

強迫性障害の治療メカニズムに関する研究

2022

幡鎌 輝

目次

緒言	1
第 1 章 OCD モデル動物に対する SSRI の作用機序	3
実験方法.....	5
第 1 節 SSRI 長期投与が QNP 誘発の固執行動へ与える影響.....	8
第 2 節 SSRI 長期投与が QNP 誘発の外側 OFC の錐体神経過活動へ与える影響.....	8
第 3 節 SSRI 長期投与が 5-HT _{2C} 受容体を介した外側 OFC の錐体神経活動へ与える影響.....	11
第 4 節 SSRI 長期投与が外側 OFC における錐体神経の抑制性入力へ与える影響.....	11
第 5 節 5-HT _{2C} 受容体遮断薬短期投与が QNP 誘発の外側 OFC 神経過活動と固執行動へ与える影響	14
考察.....	16
第 2 章 リアルワールドデータ解析で見出された新規 OCD 治療候補薬の有効性と作用機序.....	19
実験方法.....	20
第 1 節 リアルワールド解析を用いた D ₂ R 刺激薬誘発 OCD 様症状を抑制する薬剤の探索	26
第 2 節 D ₂ R 刺激薬誘発の OCD 様反復行動に対する PPI の影響.....	35
第 3 節 D ₂ R 刺激薬誘発の OCD 様習慣形成異常に対する PPI の影響.....	37
第 4 節 QNP による外側 OFC の錐体神経過活動に対する PPI の影響.....	40
第 5 節 初代培養皮質ニューロンを用いた PPI の神経活動抑制作用のメカニズム検討	42
第 6 節 細胞内酸性条件下での外側 OFC の錐体神経活動に対する PPI の影響	43
考察.....	45
総括および結論	48
謝辞	49
発表論文目録.....	50
参考文献.....	51

緒言

強迫性障害 (OCD) は、不適切な思考 (強迫観念) が浮かび、それを排除するための行動 (強迫行為) を繰り返すことを特徴とする精神疾患である。かつては不安障害の一種と考えられてきたが、DSM-5 では新規の疾患として再分類された。また、OCD の生涯有病率は 1-3% と高いことが明らかになっている (Pauls *et al.*, 2014)。OCD の薬剤治療では、第一選択薬として選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) が用いられる。しかし、他の精神疾患と比較して高濃度・長期間投与を必要とし、症状ごとで有効性が異なるため (Bokor & Anderson, 2014)、治療期間や奏効率を改善するような新規 OCD 治療薬が希求されている。所属研究室ではこれまでに、ドパミン D₂ 受容体 (D₂R) 刺激薬キンピロール (QNP) の反復投与による新規 OCD モデル動物を作製し、報告してきた (Asaoka *et al.*, 2019; Asaoka *et al.*, 2021)。QNP 投与マウスは複数の OCD 様の行動異常や神経機能の異常が認められている。

そこで、本研究では、この新規 OCD モデル動物を用い、未だ詳細が明らかとなっていない OCD の治療メカニズムについて検討を行い、以下の新知見を得た。

第 1 章では、OCD に対する SSRI 長期投与の作用機序について検討を行い、SSRI 長期投与は外側 OFC における 5-HT_{2C} 受容体シグナルの減少を介して OCD 様の固執行動を改善することを明らかにした。

第 2 章では、リアルワールドデータ解析と薬理学的実証実験を組み合わせることで OCD の新規治療標的を探索し、その作用機序を検討した。その結果、プロトンポンプ阻害薬 (PPI) の併用が D₂R 刺激薬誘発の OCD 様症状の発生率を抑制することが明らかになった。さらに実証実験によって、PPI は細胞内酸性化を介して外側 OFC 錐体神経の過活動を抑制し、複数の OCD 様症状を改善することも見出した。

これらの研究成果について、以下に論述する。

本文中、および図中で使用した略語は以下に示す通りである。

5-HT	5-hydroxytryptamine	IPSC	inhibitory postsynaptic current
AAV	adeno-associated virus	LED	levodopa equivalent dose
ACSF	artificial cerebrospinal fluid	LPZ	lansoprazole
AMPA	alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid	MedDRA	Medical Dictionary for Regulatory Activities <i>Terminology</i>
ANOVA	analyses of variance	ML	mediolateral
AP	anteroposterior	NMDA	N-methyl-D-aspartate
APV	2-amino-5-phosphonopentanoic acid	OCD	obsessive-compulsive disorder
ATP	adenosine 5'-triphosphate	OED	omeprazole equivalent dose
c-Fos	cellular homolog of the oncogene of Finkel–Biskis–Jinkins murine osteosarcoma virus	OFC	orbitofrontal cortex
Cit	citalopram	PB	phosphate-buffer
CRF	continuous reinforcement	PBS	phosphate-buffered saline
CSTC	cortico–striato–thalamo–cortical	PPI	proton pump inhibitor
D ₂ R	dopamine D ₂ receptor	PT	preferred term
DMSO	dimethyl sulfoxide	PCR	polymerase chain reaction
DNA	deoxyribonucleic acid	PV	parvalbumin
DNQX	6,7-dinitroquinoxaline-2,3(1H,4H)-dione	QNP	quinpirole
DV	dorsoventral	RNA	ribonucleic acid
EGTA	ethyleneglycol bis(2-aminoethylether) tetraacetic acid	ROR	reporting odds ratio
FAERS	FDA Adverse Event Reporting System	RR	random ratio
FDA	Food and Drug Administration	RT-PCR	reverse transcription-PCR
GABA	gamma-aminobutyric acid	SEpHluorin	super-ecliptic pHluorin
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	SERT	serotonin transporter
GTP	guanosine triphosphate	SSRI	selective serotonin reuptake inhibitor
HEPES	4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethane-sulfonic acid	TEA	tetraethylammonium
ICD	international classification of disease	TTX	tetrodotoxin
i.c.v.	intracerebroventricular	VEH	vehicle
i.p.	intraperitoneal	VPZ	vonoprazan

第1章

OCD モデル動物に対する SSRI の作用機序

OCD は皮質-線条体-視床-皮質 (CTSC) 回路の異常が関与する。前頭皮質から線条体が過剰に刺激されることで直接経路と間接経路のバランスが崩れ、視床への神経投射が脱抑制することで過活動状態となり、症状が発現すると考えられている (Stein *et al.*, 2019)。前頭皮質の中でも、OCD 患者の外側眼窩前頭皮質 (OFC) においてグルコース代謝が上昇していることが明らかになっている (Baxter *et al.*, 1987)。しかし、SSRI を用いた薬物治療に成功した OCD 患者において代謝上昇は認められていない (Saxena *et al.*, 1999)。また、OCD 患者に対して繰り返し OFC を経頭蓋磁気刺激することで、OFC のグルコース代謝が減少し、症状が改善することも報告されている (Nauczyciel *et al.*, 2014)。これらの臨床観察は、外側 OFC の活動を抑制することが OCD の治療戦略として有効であることを示唆している。しかし、SSRI によって外側 OFC の過活動を抑制する詳細なメカニズムは不明である。

ヒトとげっ歯類両方において、OFC は柔軟な意思決定に重要な役割を担っている (Dias *et al.*, 1996; Izquierdo *et al.*, 2013; Kringelbach *et al.*, 2005)。近年、OCD 患者が思考の柔軟性を欠き、固執性を示すことが明らかになっている (Gillan *et al.*, 2011; Nielen *et al.*, 2009; Voon *et al.*, 2015)。OCD 患者は思考柔軟性を評価する逆転学習試験中に外側 OFC の神経活動が変化していることから (Beucke *et al.*, 2013; Remijnse *et al.*, 2006)、OFC の神経過活動が OCD 病態に関与していることが考えられる。

OFC の活動性は 5-HT_{2A} および 5-HT_{2C} 受容体を含む様々な 5-HT 受容体シグナルによって調節される (Celada *et al.*, 2004; Millan *et al.*, 1998)。また、5-HT₂ 受容体は逆転学習に関与することが報告されている。マウスを用いた逆転学習試験において、5-HT_{2C} 受容体遮断薬の短期投与は固執性を抑制するが、5-HT_{2A} 受容体遮断薬の短期投与は増悪させる (Boulougouris *et al.*, 2008)。さらに、5-HT_{2C} 受容体遮断薬の OFC 局所投与は逆転学習の正答率を増加させることから (Boulougouris and Robbins, 2010)、外側 OFC の 5-HT_{2C} 受容体が逆転学習において重要な役割を担っていることが示唆される。

近年の臨床研究から、SSRI 長期投与は 5-HT シグナルの機能的変化を引き起こすことが示されている。SSRI はセロトニントランスポーター (SERT) を抑制することで、細胞外のセロトニン濃度を増加させることが広く認められている (Benmansour *et al.*, 1999; Invernizzi *et al.*, 1994)。さらに、SSRI は 5-HT₂ 受容体を含む 5-HT 受容体の機能にも影響を与える。SSRI 長期投与は 5-HT₂ 受容体を脱感作させることや (El and Blier, 2005)、皮質における 5-HT₂ 受容体の密度を減少させる (Maj *et al.*, 1996) ことも明らかになっている。また、SSRI 長期投与は大うつ病患者の皮質における 5-HT₂ 受容体の結合能を低下させる (Meyer *et al.*, 2001)。この知見と一致して、動物実験においても 5-HT_{2C} 受容体遮断薬の全身投与は即効性の抗うつ効果を示している (Opal *et al.*, 2014)。これらの報告から、SSRI の治療効果には 5-HT₂ 受容体シグナルの抑制が寄与している可能性がある。し

かし、OCD 関連の異常行動に対する SSRI の効果に 5-HT₂ 受容体シグナルの抑制が関与するかは不明である。

以前所属研究室では、D₂R 刺激薬であるキンピロール (QNP) をマウスに反復投与すると、固執行動や外側 OFC 錐体神経の過活動など OCD 様の行動・神経異常を示すことを報告した (Asaoka *et al.*, 2019)。

本章では、QNP 反復投与によって誘発される固執行動に対する SSRI の治療メカニズムを検討した。SSRI であるシタロプラムの長期投与による効果を行動学的・組織学的、電気生理学の実験により評価した。また、シタロプラム長期投与が QNP 投与マウスの外側 OFC 過活動に及ぼす影響や 5-HT₂ 受容体がどのように関与しているかを検討した。さらに、QNP 反復投与による固執行動への 5-HT_{2C} 受容体遮断薬の影響を検討した。その結果、SSRI 長期投与と同様に、5-HT_{2C} 受容体遮断薬の短期投与も QNP 誘発の OCD 様異常に対して治療効果を示すことが明らかとなった。

実験方法

試薬

D₂R 刺激薬である(-)-キンピロール (QNP; Tocris Bioscience, Bristol, UK) は生理食塩水に溶解した。5-HT_{2C} 受容体遮断薬である SB242084 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)、5-HT_{2A} 受容体遮断薬である MDL100907 (Tocris Bioscience)、5-HT_{2A} 受容体刺激薬である WAY161503 と AMPA 受容体遮断薬である 6,7-dinitroquinoxaline-2,3(1H,4H)-dione (DNQX; Tocris Bioscience) は dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解した。NMDA 受容体遮断薬である DL-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (DL-APV; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) と SSRI であるシタロプラム臭化水素酸塩 (Struchem, Wujiang, China) は水に溶解した。ストック溶液は-20°C で保管し、使用時に生理食塩水もしくは人工脳脊髄液 (ACSF) で希釈した。また、最終の DMSO 濃度は行動試験では 5%以下、電気生理学的検討では 0.05%以下になるように希釈した。

動物

すべての実験は動物の使用数と実験回数を最小限になるように設定した。動物の使用およびその実験手法は全て京都大学動物実験委員会の審査・承認を受け、「動物実験に関する日本薬理学会指針」を遵守して行った。雄性 C57BL/6J 系統マウス (6–15 週齢) は日本 SLC (静岡、日本) より購入し、室温が 24 ± 1°C、12 時間の明暗周期の飼育室にて飼育した。

マウスを D₂R 刺激に感作させるために、QNP (1 mg/kg/day, i.p.) を毎日投与した。QNP を 7–12 回投与したマウスを QNP 投与群とした (Asaoka *et al.*, 2021)。

シタロプラムの長期投与は、シタロプラム臭化水素酸塩を 0.2 mg/mL の濃度で水に溶解し、28 日間与えることで行った。平均的な飲水量はマウス 1 匹あたり 1 日 3–4 mL であるため、シタロプラムの平均投与濃度は 24 mg/kg/day であった (Asaoka *et al.*, 2017)。薬剤を含む飲み水は遮光し、3–5 日ごとに交換した。

5-HT_{2C} 受容体遮断薬の急性投与の検討において、QNP の投与の 5 分前に SB242084 (1 mg/kg/day, i.p.) を投与した。

左右弁別学習試験

空間弁別課題は、以前当研究室で報告した方法で行った (Asaoka *et al.*, 2021)。平日には、自由摂食時の体重の 80–90%となるようマウスの摂食量を制限 (2–3 g/day) した。マウスを T 字迷路装置に慣れさせた後、以下のように 3 段階学習課題を行った。6–7 日間の学習期と 8 日間の過剰学習期では 1 日 5 回、迷路の片方のアームに報酬として 100 μL の練乳があることをマウスに学習させた。4 日間の逆転学習期では、これまで報酬が置かれたアームとは逆のアームに報酬を入れ、1 日 10 回試験を行った。過剰学習期と逆転学習期で、マウスに溶媒または QNP を合計 12 回投与した。QNP の鎮静効果を避けるため、最初 2 回の QNP 投与は試験終了後に行い、それ以降は試験開始 20 分前に投与を行った。

免疫染色

8回目もしくは12回目のQNP投与120分後、ペントバルビタール(64.8 mg/kg; Kyoritsu Seiyaku, Tokyo, Japan) によってマウスを麻酔した。麻酔下でPBS 経心灌流による脱血および4%パラホルムアルデヒド (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) 含有リン酸バッファー (PB) 経心灌流でマウスを固定した。経心灌流固定の後、全脳を摘出して、15%スクロース中で一晩冷蔵(4°C) 静置した。全脳は-20°C で凍結し、クリオスタット (Leica CM3050S; Leica Biosystems) で30 μm 厚の冠状切片を作製した。作製した冠状切片は観察まで-20°C で保管した。免疫組織化学的検討では、スライドガラス上の冠状切片を0.3% Triton X-100 (Nacalai Tesque) と5%ウマ血清含有PBS (PBS-T) で1時間透過処理した。その後、一次抗体希釈液中で4°C にて一晩反応させた。その後、冠状切片をPBS で15分間洗浄し、二次抗体希釈液中で室温(25°C)・遮光下にて2時間反応させた。一次抗体および二次抗体は0.3% Triton X-100 含有中に希釈した。一次抗体にはウサギ由来抗c-Fos抗体(2000倍希釈、9F6; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)、二次抗体にはAlexa Fluor 594 で標識したロバ由来抗ウサギ抗体(200倍希釈、Molecular Probes, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いた。その後、切片をDAPI Fluoromount-G (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA) とカバーガラス(松浪硝子工業) で封入し、共焦点顕微鏡(Fluoview FV10i、オリンパス、東京) を用いて観察した。外側OFC(ブレグマからAP +2.7 mm) におけるc-Fos陽性細胞数は6区分(0.045 mm²/区分) に分けた合計を計数した。

電気生理学的記録

急性単離切片の作製においては、マウスをイソフルランで麻酔し、断頭した。OFCを含む冠状脳切片(厚さ200 μm) をビブラトーム(VT1000S; Leica, Wetzlar, Germany) で作製した。ビブラトームのステージは氷冷したcutting buffer(120 mM NMDG-Cl, 2.5 mM KCl, 26 mM NaHCO₃, 1.25 mM NaH₂PO₄, 0.5 mM CaCl₂, 7 mM MgCl₂, 15 mM D-glucose, 1.3 mM ascorbic acid, pH 7.2) で冷却した。切り出した切片は、32°C に加温し、95%酸素を常に通気した人工脳脊髄液(ACSF; 124 mM NaCl, 3 mM KCl, 26 mM NaHCO₃, 1 mM NaH₂PO₄, 2.4 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 10 mM D-glucose, pH 7.3) 中に安置した。ACSFは常に灌流し、最低1時間リカバリを行ってから実験に使用した。リカバリ後、酸素を含むACSFで灌流させ、27°C ± 1°C で保持した記録チャンバーに切片を移した。記録は切片の作製5時間以内に行った。

電気生理学的記録はEPC9 amplifier (HEKA, Pfalz, Germany) およびPatchmaster software (HEKA) を用いて行った。

電極内液は以下の通りである:

Current-clamp 記録: 140 mM K-gluconate, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM Na-ATP, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM EGTA (KOH で pH 7.3 に調整)。

Inhibitory post-synaptic current (IPSC) 記録: 70 mM K-gluconate, 75 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM Na-ATP, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM EGTA (KOH で pH 7.3 に調整)。

電極内液を通した際に電極抵抗が 3–7 M Ω となるようにガラス電極を作製し、記録に用いた。神経細胞の観測には、40 \times 水浸対物レンズ (Zeiss, Jena, Germany) と CCD カメラを用いた。記録に際して、series resistance は 70% 補正し、35 M Ω を超えたデータは除外した。既報のように (Apicella *et al.*, 2012)、外側 OFC (AP +2.2–3.0 mm; the Brain Atlas; Franklin and Paxinos, 2007) における錐体神経は第 5 層 (皮質の腹端から 0.6–0.8 mm) で、介在神経は第 2–3 層 (皮質の腹端から 0.2–0.4 mm) で記録した。活動の特性は current injection (300 pA, 1 秒持続) に対する反応によって定義した。IPSC は、20 μ M DNQX および 50 μ M DL-APV の存在下で記録した。Voltage-clamp 記録中の膜電位は -70 mV に保持した。

5-HT 受容体遮断薬存在下での記録では、SB242084 (3 μ M) または MDL100907 (1 μ M) を ACSF に溶解した。遮断薬の濃度は阻害定数に基づいて決定した (SB242084: 5-HT_{2C} 受容体に対する阻害定数 1.0 nM, MDL100907: 5-HT_{2A} 受容体に対する阻害定数 0.36 nM)。

5-HT_{2C} 受容体刺激の効果を調べるために、5-HT_{2C} 受容体刺激薬である WAY161503 (10 μ M) を 5 分間処置する前後に current injection による反応を記録した。

データ解析には Minianalysis ソフトウェア (SynaptoSoft, Decatur, GA, USA) と Win EDR 3.7.3 (University of Strathclyde, UK) を用いた。

統計解析

全てのデータは平均値 \pm 標準誤差で表示した。統計解析は GraphPad Prism8 (GraphPad, San Diego, CA, USA) を用いて行い、危険率 5% 未満を統計的に有意であるとみなした。

3 群以上の有意差検定には one-way ANOVA および *post hoc* 試験として Tukey's multiple comparison test を使用した。左右弁別学習試験の解析には two-way ANOVA および *post hoc* 試験として Sidak's multiple comparison test を使用した。

実験結果

第1節 SSRI 長期投与が QNP 誘発の固執行動へ与える影響

QNP 投与マウスの固執行動に対する SSRI の効果を検討するために、T 字迷路装置を用いた左右弁別学習試験を行った。2 つのアームのどちらに報酬があるかを学習する学習期と、さらに継続して学習する過剰学習期において、正答率は群間で差は認められなかった (図 1-1A, B)。続いて、学習期・過剰学習期で学習した報酬の場所を逆のアームにした逆転学習を行った。その結果、対照群と比較して QNP 投与群では正答率が低下し、シタロプラム 4 週間投与により改善した (図 1-1C)。

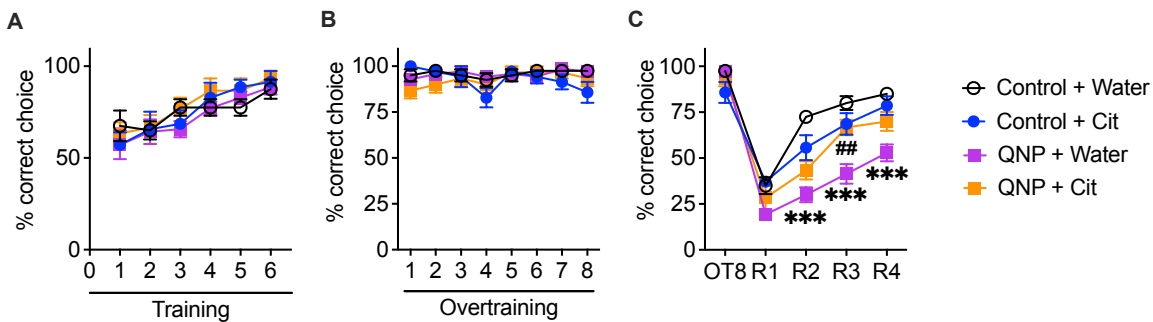


図 1-1 SSRI の 4 週間長期投与は QNP による固執行動を改善した

(A–C) マウスは毎日左右弁別学習試験を行い、その 4 日後に逆転学習を行った。過剰学習期と逆転学習期に QNP (1 mg/kg) を投与した。また、逆転学習期の 1 日目の 4 週間前から水またはシタロプラム (24 mg/kg/日; Cit) を飲水投与した。6 日間の学習期 (A)、8 日間の過剰学習期 (B) と 4 日間の逆転学習期 (C) における正答率。n = 6–14。*** $P < 0.001$ (Ctrl+Water vs. QNP+Water)。## $P < 0.01$ (QNP+Water vs. QNP+Cit)。

第2節 SSRI 長期投与が QNP 誘発の外側 OFC の錐体神経過活動へ与える影響

次に、シタロプラム 4 週間投与が外側 OFC の神経活動に与える影響を免疫組織化学的に検討した。その結果、シタロプラム 4 週間投与は QNP 投与による神経活性化マーカーの c-Fos 陽性細胞数の増加を抑制した (図 1-2A, B)。

