。SAMP6 の低不安に関わる生得的なメカニズム異常として、SAMP6 の脳幹におけるセロトニン合成酵素の増加、成熟期の低不安に関わるメカニズムとして、大脳皮質および側坐核におけるセロトニン含有量増加が示唆された。SAMP6 の短期記憶増加に関わる生得的なメカニズム異常として、SAMP6 の線条体および側坐核におけるドーパミン合成酵素の増加、脳幹におけるセロトニン合成酵素の増加、成熟期の短期記憶増加に関わるメカニズムとして、大脳皮質におけるドーパミンおよびセロトニン含有量増加が示唆された。成熟期の SAMP6 の運動協調性異常に関わるメカニズムとして、小脳における D3 受容体発現量増加が示唆された。成熟期における SAMP6 の抗鬱に関わるメカニズムとして、側坐核における D3 受容体の発現量増加が示唆された。

小括

本章では、SAMP6 の行動特性に関わるメカニズムについて明らかにするために、ウエスタンブロット解析、高速液体クロマトグラフィーを用いたモノアミン量の計測、薬物投与実験、および組織学的解析を行い、次のような結果を得た。

1. SAMP6 の高運動活性に関わる生得的なメカニズム異常として、若齢期で認められた線条体および側坐核におけるドーパミン合成酵素の増加、成熟期の高運動活性に関わるメカニズムとして、線条体における D1 受容体発現量増加、側坐核におけるドーパミン含有量の増加および D1 受容体の感受性増加が関わっている可能性が示唆された。また、SAMP6 で認められた促進老化パターンを示す運動活性の変化は、D1 受容体の感受性の変化によるものである可能性が示唆された。
2. SAMP6 の低不安に関わる生得的なメカニズム異常として、若齢期で認められた脳幹におけるセロトニン合成酵素の増加、成熟期の低不安に関わるメカニズムとして、大脳皮質および側坐核におけるセロトニン含有量増加が示唆された。
3. SAMP6 の短期記憶増加に関わる生得的なメカニズム異常として、若齢期で認められた線条体および側坐核におけるドーパミン合成酵素の増加、脳幹におけるセロトニン合成酵素の増加、成熟期の短期記憶増加に関わるメカニズムとして、大脳皮質におけるドーパミンおよびセロトニン含有量増加が示唆された。
4. SAMP6 の成熟期の運動協調性異常に関わるメカニズムとして、小脳における D3 受容体発現量増加が示唆された。
5. SAMP6 の成熟期の抗鬱に関わるメカニズムとして、側坐核における D3 受容体の発現量増加が示唆された。
6. 光学顕微鏡下では、脳の全体的な構造において成熟期の SAMP6 と SAMR1

で明らかな違いは認められなかった。

第 3 章 SAMP6 で認められた短期記憶増加に関わる NMDA 型グルタミン酸受容体シグナルカスケードの検討

序

第 1 章で認められた Y 字迷路試験における SAMP6 の短期記憶増加に、第 2 章で明らかとなった若齢期のドーパミン、セロトニンの合成酵素発現量増加および成熟期の脳皮質におけるドーパミンおよびセロトニン含有量増加が関与している可能性が考えられた。しかしながら、ドーパミンおよびセロトニンは加齢によって減少することが知られている (Goicoechea et al., 1997、Morgan et al., 1987) が、SAMP6 で認められた短期記憶増加には加齢に伴う明らかな変化は認められなかった。従って、SAMP6 の短期記憶増加にはこれらの分子とは異なる別のメカニズムも関与している可能性が考えられた。記憶に関わる分子として良く知られる *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 型グルタミン酸受容体 (Tang et al., 1999、Tsien, 2000) は、短期記憶を評価する実験においても関与が報告されているため (Cao et al., 2007、Lima et al., 2005、Niewoehner et al., 2007、Parada-Turska & Turski, 1990、Rampon et al., 2000) この NMDA 型グルタミン酸受容体に着目することにした。NMDA 型グルタミン酸受容体を構成するサブユニットには、NR1、NR2A、NR2B、NR2C、NR2D、NR3A、および NR3B の 7 種類があり、NMDA 型グルタミン酸受容体は NR1 と NR2 サブユニットもしくは NR3 サブユニットの何れか 1 つとヘテロダイマーを形成する (Dingledine et al., 1991) 。これらのサブユニットのうち、NR1、NR2A、および NR2B サブユニットは前脳に強い発現が認められ、記憶に関与することで良く知られている (Berberich et al., 2005、Liu et al., 2004、Massey et al., 2004、Niewoehner et al., 2007、Rampon et al., 2000、Weitlauf et al., 2005、Zhao et al., 2005) 。

本章では、SAMP6 の短期記憶増加に NMDA 型グルタミン酸受容体が関与しているかどうかを検討するため、NR2 サブユニットのグルタミン酸結合部位に競合的に結合し、NMDA 型グルタミン酸受容体全体の働きを阻害する薬剤である (±)-3-(2-carboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-phosphonic acid (CPP) (Lehmann et al., 1987、Yoneda & Ogita, 1991) を用いて、Y 字迷路試験および新奇物体認識試験における SAMP6 の短期記憶への影響を評価した。また、NR1、NR2A、および NR2B サブユニットの前脳における発現量を SAMP6 と SAMR1 で比較した。SAMP6 で認められる短期記憶増加は、明らかな加齢による影響は認められない

非加齢依存的行動特性であることから、全ての実験は 4 ヶ月齢（成熟期）のマウスを用いて実施した。

材料と方法

1. 動物

日本 SLC より購入した 4 ヶ月齢の雄の SAMR1 および SAMP6 を用いた。導入後、マウスは 12 時間ごとの明暗周期の照明下（8:00 点灯、20:00 消灯）で、マイクロアイソレーションケージ内で 1 週間以上個別飼育し、飼育環境へ馴化させた後に実験に使用した。全ての行動解析実験は、マウス系統を伏せて、10:00 から 16:00 の時間帯に実施した。

2. 化合物

NMDA 型グルタミン酸受容体拮抗薬

($\pm$)-3-(2-carboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-phosphonic acid (CPP、Sigma-Aldrich、St. Louis、IL、アメリカ)を生理食塩水で希釈し、vehicle のみ、5.0、および 10.0mg/kg の用量で行動実験の 30 分前に腹腔内投与を行った。

3. NMDA 型グルタミン酸受容体アンタゴニスト CPP 投与後運動活性計測試験
4 ヶ月齢の SAMR1 および SAMP6 へ vehicle のみ（SAMR1 を 6 匹、SAMP6 を 9 匹）5.0mg/kg（SAMR1 を 5 匹、SAMP6 を 7 匹）および 10.0mg/kg（SAMR1 を 5 匹、SAMP6 を 7 匹）の用量の CPP を投与し、実験に使用した。運動活性計測用ケージ内にマウスを入れ、運動活性計測センサー（LOCOMO LS-5）（図 2）を横切った回数を 10 分間計測した。

4. Y 字迷路試験

4 ヶ月齢の SAMR1 および SAMP6 へ vehicle のみ（SAMR1 を 9 匹、SAMP6 を 6 匹）5.0mg/kg（SAMR1 を 9 匹、SAMP6 を 10 匹）および 10.0mg/kg（SAMR1 を 7 匹、SAMP6 を 6 匹）の用量の CPP を投与し、実験に使用した。3（幅）× 40（奥行）× 25（高さ）cm のアームがそれぞれ 120° の角度で連結した Y 字型の装置（図 7）内にマウスを入れ、10 分間装置内を自由に探索させた。実験は 35lux の照明下で実施した。3 本の足がアームに入った状態をアーム進入と定義し、そのアーム進入の順序を記録した。連続して異なる 3 本のアームを選択し

た回数を交替行動回数とし、 $\text{交替行動回数} / (\text{総移動回数} \cdot 2) \times 100$ の計算式により自発的交替行動率を求め、短期記憶の指標とした。

5. 新奇物体認識試験

4 ヶ月齢の SAMR1 および SAMP6 へ vehicle のみ (SAMR1 を 5 匹、SAMP6 を 6 匹) および 10.0mg/kg (SAMR1 を 5 匹、SAMP6 を 5 匹) の用量の CPP を投与し、実験に使用した。10-25lux の照明下で、35 (幅) × 35 (奥行) × 35 (高さ) cm の装置 (図 27) 内にマウスを入れ、装置内の対称的な一に設置した 2 つの物体への探索行動時間を 10 分間計測し、その比率を比較した。物体から 1cm 以内の距離に鼻吻部が入っている状態を探索行動時間とした。試験は馴化期、習得期、および保持期 (習得期の 2 時間後) からなる。馴化期では、物体は設置せず 15 分間装置内を探索させた。馴化期終了後に CPP 投与を行い、その 30 分後を習得期とし、2 つの同じ物体を設置し 10 分間探索させた。習得期終了後 2 時間後を保持期とし、習得期に使用した物体のうち片方を新しい物体に変え、10 分間探索させた。習得期では 2 つの同じ物体のうちの片方の物体へ、保持期では新しい物体への探索行動時間が全体の探索行動時間に占める割合を求め、短期記憶の指標とした。



