

学位論文（博士）

糖尿病マウスに認められる社会性の低下における
neuropeptide Y の役割

The role of neuropeptide Y
in impairment of social behavior
in diabetic mice

2021年3月

星薬科大学大学院 薬学研究科

薬学専攻

薬物治療学

植田 大暉

目次

序論	1
目的と意義	4
第 1 章		
糖尿病マウスに認められる社会性の低下に対する neuropeptide Y およびグルタミン酸神経の関与		
緒言	6
実験材料および実験方法	7
結果	12
考察	27
第 2 章		
糖尿病マウスに認められる社会性の低下に対する腹側海馬および扁桃体の関与		
緒言	32
実験材料および実験方法	33
結果	35
考察	43
総括	45
論文目録	47
謝辞	48
引用文献	49

略語リスト

ANOVA	analysis of variance
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
NHS	normal horse serum
NPY	neuropeptide Y
RIPA	radio immunoprecipitation assay
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
STZ	streptozotocin
TBS	tris-buffered saline
TBST	tris-buffered saline with tween 20
vHC	ventral hippocampus

序論

糖尿病と精神疾患

2019年に厚生労働省より発表された「2017年患者調査の概況」では、日本の糖尿病患者数は過去最多の約329万人となった。糖尿病は、適切な治療を行わず血糖コントロール不良の状態が続くと、いわゆる三大合併症として知られる網膜症や腎症、神経障害をはじめ、様々な合併症をひき起こすことが知られる。これらの合併症に加えて、糖尿病患者では精神疾患の罹患率が健常者と比べて高いことが報告され^{1,2)}、糖尿病が精神疾患をもひき起こす可能性が考えられる。糖尿病による精神疾患はそれ自体が問題となるだけでなく、治療のための服薬アドヒアランスを低下させることから³⁾、糖尿病における精神疾患の予防および治療法の確立は患者のQOLを維持するのみならず、糖尿病に対する適切な治療を行ううえでも重要である。しかし、糖尿病における精神疾患の発症の詳細なメカニズムは明らかになっておらず、有効な予防および治療法も確立されていない。

社会性と精神疾患

精神疾患の患者では適切なコミュニケーションをとることが困難であることから、社会性が低下していることが考えられる。社会性とは人が社会に適応しその中で生活するために、他者と適切な関係性を築くうえで必要なものである。社会性が低下すると他者と適切な関係を築くことが困難になり、他者との関係の悪化やそれによる孤立は精神疾患の発症に繋がるということが指摘されている⁴⁾。したがって、社会性の低下は精神疾患の発症において重要な要因であると考えられる。

基礎研究において、社会性は **social interaction test** を用いて評価することができる。**Social interaction test** で測定する **sociability** (社会性) は他者に対する興味を表し、**social novelty preference** (社会的新奇探索性) はコミュニケーション能力を反映すると考えられる⁵⁾。したがって、**social interaction test** において **sociability** と **social**

novelty preference をそれぞれ測定することで、社会性を詳細に評価することができる。

社会性における腹側海馬および扁桃体の関与

記憶の中核として知られる海馬は、背側海馬と腹側海馬の2つに分けられる。近年、この2つの部位は異なる機能を司ることが指摘されており、背側海馬が記憶に関与するのに対し、腹側海馬は情動に関与することが報告されている⁶⁾。これまでに、腹側海馬を破壊することによって、社会性が低下することが報告され⁷⁾、腹側海馬は社会性に関与することが示唆される。

一方、扁桃体も腹側海馬と同様に情動に関与することが知られている。実際に、当研究室では扁桃体が糖尿病における恐怖記憶の増強に関与することを報告している⁸⁾。また、扁桃体を破壊することで社会性が増加することが報告されていることから⁹⁾、扁桃体は社会性に関与する可能性が考えられる。

上記に加え、腹側海馬から扁桃体へ投射するグルタミン酸神経を活性化すると社会性が低下することが報告されている¹⁰⁾。したがって、扁桃体および腹側海馬のグルタミン酸神経は社会性に重要な役割を果たすものと考えられる。

Neuropeptide Y 神経

視床下部は摂食調節や血糖調節といったエネルギー調節を行うことによって、全身のエネルギー恒常性を維持している^{11,12)}。視床下部には様々な神経ペプチドが存在し、その中の1つである neuropeptide Y (NPY) は摂食促進ペプチドとして知られる¹³⁾。NPY 神経は全身のエネルギー状態が低下すると活性化し、摂食行動を促進することでエネルギー状態を維持している¹⁴⁾。

NPY はエネルギー調節だけでなく、情動にも関与する可能性が指摘されている。これまでに NPY の脳室内投与は抗不安作用や抗うつ作用を示すことが報告されている^{15,16)}。さらに、NPY Y₁ 受容体の刺激は抗不安作用を示し¹⁷⁾、NPY Y₂ 受容体の