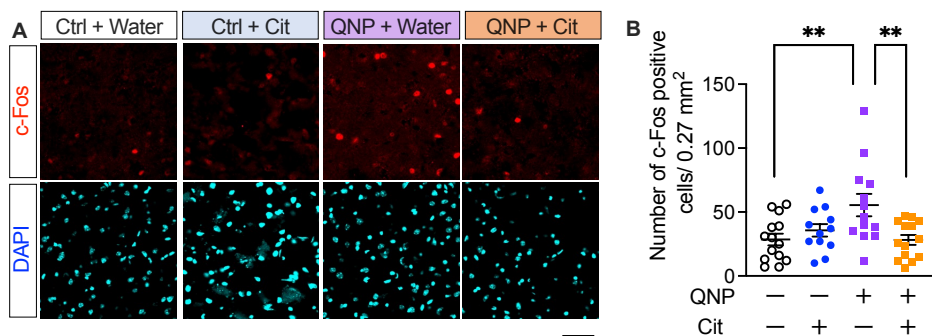


図 1-2 SSRI の 4 週間投与は QNP 投与による外側 OFC の c-Fos 陽性細胞数増加を抑制した

QNP 投与 8 日目の 4 週間前から、マウスに水またはシタロプラム (24 mg/kg/日; Cit) を飲水投与した。8 日後の溶媒または QNP (1 mg/kg) 投与 2 時間後、脳を回収した。外側 OFC を含む冠状切片を作製し、抗 c-Fos 抗体で染色し、共焦点顕微鏡で画像化した。n = 12–14。(A) 外側 OFC における c-Fos 陽性細胞の代表画像。赤: 神経活性化マーカーである c-Fos、シアン: DAPI、スケールバー: 50 μm 。(B) 外側 OFC の c-Fos 陽性細胞数。** $P < 0.01$ 。

続いて、シタロプラム 4 週間投与の神経抑制作用について、急性単離切片を用いた電気生理学的記録により詳細な検討を行った。すると、外側 OFC の錐体神経の発火頻度は QNP 投与マウスで増加し、それはシタロプラム 4 週間投与を行った QNP 投与マウスで抑制された (図 1-3A)。また、全群間で静止膜電位の有意な変化は認められなかった (図 1-3B)。

続いて SSRI の錐体神経の活動抑制作用のメカニズムを検証した。これまでに、SSRI 長期投与によってセロトニン 5-HT₂ 受容体シグナルが減弱することが報告されている (El and Blier, 2005; Maj *et al.*, 1996; Meyer *et al.*, 2001)。そこで 5-HT₂ 受容体の関与を評価するために、外側 OFC における錐体神経の発火頻度に対する 5-HT₂ 受容体遮断作用の影響を検討した。5-HT_{2C} 受容体遮断薬である SB242084 (3 μM) 存在下では、QNP 投与による発火頻度の増加は観察されず、シタロプラム 4 週間投与 QNP 投与マウスと差は見られなかった (図 1-3C, D)。しかし、5-HT_{2A} 受容体遮断薬である MDL100907 (1 μM) 存在下では、QNP 投与群における発火頻度の増加は認められ、慢性的なシタロプラム投与の効果も観察された (図 1-3E, F)。これらの結果は、シタロプラムの 4 週間投与が QNP による外側 OFC の錐体神経の過活動を減少させたことを示している。また、5-HT_{2A} 受容体ではなく、5-HT_{2C} 受容体を遮断することでも、QNP による外側 OFC の錐体神経過活動は抑制された。

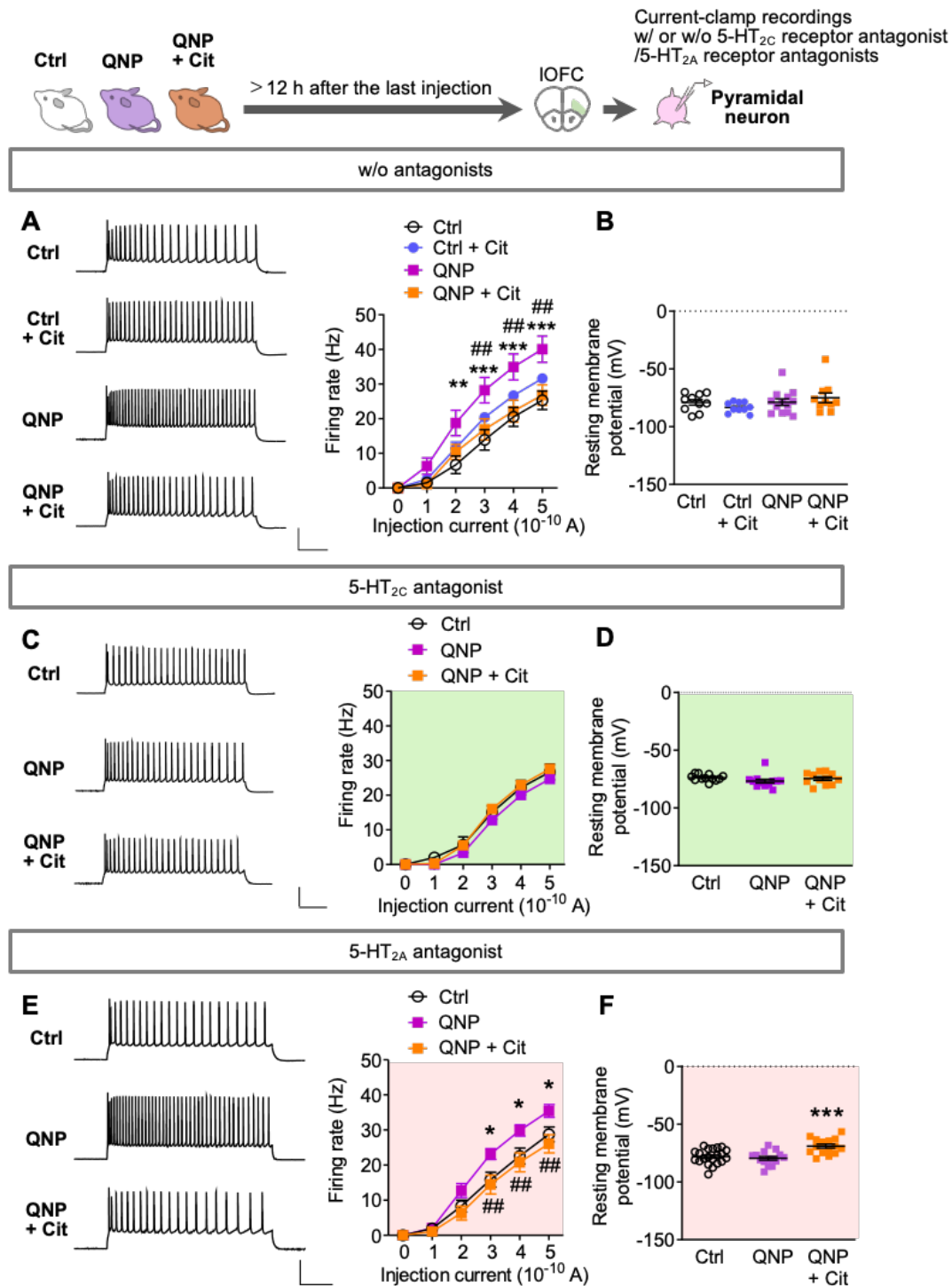


図 1-3 SSRI の 4 週間長期投与および 5-HT_{2C} 受容体遮断薬の急性処置は QNP 投与マウスの外側 OFC における錐体神経の過活動を抑制した

(A, B) 外側 OFC における錐体神経の電気生理学的記録。n = 8–10 (マウス 3–4 匹)。A: Current injection により誘発された発火応答 (0–500 pA; 1 秒)。スケールバー: 200 ms、50 mV。B: 静止膜電位。(C, D) 外側 OFC において SB242084 (3 μM) を処置した際の錐体神経の電気生理学的記録。n = 12 (マウス 3 匹)。C: Current injection により誘発された発火応答 (0–500 pA; 1 秒)。スケールバー: 200 ms、50 mV。D: 静止膜電位。(E, F) 外側 OFC において MDL100907 (1 μM) を処置した際の錐体神経の電気生理学的記録。n = 15–21 (マウス 3 匹)。E: Current injection により誘発された発火応答 (0–500 pA; 1 秒)。スケールバー: 200 ms、50 mV。F: 静止膜電位。**P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001 (control versus QNP)。##*P* < 0.01 (QNP versus QNP+Cit)。

第3節 SSRI 長期投与が 5-HT_{2C} 受容体を介した外側 OFC の錐体神経活動へ与える影響

上記の実験から、SSRI 慢性投与と 5-HT_{2C} 受容体遮薬投与は外側 OFC における錐体神経の発火頻度を調節する共通のメカニズムを有している可能性が考えられる。SSRI の慢性投与が 5-HT_{2C} 受容体を介した神経活動調節に影響を与えるかどうかを調べるために、シタロプラムを 4 週間投与したマウスの外側 OFC の錐体神経の活動性に対する急性 5-HT_{2C} 受容体刺激の影響を評価した。5-HT_{2C} 受容体刺激薬である WAY161503 (10 μM) を外側 OFC の急性単離切片に処置すると、対照群では錐体神経の発火頻度が有意に増加した (図 1-4A, B)。一方、シタロプラムの 4 週間投与群では WAY161503 は発火頻度を変化させなかった (図 1-4C, D)。この結果は、シタロプラム長期投与が外側 OFC における 5-HT_{2C} 受容体シグナルを抑制することを示唆している。

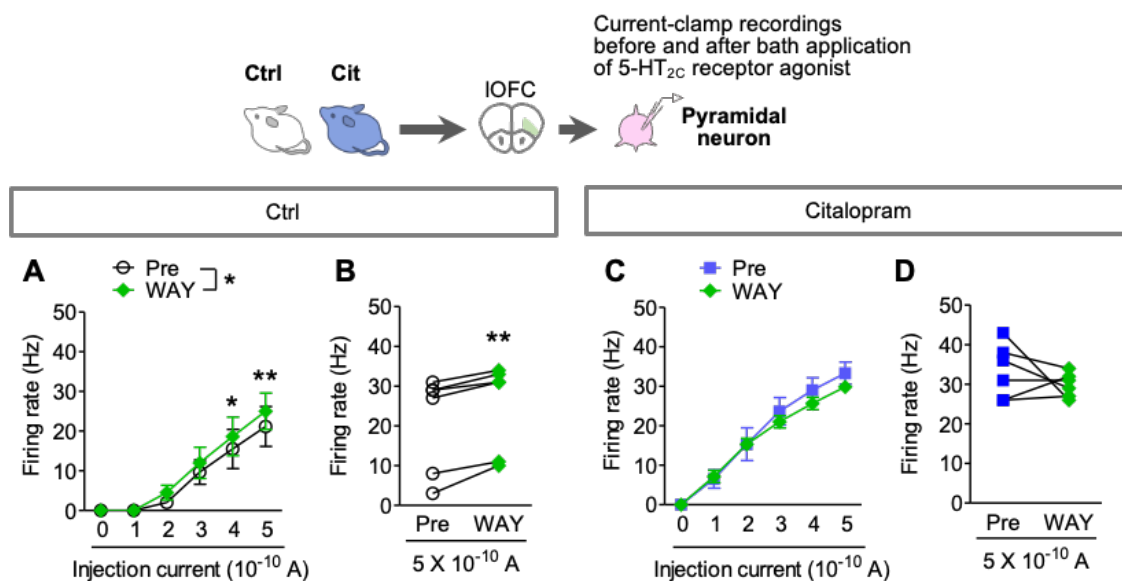


図 1-4 SSRI の 4 週間長期投与は外側 OFC における錐体神経の 5-HT_{2C} 受容体刺激薬による活動増加を抑制した

(A-D) 対照マウス (A, B) またはシタロプラム投与マウス (C, D) の外側 OFC における WAY161503 (10 μM) 処置前後の錐体神経の電気生理学的記録。n = 6 (マウス 2 匹)。Current injection により誘発された発火応答 (0–500 pA; 1 秒)。**P* < 0.05; ***P* < 0.01。

第 4 節 SSRI 長期投与が外側 OFC における錐体神経の抑制性入力へ与える影響

SSRI 慢性投与により外側 OFC の錐体神経過活動が改善されるメカニズムを明らかにするため、外側 OFC の錐体神経への抑制性入力 spontaneous IPSC (sIPSC) を記録した。対照マウスと比較して、QNP 投与マウスでは錐体神経の sIPSC 頻度が有意に低下したが、シタロプラムを 4 週間投与すると QNP による sIPSC 頻度の低下が抑制された (図 1-5A–C)。また全群間の sIPSC 振幅には変化がなかった (図 1-5D, E)。これらの結果は、QNP 反復投与が外側 OFC の錐体神経に対して GABA 作動性の抑制性入力を減少させ、4 週間のシタロプラムの投与によってそれが抑制されたことを示唆している。

さらに、SB242084 (3 μM) 存在下では発火頻度の結果と同様、錐体神経の sIPSC 頻度は全群間で有意差が認められず、シタロプラム 4 週間投与は QNP 処理群の sIPSC 頻度を

さらに増加させなかった (図 1-5F-H)。また、SB242084 の存在下では錐体神経の sIPSC 振幅は全群間で変化しなかった (図 1-5I, J)。これらの結果は、急性 5-HT_{2C} 受容体遮断作用と同様に、シタロプラムの 4 週間投与が外側 OFC における錐体神経に対する GABA 作動性抑制性入力の低下を増強することを示唆している。

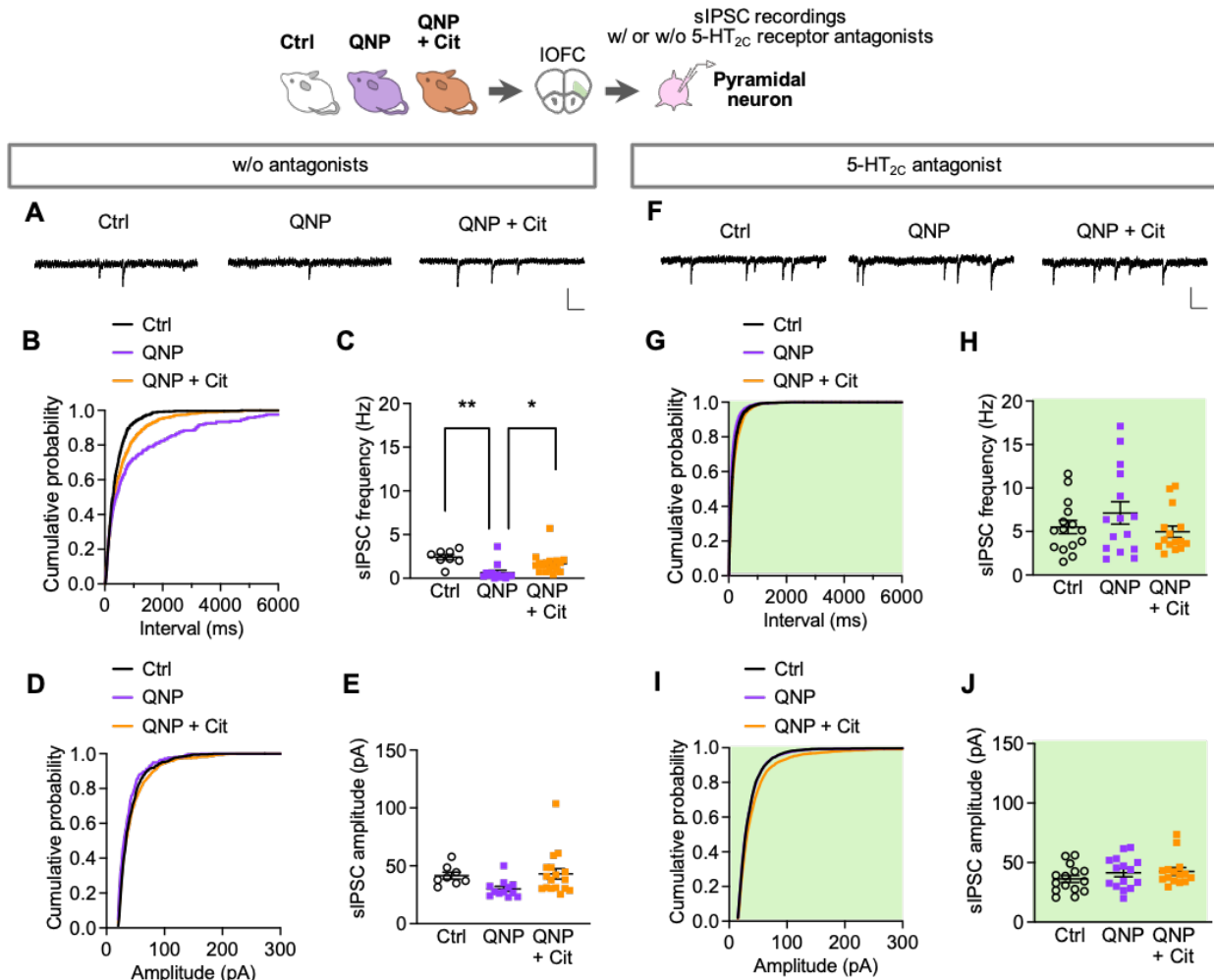


図 1-5 SSRI の 4 週間長期投与および 5-HT_{2C} 受容体遮断薬の急性処置は QNP 投与マウスの外側 OFC における錐体神経の抑制性入力の低下を抑制した

(A) 外側 OFC における錐体神経の sIPSC の代表トレース画像。スケールバー: 100 ms, 50 pA。
 (B, C) 外側 OFC における錐体神経の sIPSC 頻度。n = 8–17 (マウス 3–6 匹)。B: sIPSC 頻度の累積分布。C: 30 秒間の平均値。
 (D, E) 外側 OFC における錐体神経の sIPSC 振幅。n = 8–17 (マウス 3–6 匹)。D: sIPSC 振幅の累積分布。E: 30 秒間の平均値。
 (F) SB242084 (3 μM) を処置した際の外側 OFC における錐体神経の sIPSC の代表トレース画像。スケールバー: 100 ms, 50 pA。
 (G, H) SB242084 (3 μM) を処置した際の外側 OFC における錐体神経の sIPSC 頻度。n = 13–15 (マウス 3 匹)。G: sIPSC 頻度の累積分布。H: 30 秒間の平均値。
 (I, J) SB242084 (3 μM) を処置した際の外側 OFC における錐体神経の sIPSC 振幅。n = 13–15 (マウス 3 匹)。I: sIPSC 振幅の累積分布。J: 30 秒間の平均値。*P < 0.05; **P < 0.01。

次に、外側 OFC での錐体神経への抑制性入力元として介在神経に注目した。QNP 投与マウスの外側 OFC の介在神経の sIPSC 頻度は対照群に比べ有意に高く、それは 4 週間のシタロプラム投与により減少した (図 1-6A-C)。また、シタロプラムは sIPSC 振幅に影響を与えなかった (図 1-6D, E)。SB242084 (3 μ M) 存在下での sIPSC 頻度は全群間で有意差は見られなかった。シタロプラム 4 週間投与は、SB242084 の存在下で介在神経の sIPSC 頻度のさらなる減少を誘発しなかった (図 1-6F-J)。これらの結果から、シタロプラムの 4 週間投与は外側 OFC の介在神経に対する GABA 作動性抑制性入力を低下させることが示唆された。さらに、5-HT_{2C} 受容体遮断薬の急性処置は QNP 投与マウスの外側 OFC の介在神経に対する GABA 作動性抑制性入力の増強を抑制することが明らかとなった。

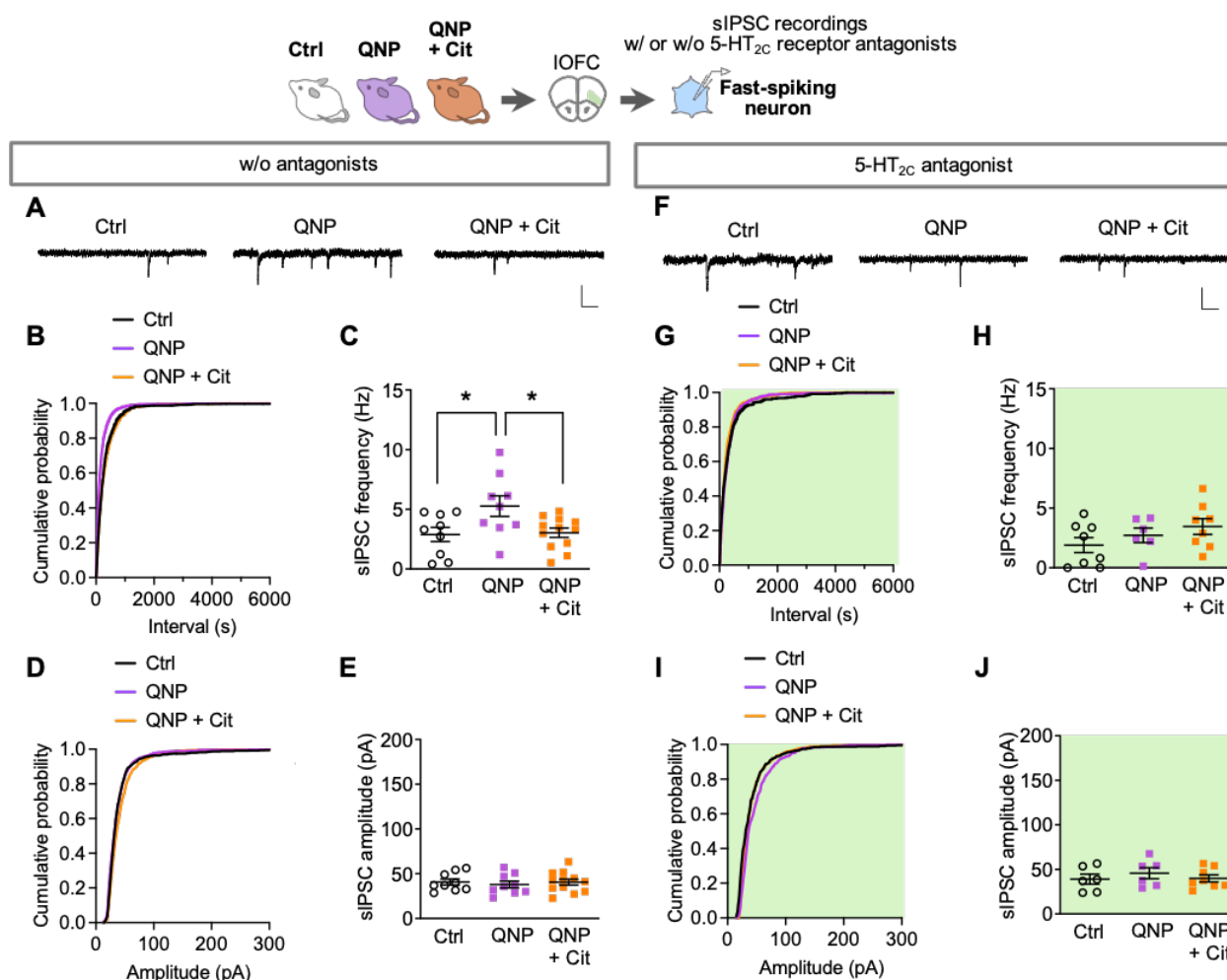


図 1-6 SSRI の 4 週間長期投与および 5-HT_{2C} 受容体遮断薬の急性処置は QNP 投与マウスの外側 OFC における介在神経の抑制性入力の増加を抑制した