図 27. 新奇物体認識試験装置

6. ウエスタンブロット解析による NMDA 型グルタミン酸受容体の発現量比較
4 ヶ月齢の SAMR1 および SAMP6 をそれぞれ 5 匹ずつ使用した。マウスから前脳（大脳皮質 + 海馬）および肝臓を摘出し、上記と同様にタンパクを抽出後、泳動および PVDF メンブレンへの転写を行った。NMDA 型グルタミン酸受容体 1 サブユニット（NR1）（BD Bioscience PharMingen、Franklin Lakes、NJ、アメリカ）NMDA 型グルタミン酸受容体 2A サブユニット（NR2A）（PhosphoSolutions、Aurora、CO、アメリカ）および NMDA 型グルタミン酸受容体 2B サブユニット（NR2B）（Upstate Biotechnology、Billerica、MA、アメリカ）を特異的に認識する抗体を用いて発現量を比較した。タンパク量はシグナル処理ソフト（ImageJ、NIH、Bethesda、MD、アメリカ）を用いてシグナルの強度を数値化し、アクチン量に対する比を求め、SAMR1 と SAMP6 の各タンパク量を比較した。

7. 統計学的処理

データは平均値 ± 標準誤差で表す。統計解析ソフトは Excel Statistics 2006（SSRI、東京、日本）を用いた。データは Student の t 検定もしくは two-、および three-way ANOVA で有意差検定を行い、Bonferroni 補正法もしくは Tukey 多重比較法により群間の比較を行った。

結果

1. CPP 投与後運動活性計測試験

CPP 投与による運動活性への影響を検討するために、CPP 投与後の SAMR1 および SAMP6 の運動活性を計測した。用量効果および用量 × 系統交互作用は認められなかったことから（用量効果： $F(2, 33)=2.45$, $P=0.102$ 、用量 × 系統交互作用： $F(1, 33)=10.88$, $P=0.002$ ）SAMR1 および SAMP6 の両系統ともに、CPP によって運動活性に影響を受けないことが示された（図 28）。

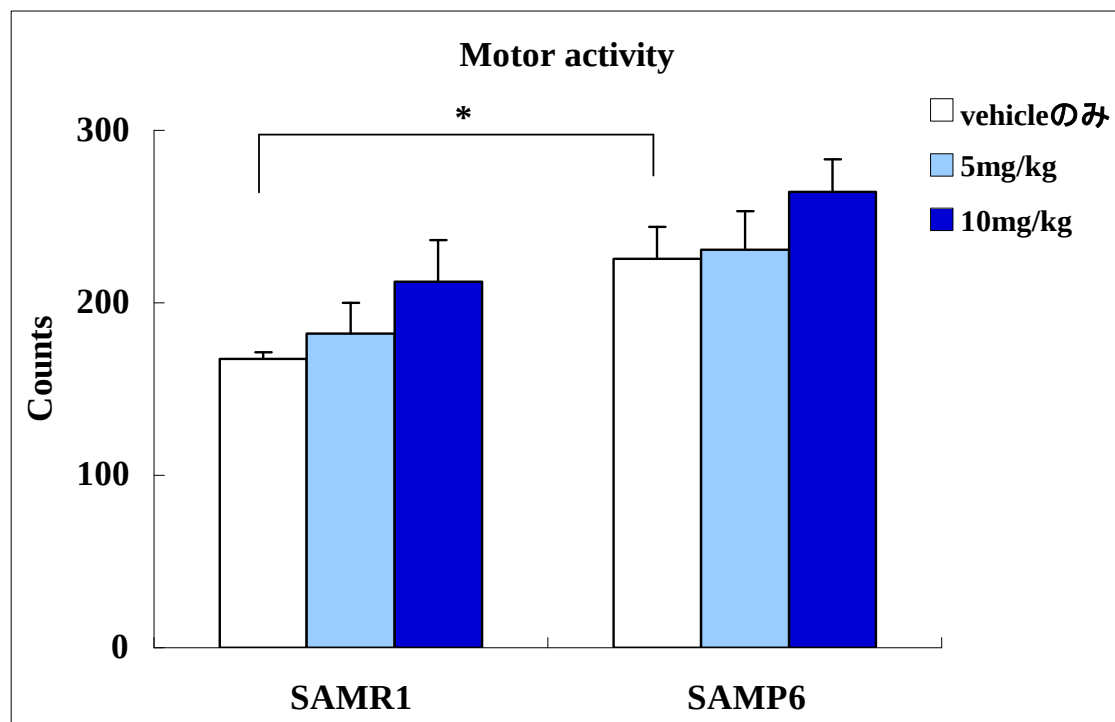


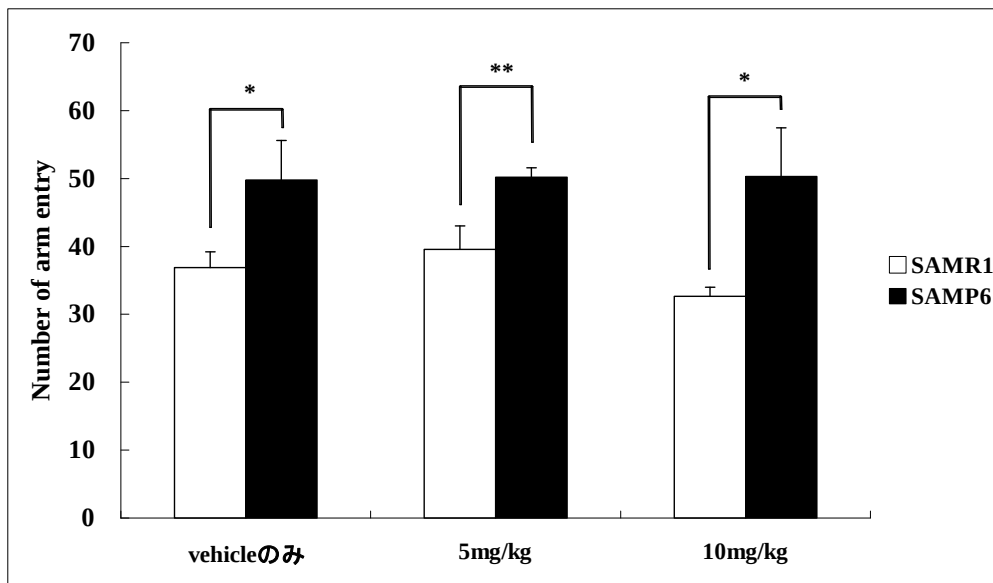
図 28. CPP 投与後運動活性計測試験

4 ヶ月齢の SAMR1 および SAMP6 へ vehicle のみ (SAMR1 を 6 匹、SAMP6 を 9 匹)、5.0mg/kg (SAMR1 を 5 匹、SAMP6 を 7 匹) および 10.0mg/kg (SAMR1 を 5 匹、SAMP6 を 7 匹) の用量の CPP を投与し、実験に使用した。データは平均値 ± 標準誤差で示した。*; $P < 0.05$

2. Y 字迷路試験

全ての用量において、SAMP6 は SAMR1 に比べてアームの進入回数が多かった (vehicle のみ: $F(1, 13) = 5.57$, $P = 0.035$ 、5.0mg/kg: $F(1, 17) = 8.83$, $P = 0.009$ 、10.0mg/kg: $F(1, 11) = 6.81$, $P = 0.024$) (図 29A)。また、CPP 用量と系統間に交互作用は認められなかった ($F(2, 41) = 0.48$, $P = 0.625$)。全ての用量において、SAMP6 の自発的交替行動率は SAMR1 よりも高かった (vehicle のみ: $F(1, 13) = 5.02$, $P = 0.043$ 、5.0mg/kg: $F(1, 17) = 7.85$, $P = 0.012$ 、10.0mg/kg: $F(1, 11) = 5.88$, $P = 0.034$) (図 29B)。SAMR1 では、vehicle 投与に比べて 10.0mg/kg の用量で有意に短期記憶が障害された ($F(1, 14) = 4.73$, $P = 0.047$) (図 29B)。一方、SAMP6 では有意差は認められなかった ($F(1, 10) = 0.28$, $P = 0.759$) (図 29B)。