拮抗は抗不安作用を示すことも報告され¹⁸⁾、NPY Y₁および Y₂受容体は不安に対して相反する作用を示す可能性が考えられる。以上より、NPY はうつや不安といった精神疾患において重要な役割を果たすものと考えられる。

目的と意義

糖尿病における精神疾患には社会性の低下が関与すると考え、本研究では糖尿病における社会性の低下のメカニズムを明らかにすることを目的とし、糖尿病における社会性の低下に NPY およびグルタミン酸神経がどのような役割を果たすか検討した。

本研究の目的は以下の通りである。

第 1 章：

Streptozotocin (STZ) 誘発糖尿病マウスにおいて社会性が変化しているか明らかにし、その変化に NPY およびグルタミン酸神経が関与するか検討した。

第 2 章：

STZ 誘発糖尿病マウスにおける社会性の低下に、腹側海馬および扁桃体の NPY およびグルタミン酸神経がどのような役割を果たすか検討した。

第 1 章

糖尿病マウスに認められる社会性の低下に対する
neuropeptide Y およびグルタミン酸神経の関与

緒言

糖尿病患者では健常者と比べて精神疾患の罹患率が高いことが報告されている^{1,2)}。一方、10代の糖尿病患者に対する調査では、健常者と比べて異性の友人がいると回答した患者が少ないことや¹⁹⁾、血糖コントロールが不良な患者ほど、友人とのトラブルを抱える頻度が高いと回答する傾向が指摘されていることから²⁰⁾、糖尿病患者では社会性が低下する可能性が懸念される。社会性の低下は精神疾患の発症の一因であることから、糖尿病では社会性が低下することによって精神疾患が発症する可能性が考えられる。

一方、視床下部に存在する NPY 神経は扁桃体を含む脳内に広く投射することが報告されている²¹⁾。また、NPY は社会性に関与することも指摘されている²²⁾。NPY 神経は全身のエネルギー状態により活性が調節されることから、全身のエネルギー状態が大きく変化している糖尿病では視床下部に存在する NPY 神経の活性が変化し、社会性が変化する可能性が考えられる。

社会性には、扁桃体および腹側海馬のグルタミン酸神経が関与することが指摘されている。また、糖尿病では海馬における AMPA 受容体の発現が変化することが報告されていることから²³⁾、糖尿病では腹側海馬および扁桃体のグルタミン酸神経機能が変化することによって社会性が変化する可能性が考えられる。

そこで、第1章ではまず、STZ 誘発糖尿病マウスにおいて社会性が変化しているか検討した。次に STZ 誘発糖尿病マウスにおける社会性の変化に、NPY が関与するか検討した。さらに、STZ 誘発糖尿病マウスにおける社会性の変化にグルタミン酸神経機能が関与するか検討を加えた。

実験材料および実験方法

実験動物

実験には ICR 系雄性マウス (4-7 週齢: 18-38 g; 東京実験動物) を用いた。実験動物はポリカーボネート製のケージ (225 × 340 × 155 mm) 内で、12 時間の明暗サイクル (点灯: 08:00、消灯: 20:00)、温度 24 ± 1 °C、湿度 $55 \pm 5\%$ の恒温恒湿環境下で飼育した。飼料 (MF; オリエンタル酵母工業) および水は自由に摂取させた。糖尿病は STZ (200 mg/kg) を 3% isoflurane (富士フィルム和光純薬) 吸入麻酔下で尾側静脈内投与することで誘発した。STZ 投与 2 週間後に血糖値が 400 mg/dl を超えるものを糖尿病とした。また、溶媒である 155 μ M クエン酸緩衝液を同様に投与したマウスを対照とした。

本研究を遂行するにあたり、星薬科大学動物実験指針に従い、星薬科大学動物実験委員会の承認を得たうえで、動物に対する倫理面を十分に考慮して全ての実験を行った。

使用薬物

実験には、NPY Y_1 受容体作動薬の LP-NPY ([Leu³¹, Pro³⁴]-neuropeptide Y; Tocris Biosciences)、NPY Y_2 受容体作動薬の NPY 13-36 (Tocris Biosciences)、NPY Y_2 受容体拮抗薬の BIIE 0246 ((N-[(1S)-4-[(Aminoiminomethyl)amino]-1-[[[2-(3,5-dioxo-1,2-diphenyl-1,2,4-triazolidin-4-yl)ethyl]amino]carbonyl]butyl]-1-[2-[4-(6,11-dihydro-6-oxo-5H-dibenz[b,e]azepin-11-yl)-1-piperazinyl]-2-oxoethyl]-cyclopentaneacetamide; Tocris Biosciences)、AMPA 受容体作動薬の AMPA ((\pm)- α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid hydrate; Sigma-Aldrich)、および AMPA 受容体拮抗薬の NBQX (1,2,3,4-tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxo-benzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide; Sigma-Aldrich) を使用した。AMPA は少量の 1 N NaOH (富士フィルム和光純薬) 水溶液に溶解し、1 N HCl (富士フィルム和光純薬) 水溶液で pH 8 にした後、生理食塩液 (0.9 w/v % NaCl