(A) 外側 OFC における介在神経の sIPSC の代表トレース画像。スケールバー: 100 ms、50 pA。
 (B, C) 外側 OFC における介在神経の sIPSC 頻度。n = 8–12 (マウス 3 匹)。B: sIPSC 頻度の累積分布。C: 30 秒間の平均値。(D, E) 外側 OFC における介在神経の sIPSC 振幅。n = 8–12 (マウス 3 匹)。D: sIPSC 振幅の累積分布。E: 30 秒間の平均値。(F) SB242084 (3 μ M) を処置した際の外側 OFC における介在神経の sIPSC の代表トレース画像。スケールバー: 100 ms、50 pA。(G, H) SB242084 (3 μ M) を処置した際の外側 OFC における介在神経の sIPSC 頻度。n = 6–8 (マウス 3–4 匹)。G: sIPSC 頻度の累積分布。H: 30 秒間の平均値。(I, J) SB242084 (3 μ M) を処置した際の外側 OFC における介在神経の sIPSC 振幅。n = 6–8 (マウス 3–4 匹)。I: sIPSC 振幅の累積分布。J: 30 秒間の平均値。* P < 0.05。

第 5 節 5-HT_{2C} 受容体遮断薬短期投与が QNP 誘発の外側 OFC 神経過活動と固執行動へ与える影響

5-HT_{2C} 遮断作用の生体内での神経過活動への効果を確認するために、SB242084 (1 mg/kg/day, i.p.) を 4 日間投与し、外側 OFC の c-Fos 陽性細胞を観察した。電気生理学的観察と一致して、SB242084 の投与は外側 OFC において QNP 誘発の c-Fos 陽性細胞数の増加を抑制した (図 1-7A, B)。

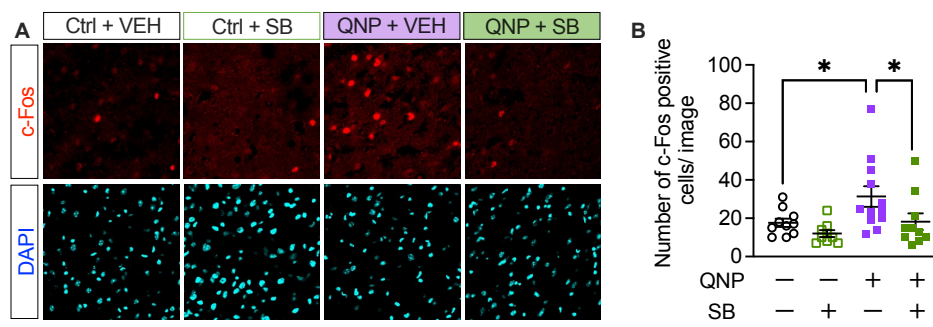


図 1-7 5-HT_{2C} 受容体遮断薬の 4 日間短期投与は QNP 投与による外側 OFC の c-Fos 陽性細胞数の増加を抑制した

8 日間溶媒または QNP (1 mg/kg) を投与し、さらに 4 日間で QNP 投与 5 分前に溶媒 (VEH) または SB242084 (SB; 1 mg/kg) を投与した。最終 QNP 投与 2 時間後に脳を回収した。外側 OFC を含む冠状切片を作製し、抗 c-Fos 抗体で染色し、共焦点顕微鏡で画像化した。n = 9–12。(A) 外側 OFC における c-Fos 陽性細胞の代表画像。赤: 神経活性化マーカーである c-Fos、シアン: DAPI、スケールバー: 50 μm。(B) 外側 OFC の c-Fos 陽性細胞数。**P* < 0.05。

次に 5-HT_{2C} 遮断薬の固執行動への急性的な効果を検討した。SB242084 の 4 日間投与の効果を調べるため、逆転学習期の 4 日間のみ SB242084 (1 mg/kg/day, i.p.) を前投与した。その結果、SB242084 の 4 日間投与は逆転学習期における QNP 誘発の正答率の低下を有意に増加させた (図 1-8A–C)。シタロプラム 4 週間投与マウスに対する SB242084 (1 mg/kg/day, i.p.) の 4 日間前投与は、逆転学習における正答率のさらなる増加を誘発しなかった (図 1-8D–F)。これらの結果から、5-HT_{2C} 受容体遮断作用は固執行動に対して急性の改善効果を有することが示唆された。

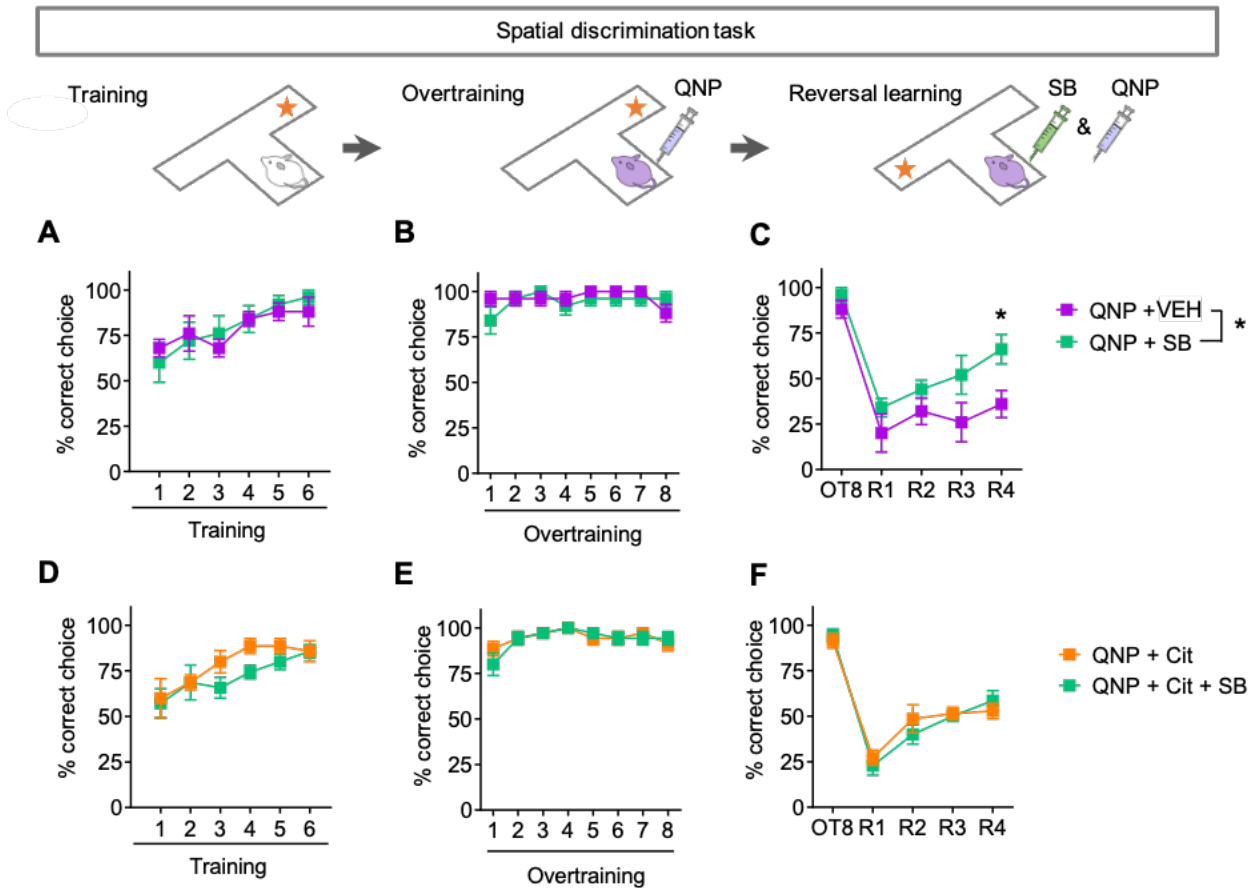


図 1-8 5-HT_{2C} 受容体遮断薬の 4 日間短期投与は QNP による固執行動を改善した

(A-C) 過剰学習期と逆転学習期に QNP (1 mg/kg) を投与した。逆転学習期には QNP 投与 5 分前に溶媒 (VEH) または SB242084 (SB; 1 mg/kg) をマウスに投与した。6 日間の学習期 (A)、8 日間の過剰学習期 (B) と 4 日間の逆転学習期 (C) における正答率。n = 5。(D-F) 過剰学習期と逆転学習期に QNP (1 mg/kg) を投与した。逆転学習期の 1 日目の 4 週間前からシタロプラム (24 mg/kg/日; Cit) を飲水投与した。逆転学習期には、QNP 投与 5 分前に溶媒 (VEH) または SB242084 (SB; 1 mg/kg) を投与した。6 日間の学習期 (D)、8 日間の過剰学習期 (E) と 4 日間の逆転学習期 (C) における正答率。n = 7。* $P < 0.05$ 。

考察

本章では、4週間のSSRI投与はQNP投与による固執行動を改善することが明らかになった。また、4週間のSSRI投与はQNP投与マウスの外側OFCにおける錐体神経過活動を抑制し、錐体神経への抑制性入力への減弱と介在神経への抑制性入力への増強を改善した。5-HT_{2C}受容体遮断薬の急性処置は慢性SSRI投与と同様の効果を示した。さらに、4週間のSSRI投与は5-HT_{2C}受容体刺激薬による神経活動上昇を抑制した。4日間の5-HT_{2C}受容体遮断薬投与は、QNP投与による外側OFCの神経過活動を抑制し、固執行動も改善した。

OFCにおける神経細胞のうち、錐体神経がほとんどの割合を占め、介在神経は10%を占めている (Homayoun and Moghaddam, 2008)。大脳皮質における介在神経の主要なサブタイプの1つは、パルブアルブミン (PV) 陽性介在神経である (Kepecs and Fishell, 2014)。一般的に、PV陽性介在神経が大脳皮質の錐体細胞に抑制性入力を行う主要な神経種であるとされている (Rudy *et al.*, 2011)。また、OCD患者の前頭前野でPV遺伝子の発現が低下しており (Jaffe *et al.*, 2014)、錐体神経への抑制性入力に異常があることが示唆されている。これらの報告と一致して、QNP投与マウスでは外側OFCにおいて介在神経の抑制性入力が増強することで、錐体神経が脱抑制されている可能性がある。

前述のように皮質においてPV陽性神経の割合は低いものの、逆転学習を含む行動変化に重要な役割を担っている (Courtin *et al.*, 2014; Goodwill *et al.*, 2018)。例えば、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子受容体をコードする遺伝子を欠損したマウスは前頭皮質のPV陽性介在神経が減少しており、逆転学習が障害される (Bissonette *et al.*, 2015)。さらに、OFCのPV陽性介在神経を光遺伝学的に抑制した場合も逆転学習は障害された (Goodwill *et al.*, 2018)。さらなる検討が必要であるが、外側OFCのPV陽性介在神経の活動低下はOCD病態に関与する可能性がある。

意思決定におけるOFCの役割は多く報告されているが、逆転学習におけるOFCの関与は未だ議論の余地がある。今回の結果と一致して、視床から外側OFCへの興奮性入力を光遺伝的に抑制すると、慢性ストレスを経験したラットの逆転学習障害が改善される (Adler *et al.*, 2020)。一方、これらの知見と反していくつかの研究では、特に通常の状態、すなわち薬物やストレスのない状態において、外側OFCが認知柔軟性に必要であることが示されている。具体的には、外側OFCの損傷または不活性化は逆転学習を障害させることが示唆されている (Banerjee *et al.*, 2020; Burke *et al.*, 2009; Dalton *et al.*, 2016; Izquierdo *et al.*, 2013)。最近の知見では、OFCが逆転学習の実行を双方向に制御していることが示されている。逆転学習は、OFCから側坐核への経路の除去によって障害され、OFCから扁桃核への経路の除去によって促進される (Groman *et al.*, 2019)。これらの報告から、SSRIの長期投与は外側OFCの錐体神経の活動を回路特異的に調節する可能性がある。しかし、この可能性を確認するためには細胞種特異的および経路特異的な検討が必要である。

SSRI長期投与による治療メカニズムの一つとして、5-HT受容体のダウンレギュレーション

オンが考えられる。SSRI の慢性投与は、前頭前野の 5-HT_{2C} 受容体の発現を低下させる (Barbon *et al.*, 2011)。今回の著者の検討では、4 週間の SSRI 投与は外側 OFC 錐体神経の 5-HT_{2C} 受容体を介した活性化を抑制することを示した。これらの結果は、4 週間の SSRI 投与後に外側 OFC で 5-HT_{2C} 受容体シグナルが減弱することを示唆している。今回の結果である 5-HT_{2C} 受容体遮断薬を用いた電気生理学的記録は、QNP 投与マウスにおける神経活動および抑制性入力 of 改善に 5-HT_{2C} 受容体シグナルの低下が十分であることを明らかにした。しかし、SSRI 長期投与の治療メカニズムを正確に解明するためには、特に 5-HT_{2C} 受容体ダウンレギュレーションの必要性についてさらなる検討が必要であると考えられる。

SSRI は大脳皮質の細胞外セロトニン濃度を増加させ、長期投与によってさらなる増加を引き起こすことが広く認められている (Arborelius *et al.*, 1996)。今回の結果において、SSRI の 4 週間投与と同様、5-HT_{2C} 受容体遮断薬は QNP 反復投与による神経・行動異常を抑制した。5-HT_{2C} 受容体遮断薬は大脳皮質のセロトニン濃度を変化させないことから (Millan *et al.*, 1998)、OCD 様の異常に対する改善効果は外側 OFC における細胞外セロトニン濃度の増加に依存しない可能性がある。この考察を支持する臨床報告として、トリプトファン欠乏食によるセロトニン合成の減少は不安症状を悪化させるが (Barr *et al.*, 1994)、SSRI を用いた治療に成功した OCD 患者の症状に影響を与えないことが明らかになっている (Berney *et al.*, 2006; Külz *et al.*, 2007)。これらの結果から、SSRI の長期投与は、セロトニン濃度増加よりも 5-HT_{2C} 受容体シグナルの減弱によって OCD 関連の異常を改善する可能性がある。

QNP 反復投与による外側 OFC の錐体神経過活動に対する SSRI の改善効果は、5-HT_{2A} 受容体遮断薬ではなく、5-HT_{2C} 受容体遮断薬処置によっても再現された。5-HT_{2A} 受容体と 5-HT_{2C} 受容体は OFC を含む皮質領域の GABA 作動性介在神経で発現している (Nocjar *et al.*, 2015; Santana and Artigas, 2017)。両受容体は神経において興奮性シグナル伝達を媒介する Gq タンパク質に結合するが、それぞれの受容体が異なる特性を有している。前頭前皮質における 5-HT_{2A} 受容体の発現量は 5-HT_{2C} 受容体よりも高い (Santana and Artigas, 2017)。一方、セロトニンは 5-HT_{2C} 受容体に対して高い親和性と作用強度を示す (Knight *et al.*, 2004; Porter *et al.*, 1999)。前頭前皮質における GABA 作動性介在神経の多くは 5-HT_{2C} 受容体を発現するが (Liu *et al.*, 2007; Nocjar *et al.*, 2015)、5-HT_{2A} 受容体を発現する GABA 作動性介在神経集団は少数である (Santana *et al.*, 2004)。これらの 5-HT_{2A} 受容体と 5-HT_{2C} 受容体サブタイプの機能的および解剖学的な違いは、本章の遮断薬を用いた検討で認められた効果の違いを支持するものである。さらに、5-HT_{2C} 受容体は介在神経に豊富に発現していることから、SSRI 長期投与は外側 OFC の介在神経の上流にある 5-HT_{2C} 受容体発現介在神経に影響を与えることが考えられる。この仮説を検証するためには、さらに細胞種特異的な検討が必要である。

QNP 反復投与は外側 OFC における錐体神経への抑制性入力を減少させ、錐体神経の活動亢進を誘発した。また、これらの変化は SSRI 長期投与と 5-HT_{2C} 受容体遮断薬の短期投与により回復した。所属研究室での以前の報告では、QNP による神経過活動は SSRI 長期投与によって抑制され、この効果は GABA_A 受容体遮断薬の存在下で消失することを明ら

かにした (Asaoka *et al.*, 2019)。神経活動変化と抑制性入力変化の関連性が示唆されるが、神経活動は *current injection* による発火応答で評価しているため、*phasic GABA_A* 電流の減少が直接錐体神経の活動亢進を引き起こしたとは考えにくい。メカニズムの一つとして、神経活動を持続的に抑制する *tonic GABA_A* 電流が考えられる。このような *tonic* 抑制は、前頭前皮質を含む様々な脳領域で報告されており、*current injection* による発火反応を抑制する (Kita *et al.*, 2021, Trujeque-Ramos *et al.*, 2018)。シナプスからの *GABA* 放出は *tonic GABA_A* 電流の振幅を制御する要因の一つである (Carta *et al.*, 2004)。QNP による錐体神経への抑制性入力の減少は *tonic GABA_A* 電流の減少を介して錐体神経活動を脱抑制する可能性がある。一方で QNP が *GABA_B* 受容体シグナルの減少など他のメカニズムで神経活動活性化を誘発した可能性も残っている。詳細なメカニズムを解明するためには、さらなる電気生理学的検討が必要である。

OCD の増強療法として、抗精神病薬は SSRI と併用される。メタ解析によると、リスペリドンやアリピプラゾールなどの *5-HT_{2C}* 受容体遮断作用を有する抗精神病薬と SSRI の併用は、SSRI 単独使用よりも OCD の重症化を軽減させる効果が高い (Dold *et al.*, 2015)。齧歯類のモデルを用いた検討では、リスペリドン、クロザピンなどの *5-HT₂* 受容体遮断作用を有する抗精神病薬は、*5-HT_{2C}* 受容体シグナルを抑制することにより OFC の神経活動を抑制する (Bergqvist *et al.*, 1999)。これらの報告は、外側 OFC における *5-HT_{2C}* 受容体の抑制作用が OCD 様の固執性を改善するための有効な治療戦略となることを示唆している。

本研究では、SSRI 長期投与は QNP 投与による固執性を改善することが明らかになった。SSRI 長期投与は外側 OFC において *5-HT_{2C}* 受容体刺激による神経活動亢進の効果を減弱させたことから、*5-HT_{2C}* 受容体のダウンレギュレーションの関与が示唆された。これを裏付けるように、SSRI 長期投与と *5-HT_{2C}* 受容体遮断薬の短期投与は、OCD モデルマウスの外側 OFC における錐体神経の活動性と抑制性入力を改善した。また、外側 OFC の介在神経への抑制的入力も減少した。最後に、*5-HT_{2C}* 受容体遮断薬は、固執性に対して即効性の効果を示した。これらの結果は、*5-HT_{2C}* 受容体が OCD の新規治療ターゲットとなる可能性を示している。

第2章

リアルワールドデータ解析で見出された 新規 OCD 治療候補薬の有効性と作用機序

OCD の症状は多岐に渡り、患者の 40–60%は十分な治療期間を経ても SSRI が効果を発揮しない (Bokor *et al.*, 2014; Pallanti *et al.*, 2004; Robbins *et al.*, 2019)。よって、様々な OCD 症状に有効性を示し、即効性のある効果的な治療法が必要とされている。

トランスレーショナル研究では、ヒトと動物の違いから、動物実験のみから臨床効果を予測することは困難である (Machado-Vieira, 2012)。そこで、所属研究室ではリアルワールドデータの発生率解析と遡及的解析を組み合わせたリバーズ・トランスレーショナル研究を開発した (Kaneko *et al.*, 2020)。この方法では、罹患率を算出することで症状の発現と薬剤使用の相関を解析し、有害事象の発生を抑制しうる薬剤を探索することが可能である (Nagaoka *et al.*, 2021; Nagashima *et al.*, 2016; Siswanto *et al.*, 2021)。

薬剤によって強迫観念や強迫行為を引き起こすことがある。特に、ドパミン受容体刺激薬を服用している患者では OCD 様の症状が観察されている (Schirmbeck *et al.*, 2013; Voon *et al.*, 2009)。OCD 患者では線条体 D₂R の結合能の低下などドパミンの異常が報告されていることから (Perani *et al.*, 2008)、原疾患の OCD 患者と薬剤誘発性 OCD 様症状には病態の類似性、特にドパミンの異常が共通することが考えられる。この仮説と一致して、前章でも用いた D₂R 刺激薬である QNP の反復投与は OCD 様行動を誘発する (Asaoka *et al.*, 2019; Asaoka *et al.*, 2021)。この結果も、原疾患の OCD 患者と薬剤誘発性 OCD 様症状に対する共通の治療戦略が存在することを示唆している。

本検討では、FDA Adverse Event Reporting System (FAERS) データと IBM® Watson Health®の米国における保険請求データ (MarketScan データ) の 2 つの臨床データを用いて、OCD の治療候補薬を明らかにした。データ駆動型の候補治療薬の同定後、実証実験として OCD モデルマウスを用いることで、薬剤の効果を評価し、そのメカニズム解明を目指した。

実験方法

FAERS データ解析

臨床ビッグデータの解析は既報と同様とした (Nagaoka *et al.*, 2021; Nagashima *et al.*, 2016; Siswanto *et al.*, 2021)。2004 年から 2019 年までの FAERS データを FDA のウェブサイトからダウンロードした。重複する報告を除外し、11,438,031 例を用いて解析を行った。商品名や略称を含む医薬品名は、ライフサイエンス辞書シソーラスを駆使したテキストマイニングにより一般名に統一した。OCD 様症状は MedDRA (バージョン 23.0) の preferred term (PT) より定義した (表 2-1)。有害事象のリスクは、Z 値を用いた報告オッズ比 (ROR) の算出により評価した。信頼区間 (CI) 付きの ROR と Z 値は以下のように算出した。

FAERS データ内の患者を次の 4 群に分けた: (a) 任意の薬剤を使用し、OCD 様症状を発症した人。(b) 任意の薬剤を使用し、OCD 様症状を発症しなかった人。(c) 任意の薬剤を使用せず、OCD 様症状を発症した人。(d) 任意の薬剤を使用せず、OCD 様症状を発症しなかった人。

$$ROR = \frac{a/b}{c/d}$$

$$95\% \text{ CI} = \exp \left\{ \log (ROR) \pm 1.96 \sqrt{\frac{1}{a} + \frac{1}{b} + \frac{1}{c} + \frac{1}{d}} \right\}$$

$$Z \text{ 値} = \frac{\log (ROR)}{\sqrt{\frac{1}{a} + \frac{1}{b} + \frac{1}{c} + \frac{1}{d}}}$$

Z 値が 1.96 以上の場合、任意の薬剤使用と OCD 様症状発症との間に有意な正の相関があるとした。一方、Z 値が -1.96 未満の場合、任意の薬剤使用と OCD 様症状発症との間に有意な負の相関があるとした。