A



B

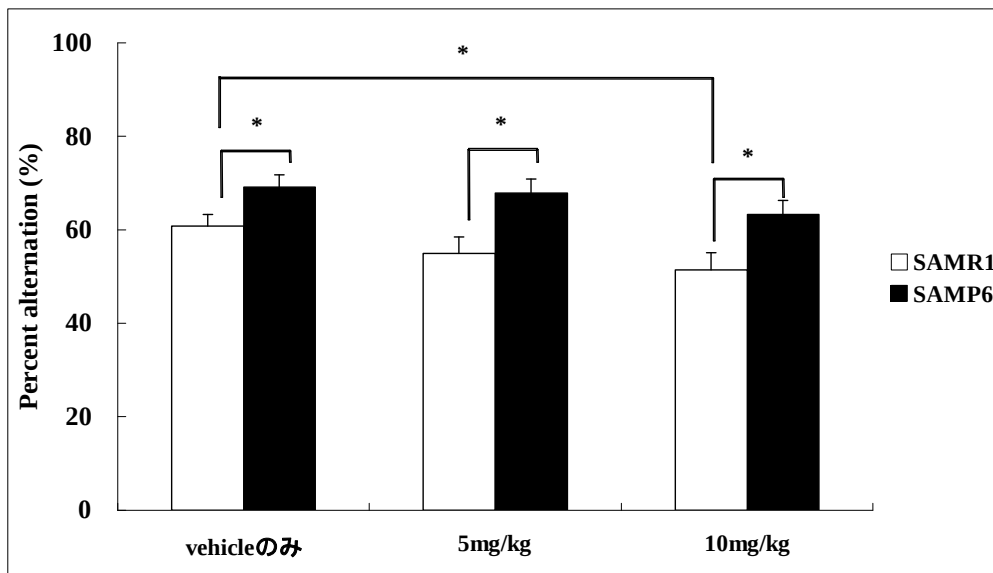


図 29. Y 字迷路試験

4 ヶ月齢の SAMR1 および SAMP6 へ vehicle のみ (SAMR1 を 9 匹、SAMP6 を 6 匹)、5.0mg/kg (SAMR1 を 9 匹、SAMP6 を 10 匹) および 10.0mg/kg (SAMR1 を 7 匹、SAMP6 を 6 匹) の用量の CPP を投与し、実験に使用した。(A) アームの総進入回数。(B) 自発的交替行動率。データは平均値 ± 標準誤差で示した。**: $P < 0.01$ 、*: $P < 0.05$

3. 新奇物体認識試験

習得期において、vehicle 投与群および 10.0mg/kg 投与群ともに SAMR1 と SAMP6 で探索行動時間比に有意差は認められなかった（図 30）。このことから、いずれの系統も 2 つの物体のうちの片方へ偏った探索行動を行っていないこと、および CPP 投与が物体の選択に影響を与えていないことが示された。さらに、2 つの物体への総探索行動時間は、vehicle 投与 SAMR1 で 16.63 ± 2.97 秒、10.0mg/kg 投与 SAMR1 で 14.30 ± 1.07 秒、vehicle 投与 SAMP6 で 22.80 ± 1.29 秒、10.0mg/kg 投与 SAMP6 で 21.64 ± 3.02 秒であり、用量効果および CPP 用量と系統間の交互作用は認められなかった（用量効果： $F(1, 17) = 0.63$, $P = 0.439$, CPP 用量 $\times$ 系統交互作用： $F(1, 17) = 0.07$, $P = 0.793$ ）。このことから CPP が習得期における探索行動自体には影響を与えていないことが示された。保持期において、SAMP6 は SAMR1 に比べて両方の用量で、新奇物体への探索行動時間比が有意に高かった（vehicle のみ： $F(1, 9) = 5.16$, $P = 0.049$ 、10.0mg/kg： $F(1, 8) = 12.72$, $P = 0.007$ ）（図 30）。このことから、SAMP6 の短期記憶増加が示唆された。また、10.0mg/kg の用量で CPP を投与された SAMP6 では短期記憶障害が有意ではなかったのに対して、同じ用量を投与された SAMR1 では有意な障害が認められた（図 30）。

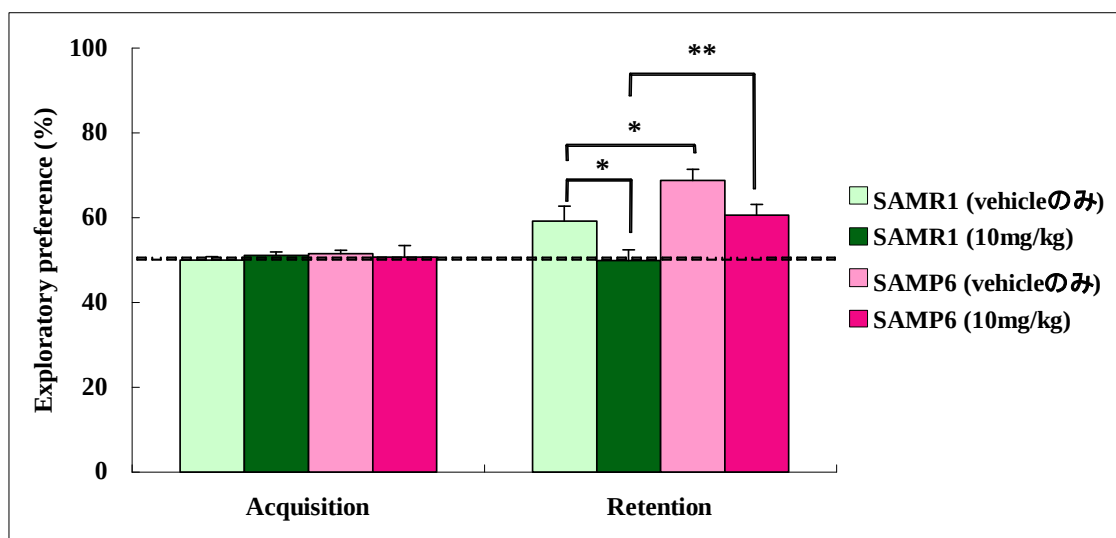


図 30. 新奇物体認識試験

4 ヶ月齢の SAMR1 および SAMP6 へ vehicle のみ（SAMR1 を 5 匹、SAMP6 を 6 匹）および 10.0mg/kg（SAMR1 を 5 匹、SAMP6 を 5 匹）の用量の CPP を投与し、実験に使用した。総探索行動時間に対する片方の物体への探索時間を比（%）で示す。データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。**； $P < 0.01$ 、*； $P < 0.05$

4. ウェスタンブロット解析による NMDA 型グルタミン酸受容体の発現量比較
4 ヶ月齢の SAMR1 および SAMP6 の前脳を用いたウェスタンブロット解析により、SAMP6 の NR2B 発現量が SAMR1 に比べて有意に増加していることが示された ($P < 0.001$, t 検定) (図 31A、31B)。一方、NR1 および NR2A の発現量において SAMR1 と SAMP6 で明らかな違いは認められなかった (図 31A、31B)。

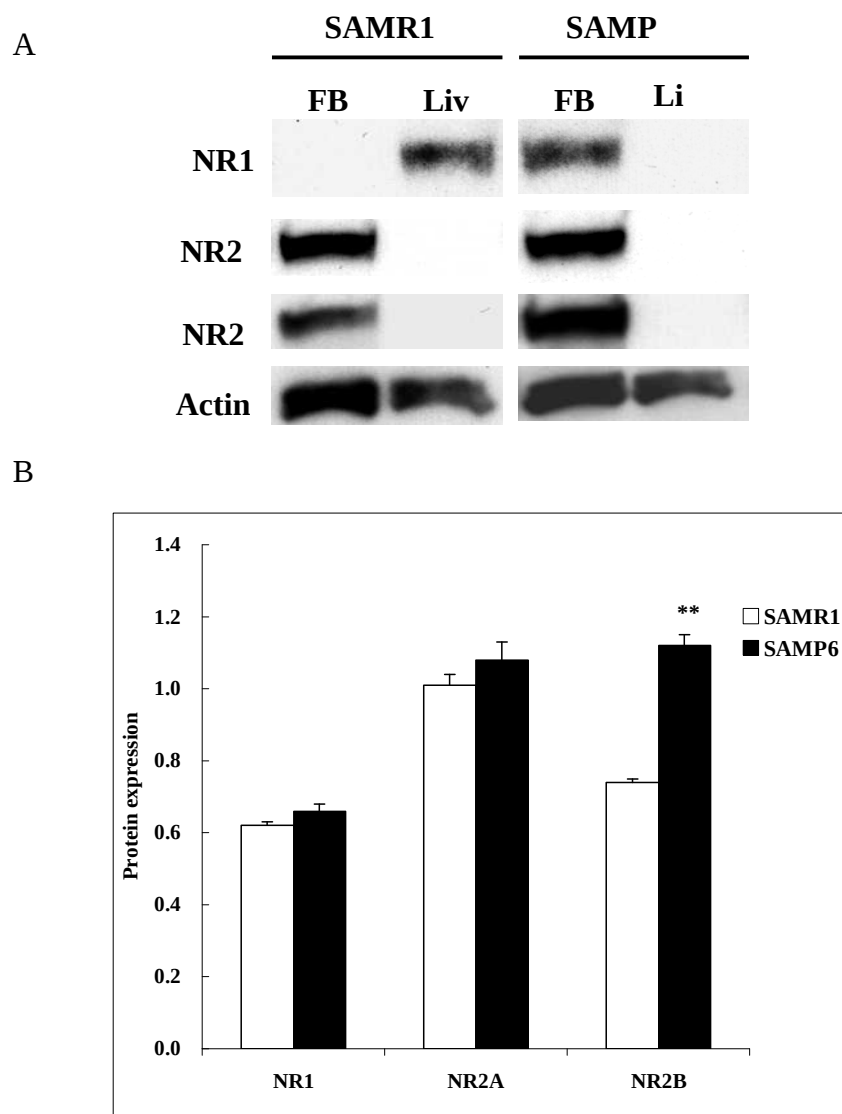


図 31. NMDA 型グルタミン酸受容体 (NR1、NR2A、および NR2B) のウェスタンブロット解析

4 ヶ月齢の SAMR1 および SAMP6 をそれぞれ 5 匹ずつ使用した。(A) 前脳における NR1、NR2A、および NR2B の発現。アクチンは泳動タンパク量の指標とした。(B) タンパク発現量の定量。アクチンタンパク量に対する比で示す。データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。*; $P < 0.01$