solution) で希釈した。その他の薬物は生理食塩液に溶解した。

脳室内投与

脳室内投与には、hamilton microsyringe (Hamilton) に取り付けられた針先 3 mm の二段針 (夏目製作所) を用いた。投与部位は頭蓋骨中線より 1 mm 側方にずらした位置とし、マウス当たり 4 μ l の容量で投与した。

Social interaction test

Social interaction test は過去の報告に従って行った^{24,25)}。マウスの社会性行動は three-chambered social interaction test system (小原医科産業) を用いて評価した。装置は透明なアクリル製の仕切りで 3 つの区画 (20 \times 40 \times 22 cm) に分けられており、仕切りにはマウスが自由に装置内を探索できるように穴 (5 \times 3 cm) が空いたものを使用した。また、左右の区画の隅には新奇マウスを入れるためのチャンバーを設置した。Social interaction test は 3 つの session で構成される。まず session 1 (habituation) では、両側のチャンバーは空の状態に測定マウスを中央の区画に入れ装置内を自由に探索させた。次に session 2 (sociability) では片方のチャンバーに新奇マウスを入れ、測定マウスを自由に探索させた。最後に session 3 (social novelty preference) では片方のチャンバーに session 2 で用いたマウスを入れ、もう一方のチャンバーに新たな新奇マウスを入れ、測定マウスを自由に探索させた。すべての session は 10 分間行い、測定マウスがそれぞれのチャンバーに接触した時間を測定した。測定マウスの行動は装置内上部に設置されたカメラで記録し、測定マウスの鼻先がチャンバーから 2 cm 以内に近づいた時、測定マウスがチャンバーに接触したと判断した。また、interaction time (%) は測定マウスが両チャンバーに接触した合計時間に対する一方のチャンバーとの接触時間の割合として算出した。

すべての薬物は session 2 の前に投与した。LP-NPY および NPY13-36 は session 2 の 15 分前、AMPA は 20 分前、BIIE 0246 および NBQX は 30 分前に投与した。薬物

の投与量およびタイミングは過去の文献を参考に行った²⁶⁻²⁸⁾。

Novel object recognition test

マウスの物体認知能力 (novel object recognition) は social interaction test と同様の装置を用いて行った。Novel object recognition test は3つの session で構成される。まず session 1 (habituation) では、左右の区画の隅に何も置かず、測定マウスを中央の区画に入れ装置内を自由に探索させた。次に session 2 (familiarization) では左右の隅に同じ物体を置き、測定マウスを自由に探索させた。最後の session 3 (memory) では、片方に session 2 で用いたのと同じ物体を置き、もう一方には異なる物体を置いた。物体として陶器製の六角錐と褐色瓶を使用した。すべての session は10分間行い、測定マウスがそれぞれの物体に接触する時間を測定した。なお、測定マウスの鼻先が物体から 2 cm 以内に近づいた時、物体に接触したと判断した。また、% time with each object は測定マウスが両物体に接触した合計時間に対する一方の物体との接触時間の割合として算出した。

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法

視床下部、腹側海馬および扁桃体は分画後、液体窒素で凍結し、使用するまでの間 -80 °C で保存した。各脳部位サンプルから Nucleospin[®] RNA kit (タカラバイオ) を用いて total RNA を抽出した。PrimeScript[®] RT Master Mix kit (タカラバイオ) を用いて逆転写を行うことによって cDNA を作製した。

PCR 反応は、サンプルに THUNDERBIRD[®] SYBR[®] qPCR Mix (東洋紡) を加え、StepOne Plus[™] real-time PCR systems (Applied Biosystems) を用いて行った。プライマーは以下の配列のものを使用した: NPY (NM_023456; forward: 5'- CAG ATA CTA CTC CGC TCT GCG ACA CTA CAT -3', reverse: 5'- TTC CTT CAT TAA GAG GTC TGA AAT CAG TGT CT -3'), GluA1 (XM_017314275; forward: 5'- GTC CGC CCT GAG AAA TCC AG -3', reverse: 5'- CTC GCC CTT GTC GTA CCA C -3'), GluA2 (XM_006501014;