MarketScan データ解析

2017 年 1 月から 2019 年 12 月までの保険請求データを IBM® Watson Health® から購入した。データセットである米国のメディケアとメディケイドには、43,723,094 人の匿名化された患者とその扶養家族の医療診断と処方箋の請求が日ごとに記録されている。診断名は国際疾病分類 10 (ICD-10) に基づいている。OCD 様症状の症例は ICD-10 によって同定し、D₂R 刺激薬および PPI を使用した患者数を示した (表 2-2-4)。

MarketScan データ登録後の初回イベント発生の時間分布を見ると (図 2-2A, B)、最初に OCD 様症状と診断された、または D₂R 刺激薬 (プラミペキソールまたはロピニロール) を処方された患者数は、最初の 3 ヶ月が非常に多く、4 ヶ月目以降は安定していた。登録後 3 ヶ月以前に OCD 様症状の診断を受けた、または D₂R 刺激薬を処方された患者は、登録前または登録直後に症状を発症していたり継続処方をされていた可能性があるため、コホート解析対象から除外した。

傾向スコアマッチングでは以下の要素を交絡因子として解析した: 高齢者 (65 歳以上)、

性別、SSRI（シタロプラム、エスシタロプラム、フルオキセチン、フルボキサミン、パロキセチン、セルトラリン）、ヒスタミン H₂ 受容体遮断薬（シメチジン、ファモチジン、ニザチジン、ラニチジン）、パーキンソン病（ICD-10 コード: G20）、レストレスレッグス症候群（ICD-10 コード: G2581）、食道・胃及び十二指腸の疾患（ICD-10 コード: K20–29）、肝臓疾患（ICD-10 コード: K7）、腎不全（ICD-10 コード: N17–19）。高プロラクチン血症（ICD-10 コード: E22）は、D₂R 刺激薬が使用される疾患であるため交絡因子に追加した（Moore *et al.*, 2014）。時系列解析には R パッケージ survival（バージョン 3.2.3）および MatchIt（バージョン 3.0.2）を使用した。D₂R 刺激薬使用患者のうち、PPI 非使用群と使用群に分けた後、1:1 の傾向スコアマッチング（Olmos *et al.*, 2015）を用いて、交絡因子の割合を一致させ、Chi-squared test と Fisher's exact test で 2 群間を比較した。傾向スコアマッチングでは、キャリパー幅 0.01 の最近傍法を用いて 2 つのグループのペアをマッチングして行った（Austin, 2011）。そして D₂R 刺激薬、レボドパ、および PPI の 1 日平均投与量、累積投与量、投与期間を算出し、unpaired *t*-test with Welch's correction で比較した。

OCD 様症状の累積発生率は、従来の生存分析（Yokoyama *et al.*, 2018）を用いて PPI 併用群と非併用群を比較し、生存曲線を Kaplan-Meier 曲線で表した。有意性は log-rank test で評価し、ハザード比の算出には Cox 比例回帰を使用した。Number at risk は、毎日 OCD 様症状が発症する可能性のある患者数を示したものである。

試薬

キンピロールとシタロプラムは第 1 章と同様に調整した。ランソプラゾール（プロトンポンプ阻害剤; 東京化成工業、東京、日本）、ボノプラザン（カリウム競合型プロトンポンプ阻害薬; Struchem, Wujiang, China）およびニゲリシン（H⁺などの一価陽イオンに対する高親和性イオノフォア; Cayman, Ann Arbor, MI）を DMSO に溶解させた。テトロドトキシン（電位依存性 Na⁺チャンネル遮断薬; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO）のストック液は使用時まで -20°C で保存し、生理食塩水、20 % Tween80 溶液（lansoprazole）、人工脳脊髄液（ACSF）、Krebs-Ringer 溶液に溶解して使用した。DMSO の最終濃度は i.p. または i.c.v. の場合は 5% 以下、電気生理学的検討の場合は 0.05% 以下とした。

動物

第 1 章と同様、京都大学動物実験委員会の審査・承認を受け、雄性 C57BL/6J 系統マウス（6–15 週齢）を適切な環境で飼育した。キンピロール投与、およびシタロプラム投与に関しても第 1 章と同様に行った。

脳定位手術と脳室内投与

ボノプラザンの投与には、ガイドカニューレ（Eicom）によって薬物を局所投与した。そのために、マウスをペントバルビタールナトリウム（64.8 mg/kg; kyouritsu Seiyaku Corporation）の腹腔内投与で麻酔し、脳定位固定装置（Narishige）上に固定した後、ガ

イドカニューレを右側脳室内に挿入した（ブレグマから AP = -0.3 mm, ML = +1.0 mm, DV = +3.5 mm）。手術後のマウスの回復期間は少なくとも 7 日間とし、十分な回復の後に行動実験に使用した。ボノプラザン (3 µg) をカニューレから 0.6 µL/min の割合で注入し、注入 5 分後にカニューレを抜いた。実験後注入部位を確認するために、3 µL のエバンスブルー溶液をカニューレから注入した。注入位置が不適切な場合、その動物は解析から除外した。

反復行動の記録

マウスは単頭飼育し、ホームケージでの自発行動を記録した。反復行動が最も強く誘発される最後の QNP 投与 20 分後から 10 分間を評価した (Asaoka *et al.*, 2019; Asaoka *et al.*, 2021)。これまでの所属研究室の報告を参考にし、反復行動を次のように定義した: 前肢で床敷を持ち、口で軽く噛む。

オープンフィールド試験

オープンフィールド装置 (75×75cm) の中央にマウスを置き、ボノプラザンの脳室内直後から 10 分間の行動を記録した。総移動距離はビデオ追跡システム (ANY-maze; バージョン 4.99) を用いて記録・解析した。

オペラント条件付け学習

訓練開始前にマウスを摂食制限した (2–2.2 g/日; 自由摂食時の体重の 80–90%)。ハウスライト、1 個のレバー、1 個の報酬送達ポートを備えたオペラント装置にマウスを入れ、防音ボックス内に置いた。オペラント装置 (Med Associates, St Albans, VT) は MED-PC IV ソフトウェア (Med Associates) で制御させた。各トレーニングセッションは、レバーの出現とハウスライトの点灯で開始し、レバーの消失とハウスライトの消灯で終了した。訓練は 11 日間実行した (Gremel *et al.*, 2018)。まずはじめの 2 日間では、レバーを提示せず平均 60 秒ごとに 15 回の報酬 (報酬 1 回につき 20% スクロース溶液 10 µL) を与えて慣れさせた。その後、3 日間の連続強化 (CRF) 学習では、レバーを押すたびに報酬が与えられ、訓練日ごとに与えられる報酬の上限数が増加した (5、15、30)。その後、ランダム比 (RR) 強化学習を 6 日間行った。マウスは 2 日間 RR10 スケジュール (平均 10 回のレバー押しで報酬が 1 回与えられる) で訓練され、その後 4 日間 RR20 スケジュール (平均 20 回のレバー押しで報酬が 1 回与えられる) で訓練を受けた。各 RR 学習は、マウスが 15 回報酬を獲得した後、あるいは 60 分経過した後で終了した。

6 日間の RR 学習後、2 日連続で報酬価値軽減の試験を実施した。試験において、マウスは 30 分間餌ペレット (対照の報酬; valued) またはスクロース溶液 (レバー押しによって得られていた報酬; devalued) を自由に摂食することができた。その後、レバーを押したとしても報酬は得られない条件で、5 分間マウスのレバー押し回数を記録した。Devaluation index は以下のように算出した: $[(\text{valued でのレバー押し数}) - (\text{devalued でのレバー押し数})] / [(\text{valued でのレバー押し数}) + (\text{devalued でのレバー押し数})]$ 。Valued と devalued の

順番は無作為に決定した。

脳組織サンプルの準備

マウスにペントバルビタール (64.8 mg/kg) を腹腔内投与することで麻酔を行い断頭した。既報を参考にして (Asaoka *et al.*, 2021)、1-mm マウス脳スライサーで脳切片を作製した。Brain Atlas (Franklin and Paxinos, 2007) に従って、各脳領域はカミソリ刃を使用して分画した。回収したサンプルは液体窒素で凍結し、 -80°C で保存した。

Real-time RT-qPCR

mRNA は NucleoSpin RNA Kit (Toyobo) を用いて抽出し、抽出した mRNA は濃度をそろえたのち、ReverTra Ace qPCR RT Kit (Toyobo) により cDNA に逆転写した。Real-time quantitative PCR には、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo) を用い、StepOne real-time PCR system (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を使用して反応・解析を行った。内部標準遺伝子には、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用い、mRNA の発現量は対照群に対する相対発現量で示した。実験に用いたプライマーは以下の通りである。

Gapdh (Fw: 5'- CTTACTAATTGGAGGCCATGTAG -3', Rv: 5'- TGTC AAGCTCATTTCCTGGT -3')

Atp4a (Fw: 5'- GCTGGTTCCTCTGTTGTGT -3', Rv: 5'- TACAGGCGCTGACCAAATGT -3')

免疫染色

第一章の実験方法と同様に行った。

ウイルスベクターの作製と精製

AAV-hSyn-mCherry-SEpHluorin-miRNA の作製には、hSyn-mCherry-SEpHluorin (#32001; Addgene Plasmid) から PCR で増幅した hSyn-mCherry-SEpHluorin 断片を pAAV-CMV-EmGFP-miRNA (Tanaka *et al.*, 2021) から得た AAV 配列と結合させた。使用した miRNA 標識配列は以下の通りである。

Negative control (NC) : 5'- GAGACCGTTTAAACGTCTCA -3'

Atp4a: 5'- AAAGATCTGTGCAGAGTTCGTTGCCACTGACGAACTCTGCAGATCTTT -3'

アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) は既報にしたがって作製した (Nagaoka *et al.*, 2021)。Lenti-X 293T 細胞 (Clontech) に、pAAV-hSyn-mCherry-SEpHluorin、pAAV-DJ (VPK-402-DJ; Cell Biolabs) と pHelper (240202; Cell Biolabs) を混合して、ポリエチレンイミン ('Max,' Polysciences, Warrington, PA, USA) を用いてトランスフェクションした。60–72 時間後、細胞を回収し、凍結融解を 4 回行うことで細胞膜を破壊した。ベンゾナーゼヌクレアーゼ (Sigma-Aldrich) を用いて DNA と RNA を除去した後、少なくとも 5 回 14,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を回収した。

マウス初代培養皮質ニューロンの作製

所属研究室の以前の報告を参考にして(Asaoka *et al.*, 2021)、胎生 14–16 日の C57BL/6J マウスから皮質ニューロンの初代培養液を調製した。細胞は、ポリ-D-リジン (Sigma Millipore) でコーティングしたカバーガラスまたは培養プレートに播種した。2% B-27 プラスサプリメント (Thermo Fisher Scientific) および 1% ペニシリン・ストレプトマイシン・グルタミン溶液 (Nacalai Tesque) 含有 Neurobasal Plus medium (Thermo Fisher Scientific) で 37°C、5% CO₂ のインキュベーター内で培養した。培養液は 2–3 日ごとに半分を交換した。

2 日間培養した後、細胞内 pH の測定および *Atp4a* ノックダウン実験のための細胞を AAV-hSyn-SEpHluorin (図 2-5A)、AAV-hSyn-SEpHluorin-miR/NC または AAV-hSyn-SEpHluorin-miR/*Atp4a* (図 2-5G) に感染させ、さらに 10–12 日間培養した。

電気生理学的記録

急性単離切片の作製においては第 1 章と同様に行った。ACSF は 32°C で常に灌流し、最低 1 時間リカバリを行ってから実験に使用した。リカバリ後、酸素を含む ACSF で灌流させ、27°C ± 1°C で保持した記録チャンバーに切片を移した。記録は切片の作製 4 時間以内に行った。

培養皮質ニューロンからの記録は、酸素含有 ACSF で満たした記録チャンバーにカバースリップを移した後、室温で行った。

電気生理学的記録は第 1 章と同様、EPC9 amplifier および Patchmaster software を用いて行った。Current-clamp 記録の電極内液は第 1 章と同様である。Voltage-clamp 記録の電極内液は以下の通りである: 120 mM CsMeSO₄, 15 mM CsCl, 8 mM NaCl, 10 mM HEPES, 2 mM Mg-ATP, 0.3 mM Na-GTP, 0.2 mM EGTA, 10 mM TEA-Cl, 5 mM QX-314 (CsOH で pH 7.3 または 7.0 に調整した)。

神経細胞の観察と錐体神経の定義については第 1 章と同様である。

神経発火の記録は電流固定条件で行った (保持電流: 0 pA)。活動電位は current injection によって誘発した (0–500 pA、1 秒持続)。ボノプラザンを処置した実験では、ボノプラザン (10 μM) 処置前と処置 5 分後に発火反応を記録した。AAV 感染細胞では、400pA を超える電流を注入するとほとんど発火しなくなるため、0–300pA の条件で検討を行った。

細胞内 pH 測定

カバーガラス上の細胞はクレブス・リンゲル液 (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 10 mM glucose, 10 mM HEPES; NaOH で pH 7.3 に調整) 中に置き、SEpHluorin 由来の蛍光をイメージングシステム (AQUACOSMOS/ORCA-AG、浜松ホトニクス、静岡、日本) を用いて 480 nm の波長で 1 秒ごとに記録した。校正のため、神経細胞を高カリウム含有クレブス・リンゲル液 (3 mM NaCl, 140 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 10 mM D-glucose, 10 mM HEPES, 5 μM nigericin、NaOH で pH 6.7–7.9 に調整) でインキュベートした。ボノプラザン処置の実験において、発火数の低下が細胞内

のアルカリ化を誘発するため (Bonnet *et al.*, 2000)、ボノプラザン処置 15 分前にテトロドトキシン (0.3 μM) を処理することで神経活動の影響を消失させた。解析では、ベースラインの GFP 蛍光強度をボノプラザン処置 3 分前から 2 分間の平均値とし、ボノプラザンによる影響については薬剤処置 5 分後の値を算出した。Atp4a KD 細胞を用いた検討においては、GFP 蛍光強度を測定開始 9 分以内の 2 分間の平均値とした。

統計解析

全てのデータは平均値 \pm 標準誤差で表示した。統計解析は GraphPad Prism9.3.1 を用いて行い、危険率 5%未満を統計的に有意であるとみなした。

2 群の有意差検定には two-tailed Student's t test または unpaired t test with Welch's correction を使用した。3 群以上の有意差検定には one-way ANOVA または two-way ANOVA および *post hoc* 試験として Sidak's multiple comparison test を使用した。クロスオーバーデザインの結果の解析においては、two-way ANOVA および *post hoc* 試験として Tukey's multiple comparisons test を使用した。オペラントレバー押しによる報酬価値軽減の試験の解析には、three-way ANOVA および *post hoc* 試験として Holm-Sidak's multiple comparisons test を使用した。

実験結果

第1節 リアルワールド解析を用いた D₂R 刺激薬誘発 OCD 様症状を抑制する薬剤の探索

はじめに、薬剤の使用と OCD 様症状の発症との関連を調べるために、世界最大の有害事象自発報告データである FAERS データを解析した (表 2-1)。

表 2-1 FAERS データにおける OCD 様症状の定義

PT	患者数
Obsessive-compulsive disorder	5,674
Compulsive shopping	1,547
Obsessive thoughts	1,281
Compulsive sexual behaviour	650
Trichotillomania	428
Compulsions	419
Compulsive hoarding	281
Obsessive-compulsive symptom	122
Compulsive lip biting	60
Obsessive rumination	37
Compulsive cheek biting	20
Compulsive handwashing	18

不均衡解析の結果、ドパミン受容体刺激薬の使用と OCD 様症状発症の増加との間に有意な関連が認められた (図 2-1A)。また、ドパミン受容体刺激薬のうち、D₂R 刺激薬のプラミペキソールとロピニロールは高い ROR および Z 値を示した (プラミペキソール: ROR = 70.7、Z 値 = 130; ロピニロール: ROR = 22.4、Z 値 = 60.7)。また、アリピプラゾールは OCD 様症状の発症と強い相関関係を示したが (図 2-1A; ROR = 40.6、Z 値 = 143)、アリピプラゾールは治療抵抗性 OCD 患者の増強薬として広く用いられていることを考慮すると、この関連性は母集団の偏りに由来する可能性がある (Delle Chiaie *et al.*, 2011)。臨床報告 (Evans *et al.*, 2009; Nirenberg *et al.*, 2006; Salas *et al.*, 2009) と一致して、本解析によって D₂R 刺激薬の使用と OCD 様症状に関連性があることが示されたため、D₂R 刺激薬に着目して後の検討を進めた。

続いて、D₂R 刺激薬による OCD 様症状を抑制しうる併用薬を FAERS データの解析により網羅的に解析した。D₂R 刺激薬使用者を解析対象として不均衡解析を行ったところ、OCD 様症状の割合を低下させる併用薬としてビタミン D (コレカルシフェロール、エルゴカルシフェロール)、ループ利尿薬 (フロセミド、トルセミド、ブメタニド)、プロトンポンプ阻害薬 (PPI; パントプラゾール、オメプラゾール、エソプラゾール、ランソプラゾール、ラベプラゾール) にクラス効果が認められた (図 2-1B)。D₂R 刺激薬を用いて治療されるレストレスレッグス症候群に対してビタミン D は治療効果があることから (Wali *et al.*, 2015)、D₂R 刺激薬の投与量を減少させる可能性があるため、D₂R 刺激薬による OCD

様症状の発症を抑制する候補薬から除外した。さらに、ループ利尿薬は腎排泄されるプラミペキソールの薬物動態に影響を及ぼす可能性があるため除外した (You *et al.*, 2020)。したがって、D₂R 刺激薬による OCD 様症状を抑制するための併用薬として PPI に着目した。

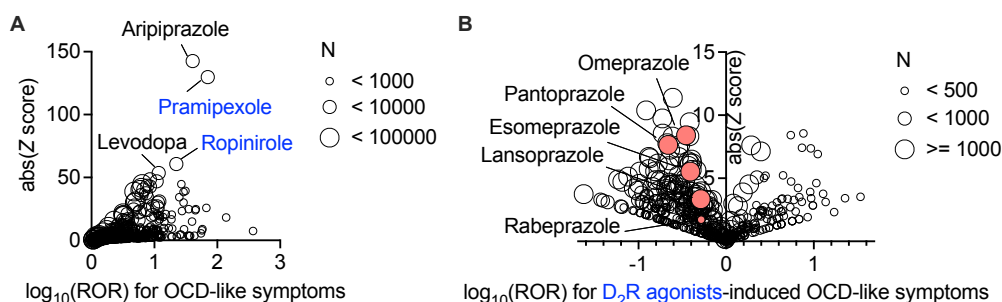


図 2-1 FAERS データ解析によって D₂R 刺激薬使用による OCD 様症状の報告率は増加し、PPI の併用により低下することが明らかになった

FAERS データにおいて、ボルケーノプロットは対数スケールの報告オッズ比 (ROR) と有意性を示す指標である絶対値をとった Z 値で示した。各プロットの大きさは薬剤使用患者の人数を反映した。(A) プラミペキソールとロピニロールなどの D₂R 刺激薬使用患者では OCD 様症状の ROR が有意に増加した。(B) D₂R 刺激薬使用患者において、薬剤誘発 OCD 様症状に対する薬剤併用効果を示した。

次に、D₂R 刺激薬使用者数および処方日に関する情報を含む MarketScan データから、D₂R 刺激薬による OCD 様症状発症に対する PPI の影響を解析した (図 2-2A, B、表 2-2-4)。

PPI を使用した患者は D₂R 刺激薬使用後に初めて PPI を処方された患者と定義した。既知の交絡因子 (Barragry *et al.*, 1986; Bokor *et al.*, 2014; Moore *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2018) を排除するために、傾向スコアマッチングを行った (表 2-5-8)。

患者背景が一致した PPI 非使用群と使用群における D₂R 刺激薬、レボドパ、PPI の 1 日平均投与量、累積投与量、投与期間について算出した (表 2-9)。D₂R 刺激薬と PPI の投与量は、それぞれレボドパ換算量 (LED) (Tomlinson *et al.*, 2010) とオメプラゾール換算量 (OED) (Graham *et al.*, 2018) に変換した。D₂R 刺激薬と PPI の 1 日投与量は、米国における標準的な投与量の範囲内であった (D₂R 刺激薬: LED 12.5–450、PPI: OED 5–40)。レボドパの使用と OCD 様症状発症の関連性が報告されているため (Weintraub *et al.*, 2010)、レボドパの投与量の違いが発症率の差に影響することが示唆される。しかし、レボドパの投与量は妥当であり (標準用量: LED 42–500)、2 群間で投与量に差はなかった。

そこで、D₂R 刺激薬による OCD 様症状に対する PPI の効果を評価するために、時系列解析を行った。Kaplan-Meier 解析および Cox 比例回帰によって、FAERS 解析と同様、PPI の併用は D₂R 刺激薬によって誘発される OCD 様症状の発症率を有意に減少させることが明らかになった (図 2-2C、ハザード比: 0.432、95% CI: 0.238–0.783、*P* = 0.004)。一方、H₂ 受容体遮断薬の併用は D₂R 刺激薬による OCD 様症状の発症率に影響を与えなかったことから (図 2-2D、ハザード比 1.10、95% CI: 0.359–3.39、*P* = 0.090、表 2-10–15)、PPI による OCD 様症状の発症抑制は胃酸分泌抑制や胃腸疾患には起因しないことが示唆された。