考察

CPP 投与後運動活性計測試験において、SAMR1 および SAMP6 の両系統ともに、CPP によって運動活性に影響を受けないことが示された。

CPP 投与を行ったマウスを用いた Y 字迷路試験では、SAMP6 のアーム進入回数は、投与を実施した全ての用量（vehicle のみ、5.0、および 10.0mg/kg）において、SAMR1 よりも多かった。また、SAMP6 の自発的交替行動率は、投与を実施した全ての用量（vehicle のみ、5.0、および 10.0mg/kg）において、SAMR1 よりも高かった。10.0mg/kg の用量の CPP は vehicle 投与に比べて有意に SAMR1 の自発的交替行動率を阻害した。一方、SAMP6 では 10.0mg/kg の用量で若干の自発的交替行動率の低下が認められたが有意ではなかった。このことから、SAMP6 で NMDA 型グルタミン酸受容体シグナルカスケードが亢進している可能性が示唆された。

次に、CPP 投与を行ったマウスを用いて、短期記憶を評価する別の行動試験である新奇物体認識試験を行った。Y 字迷路試験において SAMR1 の短期記憶を有意に阻害した用量が 10.0mg/kg であるため、この試験では CPP 投与量は 10.0 mg/kg で行った。まず習得期において、両系統ともに CPP 投与の有無に関わらず、同じ 2 つの物体のうちの片方への偏った探索行動は認められず、CPP 投与が物体の選択に影響を与えていないことが示された。CPP 投与後運動活性計測試験で得られた結果とも一致して、両系統ともに 2 つの物体への総探索行動時間は CPP 投与の有無によって変化しないことから、総探索行動時間の長短によって保持期の成績が影響を受けた訳ではないことが示された。保持期では、SAMP6 は SAMR1 に比べて両方の用量で新奇物体への探索行動時間比が有意に高く、SAMP6 の短期記憶増加が示唆された。また、10.0mg/kg の用量で CPP を投与された SAMP6 では短期記憶阻害が有意ではなかったのに対して、同じ用量を投与された SAMR1 では有意な阻害が認められた。このことから、新奇物体認識試験においても、SAMP6 の短期記憶増加に NMDA 型グルタミン酸受容体シグナルカスケードの亢進が関わっている可能性が示唆された。

NMDA 型グルタミン酸受容体シグナルカスケード亢進の原因として、NMDA 型グルタミン酸受容体の発現量自体の増加と NMDA 型グルタミン酸受容体の感受性増加の可能性が考えられる。そこで、ウエスタンブロット解析により NMDA 型グルタミン酸受容体の発現量を比較することにした。海馬歯状回の顆粒細胞特異的に NR1 を破壊したノックアウトマウスで three-from-six 放射状迷路試験に

において短期記憶が低下したという報告 (Niewoehner et al., 2007) や、前脳特異的に NR2B が過剰発現するトランスジェニックマウスで T 字迷路試験における短期記憶が増加したという報告 (Cao et al., 2007) また、海馬 CA1 領域特異的 NR1 ノックアウトマウスを用いた新奇物体認識試験で短期記憶の低下が認められたという報告 (Rampon et al., 2000) などから、前脳の NMDA 型グルタミン酸受容体が短期記憶に重要であると考えられた。そこで本研究では、SAMP6 および SAMR1 より前脳を採取し、ウエスタンブロット解析により、NR1、NR2A、および NR2B サブユニットの発現量を比較した。その結果、SAMP6 の前脳における NR2B サブユニットの発現量が SAMR1 に比べて多いことが明らかになった。一方、NR1 および NR2A サブユニットの発現量については、SAMP6 と SAMR1 で違いは認められなかった。このことから、NR2B の発現量増加が、SAMP6 で認められた短期記憶の増加に関わるメカニズムの 1 つである可能性が示唆された。

小括

本章では、第 1 章において Y 字迷路試験で認められた SAMP6 の短期記憶増加に関わるメカニズムとして、第 2 章で明らかとなった大脳皮質におけるセロトニン、ドーパミン含有量増加以外に、NMDA 型グルタミン酸受容体が関与しているかどうかを検討し、次のような結果を得た。

1. CPP 投与後運動活性計測試験では、SAMR1 および SAMP6 の両系統ともに、CPP によって運動活性に影響を受けないことが示された。
2. CPP 投与を行ったマウスを用いた Y 字迷路試験では、CPP の用量に関わらず SAMP6 の高運動活性が認められた。また、CPP の用量に関わらず SAMR1 に比べて SAMP6 の短期記憶増加が認められた。10.0mg/kg の用量の CPP は有意に SAMR1 の短期記憶を阻害したが、SAMP6 では有意な阻害は認められなかったことから、SAMP6 の NMDA 型グルタミン酸受容体シグナルカスケード亢進が示唆された。
3. CPP 投与を行ったマウスを用いた新奇物体認識試験では、習得期において CPP 投与の有無に関わらず、両系統ともに同じ 2 つの物体のうちの片方への偏った探索行動は認められなかった。また、保持期において SAMP6 は SAMR1 に比べて全ての用量で新奇物体への探索行動時間比が有意に高く、新奇物体認識試験においても SAMP6 の短期記憶増加が示された。また、10.0mg/kg の用量の CPP は有意に SAMR1 の短期記憶を阻害したが、SAMP6 では有意な阻害は認められなかったことから、SAMP6 の NMDA 型グルタミン酸受容体シグナルカスケード亢進が示唆された。
4. SAMP6 の前脳において NR2B サブユニットの発現量増加が認められた。NR1 および NR2A サブユニットの発現量は、SAMP6 と SAMR1 で違いは認められなかったことから、前脳の NR2B 発現量増加が SAMP6 の短期記憶増加に関わるメカニズムの 1 つである可能性が示唆された。

総括

SAMP6 の骨密度は 4 ヶ月齢でピーク値を示し、加齢に伴ってコントロールマウスよりも急速に骨密度が減少することから、促進老化を示す骨粗鬆症のモデル動物とされてきた。近年、老化の指標とされる脳内 S100 β の蓄積が SAMP6 で加齢に伴って増加していることが報告され、中枢神経系領域における老化モデル動物としての可能性が注目されているが、その検討はあまり進んでいない。そこで本研究では、1 ヶ月齢（若齢期）、4～6 ヶ月齢（成熟期）、8～12 ヶ月齢（老齢期）のライフステージごとに包括的行動解析試験を行い、SAMP6 の加齢に伴う行動特性の変化とそのメカニズムを検討した。

包括的行動解析試験により、対照の SAMR1 マウスに比べて SAMP6 は生得的な高運動活性、低不安、短期記憶増加、運動協調性異常および抗鬱という行動特性を有していることが明らかとなった。SAMP6 は若齢期から成熟期までは高運動活性を示すが老齢期では SAMR1 よりも低運動活性を示すことから、SAMP6 の運動活性は、骨密度の変化と同様に成熟期をピークとする促進老化パターンを示すと考えられた。SAMP6 の運動協調性については、若齢期および老齢期では SAMR1 に比べて著しい異常が認められるが成熟期では部分的に回復することから、SAMP6 は生得的な運動協調性異常を示し、さらに成熟期をピークとする促進老化パターンを示すと考えられた。一方、低不安や抗鬱については、若齢期をピークとして加齢に伴って SAMR1 との差が減少したことから、促進老化とは異なるパターンで加齢の影響を受ける行動特性であると考えられた。また、短期記憶増加については明らかな加齢の影響は認められなかった。これらの結果から、SAMP6 の行動様式を対照である SAMR1 と比較して加齢の影響について分類すると、促進老化パターンを示す行動特性（促進老化様行動特性）として高運動活性および運動協調性異常、促進老化とは異なるパターンの加齢の影響が認められる行動特性（加齢依存的变化を伴う行動特性）として低不安および抗鬱、明らかな加齢の影響が認められない行動特性（非加齢依存の行動特性）として短期記憶増加、の 3 つに分類することが出来た。