forward: 5'- TGT GTG GTG GTT CTT TAC CCT -3', reverse: 5'- AGT AGG CAT ACT TCC CTT TGG AT -3'), GluA3 (XM_017318547; forward: 5'- ACC ACT AGC ATA GGT GGA CTT -3', reverse: 5'- ACG TGG TAG TTC AAA TGG AAG G -3'), GluA4 (XM_011242355; forward: 5'- GCT GCA GCT AAG ACC TTC ACT G -3', reverse: 5'- CCC CTG TCT GTA TCA TAC AGG AAG A -3'), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; XM_036165840; forward: 5'- GGC ACA GTC AAG GCT GAG AAT G -3', reverse: 5'- ATG GTG GTG AAG ACG CCA GTA -3'). 最初に 95 °C で denature を 20 秒間行った後、95 °C で denature を 5 秒、60 °C で annealing/amplification を 30 秒の組み合わせで 40 cycles 行った。最後に融解曲線解析 (Melting/Dissociation Curve Analysis) を行った。各値は対応する GAPDH の値で補正し、 $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて定量した。

Western blot 法

Western blot 法は過去の報告に従って行った^{8,29)}。腹側海馬は分画後に液体窒素で凍結し、使用するまで -80 °C で保存した。腹側海馬は radio immunoprecipitation assay (RIPA) buffer でホモジナイズした後、20,000 × g、4 °C で 20 分間遠心分離し、得られた上清をサンプルとした。サンプル中のタンパク質量は、BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定し、RIPA buffer で希釈することによってタンパク質濃度を揃えた (10 µg/2 µl)。サンプルは同量の 2% SDS と 20% スクロースを含む 2 × 電気泳動用バッファーで希釈し、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に従い、5-20% 濃度勾配のゲル (アトー) を用いて、電気泳動することで抗原タンパクを分子量の差によって分離した。分離完了後、速やかにゲルを取り出し、電気泳動した抗原タンパクをホライズブロット (アトー) を用いて 5% methanol を含む 10 mM tris-HCl buffer に浸したニトロセルロースメンブレンに電氣的に移動させた。抗 GluA1 抗体用のメンブレンは tris-buffered saline (TBS) に 0.1% tween 20 (Nacalai Tesque) を加えた緩衝液 (TBST) で調製した 0.3% nonfat

dried milk (富士フイルム和光純薬) 中で 60 分間ブロッキングし、抗リン酸化 GluA1 抗体用のメンブランは Blocking One-P (Nacalai Tesque) 中で 20 分間ブロッキングした。その後、抗 GluA1 抗体 (1:1000; Millipore #07-660; RRID:AB_390157) および Ser845 部位がリン酸化された GluA1 (pGluA1 (Ser845)) に対する抗体 (1:1000; Millipore #AB5849; RRID:AB_92079) にて 4 °C で一晩インキュベーションを行った。TBST で 10 分 × 3 回洗浄し、0.3% nonfat dried milk 中で 20,000 倍希釈した horseradish peroxidase 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Cell Signaling Technology) と室温で 1.5 時間インキュベーションした。TBST で 5 分 × 5 回および TBS で 5 分 × 2 回洗浄した後、ケミルミノエッセンス法に従い化学発光基質 (Thermo Fisher Scientific) を用いて、目的とするタンパク質を検出した。蛍光バンドの撮影には Light Capture (AE-6981C; アトー) を、解析には ImageJ (National Institutes of Health, USA) を用いた。メンブランは 0.1% のアジ化ナトリウムを含むブロッキングバッファーで洗浄し、1,000 倍希釈した抗 β -actin 抗体 (Cell Signaling Technology) にて 4 °C で一晩インキュベーションを行った。その後、二次抗体とインキュベーションし、先程と同様にタンパク質の検出と解析を行った。なお、 β -actin を陽性対照とし、それぞれのバンドを補正した後、解析を行った。

統計処理

データはすべて平均値 \pm 標準誤差で算出した。二元配置分散分析 (ANOVA) を行い、その後 Bonferroni 法により検定を行った。また、二群間の比較には Mann-Whitney の U 検定を行った。危険率 5% 以下のものを有意差ありと判定した。

結果

STZ 誘発糖尿病マウスにおける社会性の変化

糖尿病により社会性が低下するか検討した。Session 1 (habituation) では対照マウスと STZ 誘発糖尿病マウスにおいて両側の空のチャンバーへの接触時間に差はなく、同程度の接触時間を示した (Fig. 1-1A)。Session 2 (sociability) では対照マウス、STZ 誘発糖尿病マウスともに新奇マウスの入ったチャンバーへの接触時間が空のチャンバーとの接触時間より有意に長かった (two-way ANOVA, $F_{(1,50)} = 3.70$, $p < 0.001$; Fig. 1-1B)。Session 3 (social novelty preference) では、対照マウスでは既知マウスと比べて新奇マウスへの接触時間が有意に長かったが、STZ 誘発糖尿病マウスの新奇マウスへの接触時間は対照マウスと比べて有意に短かった (two-way ANOVA, $F_{(1,50)} = 14.59$, $p < 0.001$; Fig. 1-1C)。この結果から、糖尿病では social novelty preference が低下することが示唆された。