以上の解析から、PPI の併用は OCD 様症状を軽減させる可能性が示された。

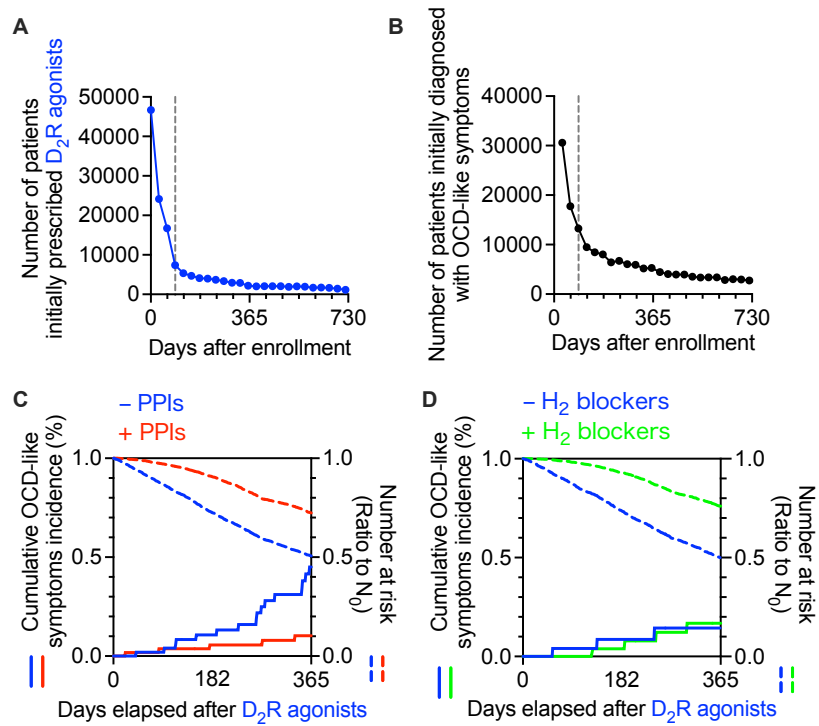


図 2-2 MarketScan データ解析によって D₂R 刺激薬使用による OCD 様症状の発症率は PPI の併用により低下することが明らかになった

(A, B) MarketScan データの登録後、初回のイベント発生までの時間分布。保険加入から D₂R 刺激薬の初回処方 (A)、OCD 様症状の初回診断 (B) までの期間。(C, D) 患者の特性を一致させた後、D₂R 刺激薬服用患者における OCD 様症状の累積発症率を Kaplan-Meier 曲線として実線で示した。全体の患者数に対する OCD 様症状発症リスクのある患者数の比率を点線で示した。(C) PPI 非併用群 (青) と併用群 (赤) の全体の累積発症率 (両群とも n₀ = 5,528)。(D) H₂ 受容体遮断薬非併用群 (青) と併用群 (緑) の全体の累積発症率 (両群とも n₀ = 2,680)。

表 2-2 MarketScan データにおける D₂R 刺激薬の定義

薬剤	剤型	患者数
Pramipexole Dihydrochloride	Oral	65,937
Ropinirole Hydrochloride	Oral	101,833

表 2-3 MarketScan データにおける PPI の定義

薬剤	剤型	患者数	薬剤	剤型	患者数
Omeprazole	Oral	1,866,889	Amoxicillin;Clarithromycin	Oral	1,285
Pantoprazole Sodium	Oral	1,127,643	;Omeprazole		
Esomeprazole	Oral	280,157	Omeprazole	Route Not	492
Magnesium				Applicable	
Lansoprazole	Oral	154,310	Esomeprazole Strontium	Oral	220
Dexlansoprazole	Oral	88,083	Aspirin/Omeprazole	Oral	160
Rabeprazole Sodium	Oral	39,442	Lansoprazole	Route Not	90
Esomeprazole	Oral	21,619		Applicable	
Magnesium/Naproxen			Pantoprazole Sodium	Intravenous	74
Amoxicillin;Clarithromycin	Oral	15,596	Esomeprazole Sodium	Intravenous	6
;Lansoprazole			Omeprazole;Powder,	Route Not	3
Omeprazole/Sodium	Oral	9,958	Multi Ingredient	Applicable	
Bicarbonate				Route Not	
Omeprazole Magnesium	Oral	1,502	Pantoprazole Sodium	Applicable	2

表 2-4 MarketScan データにおける OCD 様症状の定義

症状	ICD-10	患者数	症状	ICD-10	患者数
Obsessive-compulsive disorder	F42	36,092	(Non-Billable Dx) Habit and	F63	12
Mixed obsessional thoughts and acts	F422	51,797	impulse disorders		
Hoarding disorder	F423	1,706	Trichotillomania	F633	10,579
Excoriation (skin-picking) disorder	F424	8,375	(Non-Billable Dx) Other habit and	F638	14
Other obsessive-compulsive disorder	F428	15,619	impulse disorders		
Obsessive-compulsive disorder, unspecified	F429	80,201	Other habit and impulse disorders	F6389	2,527
			Habit and impulse disorder, unspecified	F639	10,145

表 2-5 傾向スコアマッチング前の PPI 非使用患者・使用患者の特性

	Without PPIs		With PPIs		P value
Number of patients	46,278	100%	5,531	100%	
OCD-like symptoms (day <= 365)	158	0.341%	5	0.090%	
Median age (IQR)	53 (44–61)		54 (45–61)		
Elderly (over 65)	6,368	13.8%	909	16.4%	7.07*10 ⁻⁸
Female	28,044	60.6%	3,758	67.9%	< 2.20*10 ⁻¹⁶
Concomitant drug					
SSRI	16,585	35.8%	2,323	42.0%	< 2.20*10 ⁻¹⁶
H ₂ blocker	2,870	6.20%	973	17.6%	< 2.20*10 ⁻¹⁶
Comorbidity					
Parkinson disease	2,824	6.10%	251	4.54%	3.78*10 ⁻⁶
Restless legs	26,343	56.9%	3,416	61.8%	6.75*10 ⁻¹²
Diseases of oesophagus, stomach and duodenum	7,833	16.9%	3,688	66.7%	< 2.20*10 ⁻¹⁶
Diseases of liver	3,150	6.81%	901	16.3%	< 2.20*10 ⁻¹⁶
Renal failure	3,395	7.34%	672	12.1%	< 2.20*10 ⁻¹⁶

表 2-6 傾向スコアマッチング前の OCD 様症状非発症患者・発症患者の特性

	Without		With		P value
	OCD-like symptoms		OCD-like symptoms		
Number of patients (day <= 365)	51,646	100%	163	100%	
Elderly (over 65)	7,263	14.1%	14	16.4%	0.058
Female	31,708	61.4%	94	67.9%	0.371
Concomitant drug					
SSRI	18,817	36.4%	91	42.0%	4.34*10 ⁻⁷
H ₂ blocker	6,080	11.8%	14	17.6%	0.255
Comorbidity					
Parkinson disease	3,065	5.93%	10	4.54%	1.00
Restless legs	29,686	57.5%	73	61.8%	0.001
Hyperprolactinemia	142	0.275%	4	2.45%	1.61*10 ⁻⁷
Diseases of oesophagus, stomach and duodenum	11,500	22.3%	21	66.7%	0.005
Diseases of liver	4,039	7.82%	12	16.3%	0.943
Renal failure	4,058	7.86%	9	12.1%	0.336

表 2-7 傾向スコアマッチング後の PPI 非使用患者・使用患者の特性

	Without PPIs		With PPIs		P value
	Number	Percentage	Number	Percentage	
Number of patients	5,528	100%	5,528	100%	
OCD-like symptoms (day <= 365)	16	0.289%	5	0.090%	
Median age (IQR)	55 (46–62)		54 (45–61)		
Elderly (over 65)	932	16.9%	909	16.4%	0.574
Female	3,761	66.0%	3,755	67.9%	0.640
Concomitant drug					
SSRI	2,353	42.6%	2,320	42.0%	0.538
H ₂ blocker	915	16.6%	865	15.6%	0.205
Comorbidity					
Parkinson disease	228	4.12%	251	4.54%	0.304
Restless legs	3,436	62.2%	3,413	61.7%	0.667
Diseases of oesophagus, stomach and duodenum	3,685	66.7%	3,685	66.7%	1.00
Diseases of liver	855	15.5%	898	16.2%	0.274
Renal failure	688	12.4%	669	12.1%	0.602

表 2-8 傾向スコアマッチング後の OCD 様症状非発症患者・発症患者の特性

	Without OCD-like symptoms		With OCD-like symptoms		P value
	Number	Percentage	Number	Percentage	
Number of patients (day <= 365)	11,035	100%	21	100%	
Elderly (over 65)	1,840	16.7%	1	4.76%	0.236
Female	7,471	67.7%	15	71.4%	0.896
Concomitant drug					
SSRI	4,657	42.2%	16	76.2%	3.40*10 ⁻³
H ₂ blocker	1,777	16.1%	3	14.3%	1.00
Comorbidity					
Parkinson disease	479	4.34%	0	0%	1.00
Restless legs	6,839	62.0%	10	47.6%	0.259
Hyperprolactinemia	43	0.390%	1	4.76%	0.080
Diseases of oesophagus, stomach and duodenum	7,358	66.7%	12	57.1%	0.487
Diseases of liver	1,750	15.9%	3	14.3%	1.00
Renal failure	1,354	12.3%	3	14.3%	1.00

表 2-9 傾向スコアマッチング後の PPI 非使用患者・使用患者の投与量、投与期間

		Without PPIs (n = 5,528)	Without PPIs (n = 5,528)	P value	T value
D ₂ R agonists	Average daily dose (LED, median&IQR)	20.0 (10.0–50.0)	25.0 (12.5–50.0)	0.123	t(10617) = 1.54
	Cumulative dose (LED, median&IQR)	2,250 (750–8,834)	4,200 (1,125–15,900)	0.503	t(8613) = 0.667
Levodopa	Administration period (day, median&IQR)	90 (30–300)	180 (60–450)	< 0.001	t(10541) = 15.0
	Average daily dose (LED, median&IQR)	347 (229–577)	350 (290–7,645)	0.887	t(489) = 0.143
	Cumulative dose (LED, median&IQR)	117,030 (24,000–344,250)	156,000 (36,000–421,650)	0.501	t(450) = 0.674
	Administration period (day, median&IQR)	330 (90–720)	360 (90–750)	0.398	t(449) = 0.847
PPIs	Average daily dose (OED, median&IQR)		20.1 (20.0–40.0)		
	Cumulative dose (OED, median&IQR)		3,000 (1,200–7,200)		
	Administration period (day, median&IQR)		90 (30–240)		

表 2-10 MarketScan データにおける H₂ 受容体遮断薬の定義

Drug	Dosage form	Number of patients
Ranitidine Hydrochloride	Oral	692,834
Famotidine	Oral	378,331
Famotidine/Ibuprofen	Oral	46,032
Cimetidine	Oral	16,555
Nizatidine	Oral	6,297
Cimetidine Hydrochloride	Oral	4,898
Famotidine	Intravenous	158
Ranitidine Hydrochloride	Injection	42
Cimetidine	Route Not Applicable	37
Ranitidine Hydrochloride	Route Not Applicable	20
Famotidine	Route Not Applicable	5
Calcium Carbonate/Famotidine/Magnesium Hydroxide	Oral	2

表 2-11 傾向スコアマッチング前の H₂ 受容体遮断薬非使用患者・使用患者の特性

	Without H ₂ blockers		With H ₂ blockers		P value
Number of patients	64,787	100%	2,682	100%	
OCD-like symptoms (day <= 365)	203	0.313%	4	0.149%	
Median age (IQR)	54 (45–61)		55 (46–62)		
Elderly (over 65)	9,875	15.2%	517	19.3%	1.66*10 ⁻⁸
Female	40,095	61.9%	891	70.5%	< 2.20*10 ⁻¹⁶
Concomitant drug					
SSRI	24,355	37.6%	1,195	44.6%	3.72*10 ⁻¹³
Proton pump inhibitor	21,376	33.0%	1,694	63.2%	< 2.20*10 ⁻¹⁶
Comorbidity					
Parkinson disease	3,591	6.10%	109	4.06%	1.14*10 ⁻³
Restless legs	37,252	57.5%	1,658	61.8%	9.98*10 ⁻⁶
Hyperprolactinemia	169	0.261%	18	0.671%	1.61*10 ⁻⁴
Diseases of oesophagus, stomach and duodenum	20,702	32.0%	1,871	69.8%	< 2.20*10 ⁻¹⁶
Diseases of liver	5,959	9.20%	458	17.1%	< 2.20*10 ⁻¹⁶
Renal failure	5,674	8.76%	361	13.5%	< 2.20*10 ⁻¹⁶

表 2-12 傾向スコアマッチング前の OCD 様症状非発症患者・発症患者の特性

	Without OCD-like symptoms		With OCD-like symptoms symptom		P value
Number of patients (day <= 365)	67,261	100%	207	100%	
Elderly (over 65)	10,375	15.4%	17	8.21%	0.006
Female	41,862	62.2%	124	59.9%	0.535
Concomitant drug					
SSRI	25,424	37.8%	126	60.9%	1.37*10 ⁻¹¹
Proton pump inhibitor	23,013	34.2%	57	27.5%	5.13*10 ⁻²
Comorbidity					
Parkinson disease	3,686	5.5%	14	6.76%	0.511
Restless legs	38,816	57.7%	94	45.4%	4.56*10 ⁻⁴
Hyperprolactinemia	182	0.271%	5	2.42%	2.98*10 ⁻⁴
Diseases of oesophagus, stomach and duodenum	22,526	33.5%	47	22.7%	1.33*10 ⁻³
Diseases of liver	6,398	9.51%	19	9.18%	0.964
Renal failure	6,022	8.95%	13	6.28%	0.221

表 2-13 傾向スコアマッチング後の H₂ 受容体遮断薬非使用患者・使用患者の特性

	Without H ₂ blockers		With H ₂ blockers		<i>P value</i>
Number of patients	2,680	100%	2,680	100%	
OCD-like symptoms (day <= 365)	3	0.112%	4	0.149%	
Median age (IQR)	55 (47–62)		55 (46–62)		
Elderly (over 65)	517	19.3%	515	19.2%	0.972
Female	1,911	71.3%	1,890	70.5%	0.548
Concomitant drug					
SSRI	1,225	45.7%	1,194	44.6%	0.410
Proton pump inhibitor	1,663	62.1%	1,692	63.1%	0.429
Comorbidity					
Parkinson disease	112	4.18%	108	4.03%	0.836
Restless legs	1,664	62.1%	1,656	61.8%	0.844
Hyperprolactinemia	17	0.634%	17	0.634%	1.00
Diseases of oesophagus, stomach and duodenum	1,874	69.9%	1,869	69.8%	0.905
Diseases of liver	456	17.0%	457	17.1%	1.00
Renal failure	348	13.0%	360	13.4%	0.657

表 2-14 傾向スコアマッチング後の OCD 様症状非発症患者・発症患者の特性

	Without OCD-like symptoms		With OCD-like symptoms		<i>P value</i>
Number of patients (day <= 365)	5,353	100%	7	100%	
Elderly (over 65)	1,031	19.3%	1	14.3%	1.00
Female	3,796	70.9%	5	71.4%	1.00
Concomitant drug					
SSRI	2,416	45.1%	3	42.9%	1.00
Proton pump inhibitor	3,353	62.6%	2	28.6%	0.111
Comorbidity					
Parkinson disease	220	4.11%	0	0%	1.00
Restless legs	3,315	61.9%	5	71.4%	0.898
Hyperprolactinemia	33	0.616%	1	14.3%	0.044
Diseases of oesophagus, stomach and duodenum	3,739	69.8%	4	57.1%	0.438
Diseases of liver	911	17.0%	2	28.6%	0.341
Renal failure	707	13.2%	1	14.3%	1.00

表 2-15 傾向スコアマッチング後の H₂ 受容体遮断薬非使用患者・使用患者の投与量、投与期間

		Without H ₂ blockers (n = 2,680)	Without H ₂ blockers (n = 2,680)	P value	T value
D ₂ R agonists	Average daily dose (LED, median&IQR)	20.0 (10.0–49.2)	21.9 (10.0–50.0)	0.164	t(3644) = 1.39
	Cumulative dose (LED, median&IQR)	2,700 (750–9,000)	3,750 (1,050–13,500)	0.097	t(3599) = 1.66
	Administration period (day, median&IQR)	120 (30–300)	180 (60–450)	< 0.001	t(5186) = 8.75
Levodopa	Average daily dose (LED, median&IQR)	305 (269–526)	382 (200–799)	0.777	t(196) = 0.284
	Cumulative dose (LED, median&IQR)	106,830 (27,000–270,750)	210,000 (36,000–565,450)	0.913	t(206) = 0.109
	Administration period (day, median&IQR)	270 (101–608)	450 (128–887)	0.189	t(215) = 2.37
PPIs	Average daily dose (OED, median&IQR)	26.6 (20.0–40.0)	26.6 (20.0–40.0)	0.774	t(3331) = 0.338
	Cumulative dose (OED, median&IQR)	9,600 (3,600–20,400)	9,900 (3,600–21,600)	0.482	t(1955) = 0.703
	Administration period (day, median&IQR)	360 (90–720)	330 (120–720)	0.735	t(2764) = 0.287

第 2 節 D₂R 刺激薬誘発の OCD 様反復行動に対する PPI の影響

前章の通り、マウスへの QNP の反復投与は OCD 様行動と神経学的異常を誘発する (Asaoka *et al.*, 2019; Asaoka *et al.*, 2021; Hatakama *et al.*, 2022)。そこで、リアルワールドデータ解析結果の実証として QNP 誘発 OCD 様行動に対する PPI の効果を評価した。

行動の異常な繰り返しや固執性は OCD 患者や OCD 様症状を示す患者で認められる。臨床研究において、特定の自発行動の過度な繰り返しは OCD 様症状を反映していると考えられている (Ahmari *et al.*, 2013; Welch *et al.*, 2007)。所属研究室の以前の報告と一致して、8 回の QNP (1 mg/kg/day, i.p.) 投与は自発的な噛み行動を反復させた (図 2-3A, B)。QNP 投与 5 分前にマウスに PPI を投与すると (図 2-3C)、ランソプラゾール (100 mg/kg, i.p.) 投与は反復行動を減少させた (Fig. 2-3D)。続いて PPI のクラス効果を検証するために、従来の PPI よりも迅速に標的である P 型プロトンポンプを抑制するボノプラザンを用いて検討を行った (Matsukawa *et al.*, 2011)。その結果、ボノプラザン (100 mg/kg, i.p.) は QNP 誘発の反復行動の増加を抑制した (図 2-3E)。ランソプラゾールと比較すると、ボノプラザンは単回投与によっても抑制効果を発揮した。

脳における PPI の効果を評価するために、ボノプラザンの脳室内投与を行った。全身投与の結果と同様、ボノプラザン (3 μg , i.c.v.) の単回投与は QNP 誘発の反復行動を抑制した (図 2-3F, G)。さらに、ボノプラザン (3 μg , i.c.v.) の投与は運動量に影響を与えなかったことから (図 2-3H)、ボノプラザンによる反復行動の減少はボノプラザンの鎮静作用に起因しないことが示唆された。

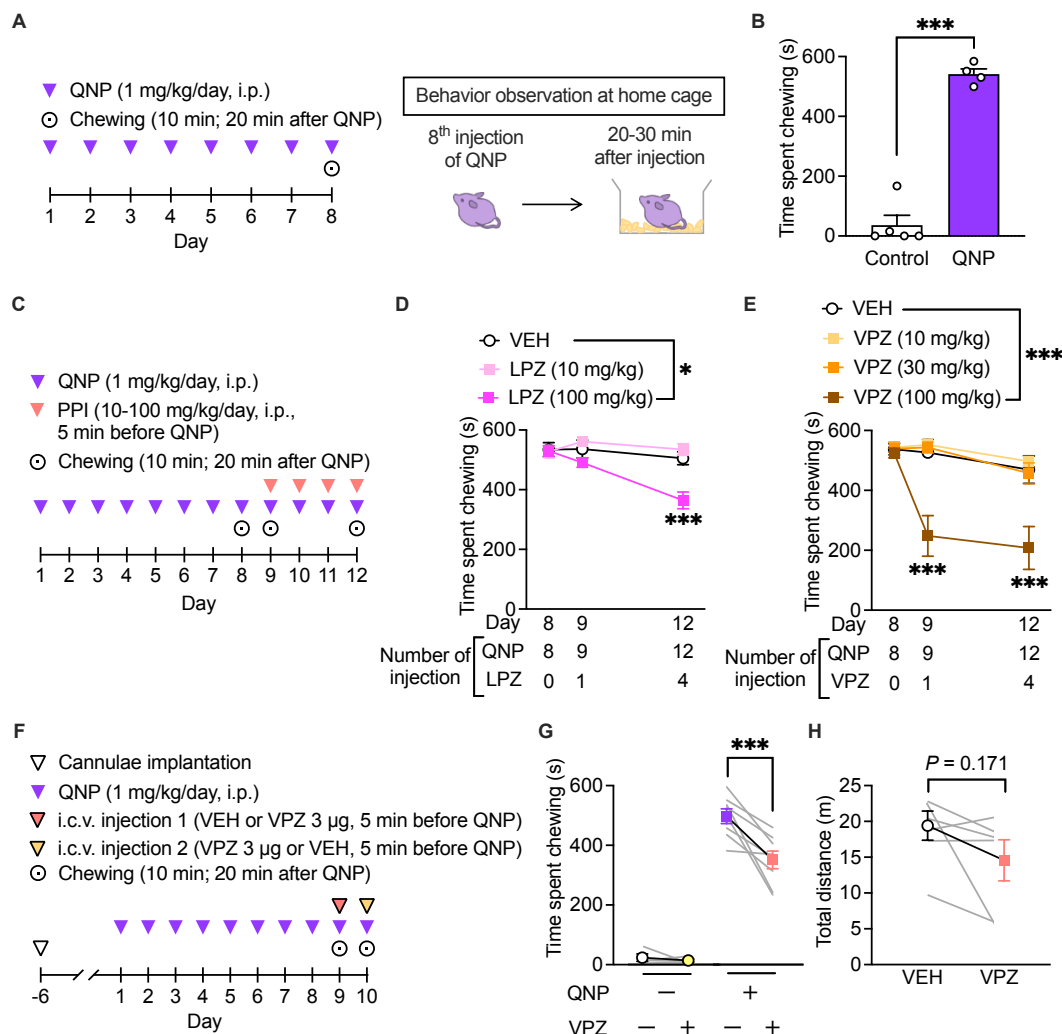


図 2-3 ボノプラザンは QNP 投与マウスの OCD 様反復行動を改善した

(A) マウスに QNP (1 mg/kg) を 1 日 1 回、8 日間投与し、8 回目の QNP 投与後 20–30 分後に自発行動を観察した。(B) 生理食塩水 (コントロール) または QNP 投与マウスの 10 分間の反復行動時間。n = 4–5。(C) 9–12 回目の QNP 投与 5 分前にプロトンポンプ阻害剤 (PPI) を腹腔内投与し、QNP 投与 20 分後から 10 分間反復行動を測定した。(D) 4 日間溶媒 (VEH) またはランソプラゾール (LPZ) を投与した反復行動時間。n = 4–10。(E) 4 日間ボノプラザン (VPZ) を投与した反復行動時間。n = 5–10。(F) ガイドカニューレ埋め込み 7 日後から QNP 投与を開始した。クロスオーバー法により VEH または VPZ (3 μg) を 9 回目または 10 回目の QNP 投与 5 分前にカニューレを通して脳室内に注入した。(G) QNP 誘発反復行動に対する VPZ (3 μg) の脳室内投与の効果。n = 4–8。(H) VPZ (3 μg) の脳室内投与が運動量に及ぼす影響。n = 6。* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ 。