SAMP6 の促進老化様行動特性のうちの高運動活性について、運動機能に関わる分子としてよく知られているドーパミンシステムに着目し、そのメカニズムを生化学的手法および薬理学的手法により検討した。若齢期の SAMP6 の線条体および側坐核で、ドーパミン合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素およびそのリン酸化フォームの発現量が増加していることから、SAMP6 の脳内ドーパ

ミン量増加が示唆され、SAMP6 の高運動活性に関わる生得的な異常の 1 つであると考えられた。また、成熟期の SAMP6 の線条体で D1 受容体の発現量増加、D1 受容体のシグナルカスケード亢進および側坐核のドーパミン含有量増加が認められ、これらが成熟期の SAMP6 の高運動活性に関わるメカニズムである可能性が示唆された。老齢期の SAMP6 で、成熟期に比べて顕著に D1 受容体の感受性が低下し、この加齢に伴う D1 受容体の感受性低下が老齢期の SAMP6 で認められる運動活性の低下に関わるメカニズムの 1 つであることが示唆された。これらの結果から、SAMP6 で認められた運動活性の促進老化様変化に関わるメカニズムとして D1 受容体の感受性の変化が示唆された。ヒトの老齢期に発症するパーキンソン病の原因の 1 つに D1 受容体シグナルカスケード活性の低下が報告されている (Palacios et al., 1988、Cortes et al., 1989、Ossowska, 1993、)。本研究において、SAMP6 においても老齢期で D1 受容体感受性が低下することにより運動活性低下が認められたことから、パーキンソン病の予防法や新たな治療薬の開発のために、SAMP6 が重要なツールとなることが期待される。また、成熟期の SAMP6 で認められた小脳における D3 受容体発現量増加が SAMP6 の運動協調性異常に関わるメカニズムの 1 つであると考えられたが、これが SAMP6 の運動協調性の促進老化様変化に関わるかどうか判断するためには、若齢期および老齢期における小脳の D3 受容体発現量を調べて、その変化の有無を検討する必要がある。

次に、加齢依存的変化を伴う行動特性である SAMP6 の低不安および抗鬱に関わるメカニズムについて、不安や鬱などの情動に関わる分子として良く知られているセロトニンシステムに着目し、検討した。若齢期の SAMP6 の脳幹で、セロトニン合成の律速酵素であるトリプトファン水酸化酵素およびそのリン酸化フォームの発現量が増加していることから、SAMP6 の脳内セロトニン量増加が示唆され、SAMP6 の低不安および抗鬱に関わる生得的な異常の 1 つであると考えられた。また、成熟期の SAMP6 で大脳皮質および側坐核のセロトニン含有量が増加していることから、これが成熟期の SAMP6 の低不安および抗鬱に関わるメカニズムである可能性が示唆された。これらが SAMP6 の不安および鬱状態の加齢依存的変化に関わるかどうかについては、若齢期および老齢期のマウスを用いてセロトニン含有量を計測し、その変化の有無を検討する必要がある。

最後に、非加齢依存的行動特性である SAMP6 の短期記憶増加に関わるメカニズムについて、短期記憶に関わるものが良く知られているドーパミン、セロト

ニン、および NMDA 型グルタミン酸受容体に着目し、検討した。若齢期の SAMP6 の線条体および側坐核ではドーパミン合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素およびそのリン酸化フォームの発現量が増加し、脳幹ではセロトニン合成の律速酵素であるトリプトファン水酸化酵素およびそのリン酸化フォームの発現量が増加していることから、SAMP6 の脳内ドーパミン量およびセロトニン量増加が SAMP6 の短期記憶増加に関わる生得的な異常の 1 つであることが示唆された。また、成熟期の前脳で NMDA 受容体の NR2B サブユニットの発現量が増加していることから、NMDA 受容体シグナルカスケード亢進もまた成熟期の SAMP6 の短期記憶増加に関わるメカニズムの一つであると思われる。老齢期の SAMP6 でこれらのメカニズムが変化しているかどうかは今後検討する必要がある。

本研究より、SAMP6 が加齢に伴って様々な病態を示すことが包括的行動解析試験により明らかとなり、生化学的および薬理学的研究手法を用いることにより、その病態メカニズムには複数の因子が関与していることが示唆された。このマウスを用いて研究することで、加齢による脳高次機能の変化とそのメカニズムが明らかになり、さらに脳高次機能を活性化させるシグナルカスケードに作用する化合物を探索できれば、健康寿命の延長や QOL 向上に貢献すると思われる。

謝辞

本論文をまとめるにあたり、終始御懇切なる御指導と御校閲を賜りました北海道大学大学院 獣医学研究科 比較形態機能学講座 薬理学教室 伊藤 茂男 教授に謹んで深謝申し上げます。

本論文を審査下さいました北海道大学大学院 獣医学研究科 動物疾病制御学講座 実験動物学教室 安居院 高志 教授、並びに同比較形態機能学講座 生化学教室 木村 和弘 教授、理化学研究所 脳科学総合研究センター リサーチリソースセンター 板倉 智敏 グループディレクターに深く感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、御指導御助言頂き、常に励まして下さいました理化学研究所 脳科学総合研究センター リサーチリソースセンター 動物実験支援ユニット 高橋 英機 ユニットリーダーに感謝申し上げます。

本研究の機会を与えて頂きました財団法人 脳科学・ライフテクノロジー研究所 伊藤 正男 理事長に感謝申し上げます。

本研究の実験遂行にあたり、技術的支援をいただきました理化学研究所 脳科学総合研究センター リサーチリソースセンター 動物実験支援ユニット 酒巻 有里子氏、浅野 智子氏、並びに長谷川 志氏（現在は基幹研究所）に厚くお礼を申し上げます。

参考文献

1. Abe M, Nakai H, Tabata R, Saito K, Egawa M (1998) Effect of 5-{3-[(2S)-1,4-benzodioxan-2-ylmethyl] amino] propoxy}-1, 3-benzodioxole HCL (MKC-242), a novel 5-HT_{1A}-receptor agonist, on aggressive behavior and marble burying behavior in mice. *Jpn J Pharmacol* 76: 297-304
2. Apps R, Garwicz M (2005) Anatomical and physiological foundations of cerebellar information processing. *Nature Rev Neurosci* 4: 297-311
3. Barik S, Beaupaire R (2005) Dopamine D₃ modulation of locomotor activity and sleep in the nucleus accumbens and in lobules 9 and 10 of the cerebellum in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29: 718-726
4. Barili P, Bronzetti E, Ricci A, Zaccheo D, Amenta F (2000) Microanatomical localization of dopamine receptor protein immunoreactivity in the rat cerebellar cortex. *Brain Res* 854: 130-138
5. Berberich S, Punnakal P, Jensen V, Pawlak V, Seeburg PH, Hvalby O, Kohr G (2005) Lack of NMDA receptor subtype selectivity for hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* 25: 6907-6910
6. Bishop C, Walker PD (2003) Combined intrastriatal dopamine D₁ and serotonin 5-HT₂ receptor stimulation reveals a mechanism for hyperlocomotion in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Neuroscience* 121: 649-657
7. Bolivar VJ, Caldarone BJ, Reilly AA, Flaherty L (2000) Habituation of activity in an open field: A survey of inbred strains and F1 hybrids. *Behav Genet* 30: 285-293
8. Bothe GWM, Bolivar VJ, Vedder MJ, Geistfeld JG (2005) Behavioral differences among fourteen inbred mouse strains commonly used as disease models. *Comp Med* 55: 326-334

9. Bouthenet ML, Souil E, Martres MP, Sokoloff P, Giros B, Schwartz JC (1991) Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA. *Brain Res* 564: 203-219
10. Boyson SJ, McGonigle P, Molinoff PB (1986) Quantitative autoradiographic localization of the D1 and D2 subtypes of dopamine receptors in rat brain. *J Neurosci* 6: 3177-3188
11. Breese GR, Duncan GE, Napier TC, Bondy SC, Iorio LC, Mueller RA (1987) 6-Hydroxydopamine treatments enhance behavioral responses to intracerebral microinjection of D1- and D2-dopamine agonists into nucleus accumbens and striatum without changing dopamine antagonist binding. *J Pharmacol Exp Ther* 240: 167-176
12. Brooks SP, Pask T, Jones L, Dunnett SB (2005) Behavioural profiles of inbred mouse strains used as transgenic backgrounds. II: cognitive tests. *Genes Brain Behav* 4: 307-317
13. Brozoski TJ, Brown RM, Rosvold HE, Goldman PS (1979) Cognitive deficit caused by regional depletion of dopamine in prefrontal cortex of rhesus monkey. *Science* 205: 929-932
14. Cao X, Cui Z, Feng R, Tan YP, Qin Z, Mei B, Tsien JZ (2007) Maintenance of superior learning and memory function in NR2B transgenic mice during aging. *Eur J Neurosci* 25: 1815-1822
15. Carvalho MC, Albrechet-Souza L, Masson S, Brandao ML (2005) Changes in the biogenic amine content of the prefrontal cortex, amygdala, dorsal hippocampus, and nucleus accumbens of rats submitted to single and repeated sessions of the elevated plus-maze test. *Braz J Med Biol Res* 38: 1857-1866
16. Chen GH, Wang YJ, Wang XM, Zhou JN (2004) Accelerated senescence prone mouse-8 shows early onset of deficits in spatial learning and memory in the radial

six-arm water maze. *Physiol Behav* 82: 883-890

17. Chen GH, Wang C, Yangcheng HY, Liu RY, Zhou JN (2007) Age-related changes in anxiety are task-specific in the senescence-accelerated prone mouse 8. *Physiol Behav* 91: 644-651