STZ 誘発糖尿病マウスにおける物体認知能力の変化

糖尿病による social novelty preference の低下が記憶の障害によるものか検討するため、STZ 誘発糖尿病マウスの物体認知能力を測定した。Session 2 (familiarization) では対照マウスと STZ 誘発糖尿病マウスにおいて左右の物体への接触時間に差はなかった (Fig. 1-1D)。Session 3 (memory) では、対照マウス、STZ 誘発糖尿病マウスともに既知物体と比べて新奇物体への接触時間が有意に長かった (two-way ANOVA, $F_{(1,44)} = 1.30$, $p < 0.05$; Fig. 1-1E)。この結果から、糖尿病では記憶の障害は認められないことが示唆された。

STZ 誘発糖尿病マウスの脳内における NPY mRNA 発現量の変化

糖尿病によって脳内の NPY mRNA 発現量に変化するか検討した。その結果、STZ 誘発糖尿病マウスにおける視床下部の NPY mRNA 発現量は対照マウスと比べて有

意に増加した (Mann-Whitney U test, $p < 0.001$; Fig. 1-2A)。一方、STZ 誘発糖尿病マウスの腹側海馬および扁桃体の NPY mRNA 発現量は対照マウスと比べて有意な変化は見られなかった (Fig. 1-2B, C)。

社会性行動に対する NPY Y₁ および Y₂ 受容体の関与

NPY の社会性における役割について明らかにするため、非糖尿病マウスを用いて、社会性行動における NPY Y₁ および Y₂ 受容体の関与について検討した。NPY Y₁ 受容体作動薬である LP-NPY (50 ng, i.c.v.) を投与しても、session 2 (sociability) および session 3 (social novelty preference) において新奇マウスへの接触時間に変化は見られなかった (Fig. 1-3A, B)。一方、NPY Y₂ 受容体作動薬である NPY 13-36 (50 ng, i.c.v.) を投与した場合には、session 2 (sociability) では変化が見られなかったものの (Fig. 1-3C)、session 3 (social novelty preference) において新奇マウスへの接触時間が有意に減少した (two-way ANOVA, $F_{(1,22)} = 11.75$, $p < 0.05$; Fig. 1-3D)。

一方、NPY Y₂ 受容体拮抗薬である BIIE 0246 (400 ng, i.c.v.) の投与は session 2 (sociability) および session 3 (social novelty preference) における新奇マウスへの接触時間に影響を及ぼさなかった (Fig. 1-4A)。さらに、BIIE 0246 (400 ng, i.c.v.) と NPY 13-36 (50 ng, i.c.v.) の併用は session 2 (sociability) における新奇マウスへの接触時間には影響を及ぼさなかったが、session 3 (social novelty preference) では NPY 13-36 (50 ng, i.c.v.) による新奇マウスへの接触時間の減少は BIIE 0246 (400 ng, i.c.v.) の併用により抑制された (two-way ANOVA, $F_{(1,26)} = 11.07$, $p < 0.05$; Fig. 1-4B)。

NPY Y₂ 受容体拮抗薬が STZ 誘発糖尿病マウスの social novelty preference に与える影響

NPY Y₂ 受容体拮抗薬が STZ 誘発糖尿病マウスの社会性行動に与える影響を検討した。BIIE 0246 (400 ng, i.c.v.) の投与により session 2 (sociability) における対照マウスおよび STZ 誘発糖尿病マウスの新奇マウスへの接触時間に変化は見られな

った (Fig. 1-5A)。一方、session 3 (social novelty preference) において BIIE 0246 (400 ng, i.c.v.) の投与により対照マウスの新奇マウスへの接触時間には影響はなかったが、STZ 誘発糖尿病マウスの新奇マウスへの接触時間の低下が改善した (two-way ANOVA, $F_{(1,31)} = 7.18$, $p < 0.001$; Fig. 1-5B)。