第3節 D₂R 刺激薬誘発の OCD 様習慣形成異常に対する PPI の影響

不適応な習慣に基づく意思決定と行動の過剰な繰り返しは、OCD および OCD 様症状を示す患者の臨床的特徴である (Robbins *et al.*, 2019)。したがって、近年の動物を用いた研究では、自発行動の過剰な繰り返しに加えて、習慣行動の形成を促進することによって OCD 様の行動異常を評価している (Hadjas *et al.*, 2019; Renteria *et al.*, 2018)。

QNP 投与マウスにおける習慣行動の形成については、オペラント条件付け課題後に報酬価値軽減の試験を行うことで評価した (図 2-4A)。はじめに、臨床的な治療効果を確認するために、OCD の第一選択薬である SSRI の長期投与の効果の評価した (Bokor *et al.*, 2014)。ランダム比 (RR) 強化学習を 6 日間行うことで、すべての群でレバーを押す回数が増加し、学習が正常にできていることが示唆された。しかし、学習後期には群間差が見られた (図 2-4B)。

目標指向的なレバー押しの形成は、RR スケジュールによる 6 日間の学習が広く用いられている (Gremel *et al.*, 2013)。報酬価値軽減の試験では、対照の報酬である餌ペレットを与えることで報酬の価値を維持させるか (valued)、スクロース溶液を与えることでレバー押しによって得られる報酬の価値を減少させた (devalued) 後に、5 分間レバーを押しても報酬が得られない条件でのレバー押し数を記録した。目標指向的な行動が形成されると、valued と比較して devalued ではレバー押しの数が減少する (図 2-4C)。水を飲水させた対照群では、devalued でのレバー押し数が減少しており、目標指向的な行動が形成されていることが示唆された。一方、QNP 群では valued と devalued におけるレバー押し数に差が認められず、目的指向行動が形成される条件でも習慣行動を取ることが示している。しかし、4 週間のシタロプラム長期飲水投与により、QNP 群のレバー押し数の分布は変化し、devalued でのレバー押し数が valued でのレバー押し数よりも少なかった (図 2-4D)。Devaluation index からも 4 週間のシタロプラム投与は QNP による習慣的な行動を目標指向的な行動にシフトさせることが明らかになった (図 2-4E)。また、自由摂食の際の餌ペレットとスクロース溶液の消費量に群間差は見られなかった (図 2-4F)。これらの結果から、QNP の反復投与は目標指向的なレバー押しを阻害することが示された。さらに、SSRI 長期投与は習慣行動を改善することが確認できた。

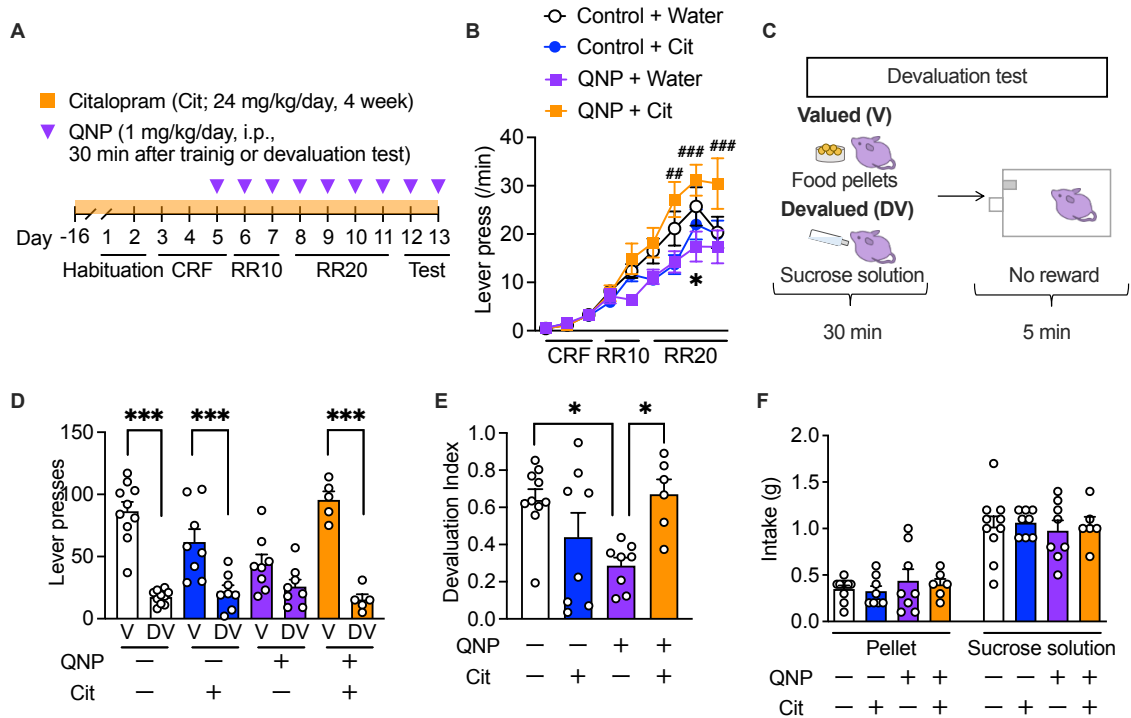


図 2-4 SSRI4 週間投与は QNP 投与マウスの OCD 様習慣形成異常を改善した

(A) ランダム比 (RR) スケジュールで学習させた後、報酬価値軽減試験を 2 日間行った。報酬価値軽減試験 1 日目に、QNP (1 mg/kg) を 8 回目となるように投与し、水またはシタロプラム (24 mg/kg/日; Cit) を 4 週間飲水投与した。n = 6–10。(B) 学習期でのレバー押しのスピード。* $P < 0.05$ (control versus QNP)。## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ (QNP versus QNP+Cit)。(C) 報酬価値軽減試験において、価値を維持させる (valued) 日には餌ペレットを、減少させた (devalued) 日にはスクロース溶液を 30 分間ホームケージで自由摂食させた。その後 5 分間レバーを押しても報酬が得られない条件でのレバー押し数を記録した。(D) Valued と devalued のレバー押し数には個々の群間で差があった。(E) マウスが目標指向行動または習慣行動を示す評価指数。(F) 30 分間の自由摂食中のマウスの餌ペレットとスクロース溶液の消費量。* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ 。

QNP 投与マウスの習慣形成異常が認められたため、PPI の効果を検証した (図 2-5A)。RR スケジュールでの学習中、レバーを押す回数に群間差は見られなかった (図 2-5B)。報酬価値軽減の試験においては、溶媒またはボノプラザン (3 μg , i.c.v.) を投与した 5 分後に餌ペレットまたはスクロース溶液をホームケージ内で 30 分間自由に摂食させ、自由摂取の直後に 5 分間のレバー押しを行った。2 日間の報酬価値軽減の試験において、valued または devalued のレバー押しを記録した (図 2-5C)。その結果、QNP を投与したマウスでは報酬価値に関わらず、2 日間のレバー押し数に変化はなかった。対照的に、ボノプラザンを投与すると報酬価値軽減によるレバー押しの低下が認められた (図 2-5D)。QNP を投与されたマウスは、対照群よりも低い devaluation index を示し、ボノプラザン投与によって抑制された (図 2-5E)。これらの検討でも、自由摂食時の摂餌量に差は認められなかった (図 2-5F)。よって、PPI は QNP 誘発の習慣形成異常に有効であることが示唆された。

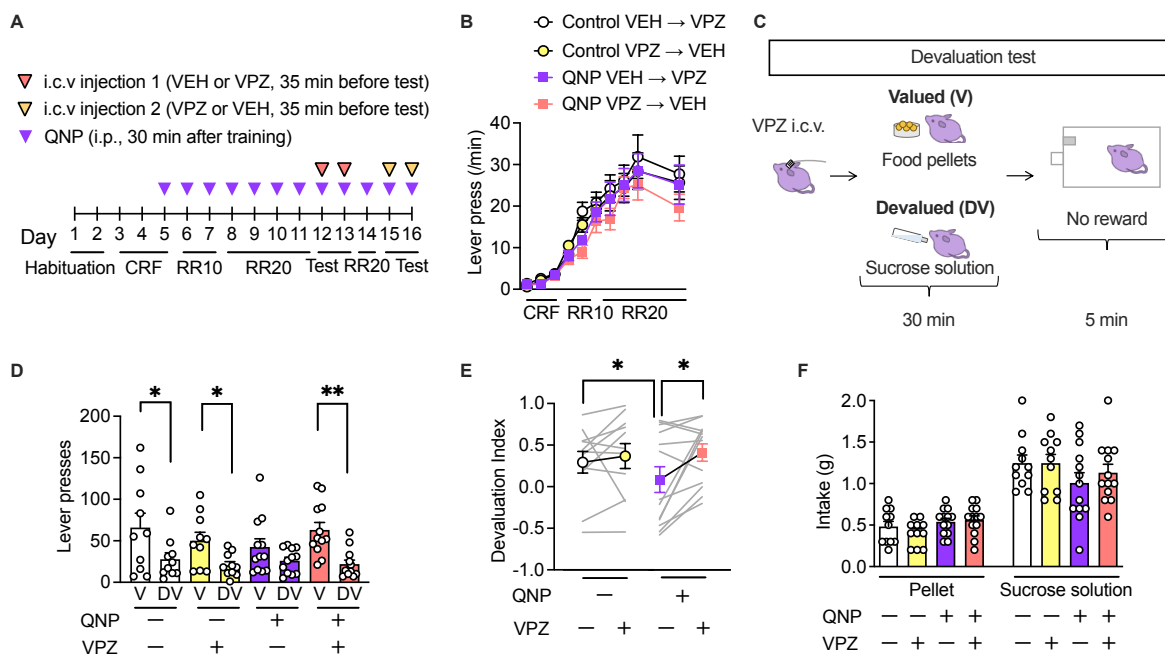


図 2-5 ボノプラザンは QNP 投与マウスの OCD 様習慣形成異常を改善した

(A) マウスをランダム比 (RR) スケジュールで学習させた。報酬価値軽減試験 1 日目の 8 日前から QNP (1 mg/kg) を毎日投与した。12 日目または 13 日目に VEH または VPZ (3 μg) を脳室内に投与した。14 日目にマウスを再び RR スケジュールで学習させた。15 日目または 16 日目にクロスオーバー法により VPZ を脳室内投与した。n = 5-7。(B) 学習期でのレバー押しのスピード。(C) 報酬価値軽減試験では、自由摂食の 5 分前に VEH または VPZ (3 μg) を脳室内投与した。(D) 報酬の価値を維持させた (valued) 日、減少させた (devalued) 日のレバー押し数には個々の群間で差があった。(E) マウスが目標指向行動または習慣行動を示す評価指数。(F) 30 分間の自由摂食中のマウスの餌ペレットとスクロース溶液の消費量。* $P < 0.05$ 。

第4節 QNP による外側 OFC の錐体神経過活動に対する PPI の影響

脳室内注入実験の結果から、PPI は脳へ作用して有効性を示すことが考えられる。OCD 患者は OFC の過活動を示し、それは SSRI 使用によって症状に有効であった患者でのみ改善される (Beucke *et al.*, 2013; Saxena *et al.*, 1999)。したがって、我々は PPI が OFC の神経活動を調節していると仮説を立てた。そこで、ボノプラザン (100 mg/kg/day, i.p.) が外側 OFC の神経活性化マーカーである c-Fos 発現に及ぼす影響を免疫組織学的検討によって調べた (図 2-6A)。その結果、QNP 投与マウスでは、外側 OFC の c-Fos 陽性細胞数の増加が見られ、この増加はボノプラザン投与により抑制された (図 2-6B, C)。

さらに、電気生理学的検討により、外側 OFC における錐体神経活動に対するボノプラザンの影響を検討した (図 2-6D)。対照群のマウスへのボノプラザン (10 μ M) 処置は神経活動に影響を与えなかった (図 2-6E, F)。しかし、QNP 投与群ではボノプラザン処置は神経活動を低下させた (図 2-6G, H)。

脳における P 型プロトンポンプの発現と機能については依然として不明な点が多い。PPI の効果に関与する脳部位を特定するために、PPI が作用する P 型プロトンポンプのサブユニットをコードする *Atp4a* の mRNA の発現パターンを調査した (Abe *et al.*, 2018)。OCD 患者は、認知・情動を司る CSTC 回路の結合性が変化していることから (Graybiel *et al.*, 2000; Posner *et al.*, 2014)、CSTC 回路関連の脳領域に着目した (図 2-6I)。その結果、無処置マウスでは *Atp4a* の遺伝子発現は OFC で豊富であった (図 2-6J)。これらの結果から、ボノプラザンが P 型プロトンポンプを阻害することによって、QNP 投与マウスの外側 OFC における神経過活動を減少させる可能性が考えられた。

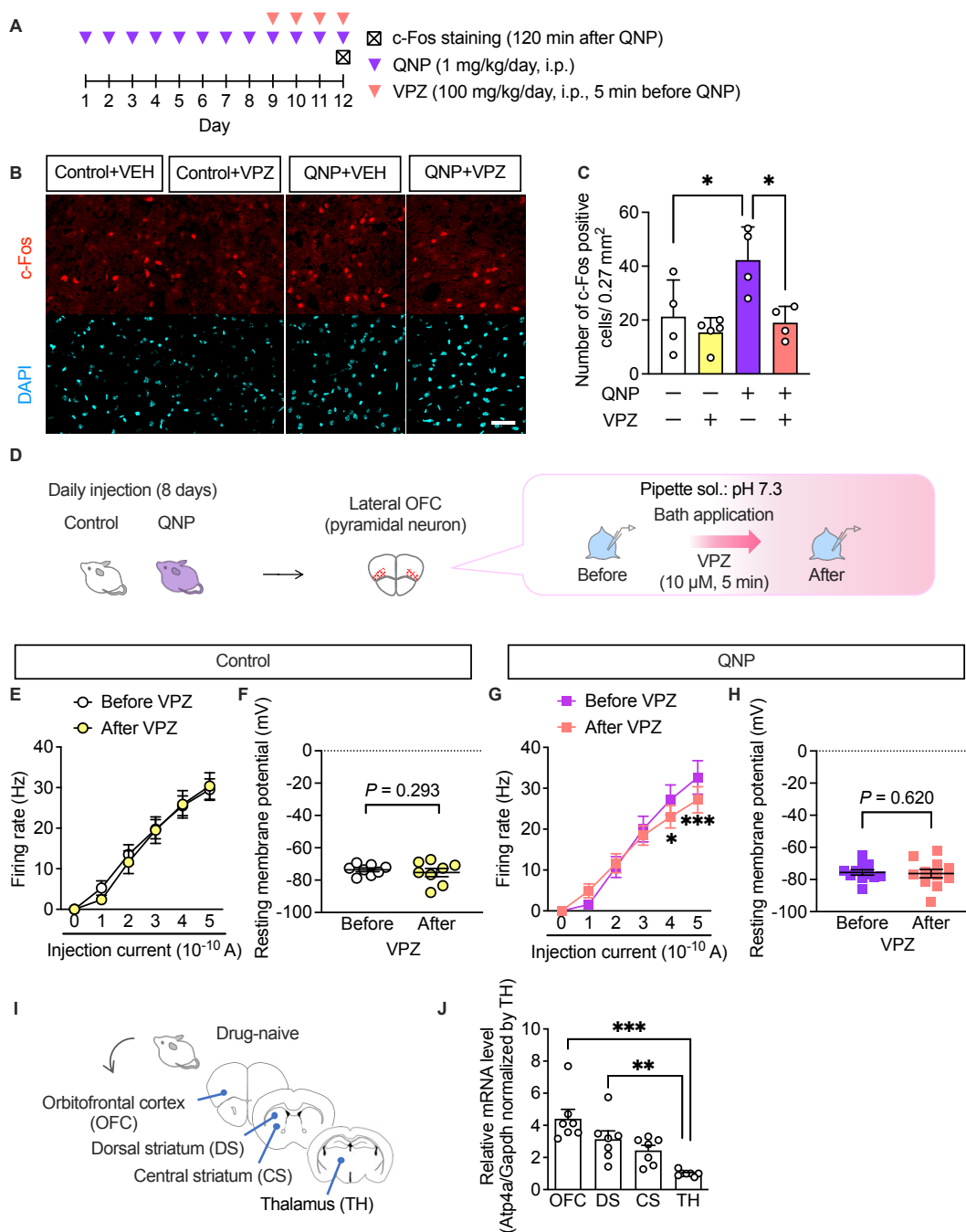


図 2-6 ボノプラザンは QNP 投与マウスの外側 OFC における錐体神経過活動を改善した

(A) マウスに QNP (1 mg/kg) を 8 日間腹腔内投与し、9–12 日目で QNP 投与 5 分前に VEH または VPZ (100 mg/kg) を投与した。最後の QNP 投与 2 時間後に脳を回収し、外側 OFC を含む冠状切片を作製した。(B) 外側 OFC における c-Fos 陽性細胞の代表画像。赤: 神経活性化マーカーである c-Fos、シアン: DAPI、スケールバー: 50 μm。(C) 外側 OFC の c-Fos 陽性細胞数。n = 4–5。(D–H) 対照マウス (E, F: n = 8、マウス 3 匹) と QNP 投与マウス (G, H: n = 11、マウス 3 匹) から得た外側 OFC の錐体神経において、細胞内 pH7.3 での VPZ (10 μM) 処置前後の current injection により誘発される発火応答 (0–500pA ; 1 秒)。E, G: Current injection により誘発された発火応答。F, H: 静止膜電位。(I) 無処置マウスから CSTC ループの脳領域を含むサンプルを得た。(J) 各脳領域における *Atp4a* mRNA 量。n = 7。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

第5節 初代培養皮質ニューロンを用いた PPI の神経活動抑制作用のメカニズム検討

ボノプラザンは P 型プロトンポンプを介して細胞外への酸放出を抑制し、細胞内プロトン濃度を上昇させる (Yang *et al.*, 2018)。そこで、酸性環境下で蛍光強度が低下する pH 感受性蛍光タンパク質である super-ecliptic pHluorin (SEpHluorin) (Miesenböck *et al.*, 1998) を発現させることで、初代培養皮質ニューロンの細胞内 pH を可視化した (図 2-7A)。その結果、溶媒と比較してボノプラザン (10 μM) は細胞内 pH を低下させた (図 2-7B)。さらに、初代培養皮質ニューロンを用いて、細胞内酸性化が神経活動に及ぼす影響を電気生理学的に検討した。記録時の電極内溶液の pH を通常 (pH 7.3) および弱酸性 (pH 7.0) にすることで測定細胞内 pH のみ変化させて検討を行った (図 2-7C)。その結果、細胞内酸性条件下では発火頻度は低下した (図 2-7D)。その際の静止膜電位には群間差は認められなかった (図 2-7E)。これらの結果から、PPI を介した細胞内酸性化が神経活動抑制作用に寄与していることが示唆された。

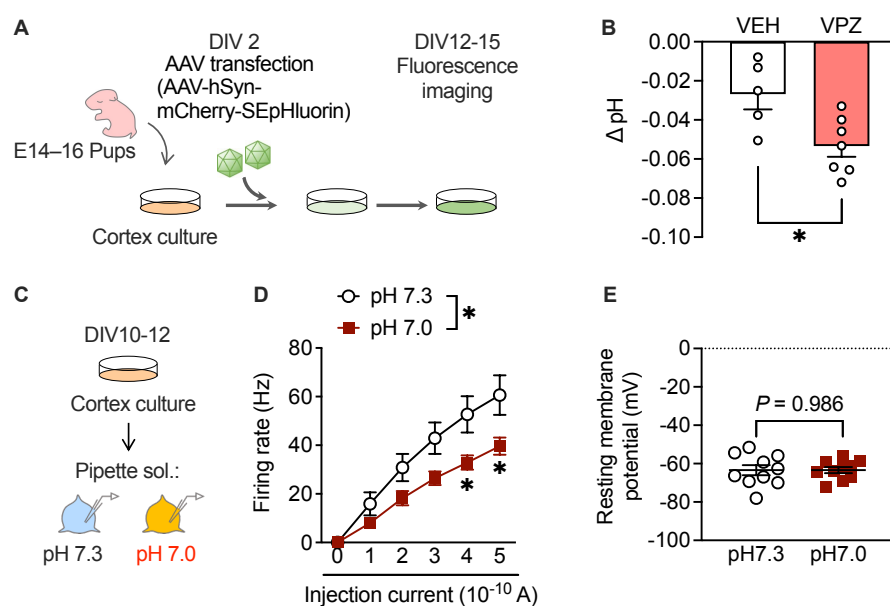


図 2-7 ボノプラザンは細胞内酸性化を介して神経活動を低下させた

(A) AAV を感染させて初代培養皮質ニューロンに SEpHluorin を発現させた。(B) VEH または VPZ (10 μM) 処置 5 分後の細胞内 pH。n = 5–7。(C–E) 初代培養皮質ニューロンを用いた細胞内 pH7.3 または pH7.0 の条件下での電気生理学的記録。n = 10。D: Current injection により誘発される発火応答 (0–500pA; 1 秒)。E: 静止膜電位。* $P < 0.05$ 。

次に、皮質神経の P 型プロトンポンプが細胞内 pH 変化と神経活動調節に関与しているかどうかを検討した。 *Atp4a* をノックダウン (KD) するために、miRNA をコードした AAV を感染させて (図 2-8A)、 *Atp4a* mRNA の発現を減少させた (図 2-8B)。ボノプラザン処置の結果 (図 2-8B) と一致して、神経特異的 *Atp4a* KD は細胞内 pH を低下させ (図 2-8C)、静止膜電位を変化させずに発火頻度を低下させた (図 2-8D, E)。