18. Chida Y, Sudo N, Mori J, Kubo C (2006) Social isolation stress impairs passive avoidance learning in senescence-accelerated mouse (SAM). *Brain Res* 1067: 201-208

19. Clarke HF, Dalley JW, Crofts HS, Robbins TW, Roberts AC (2004) Cognitive inflexibility after prefrontal serotonin depletion. *Science* 304: 878-880

20. Cortes R, Camps M, Gueye B, Probst A, Palacios JM (1989) Dopamine receptors in human brain: autoradiographic distribution of D1 and D2 sites in Parkinson syndrome of different etiology. *Brain Res* 483: 30-38

21. Crawley JN (2000) *What's wrong with my mouse?*, 1st ed., Wiley-liss press, NY

22. Deacon RMJ, Bannerman DM, Kirby BP, Croucher A, Rawlins JNP (2002) Effects of cytotoxic hippocampal lesions in mice on a cognitive test battery. *Behav Brain Res* 133: 57-68

23. De La Garza R 2nd, Mahoney JJ 3rd (2004) A distinct neurochemical profile in WKY rats at baseline and in response to acute stress: implications for animal models of anxiety and depression. *Brain Res* 1021: 209-218

24. Desai RI, Terry P, Katz JL (2005) A comparison of the locomotor stimulant effects of D1-like receptor agonists in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 81: 843-848

25. Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1991) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51: 7-61

26. D'Souza U, McGuffin P, Buckland PR (1997) Antipsychotic regulation of dopamine D1, D2 and D3 receptor mRNA. *Neuropharmacol* 36: 1689-1696
27. Fauchey V, Jaber M, Caron MG, Bloch B, Le Moine C (2000) Differential regulation of the dopamine D1, D2 and D3 receptor gene expression and changes in the phenotype of the striatal neurons in mice lacking the dopamine transporter. *Eur J Neurosci* 12: 19-26
28. Fetsko LA, Xu R, Wang Y (2005) Effects of age and dopamine D2L receptor-deficiency on motor and learning functions. *Neurobiol Aging* 26: 521-30
29. Flood JF, Morley JE (1998) Learning and memory in the SAMP8 mouse. *Neurosci Biobehav Rev* 22: 1-20
30. Gainetdinov RR, Wetsel WC, Jones SR, Levin ED, Jaber M, Caron MG (1999) Role of serotonin in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity. *Science* 283: 397-401
31. Goicoechea C, Ormazabal HJ, Alfaro MJ, Martin MI (1997) Age-related changes in nociception, behavior, and monoamine levels in rats. *Gen Pharmacol* 28: 331-336
32. Griffin WST, Sheng JG, Mrak RE (1998) Senescence-accelerated overexpression of S100 β in brain of SAMP6 mice. *Neurobiol Aging* 19: 71-76
33. Harada WJ, Haycock JW, Goldstein M (1996) Regulation of L-DOPA biosynthesis by site-specific phosphorylation of tyrosine hydroxylase in AtT-20 cells expressing wild-type and serine 40-substituted enzyme. *J Neurochem* 67: 629-635
34. Hiroi N, Martin AB, Grande C, Alberti I, Rivera A, Moratalla R (2002) Molecular dissection of dopamine receptor signaling. *J Chem Neuroanat* 23: 237-242

35. Ichimaru Y, Egawa T, Sawa A (1995) 5-HT_{1A}-receptor subtype mediates the effect of fluvoxamin, a selective serotonin reuptake inhibitor, on marble-burying behavior in mice. *Jpn J Pharmacol* 68: 65-70
36. Ikemoto S, Panksepp J (1999) The role of nucleus accumbens dopamine in motivated behavior: a unifying interpretation with special reference to reward-seeking. *Brain Res Rev* 31: 6-41
37. Jackson DM, Anden NE, Engel J, Liljequist S (1975) The effect of long-term penifluidol treatment on the sensitivity of the dopamine receptors in the nucleus accumbens and in the corpus striatum. *Psychopharmacologia* 45: 151-155
38. Jilka RL, Weinstein RS, Takahashi K, Parfitt AM, Manolagas SC (1996) Linkage of decreased bone mass with impaired osteoblastogenesis in a murine model of accelerated senescence. *J Clin Invest* 97: 1732-1740
39. Kamei J, Saitoh A (1996) Modification of the effects of 7-OH-DPAT, a dopamine D₃-receptor agonist, on morphine-induced hyperlocomotion by diabetes. *Life Sci* 59: 773-780
40. Karakuyu S, Herold C, Gunturkun O, Diekamp B (2007) Differential increase of extracellular dopamine and serotonin in the 'prefrontal cortex' and striatum of pigeons during working memory. *Eur J Neurosci* 26: 2293-2302
41. Kasai S, Shimizu M, Matsumura T, Okudaira S, Matsushita M, Tsuboyama T, Nakamura T, Hosokawa M (2004) Consistency of low bone density across bone sites in SAMP6 laboratory mice. *J Bone Miner Metab* 22: 207-214
42. Kolasiewicz W, Maj J (2001) Locomotor hypoactivity and motor disturbances-behavioral effects induced by intracerebellar microinjections of dopaminergic DA-D₂/D₃ receptor agonists. *Pol J Pharmacol* 53: 509-515

43. Kuhn DM, Arthur R Jr, States JC (1997) Phosphorylation and activation of brain tryptophan hydroxylase: identification of serine-58 as a substrate site for protein kinase A. *J Neurochem* 68: 2220-2203
44. Lammers CH, Diaz J, Schwartz JC, Sokoloff P (2000) Selective increase of dopamine D3 receptor gene expression as a common effect of chronic antidepressant treatments. *Mol Psychiatry* 5: 378-388
45. Levant B (1997) The D3 dopamine receptor: neurobiology and potential clinical relevance. *Pharmacol Rev* 49: 231-252
46. Lehmann J, Schneider J, McPherson S, Murphy DE, Bernard P, Tsai C, Bennett DA, Pastor G, Steel DJ, Boehm D (1987) CPP, a selective N-methyl-D-aspartate (NMDA)-type receptor antagonist: characterization in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 240: 737-746
47. Lhotellier L, Perez-Diaz F, Cohen-Salmon C (1993) Locomotor and exploratory activity in three inbred strains of mice from young adulthood to senescence. *Exp Aging Res* 19: 177-187
48. Lima MNM, Laraja DC, Bromberg E, Roesler R, Schroder N (2005) Pre- or post-training administration of NMDA receptor blocker MK-801 impairs object redognition memory in rats. *Behav Brain Res* 156: 139-143
49. Liu CZ, Yu JC, Cheng HY, Jiang ZG, Li T, Zhang XZ, Zhang LL, Han JX (2006) Spatial memory performance and hippocampal neuron number in osteoporotic SAMP6 mice. *Exp Neurol* 201: 452-460
50. Liu L, Wong TP, Pozza MF, Lingenhoehl K, Wang Y, Sheng M, Auberson YP, Wan YT (2004) Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science* 304: 1021-1024

51. Logue SF, Owen EH, Rasmussen DL, Wehner JM (1997) Assessment of locomotor activity, acoustic and tactile startle, and prepulse inhibition of startle in inbred mouse strains and F1 hybrids: implications of genetic background for single gene and quantitative trait loci analyses. *Neuroscience* 80: 1075-1086
52. Londei T, Valentini AMV, Leone VG (1998) Investigative burying by laboratory mice may involve non-functional, compulsive, behaviour. *Behav Brain Res* 94: 249-254
53. Luine V, Bowling D, Hearn M (1990) Spatial memory deficits in aged rats: contributions of monoaminergic systems. *Brain Res* 537: 271-278
54. Massey PV, Johnson BE, Moulton PR, Auberson YP, Brown MW, Molnar E, Collingridge GL, Bashir ZI (2004) Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in cortical long-term potentiation and long-term depression. *J Neurosci* 24: 7821-7828
55. Matsushita M, Tsuboyama T, Kasai R, Okumura H, Yamamuro T, Higuchi K, Higuchi K, Kohno A, Yonezu T, Utani A, Umezawa M, Takeda T (1986) Age-related changes in bone mass in the senescence-accelerated mouse (SAM). SAM-R/3 and SAM-P/6 as new murine models for senile osteoporosis. *Am J Pathol* 125: 276-283
56. McNamara RK, Levant B, Taylor B, Ahlbrand R, Liu Y, Sullivan JR, Stanford K, Richtand NM (2006) C57BL/6J mice exhibit reduced dopamine D3 receptor-mediated locomotor-inhibitory function relative to DBA/2J mice. *Neuroscience* 143: 141-153
57. Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78: 189-225
58. Miyamoto M, Kiyota Y, Yamazaki N, Nagaoka A, Matsuo T, Nagawa Y, Takeda T (1986) Age-related changes in learning and memory in senescence-accelerated mouse (SAM). *Physiol Behav* 38: 399-406