STZ 誘発糖尿病マウスの脳内における AMPA 受容体発現量の変化

STZ 誘発糖尿病マウスの腹側海馬と扁桃体における AMPA 受容体サブユニットの mRNA 発現量を測定した。STZ 誘発糖尿病マウスにおいて、腹側海馬の GluA1 mRNA 発現量は対照マウスと比べて有意に増加したが (Mann-Whitney U test, $p < 0.05$; Fig. 1-6A)、GluA2、GluA3 および GluA4 の mRNA 発現量に変化はなかった (Fig. 1-6B, C, D)。また、STZ 誘発糖尿病マウスの扁桃体における GluA1、GluA2、GluA3 および GluA4 の mRNA 発現量は対照マウスと比べて変化は認められなかった (Fig. 1-6E, F, G, H)。腹側海馬において mRNA 発現量の増加が認められた GluA1 サブユニットのタンパク量を測定したところ、STZ 誘発糖尿病マウスにおいて GluA1 サブユニットのタンパク量に変化は見られなかったが (Fig. 1-6I)、pGluA1 (Ser 845) のタンパク量は対照マウスと比べて有意に増加した (Mann-Whitney U test, $p < 0.05$; Fig. 1-6J)。

社会性行動に対する AMPA 受容体の関与

社会性行動に対する AMPA 受容体の関与について非糖尿病マウスを用いて検討した。Session 2 (sociability) において AMPA (40 ng, i.c.v.) の単独投与、NBQX (800 ng, i.c.v.) の単独投与および AMPA (40 ng, i.c.v.) と NBQX (800 ng, i.c.v.) の併用投与のいずれにおいても、新奇マウスへの接触時間に変化は見られなかった (Fig. 1-7A)。一方、session 3 (social novelty preference) では AMPA (40 ng, i.c.v.) の投与により新奇マウスへの接触時間が減少し (two-way ANOVA, $F_{(1,32)} = 51.35$, $p < 0.05$)、この減少は NBQX (800 ng, i.c.v.) を併用することによって抑制された (two-way

ANOVA, $F_{(1,33)} = 4.15$, $p < 0.05$; Fig. 1-7B)。

Social novelty preference に対する AMPA 受容体と NPY Y₂ 受容体の関与

Social novelty preference における AMPA および NPY Y₂ 受容体の関連を非糖尿病マウスを用いて検討した。Session 2 (sociability) において NPY 13-36 (50 ng, i.c.v.) の単独投与、NBQX (800 ng, i.c.v.) の単独投与、および NPY 13-36 (50 ng, i.c.v.) と NBQX (800 ng, i.c.v.) の併用投与により新奇マウスへの接触時間に変化は見られなかった (Fig. 1-8A)。一方、session 3 (social novelty preference) では、NPY 13-36 (50 ng, i.c.v.) の投与により新奇マウスへの接触時間が減少し (two-way ANOVA, $F_{(1,30)} = 16.32$, $p < 0.05$)、この減少は NBQX (800 ng, i.c.v.) の併用によって抑制された (two-way ANOVA, $F_{(1,29)} = 4.32$, $p < 0.05$; Fig. 1-8B)。

一方、session 2 (sociability) において AMPA (40 ng, i.c.v.)、BIIE 0246 (400 ng, i.c.v.) および AMPA (40 ng, i.c.v.) と BIIE 0246 (400 ng, i.c.v.) の併用投与により新奇マウスへの接触時間に変化は見られなかったが (Fig. 1-9A)、session 3 (social novelty preference) において、AMPA (40 ng, i.c.v.) の投与により新奇マウスへの接触時間が減少し、この減少は BIIE 0246 (400 ng, i.c.v.) の併用により影響を受けなかった (Fig. 1-9B)。

AMPA 受容体拮抗薬が STZ 誘発糖尿病マウスの social novelty preference に与える影響

AMPA 受容体拮抗薬が STZ 誘発糖尿病マウスの social novelty preference に与える影響を検討した。Session 2 (sociability) において NBQX (800 ng, i.c.v.) の投与は対照マウスおよび STZ 誘発糖尿病マウスの新奇マウスへの接触時間に影響を及ぼさなかった (Fig. 1-10A)。一方、session 3 (social novelty preference) において NBQX (800 ng, i.c.v.) の投与により対照マウスの新奇マウスへの接触時間に変化は見られなかったが、STZ 誘発糖尿病マウスにおける新奇マウスへの接触時間への減少が改