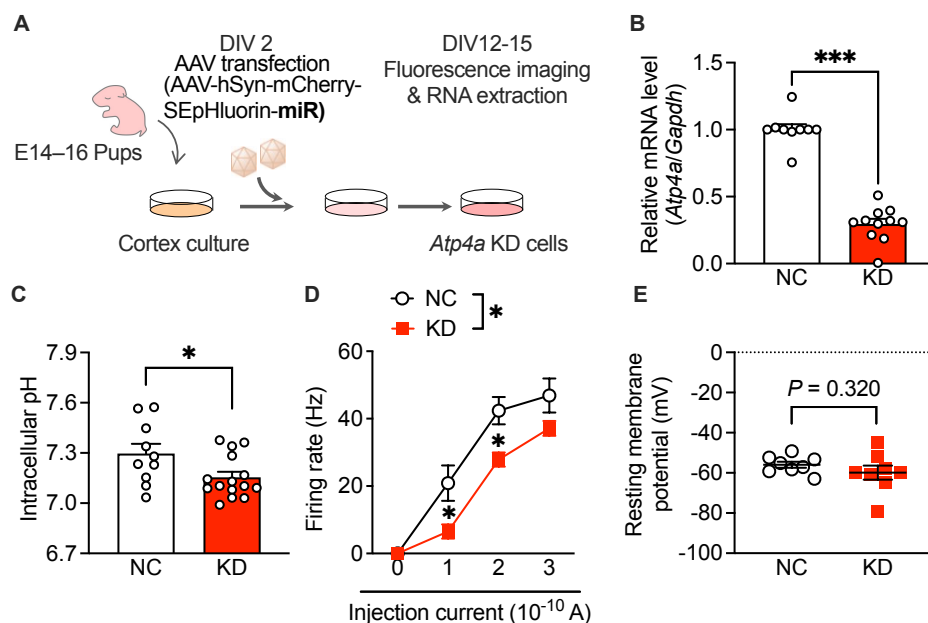


図 2-8 *Atp4a* KD は細胞内酸性化を介して神経活動を低下させた

(A–E) ネガティブコントロール (NC) または *Atp4a* を KD する miR を発現させる AAV を初代培養皮質ニューロンに感染させた。B: AAV 感染後 12 日目の *Atp4a* mRNA の発現量。n = 9–11。C: 細胞内 pH。n = 10–15。D, E: *Atp4a* を KD した初代培養皮質ニューロンの電気生理学的記録。n = 8。Current injection によって誘発された発火応答 (D) および静止膜電位 (E)。*P < 0.05; ***P < 0.001。

第6節 細胞内酸性条件下での外側 OFC の錐体神経活動に対する PPI の影響

皮質神経の P 型プロトンポンプは細胞内 pH の恒常的維持と活動調節に関与している。細胞内 pH への影響は比較的小さかったが、ボノプラザンは細胞内酸性化を介して神経活動を抑制する可能性がある。細胞内酸性化が生じると、プロトンポンプを含むさまざまな分子が細胞内の恒常性を保つために働く (Casey *et al.*, 2010)。そこで、細胞内酸性条件でも、ボノプラザンが神経活動を抑制するかを検証するために細胞内を酸性化した状態 (pH7.0) で神経活動を記録した (図 2-9A)。細胞内 pH7.0 の条件下では、ボノプラザンは対照マウスの外側 OFC における錐体神経の発火頻度を減少させた (図 2-9B, C)。この抑制効果は QNP 投与マウスでも同様に観察された。さらに、細胞内 pH7.3 の条件と比較して、小

さい injection currents (200 および 300pA) において有意な抑制が認められた (図 2-9D, E)。さらに、対照マウスおよび QNP 投与マウスのどちらでも、ボノプラザン処置と細胞内酸性条件の組み合わせは、静止膜電位のわずかな過分極を引き起こした。これらの結果は、ボノプラザンが細胞内酸性条件下でも外側 OFC における錐体神経活動を抑制することを示唆していた。

以上のことから、これら実証実験は PPI が OCD 様症状を抑制するというデータ駆動型の仮説を支持する結果であった。

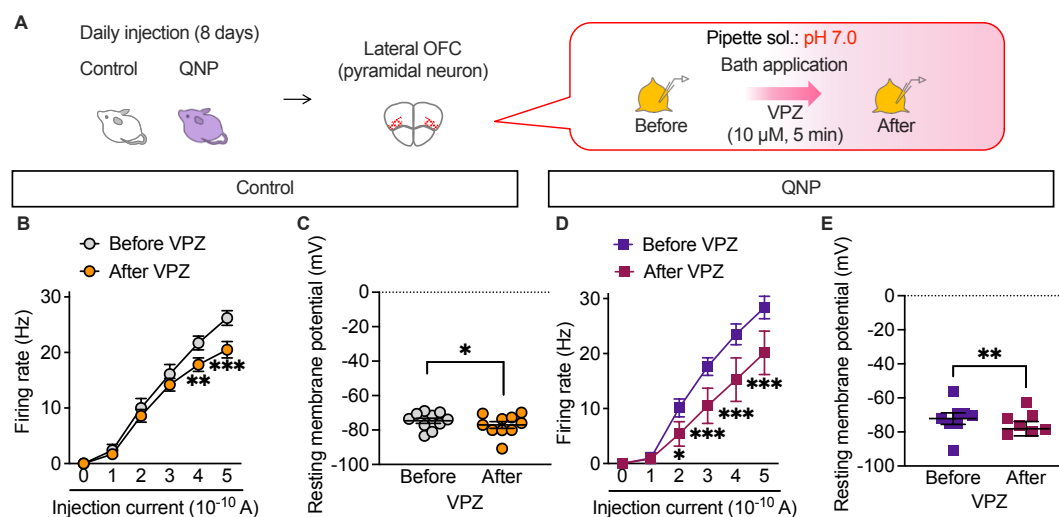


図 2-9 ボノプラザンは細胞内酸性化を介して外側 OFC における錐体神経活動を抑制した (A-E) 対照マウス (B, C: n = 10、マウス 3 匹) と QNP 投与マウス (D, E: n = 8、マウス 2 匹) から得た外側 OFC における錐体神経を用いて、細胞内 pH7.0 の条件下で VPZ (10 μM) の処置前後に current injection により誘導した発火応答を記録した (0-500 pA; 1 秒持続)。B, D: Current injection による発火応答。C, E: 静止膜電位。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

考察

本章では、リアルワールドデータ解析により、PPIがD₂R刺激薬によって誘発されるOCD様症状の発症率を低下させることを明らかにした。さらに、ボノプラザン投与は、細胞内酸性化を介してQNP投与マウスのOCD様行動を抑制し、外側OFCの過活動を改善することが示唆された。

著者のリアルワールドデータ解析と一致して、臨床報告ではドパミン受容体刺激薬の使用とOCD様症状発症の関係が示唆されている (Evans *et al.*, 2009; Nirenberg *et al.*, 2006; Salas *et al.*, 2009)。D₂R刺激薬によって誘発されるOCD様症状は、パーキンソン病、レストレスレッグス症候群や高プロラクチン血症など様々な疾患の患者において報告されている。また、OCD (Robbins *et al.*, 2019)、摂食障害 (Wang *et al.*, 2001) や物質依存症 (Nutt *et al.*, 2015) など強迫観念を持つ精神疾患患者ではD₂Rの異常が認められる。よって、今回の結果は原疾患に関係なくD₂Rの反復刺激によりOCD様症状を引き起こすことを示唆している。

FAERSデータとMarketScanデータの解析により、PPIはD₂R刺激薬によって引き起こされるOCD様症状に対する治療薬となり得ることが明らかになった。PPIは胃での胃酸分泌を抑制するなど、主に末梢臓器で作用すると考えられている。しかし、PPIは血液脳関門を通過することや (Cheng *et al.*, 2002)、ヒトの脳では*Atp4a*遺伝子を発現しているため (Li *et al.*, 2013)、中枢神経系に作用を及ぼすことが考えられる。

ランソプラゾールとボノプラザンでQNP投与誘発の反復行動への作用発現に差があった。ランソプラゾールの活性化には酸による構造変化が必要であるため、胃よりもpHの高い脳ではこの過程が律速になる可能性がある (Casey *et al.*, 2010)。ランソプラゾールなど従来のPPIと比較して、ボノプラザンはK⁺結合の阻害によってP型プロトンポンプを可逆的に抑制すること、活性化が不要であること、酸性条件下で安定性が高いことなど、独自の分子構造および作用機序を有している (Yang *et al.*, 2018)。これらの薬剤の違いが反復行動に対するボノプラザンの急性効果に寄与している可能性がある。

OFCにおける過活動はOCD様症状に関連している。OCD患者では、外側OFCの神経活動と症状の重症度との間に正の相関がある (Beucke *et al.*, 2013)。さらに、SSRIの長期投与で症状が改善したOCD患者において、外側OFCの活動は正常化していた (Saxena *et al.*, 1999)。これらの報告と一致して、所属研究室では以前に、QNP投与マウスが外側OFCの錐体神経において過活動を示し、それがSSRIの4週間投与によって抑制されることを明らかにした

(Asaoka *et al.*, 2019; Hatakama *et al.*, 2022)。本検討では、ボノプラザンの単回投与が外側 OFC の錐体神経過活動を抑制させた。ボノプラザンの急性効果は、OCD 様行動に対して即効性を示すことが期待できる。

OCD 患者の症状はいくつかのサブタイプに分類され、SSRI など薬物療法に対して異なる治療反応を示す (Bloch *et al.*, 2008; Starcevic *et al.*, 2008)。これらの報告と一致して、QNP 投与マウスに対する SSRI の 4 週間投与は習慣形成異常を改善したが、反復行動を変化させなかった (Asaoka *et al.*, 2019)。このことから、反復行動は SSRI 抵抗性の OCD 様行動であることが示唆された。ボノプラザンは反復行動と習慣形成異常の両方を抑制したことから、即効性があり、SSRI 抵抗性の症状に対する有効な治療薬であることが考えられる。

ボノプラザンが SSRI 抵抗性 OCD 様行動に対して有効であることから、その治療メカニズムは重要である。4 日間のボノプラザン投与と 4 週間の SSRI 投与は、ともに外側 OFC における錐体神経の活動を抑制するが、OCD 様行動への有効性は異なっていた。この違いは外側 OFC における作用機序の違いに起因していると考えられる。所属研究室ではこれまでに、QNP 投与マウスの外側 OFC における錐体神経は、興奮性入力が増加し抑制性入力が増加することを明らかにした (Asaoka *et al.*, 2019; Hatakama *et al.*, 2022)。前章で示したように、SSRI 長期投与は錐体神経への抑制性入力を増強させることで、この異常な興奮・抑制のバランスを改善する (Hatakama *et al.*, 2022)。対照的に、ボノプラザンは錐体神経に直接作用し、脱分極による活動電位を抑制することから、興奮性入力の増強下でもより強力な抑制作用がある可能性がある。今回の検討では、ボノプラザンが外側 OFC 以外で作用する可能性は排除できていない。ボノプラザンや従来の PPI の作用を解明するためには、他の脳領域に対する効果についても検討が必要である。

ボノプラザン処置と *Atp4a* KD は共に細胞内 pH をわずかに低下させ、弱い細胞内酸性化も神経活動を抑制した。細胞内酸性化による神経活動調節の正確なメカニズムは未だ不明であるが、脳内の細胞内 H⁺に反応して様々な分子が機能を変化させることが報告されている (Soto *et al.*, 2018)。神経活動を変化させ得る分子として、タンデムポア型内向き整流性 K⁺チャンネル (Honoré *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2020; Maingret *et al.*, 1999) や持続性／高閾値活性化型電位依存性 Ca²⁺チャンネル (Fernández-Morales *et al.*, 2019; Kanaporis *et al.*, 2017; Klöckner *et al.*, 1994; Radzicki *et al.*, 2013; Takahashi *et al.*, 1993) などは、毒性が生じ得る pH 低下と生理的 pH 低下の両方を介して一部の神経活動調節に関与している可能性がある。今回の検討では、細胞内 pH のわずかな低下が外側 OFC の錐体神経活動を低下させることを示唆している。しかし、ボノプラザンが細胞内酸性化を介して神経活動を抑制する詳細なメカニズムを解明するた

めには、さらなる研究が必要である。

本研究はリアルワールドデータ解析による治療候補薬探索と動物実験による検証を行い、OCD 様症状に対する PPI の有効性を示した。さらに、ボノプラザンが QNP 誘発の OCD 様行動に対して即効かつ効果的な作用を有することを明らかにした。また、外側 OFC においてボノプラザンは細胞内酸性化を介して神経過活動を抑制することが示唆された。

総括および結論

本研究では、OCD の治療メカニズムについて検討を行い、以下の新知見を得た。

第 1 章では、QNP 投与マウスでは OCD 様の固執性と外側 OFC の神経過活動が認められたが、4 週間の SSRI シタロプラム投与により改善した。さらに、QNP 投与マウスの外側 OFC 錐体神経への抑制性入力は減弱し、介在神経への抑制性入力は増強していた。また、SSRI 長期投与は 5-HT_{2C} 受容体を抑制して、これらの抑制性入力の異常を改善した。5-HT_{2C} 受容体遮断薬短期投与は外側 OFC 錐体神経の過活動を抑制し、QNP 投与マウスにおける固執性を改善した。これらの結果より、SSRI 長期投与は外側 OFC における 5-HT_{2C} 受容体シグナルの減少を介して OCD 様症状を改善することが明らかになった。

第 2 章では、リアルワールドデータを解析することで OCD の治療候補薬の探索を行った。その結果、D₂R 刺激薬によって誘発される OCD 様症状の発生率が、プロトンポンプ阻害薬 (PPI) の併用下で抑制されることを明らかにした。実証実験において、QNP 投与マウスへのボノプラザンの脳室内投与は OCD 様の反復行動と習慣形成異常を短期間で抑制した。さらに、ボノプラザンは細胞内酸性化を介して外側 OFC 錐体神経の過活動を抑制することを見出した。

以上、本研究より OCD に対する SSRI の治療メカニズムとリアルワールドデータによって見出した新規治療薬明の治療メカニズムを明らかにした。本研究成果は OCD 治療薬開発に新たな戦略をもたらし得るものである。

謝辞

本研究課題の遂行に際して、研究内容から研究に臨む心構えに至るまで終始温かいご指導とご支援を賜りました京都大学大学院薬学研究科 金子周司 教授に深謝いたします。また、様々な局面で親身なご助言を数多く頂いた京都大学大学院薬学研究科 白川久志 准教授、永安一樹 助教に心から感謝いたします。さらに、多角的な視点からご助言を賜りました京都大学医学部附属病院薬剤部中川貴之 副薬剤部長、富山大学総合医薬学研究科 久米利明 教授、京都大学医学研究科 林康紀 教授、京都大学医学研究科 浅岡希美 助教に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行に多大なる御協力をいただきました、日本大学医学研究科 長島卓也 助教、Soni Siswanto 博士、鈴木茉莉 学士、長岡巧樹 博士、澁井紀宏 学士、古田晴香 学士、山本浩貴 学士、周子劍 修士、戸田千尋 学士、小林萌音 学士、栢沼玄 学士、岩井信太郎くん、山田麻莉さん、鈴木崇英くん、心から感謝いたします。そして、日々の研究生活において互いに切磋琢磨し合えた京都大学大学院薬学研究科生体機能解析学分野の皆さまに深く感謝いたします。

本研究の遂行に関しまして御援助をいただきました JST 次世代研究者挑戦的研究プログラム、日本学生支援機構、藤多仁生奨学金を助成していただきました故藤多哲郎 先生、およびご遺族・関係者に深く感謝いたします。

最後に、研究活動に専念できるよう終始支えてくれた父 一弘、母 真理、妹 薫、弟 太郎、叔父 真治、祖父 俊男、祖母 瞳、祖父 飯田素明、祖母 龍子に心から感謝いたします。

論文発表目録

本研究の成果は以下の論文にて公表した。

1. A selective serotonin reuptake inhibitor ameliorates obsessive-compulsive disorder-like perseverative behavior by attenuating 5-HT_{2C} receptor signaling in the orbitofrontal cortex
(選択的セロトニン再取り込み阻害薬は外側眼窩前頭皮質の 5-HT_{2C} 受容体シグナルを減弱して強迫性障害様の固執行動を改善する)
Hikari Hatakama, Nozomi Asaoka, Kazuki Nagayasu, Hisashi Shirakawa, Shuji Kaneko.
令和 4 年 3 月 15 日発行 *Neuropharmacology* 第 206 巻 108926 頁に掲載
2. Obsessive-compulsive disorder can be ameliorated by intracellular acidification of cortical neurons with proton pump inhibitor
(プロトンポンプ阻害薬は皮質の神経細胞内酸性化を介して強迫性障害を改善する)
未発表

参考文献

1. Adler, S. M., Girotti, M., & Morilak, D. A. (2020). Optogenetically-induced long term depression in the rat orbitofrontal cortex ameliorates stress-induced reversal learning impairment. *Neurobiol Stress* **13**, 100258. 41.
2. Abe, K., Irie, K., Nakanishi, H., Suzuki, H., & Fujiyoshi, Y. (2018). Crystal structures of the gastric proton pump. *Nature* **556**, 214-218.
3. Ahmari, S. E., Spellman, T., Douglass, N. L., Kheirbek, M. A., Simpson, H. B., Deisseroth, K., Gordon, J. A., & Hen, R. (2013). Repeated cortico-striatal stimulation generates persistent OCD-like behavior. *Science* **340**, 1234-1239.
4. Apicella, A. J., Wickersham, I. R., Seung, H. S., & Shepherd, G. M. (2012). Laminarily orthogonal excitation of fast-spiking and low-threshold-spiking interneurons in mouse motor cortex. *J Neurosci* **32**, 7021–7033.
5. Arborelius, L., Nomikos, G. G., Hertel, P., Salmi, P., Grillner, P., Höök, B. B., Hacksell, U., & Svensson, T. H. (1996). The 5-HT_{1A} receptor antagonist (S)-UH-301 augments the increase in extracellular concentrations of 5-HT in the frontal cortex produced by both acute and chronic treatment with citalopram. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **353**, 630-640.
6. Asaoka, N., Ibi, M., Hatakama, H., Nagaoka, K., Iwata, K., Matsumoto, M., Katsuyama, M., Kaneko, S., & Yabe-Nishimura, C. (2021). NOX1/NADPH Oxidase Promotes Synaptic Facilitation Induced by Repeated D2 Receptor Stimulation: Involvement in Behavioral Repetition. *J Neurosci* **41**, 2780-2794.
7. Asaoka, N., Nishitani, N., Kinoshita, H., Nagai, Y., Hatakama, H., Nagayasu, K., Shirakawa, H., Nakagawa, T., & Kaneko, S. (2019). An Adenosine A_{2A} Receptor Antagonist Improves Multiple Symptoms of Repeated Quinpirole-Induced Psychosis. *eNeuro* **6**, ENEURO.0366-18.2019.
8. Austin P. C. (2011). Optimal caliper widths for propensity-score matching when estimating differences in means and differences in proportions in observational studies. *Pharm Stat* **10**, 150–161.
9. Barbon, A., Caracciolo, L., Orlandi, C., Musazzi, L., Mallei, A., La Via, L., Bonini, D., Mora, C., Tardito, D., Gennarelli, M., Racagni, G., Popoli, M., & Barlati, S. (2011). Chronic antidepressant treatments induce a time-dependent up-regulation of AMPA receptor subunit protein levels. *Neurochem Int* **59**, 896-905.
10. Barr, L. C., Goodman, W. K., McDougle, C. J., Delgado, P. L., Heninger, G. R., Charney, D. S., & Price, L. H. (1994). Tryptophan depletion in patients with

- obsessive-compulsive disorder who respond to serotonin reuptake inhibitors. *Arch Gen Psychiatry* **51**, 309-317.
11. Barragry, T. P., Blatchford, J. W., 3rd, & Allen, M. O. (1986). Giant gastric ulcers. A review of 49 cases. *Ann Surg* **203**, 255-259.
 12. Baxter, L. R., Jr, Phelps, M. E., Mazziotta, J. C., Guze, B. H., Schwartz, J. M., & Selin, C. E. (1987). Local cerebral glucose metabolic rates in obsessive-compulsive disorder. A comparison with rates in unipolar depression and in normal controls. *Archives of general psychiatry* **44**, 211-218.
 13. Benmansour, S., Cecchi, M., Morilak, D. A., Gerhardt, G. A., Javors, M. A., Gould, G. G., & Frazer, A. (1999). Effects of chronic antidepressant treatments on serotonin transporter function, density, and mRNA level. *J Neurosci* **19**, 10494-10501.
 14. Bergqvist, P. B., Dong, J., & Blier, P. (1999). Effect of atypical antipsychotic drugs on 5-HT₂ receptors in the rat orbito-frontal cortex: an in vivo electrophysiological study. *Psychopharmacology* **143**, 89-96.
 15. Berney, A., Sookman, D., Leyton, M., Young, S. N., & Benkelfat, C. (2006). Lack of effects on core obsessive-compulsive symptoms of tryptophan depletion during symptom provocation in remitted obsessive-compulsive disorder patients. *Biol Psychiatry* **59**, 853-857.
 16. Beucke, J. C., Sepulcre, J., Talukdar, T., Linnman, C., Zschenderlein, K., Endrass, T., Kaufmann, C., & Kathmann, N. (2013). Abnormally high degree connectivity of the orbitofrontal cortex in obsessive-compulsive disorder. *JAMA Psychiatry* **70**, 619-629.
 17. Bissonette, G. B., Schoenbaum, G., Roesch, M. R., & Powell, E. M. (2015). Interneurons are necessary for coordinated activity during reversal learning in orbitofrontal cortex. *Biol Psychiatry* **77**, 454-464.
 18. Bloch, M. H., Landeros-Weisenberger, A., Rosario, M. C., Pittenger, C., & Leckman, J. F. (2008). Meta-analysis of the symptom structure of obsessive-compulsive disorder. *Am J Psychiatry* **165**, 1532-1542.
 19. Bokor, G., & Anderson, P. D. (2014). Obsessive-compulsive disorder. *J Pharm Pract* **27**, 116-130.
 20. Bonnet, U., Leniger, T., & Wiemann, M. (2000). Alteration of intracellular pH and activity of CA3-pyramidal cells in guinea pig hippocampal slices by inhibition of transmembrane acid extrusion. *Brain Res* **872**, 116-124.
 21. Boulougouris, V., Glennon, J. C., & Robbins, T. W. (2008). Dissociable effects of selective 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptor antagonists on serial spatial reversal learning in rats. *Neuropsychopharmacology* **33**, 2007-2019.