59. Miyamoto M, Kiyota Y, Nishiyama M, Nagaoka A (1992) Senescence-accelerated mouse (SAM): age-related reduced anxiety-like behavior in the SAM-P/8 strain. *Physiol Behav* 51: 979-985
60. Miyamoto M (1994) Experimental techniques for developing new drugs acting on dementia (8) – Characteristics of behavioral disorders in senescence-accelerated mouse (SAMP8): possible animal model for dementia. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 14: 323-335
61. Miyamoto M (1997) Characteristics of age-related behavioral changes in senescence-accelerated mouse SAMP8 and SAMP10. *Exp Gerontol* 32: 139-148
62. Morgan DG, May PC, Finch CE (1987) Dopamine and serotonin systems in human and rodent brain: effects of age and neurodegenerative disease. *J Am Geriatr Soc* 35: 334-345
63. Mori T, Murase K, Tanaka J, Ichimaru Y (1997) Biphasic effects of D3-receptor agonists, 7-OH-DPAT and PD128907, on the D1-receptor agonist-induced hyperactivity in mice. *Jpn J Pharmacol* 73: 251-254
64. Niewoehner B, Single FN, Hvalby O, Jensen V, Borgloh SMA, Seeburg PH, Rawlins JNP, Sprengel R, Bannerman DM (2007) Impaired spatial working memory but spared spatial reference memory following functional loss of NMDA receptors in dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 25: 837-846
65. Niimi K, Takahashi E, Itakura C (2008a) Emotional behavior and expression patterns of tyrosine hydroxylase and tryptophan hydroxylase in senescence-accelerated mouse (SAM) P6 mice. *Behav Brain Res* 188:329-336
66. Niimi K, Takahashi E, Itakura C (2008b) Improved short-term memory and increased expression of NR2B observed in senescence-accelerated mouse (SAM) P6. *Exp Gerontol* 43:847-852

67. Niimi K, Takahashi E, Itakura C (2008c) Analysis of motor function and dopamine systems of SAMP6 mouse. *Physiol Behav* (doi:10.1016/j.physbeh.2008.11.012)
68. Niimi K, Takahashi E, Itakura C (2009) Age dependence of motor activity and sensitivity to dopamine receptor 1 agonist, SKF82958, of inbred AKR/J, BALB/c, C57BL/6J, SAMR1, and SAMP6 strains. *Brain Res* 125: 175-182
69. Numata T, Saito T, Maekawa K, Takahashi Y, Saitoh H, Hosokawa T, Fujita H, Kurasaki M (2002) Bcl-2-linked apoptosis due to increase in NO synthase in brain of SAMP10. *Biochem Biophys Res Commun* 297: 517-522
70. Okuma Y, Nomura Y (1998) Senescence-accelerated mouse (SAM) as an animal model of senile dementia: pharmacological, neurochemical and molecular biological approach. *Jpn J Pharmacol* 78: 399-404
71. Okuma Y, Murayama T, Tha KK, Yamada C, Hosokawa M, Ishikawa A, Watanabe R, Maekawa M, Nomura Y (2000) Learning deficiency and alterations in acetylcholine receptors and protein kinase C in the brain of senescence-accelerated mouse (SAM)-P10. *Mech Ageing Dev* 114: 191-199
72. Ossowska K (1993) Disturbances in neurotransmission processes in aging and age-related diseases. *Pol J Pharmacol* 45: 109-131
73. Owen EH, Logue SF, Rasmussen DL, Wehner JM (1997) Assessment of learning by the Morris water task and fear conditioning in inbred mouse strains and F1 hybrids: Implications of genetic background for single gene mutations and quantitative trait loci analyses. *Neuroscience* 80: 1087-1099
74. Palacios JM, Camps M, Cortes R, Probst A (1988) Mapping dopamine receptors in the human brain. *J Neural Transm (Suppl)* 27: 227-235
75. Parada-Turska J, Turski WA (1990) Excitatory amino acid antagonists and memory: effect of drugs acting at N-methyl-D-aspartate receptors in learning and

memory tasks. *Neuropharmacology* 29: 1111-1116

76. Pijnenburg AJ, Honig WM, Van der Heyden JA, Van Rossum JM (1976) Effects of chemical stimulation of the mesolimbic dopamine system upon locomotor activity. *Eur J Pharmacol* 35: 45-58

77. Pinel JPJ, Treit D (1978) Burying as a defensive response in rats. *J Comp Physiol Psychol* 92: 708-712

78. Pinel JPJ, Treit D, Ladak F, MacLennan AJ (1980) Conditioned defensive burying in rats free to escape. *Anim Learning Behav* 8: 447-451

79. Ralph RJ, Caine SB (2005) Dopamine D1 and D2 agonist effects on prepulse inhibition and locomotion: comparison of Sprague-Dawley rats to Swiss-Webster, 129X1/SvJ, C57BL/6J, and DBA/2J mice. *J Pharmacol Exp Ther* 312: 733-741

80. Rampon C, Tang YP, Goodhouse J, Shimizu E, Kyn M, Tsien JZ (2000) Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nature Neurosci* 3: 238-244

81. Rodgers RJ, Nikulina EM, Cole JC (1994) Dopamine D₁ and D₂ receptor ligands modulate the behaviour of mice in the elevated plus maze. *Pharmacol Biochem Behav* 49: 985-995

82. Rubinstein M, Phillips TJ, Bunzow JR, Falzone TL, Dziewczapolski G, Zhang G, Fang Y, Larson JL, McDougall JA, Chester JA, Saez C, Pugsley TA, Gershanik O, Low MJ, Grandy DK (1997) Mice lacking dopamine D4 receptors are supersensitive to ethanol, cocaine, and methamphetamine. *Cell* 90: 991-1001

83. Sahakian BJ, Sarna GS, Kantamaneni BD, Jackson A, Huston PH, Curzon G (1985) Association between learning and cortical catecholamines in non-drug-treated rats. *Psychopharmacology* 86: 339-343

84. Sanchez-Barcelo EJ, Megias M, Verduga R, Crespo D (1997) Differences between the circadian system of two strains of senescence-accelerated mice (SAM). *Physiol Behav* 62: 1225-1229
85. Schwarting RK, Thiel CM, Muller CP, Huston JP (1998) Relationship between anxiety and serotonin in the ventral striatum. *Neuroreport* 9: 1025-1029
86. Schwartz JC, Griffon N, Diaz J, Levesque D, Sautel F, Sokoloff P, Simon P, Costentin J, Garrido F, Mann A (1995) The D3 receptor and its relevance in psychiatry. *Int Clin Psychopharmacol (Suppl)* 3: 15-20
87. Shapovalova KB, Kamkina YV (2008) Motor and cognitive functions of the neostriatum during bilateral blockade of its dopamine receptors. *Neurosci Behav Physiol* 38: 71-79
88. Shimada A, Ohta A, Akiguchi I, Takeda T (1993) Age-related deterioration in conditional avoidance task in the SAM-P/10 mouse, an animal model of spontaneous brain atrophy. *Brain Res* 608: 266-272
89. Shimada A (1999) Age-dependent cerebral atrophy and cognitive dysfunction in SAMP10 mice. *Neurobiol Aging* 20: 125-136
90. Shimano Y (1998) Studies on aging through analysis of the glucose metabolism related to the ATP-production of the senescence accelerated mouse (SAM). *Hokkido Igaku Zasshi*. 73: 557-569
91. Smith DR, Striplin CD, Geller AM, Mailman RB, Drago J, Lawler CP, Gallagher M (1998) Behavioural assessment of mice lacking D1A dopamine receptors. *Neuroscience* 86: 135-146
92. Takahashi E, Katayama M, Niimi K, Itakura C (2008) Additive subthreshold dose effects of cannabinoid CB1 receptor antagonist and selective serotonin reuptake inhibitor in antidepressant behavioral tests. *Eur J Pharm* 589: 149-156