善した (two-way ANOVA, $F_{(1,44)} = 4.34$, $p < 0.05$; Fig. 1-10B)。

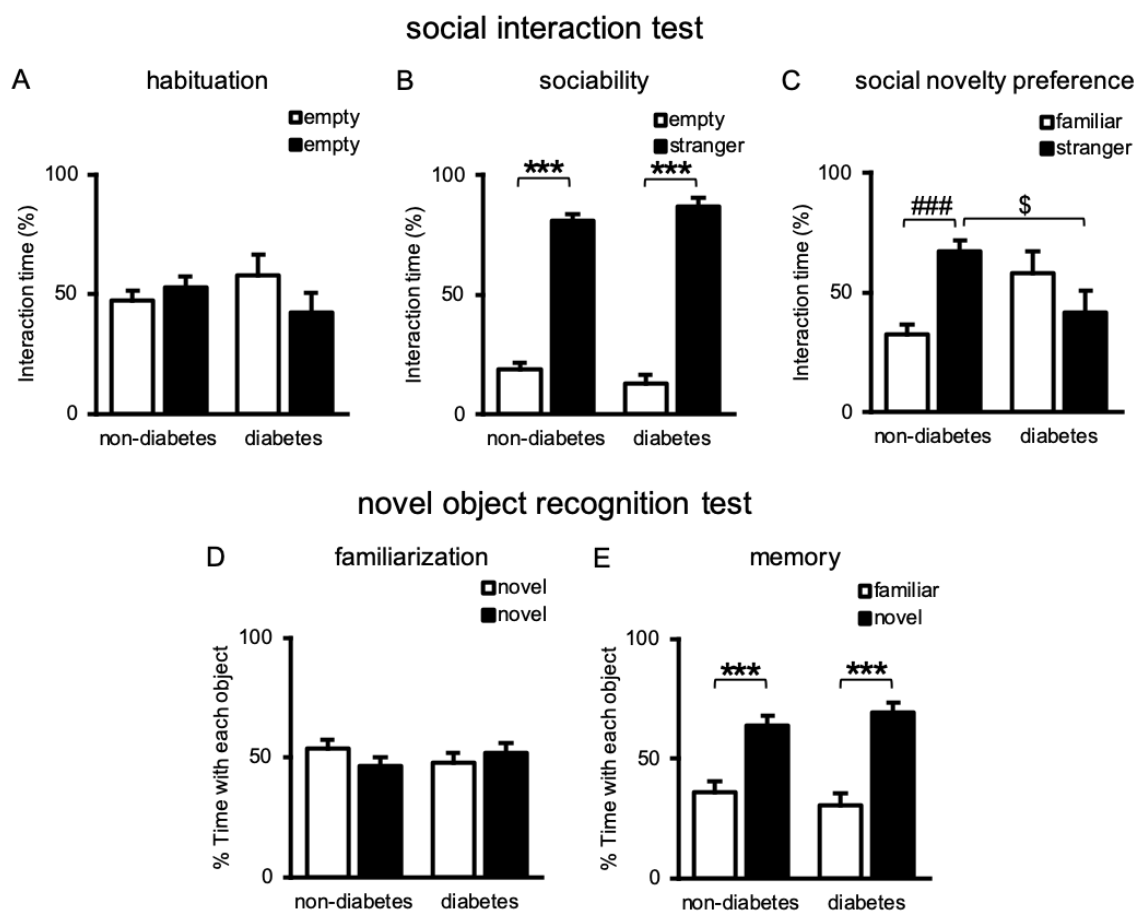


Figure 1-1. (A-C) Sociability and social novelty preference in diabetic mice. (A) Interaction time with empty cages in non-diabetic and STZ-induced diabetic mice. (B) Interaction time with the empty cage and the cage containing a stranger mouse in session 2 in non-diabetic and STZ-induced diabetic mice. (C) Interaction time with the cage containing the familiar mouse and the cage containing a new stranger mouse in session 3 in non-diabetic and STZ-induced diabetic mice. Each column represents the mean \pm S.E.M. Non-diabetes: $n = 15$; diabetes: $n = 12$. *** $p < 0.001$ vs. respective interaction time with the empty cage; ### $p < 0.001$ vs. respective interaction time with the familiar mouse; $^{\$}p < 0.05$ vs. respective interaction time in non-diabetic mice. (D, E) Novel object recognition in diabetic mice. (D) Time with each novel object in session 2 in non-diabetic and STZ-induced diabetic mice. (E) Time with the familiar object and a novel object in session 3 in non-diabetic and STZ-induced diabetic mice. Each column represents the mean \pm S.E.M. Non-diabetes: $n = 12$; diabetes: $n = 12$. *** $p < 0.001$ vs. respective time with the familiar object.