22. Boulougouris, V., & Robbins, T. W. (2010). Enhancement of spatial reversal learning by 5-HT_{2C} receptor antagonism is neuroanatomically specific. *J Neurosci* **30**, 930-938.
23. Burke, K. A., Takahashi, Y. K., Correll, J., Brown, P. L., & Schoenbaum, G. (2009). Orbitofrontal inactivation impairs reversal of Pavlovian learning by interfering with 'disinhibition' of responding for previously unrewarded cues. *Eur J Neurosci* **30**, 1941-1946.
24. Carta, M., Mameli, M., & Valenzuela, C. F. (2004). Alcohol enhances GABAergic transmission to cerebellar granule cells via an increase in Golgi cell excitability. *J Neurosci* **24**, 3746-3751.
25. Casey, J. R., Grinstein, S., & Orlowski, J. (2010). Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 50-61.
26. Celada, P., Puig, M., Amargós-Bosch, M., Adell, A., & Artigas, F. (2004). The therapeutic role of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in depression. *J Psychiatry Neurosci* **29**, 252-265.
27. Cheng, F. C., Ho, Y. F., Hung, L. C., Chen, C. F., & Tsai, T. H. (2002). Determination and pharmacokinetic profile of omeprazole in rat blood, brain and bile by microdialysis and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* **949**, 35-42.
28. Courtin, J., Chaudun, F., Rozeske, R. R., Karalis, N., Gonzalez-Campo, C., Wurtz, H., Abdi, A., Baufreton, J., Bienvenu, T. C., & Herry, C. (2014). Prefrontal parvalbumin interneurons shape neuronal activity to drive fear expression. *Nature* **505**, 92-96.
29. Dalton, G. L., Wang, N. Y., Phillips, A. G., & Floresco, S. B. (2016). Multifaceted Contributions by Different Regions of the Orbitofrontal and Medial Prefrontal Cortex to Probabilistic Reversal Learning. *J Neurosci* **36**, 1996-2006.
30. Delle Chiaie, R., Scarciglia, P., Pasquini, M., Caredda, M., & Biondi, M. (2011). Aripiprazole augmentation in patients with resistant obsessive compulsive disorder: a pilot study. *Clin Pract Epidemiol Ment Health* **7**, 107-111.
31. Dias, R., Robbins, T. W., & Roberts, A. C. (1996). Dissociation in prefrontal cortex of affective and attentional shifts. *Nature* **380**, 69-72.
32. Dold, M., Aigner, M., Lanzenberger, R., & Kasper, S. (2015). Antipsychotic Augmentation of Serotonin Reuptake Inhibitors in Treatment-Resistant Obsessive-Compulsive Disorder: An Update Meta-Analysis of Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trials. *Int J Neuropsychopharmacol* **18**, pyv047.
33. El Mansari, M., & Blier, P. (2005). Responsiveness of 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors in

- the rat orbitofrontal cortex after long-term serotonin reuptake inhibition. *J Psychiatry Neurosci* **30**, 268–274.
34. Evans, A. H., & Stegeman, J. R. (2009). Punding in patients on dopamine agonists for restless leg syndrome. *Mov Disord* **24**, 140–141.
 35. Fernández-Morales, J. C., Hua, W., Yao, Y., & Morad, M. (2019). Regulation of Ca²⁺ signaling by acute hypoxia and acidosis in cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Cell calcium* **78**, 1-14.
 36. Franklin, K. B. J. & Paxinos, G. (2007) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* 3rd edn. Academic Press.
 37. Gillan, C. M., Pappmeyer, M., Morein-Zamir, S., Sahakian, B. J., Fineberg, N. A., Robbins, T. W., & de Wit, S. (2011). Disruption in the balance between goal-directed behavior and habit learning in obsessive-compulsive disorder. *Am J Psychiatry* **168**, 718-26.
 38. Goodwill, H. L., Manzano-Nieves, G., LaChance, P., Teramoto, S., Lin, S., Lopez, C., Stevenson, R. J., Theyel, B. B., Moore, C. I., Connors, B. W., & Bath, K. G. (2018). Early Life Stress Drives Sex-Selective Impairment in Reversal Learning by Affecting Parvalbumin Interneurons in Orbitofrontal Cortex of Mice. *Cell Rep* **25**, 2299-2307.e4.
 39. Graham, D. Y., & Tansel, A. (2018). Interchangeable Use of Proton Pump Inhibitors Based on Relative Potency. *Clin Gastroenterol Hepatol* **16**, 800-808.e7.
 40. Graybiel, A. M., & Rauch, S. L. (2000). Toward a neurobiology of obsessive-compulsive disorder. *Neuron* **28**, 343-347.
 41. Gremel, C. M., & Costa, R. M. (2013). Orbitofrontal and striatal circuits dynamically encode the shift between goal-directed and habitual actions. *Nat Commun* **4**, 2264.
 42. Groman, S. M., Keistler, C., Keip, A. J., Hammarlund, E., DiLeone, R. J., Pittenger, C., Lee, D., & Taylor, J. R. (2019). Orbitofrontal Circuits Control Multiple Reinforcement-Learning Processes. *Neuron* **103**, 734-746.e3.
 43. Hadjas, L. C., Lüscher, C., & Simmler, L. D. (2019). Aberrant habit formation in the Sapap3-knockout mouse model of obsessive-compulsive disorder. *Sci Rep* **9**, 12061.
 44. Hatakama, H., Asaoka, N., Nagayasu, K., Shirakawa, H., & Kaneko, S. (2022). A selective serotonin reuptake inhibitor ameliorates obsessive-compulsive disorder-like perseverative behavior by attenuating 5-HT_{2C} receptor signaling in the orbitofrontal cortex. *Neuropharmacology* **206**, 108926.
 45. Homayoun, H., & Moghaddam, B. (2008). Orbitofrontal cortex neurons as a common target for classic and glutamatergic antipsychotic drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 18041-18046.

46. Honoré, E., Maingret, F., Lazdunski, M., & Patel, A. J. (2002). An intracellular proton sensor commands lipid- and mechano-gating of the K⁺ channel TREK-1. *The EMBO J* **21**, 2968-2976.
47. Invernizzi, R., Bramante, M., & Samanin, R. (1994). Chronic treatment with citalopram facilitates the effect of a challenge dose on cortical serotonin output: role of presynaptic 5-HT_{1A} receptors. *Eur J Pharmacol* **260**, 243-246.
48. Izquierdo, A., Darling, C., Manos, N., Pozos, H., Kim, C., Ostrander, S., Cazares, V., Stepp, H., & Rudebeck, P. H. (2013). Basolateral amygdala lesions facilitate reward choices after negative feedback in rats. *J Neurosci* **33**, 4105-4109.
49. Kanaporis, G., Treinys, R., Fischmeister, R., & Jurevičius, J. (2017). Metabolic inhibition reduces cardiac L-type Ca²⁺ channel current due to acidification caused by ATP hydrolysis. *PLoS one* **12**, e0184246.
50. Kaneko, S., & Nagashima, T. (2020). Drug Repositioning and Target Finding Based on Clinical Evidence. *Biol Pharm Bull* **43**, 362–365.
51. Kepecs, A., & Fishell, G. (2014). Interneuron cell types are fit to function. *Nature* **505**, 318-326.
52. Kim, S. E., Kim, M. H., Woo, J., & Kim, S. J. (2020). Dual regulatory effects of PI(4,5)P₂ on TREK-2 K⁺ channel through antagonizing interaction between the alkaline residues (K³³⁰ and R³⁵⁵⁻³⁵⁷) in the cytosolic C-terminal helix. *Korean J Physiol Pharmacol* **24**, 555-561.
53. Kita, K., Albergaria, C., Machado, A. S., Carey, M. R., Müller, M., & Delvendahl, I. (2021). GluA4 facilitates cerebellar expansion coding and enables associative memory formation. *Elife* **10**, e65152.
54. Klöckner, U., & Isenberg, G. (1994). Intracellular pH modulates the availability of vascular L-type Ca²⁺ channels. *J Gen Physiol* **103**, 647-663.
55. Knight, A. R., Misra, A., Quirk, K., Benwell, K., Revell, D., Kennett, G., & Bickerdike, M. (2004). Pharmacological characterisation of the agonist radioligand binding site of 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **370**, 114-123.
56. Kringelbach M. L. (2005). The human orbitofrontal cortex: linking reward to hedonic experience. *Nat Rev Neurosci* **6**, 691-702.
57. Külz, A. K., Meinzer, S., Kopasz, M., & Voderholzer, U. (2007). Effects of tryptophan depletion on cognitive functioning, obsessive-compulsive symptoms and mood in obsessive-compulsive disorder: preliminary results. *Neuropsychobiology* **56**, 127-131.
58. Li, J. Z., Bunney, B. G., Meng, F., Hagenauer, M. H., Walsh, D. M., Vawter, M. P., Evans, S. J., Choudary, P. V., Cartagena, P., Barchas, J. D., Schatzberg, A. F., Jones,

- E. G., Myers, R. M., Watson, S. J., Jr, Akil, H., & Bunney, W. E. (2013). Circadian patterns of gene expression in the human brain and disruption in major depressive disorder. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 9950-9955.
59. Liu, S., Bubar, M. J., Lanfranco, M. F., Hillman, G. R., & Cunningham, K. A. (2007). Serotonin_{2C} receptor localization in GABA neurons of the rat medial prefrontal cortex: implications for understanding the neurobiology of addiction. *Neuroscience* **146**, 1677-1688.
 60. Machado-Vieira R. (2012). Tracking the impact of translational research in psychiatry: state of the art and perspectives. *J Transl Med* **10**, 175.
 61. Maingret, F., Patel, A. J., Lesage, F., Lazdunski, M., & Honoré, E. (1999). Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel. *J Biol Chem* **274**, 26691-26696.
 62. Maj, J., Bijak, M., Dziedzicka-Wasylewska, M., Rogoz, R., Rogóz, Z., Skuza, G., & Tokarski, T. (1996). The effects of paroxetine given repeatedly on the 5-HT receptor subpopulations in the rat brain. *Psychopharmacology (Berl)* **127**, 73-82.
 63. Matsukawa, J., Hori, Y., Nishida, H., Kajino, M., & Inatomi, N. (2011). A comparative study on the modes of action of TAK-438, a novel potassium-competitive acid blocker, and lansoprazole in primary cultured rabbit gastric glands. *Biochem Pharmacol* **81**, 1145-1151.
 64. Meyer, J. H., Kapur, S., Eisfeld, B., Brown, G. M., Houle, S., DaSilva, J., Wilson, A. A., Rafi-Tari, S., Mayberg, H. S., & Kennedy, S. H. (2001). The effect of paroxetine on 5-HT_{2A} receptors in depression: an [(18)F] setoperone PET imaging study. *Am J Psychiatry* **158**, 78-85.
 65. Miesenböck, G., De Angelis, D. A., & Rothman, J. E. (1998). Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* **394**, 192-195.
 66. Millan, M. J., Dekeyne, A., & Gobert, A. (1998). Serotonin (5-HT)_{2C} receptors tonically inhibit dopamine (DA) and noradrenaline (NA), but not 5-HT, release in the frontal cortex in vivo. *Neuropharmacology* **37**, 953-955.
 67. Moore, T. J., Glenmullen, J., & Mattison, D. R. (2014). Reports of pathological gambling, hypersexuality, and compulsive shopping associated with dopamine receptor agonist drugs. *JAMA Intern Med* **174**, 1930-1933.
 68. Nagaoka, K., Nagashima, T., Asaoka, N., Yamamoto, H., Toda, C., Kayanuma, G., Siswanto, S., Funahashi, Y., Kuroda, K., Kaibuchi, K., Mori, Y., Nagayasu, K., Shirakawa, H., & Kaneko, S. (2021). Striatal TRPV1 activation by acetaminophen ameliorates dopamine D2 receptor antagonist-induced orofacial dyskinesia. *JCI*

insight **6**, e145632.

69. Nagashima, T., Shirakawa, H., Nakagawa, T., & Kaneko, S. (2016). Prevention of antipsychotic-induced hyperglycaemia by vitamin D: a data mining prediction followed by experimental exploration of the molecular mechanism. *Sci Rep* **6**, 26375.
70. Nauczyciel, C., Le Jeune, F., Naudet, F., Douabin, S., Esquevin, A., Vérin, M., Dondaine, T., Robert, G., Drapier, D., & Millet, B. (2014). Repetitive transcranial magnetic stimulation over the orbitofrontal cortex for obsessive-compulsive disorder: a double-blind, crossover study. *Transl Psychiatry* **4**, e436.
71. Nielen, M. M., den Boer, J. A., & Smid, H. G. (2009). Patients with obsessive-compulsive disorder are impaired in associative learning based on external feedback. *Psychol Med* **39**, 1519-1526.
72. Nirenberg, M. J., & Waters, C. (2006). Compulsive eating and weight gain related to dopamine agonist use. *Mov Disord* **21**, 524–529.
73. Nocjar, C., Alex, K. D., Sonneborn, A., Abbas, A. I., Roth, B. L., & Pehek, E. A. (2015). Serotonin-2C and -2A receptor co-expression on cells in the rat medial prefrontal cortex. *Neuroscience* **297**, 22-37.
74. Nutt, D. J., Lingford-Hughes, A., Erritzoe, D., & Stokes, P. R. (2015). The dopamine theory of addiction: 40 years of highs and lows. *Nat Rev Neurosci* **16**, 305-312.
75. Olmos, A., Govindasamy, P. (2015) Propensity scores: a 729 practical introduction using R. *J Multidiscip Eval* **11**: 68–88.
76. Opal, M. D., Klenotich, S. C., Morais, M., Bessa, J., Winkle, J., Doukas, D., Kay, L. J., Sousa, N., & Dulawa, S. M. (2014). Serotonin 2C receptor antagonists induce fast-onset antidepressant effects. *Mol Psychiatry* **19**, 1106-1114.
77. Pallanti, S., Hollander, E., & Goodman, W. K. (2004). A qualitative analysis of nonresponse: management of treatment-refractory obsessive-compulsive disorder. *J Clin Psychiatry* **65** Suppl **14**, 6–10.
78. Pallis, E., Vasilaki, A., Fehlmann, D., Kastellakis, A., Hoyer, D., Spyraiki, C., & Thermos, K. (2009). Antidepressants influence somatostatin levels and receptor pharmacology in brain. *Neuropsychopharmacology* **34**, 952-963.
79. Pauls, D. L., Abramovitch, A., Rauch, S. L., & Geller, D. A. (2014). Obsessive-compulsive disorder: an integrative genetic and neurobiological perspective. *Nat Rev Neurosci* **15**, 410–424.
80. Perani, D., Garibotto, V., Gorini, A., Moresco, R. M., Henin, M., Panzacchi, A., Matarrese, M., Carpinelli, A., Bellodi, L., & Fazio, F. (2008). In vivo PET study of 5HT_{2A} serotonin and D₂ dopamine dysfunction in drug-naive obsessive-compulsive disorder. *NeuroImage* **42**, 306–314.

81. Pfeffer, C. K., Xue, M., He, M., Huang, Z. J., & Scanziani, M. (2013). Inhibition of inhibition in visual cortex: the logic of connections between molecularly distinct interneurons. *Nat Neurosci* **16**, 1068-1076.
82. Porter, R. H., Benwell, K. R., Lamb, H., Malcolm, C. S., Allen, N. H., Revell, D. F., Adams, D. R., & Sheardown, M. J. (1999). Functional characterization of agonists at recombinant human 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptors in CHO-K1 cells. *Br J Pharmacol* **128**, 13-20.
83. Posner, J., Marsh, R., Maia, T. V., Peterson, B. S., Gruber, A., & Simpson, H. B. (2014). Reduced functional connectivity within the limbic cortico-striato-thalamo-cortical loop in unmedicated adults with obsessive-compulsive disorder. *Hum Brain Mapp* **35**, 2852-2860.
84. Qiu, S., Chen, T., Koga, K., Guo, Y. Y., Xu, H., Song, Q., Wang, J. J., Descalzi, G., Kaang, B. K., Luo, J. H., Zhuo, M., & Zhao, M. G. (2013). An increase in synaptic NMDA receptors in the insular cortex contributes to neuropathic pain. *Sci Signal* **6**, ra34.
85. Radzicki, D., Yau, H. J., Pollema-Mays, S. L., Mlsna, L., Cho, K., Koh, S., & Martina, M. (2013). Temperature-sensitive Cav1.2 calcium channels support intrinsic firing of pyramidal neurons and provide a target for the treatment of febrile seizures. *J Neurosci* **33**, 9920-9931.
86. Remijnse, P. L., Nielen, M. M., van Balkom, A. J., Cath, D. C., van Oppen, P., Uylings, H. B., & Veltman, D. J. (2006). Reduced orbitofrontal-striatal activity on a reversal learning task in obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry* **63**, 1225-1236.
87. Renteria, R., Baltz, E. T., & Gremel, C. M. (2018). Chronic alcohol exposure disrupts top-down control over basal ganglia action selection to produce habits. *Nat Commun* **9**, 211.
88. Robbins, T. W., Vaghi, M. M., & Banca, P. (2019). Obsessive-Compulsive Disorder: Puzzles and Prospects. *Neuron* **102**, 27-47.
89. Rudy, B., Fishell, G., Lee, S., & Hjerling-Leffler, J. (2011). Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Dev Neurobiol* **71**, 45-61.
90. Salas, R. E., Allen, R. P., Earley, C. J., & Gamaldo, C. E. (2009). A case of compulsive behaviors observed in a restless legs syndrome patient treated with a dopamine agonist. *Sleep* **32**, 587-588.
91. Santana, N., & Artigas, F. (2017). Expression of Serotonin_{2C} Receptors in Pyramidal and GABAergic Neurons of Rat Prefrontal Cortex: A Comparison with Striatum. *Cereb Cortex* **27**, 3125-3139.

92. Santana, N., Bortolozzi, A., Serrats, J., Mengod, G., & Artigas, F. (2004). Expression of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cereb Cortex* **14**, 1100-1109.
93. Saxena, S., Brody, A. L., Maidment, K. M., Dunkin, J. J., Colgan, M., Alborzian, S., Phelps, M. E., & Baxter, L. R., Jr (1999). Localized orbitofrontal and subcortical metabolic changes and predictors of response to paroxetine treatment in obsessive-compulsive disorder. *Neuropsychopharmacology* **21**, 683-693.
94. Schirmbeck, F., Rausch, F., Englisch, S., Eifler, S., Esslinger, C., Meyer-Lindenberg, A., & Zink, M. (2013). Differential effects of antipsychotic agents on obsessive-compulsive symptoms in schizophrenia: a longitudinal study. *J Psychopharmacol* **27**, 349-357.
95. Siswanto, S., Yamamoto, H., Furuta, H., Kobayashi, M., Nagashima, T., Kayanuma, G., Nagayasu, K., Imai, Y., & Kaneko, S. (2021). Drug Repurposing Prediction and Validation From Clinical Big Data for the Effective Treatment of Interstitial Lung Disease. *Front Pharmacol* **12**, 635293.
96. Soto, E., Ortega-Ramírez, A., & Vega, R. (2018). Protons as Messengers of Intercellular Communication in the Nervous System. *Front Cell Neurosci* **12**, 342.
97. Starcevic, V., & Brakoulias, V. (2008). Symptom subtypes of obsessive-compulsive disorder: are they relevant for treatment? *Aust NZ J Psychiatry* **42**, 651-661.
98. Stein, D. J., Costa, D. L. C., Lochner, C., Miguel, E. C., Reddy, Y. C. J., Shavitt, R. G., van den Heuvel, O. A., & Simpson, H. B. (2019). Obsessive-compulsive disorder. *Nat Rev Dis Primers* **5**, 52.
99. Takahashi, K., Dixon, D. B., & Copenhagen, D. R. (1993). Modulation of a sustained calcium current by intracellular pH in horizontal cells of fish retina. *J Gen Physiol* **101**, 695-714.
100. Tanaka, K., Dozono, N., Neyama, H., Nagai, J., Tsukahara, R., Nagayasu, K., Kaneko, S., & Ueda, H. (2021). Secreted PLA₂-III is a possible therapeutic target to treat neuropathic pain. *Biochem Biophys Res Commun* **568**, 167-173.
101. Tomlinson, C. L., Stowe, R., Patel, S., Rick, C., Gray, R., & Clarke, C. E. (2010). Systematic review of levodopa dose equivalency reporting in Parkinson's disease. *Mov Disord* **25**, 2649-2653.
102. Trujeque-Ramos, S., Castillo-Rolón, D., Galarraga, E., Tapia, D., Arenas-López, G., Mihailescu, S., & Hernández-López, S. (2018). Insulin Regulates GABA_A Receptor-Mediated Tonic Currents in the Prefrontal Cortex. *Front Neurosci* **12**, 345.
103. Jaffe, A. E., Deep-Soboslay, A., Tao, R., Hauptman, D. T., Kaye, W. H., Arango, V., Weinberger, D. R., Hyde, T. M., & Kleinman, J. E. (2014). Genetic neuropathology of

- obsessive psychiatric syndromes. *Transl Psychiatry* **4**, e432.
104. Voon, V., Fernagut, P. O., Wickens, J., Baunez, C., Rodriguez, M., Pavon, N., Juncos, J. L., Obeso, J. A., & Bezaud, E. (2009). Chronic dopaminergic stimulation in Parkinson's disease: from dyskinesias to impulse control disorders. *Lancet Neurol* **8**, 1140–1149.
105. Voon, V., Baek, K., Enander, J., Worbe, Y., Morris, L. S., Harrison, N. A., Robbins, T. W., Rück, C., & Daw, N. (2015). Motivation and value influences in the relative balance of goal-directed and habitual behaviours in obsessive-compulsive disorder. *Transl Psychiatry* **5**, e670.
106. Wali, S., Shukr, A., Boudal, A., Alsaiari, A., & Krayem, A. (2015). The effect of vitamin D supplements on the severity of restless legs syndrome. *Sleep Breath* **19**, 579–583.
107. Wang, G. J., Volkow, N. D., Logan, J., Pappas, N. R., Wong, C. T., Zhu, W., Netusil, N., & Fowler, J. S. (2001). Brain dopamine and obesity. *Lancet* **357**, 354-357.
108. Weintraub, D., Koester, J., Potenza, M. N., Siderowf, A. D., Stacy, M., Voon, V., Whetteckey, J., Wunderlich, G. R., & Lang, A. E. (2010). Impulse control disorders in Parkinson disease: a cross-sectional study of 3090 patients. *Arch Neurol* **67**, 589-595.
109. Welch, J. M., Lu, J., Rodriguiz, R. M., Trotta, N. C., Peca, J., Ding, J. D., Feliciano, C., Chen, M., Adams, J. P., Luo, J., Dudek, S. M., Weinberg, R. J., Calakos, N., Wetsel, W. C., & Feng, G. (2007). Cortico-striatal synaptic defects and OCD-like behaviours in Sapap3-mutant mice. *Nature* **448**, 894-900.
110. Yang, X., Li, Y., Sun, Y., Zhang, M., Guo, C., Mirza, I. A., & Li, Y. Q. (2018). Vonoprazan: A Novel and Potent Alternative in the Treatment of Acid-Related Diseases. *Dig Dis Sci* **63**, 302-311.
111. Yokoyama, S., Tanaka, Y., Nakagita, K., Hosomi, K., & Takada, M. (2018). Bleeding Risk of Warfarin and Direct Oral Anticoagulants in Younger Population: A Historical Cohort Study Using a Japanese Claims Database. *Int J Med Sci* **15**, 1686–1693.
112. You, X., Wu, W., Xu, J., Jiao, Z., Ke, M., Huang, P., & Lin, C. (2020). Development of a Physiologically Based Pharmacokinetic Model for Prediction of Pramipexole Pharmacokinetics in Parkinson's Disease Patients With Renal Impairment. *J Clin Pharmacol* **60**, 999-1010.