93. 竹田俊男 (1996) 老化促進モデルマウス (SAM) 老化病態とその制御を中心に. 日衛誌 (Jpn. J. Hyg.) 51: 569-578
94. Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K (1997) Senescence-accelerated mouse (SAM): a novel murine model of senescence. *Exp Gerontol* 32: 105-109
95. Tang YP, Shimizu E, Dube GR, Rampon C, Kerchner GA, Zhuo M, Liu G, Tsien JZ (1999) Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 401: 63-69
96. Thach WT, Goodkin HP, Keating JG (1992) The cerebellum and the adaptive coordination of movement. *Annu Rev Neurosci* 15: 403-442
97. Thach WT (1998) Combination, complementarity and automatic control: a role for the cerebellum in learning movement coordination. *Novartis Found Symp* 218: 219-228
98. Thifault S, Lalonde R, Sanon N, Hamet P (2002) Comparisons between C57BL/6J and A/J mice in motor activity and coordination, hole-poking, and spatial learning. *Brain Res Bullet* 58: 213-218
99. Tran AH, Tamura R, Uwano T, Kobayashi T, Katsuyashi T, Katsuki M, Ono T (2005) Dopamine D1 receptors involved in locomotor activity and accumbens neural responses to prediction of reward associated with place. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 2117-2122
100. Tsien JZ (2000) Linking Hebb's coincidence-detection to memory formation. *Curr Opin Neurobiol* 10: 266-273
101. Tuljapurkar S, Li N, Boe C (2000) A universal pattern of mortality decline in the G7 countries. *Nature* 405: 789-792

102. Upchurch M, Wehner JM (1988) Differences between inbred strains of mice in Morris water maze performance. *Behav Genet* 18: 55-68
103. van Gaalen MM, Steckler T (2000) Behavioural analysis of four mouse strains in an anxiety test battery. *Behav Brain Res* 115: 95-106
104. Viggiano D, Ruocco LA, Sadile AG (2003) Dopamine phenotype and behaviour in animal models: in relation to attention deficit hyperactivity disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 27: 623-637
105. Volkmar V, Koks S, Vasar E, Rauvala H (2001) Strain and gender differences in the behavior of mouse lines commonly used in transgenic studies. *Physiol Behav* 72: 271-281
106. Walter JT, Alvina K, Womack MD, Chevez C, Khodakhah K (2006) Decreases in the precision of Purkinje cell pacemaking cause cerebellar dysfunction and ataxia. *Nature Neurosci* 9: 389-397
107. Weitlauf C, Honse Y, Auberson YP, Mishina M, Lovinger DM, Winder DG (2005) Activation of NR2A-containing NMDA receptors is not obligatory for NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *J Neurosci* 25: 8386-8390
108. Yoneda Y, Ogita K (1991) Current topics on glutamate receptors. *Yakugaku Zasshi* 111: 329-344
109. Zapata A, Shippenberg TS (2002) D3 receptor ligands modulate extracellular dopamine clearance in the nucleus accumbens. *J Neurochem* 81: 1035-1042
110. Zhao MG, Toyoda H, Lee YS, Wu LJ, Ko SW, Zhang XH, Jia Y, Shum F, Xu H, Li BM, Kaang BK, Zhio M (2005) Roles of NMDA NR2B subtype receptor in prefrontal long-term potentiation and contextual fear memory. *Neuron* 47: 859-872

111. Zhuang X, Gross C, Santarelli L, Compan V, Trillat AC, Hen R (1999) Altered emotional states in knockout mice lacking 5-HT_{1A} or 5-HT_{1B} receptors. *Neuropsychopharmacology* (Suppl) 2: 52S-60S
112. Zhou QY, Palmiter RD (1995) Dopamine-deficient mice are severely hypoactive, adiposic, and aphagic. *Cell* 83: 1197-1209

Age-related changes in the higher brain functions
of Senescence-accelerated mouse prone 6 (SAMP6)

Kimie Niimi

Brain Science And Life Technology Research Foundation
Tokyo, 175-0094, Japan

Summary

The senescence-accelerated mouse (SAM) was developed through selective breeding of the AKR/J strain based on a graded score for senescence, life span, and pathological phenotypes. There are nine senescence-prone (SAMP) strains and three senescence-resistant (SAMR) strains. SAMP strains have a shortened life span and show early manifestations of senescence, such as various skin lesions and increased lordokyphosis, after a period of normal development. Among SAMR strains, SAMR1 is long-lived, showing resistance to early senescence, and is used as a control. Among SAMP strains, SAMP6 is considered to be a model of senile osteoporosis with slow bone loss after 4 months of age. Recently, it was reported that SAMP6 exhibited increased expression of S100 β in the brain compared to SAMR1, suggesting that SAMP6 is also useful as a model of age-related diseases related to central nervous system alterations. I performed a battery of behavioral analyses using 1- (juvenile stage), 4–6- (adult stage), and 8–12-month-old (old stage) SAMP6 and age-matched SAMR1 to investigate the age-related changes in behavioral features and the mechanisms involved.

The battery of behavioral analyses revealed innate behavioral alterations in SAMP6, including higher motor activity, lower anxiety, increased short-term memory, a motor coordination deficit, and antidepressant activity. The higher motor activity of SAMP6 was observed until the adult stage, and then the motor activity began to decline, and lower motor activity was observed at the old stage, indicating that the motor activity of SAMP6 exhibited the same pattern of age-related changes as seen in the bone mass of SAMP6. The marked motor coordination deficit of SAMP6 was observed at the juvenile and old stages, whereas amelioration in the motor coordination deficit was seen in the adult stage, suggesting that the motor coordination of SAMP6 exhibited a pattern

of age-related changes similar to that of the bone mass of SAMP6. On the other hand, the differences in anxiety and antidepressant activity between SAMP6 and SAMR1 decreased gradually with age, indicating that the lower anxiety and antidepressant activity of SAMP6 showed another pattern of age-related change. No apparent age-related change was observed in the increased short-term memory of SAMP6. Accordingly, the behavioral features of SAMP6 were divided into three categories based on the pattern of age-related changes: (1) accelerated-senescence-like behaviors; (2) behaviors with age-related changes; and (3) behaviors with no age-related changes.

The expression of tyrosine hydroxylase, an enzyme involved in the biosynthesis of dopamine, and its phosphorylated form was increased in the striatum and nucleus accumbens (NAc) of juvenile SAMP6, suggesting an increase in the concentration of dopamine in the juvenile SAMP6 brain. This was thought to be one of the innate alterations related to the higher motor activity of SAMP6. Increased expression of D1 in the striatum, an over-activated D1 signal cascade, and an increased dopamine concentration in the NAc were seen in adult SAMP6, which seemed to explain the higher activity of adult SAMP6. An apparent decrease in the sensitivity of D1 of old SAMP6 compared to adult SAMP6 was observed, which was thought to be involved in the decreased motor activity of old SAMP6. These results suggest that an age-related alteration in the D1 sensitivity of SAMP6 is one of the mechanisms altering motor activity, one of the accelerated-senescence-like behaviors observed in this strain. On the other hand, the increased D3 expression in the cerebellum of adult SAMP6 was thought to be one of the mechanisms related to the motor coordination deficit, another accelerated-senescence-like behavior observed in this strain. However, further examinations of the D3 expression levels in juvenile and old SAMP6 cerebellum are needed to evaluate whether the altered D3 expression is involved in the accelerated-senescence-like alteration of this behavior.

The serotonin system was studied to examine the mechanism of the lower anxiety and antidepressant activity, behaviors with age-related changes, of SAMP6. The expression of tryptophan hydroxylase, a serotonin biosynthesis enzyme, and its phosphorylated form were increased in the brainstem of juvenile SAMP6, suggesting an increase in the serotonin concentration in the juvenile SAMP6 brain. This was thought to be one of the innate mechanisms related to the lower anxiety and antidepressant activity of SAMP6. Serotonin concentrations were increased the cortex and NAc of

adult SAMP6, which likely explained these behavioral patterns in adult SAMP6. However, further examination of the serotonin concentration of juvenile and old SAMP6 brains is needed to evaluate whether the altered serotonin concentration is involved in the age-related change of these behaviors.

The dopamine and serotonin systems and *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors were studied to examine the mechanisms for increased short-term memory, a behavior with no age-related changes, of SAMP6. As mentioned above, the increased dopamine and serotonin concentrations in the juvenile SAMP6 brain were also thought to be one of the innate changes related to the increased short-term memory of SAMP6. In addition, expression of the NMDA receptor subunit 2B (NR2B) was increased in the forebrain of adult SAMP6, and this appeared to be involved in the increased short-term memory of adult SAMP6. Further examination of the mechanisms involved in this behavioral property of old SAMP6 is needed.

In this study, a battery of behavioral analyses using animals at three different ages showed various behavioral alterations with aging. In addition, biochemical and pharmacological approaches revealed the involvement of several different mechanisms in the behavioral alterations. These results suggest that the higher brain functions are controlled by variable thresholds of the respective neurons and complex neuronal networks. Studies using SAMP6 might elucidate the influences of aging on higher brain functions and related mechanisms, resulting in the specification of the signal cascades that activate higher brain function and the development of new drugs that act on these cascades. These could increase the healthy longevity and quality of life of humans.