Ueda et al.: Br J Pharmacol **178**, 726-740 (2020) より一部改変

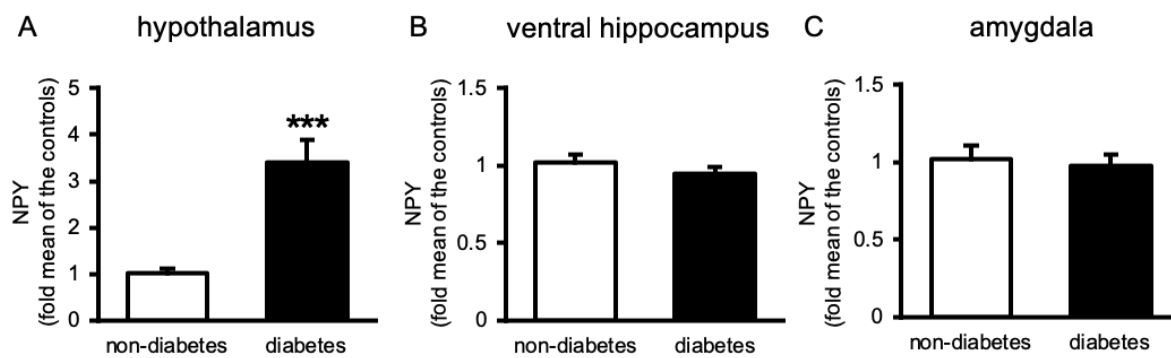


Figure 1-2. Changes in mRNA level of NPY in the hypothalamus (A), ventral hippocampus (B) and amygdala (C) of non-diabetic and STZ-induced diabetic mice. Each column represents the mean \pm S.E.M. Non-diabetes: $n = 8$; diabetes: $n = 8$. *** $p < 0.001$ vs. non-diabetic mice.

Ueda et al.: Br J Pharmacol **178**, 726-740 (2020) より一部改変

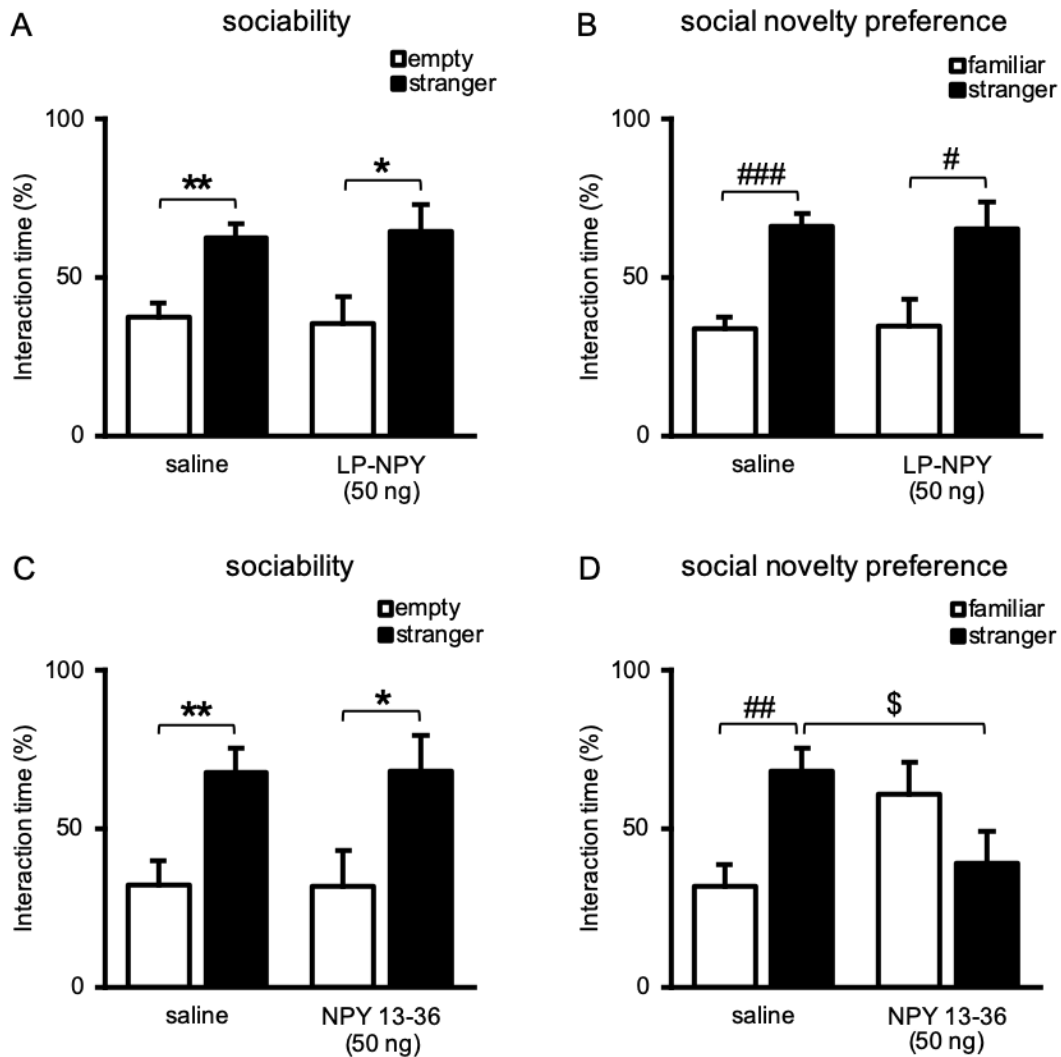


Figure 1-3. Effect of the NPY Y_1 receptor agonist LP-NPY and the NPY Y_2 receptor agonist NPY 13-36 on sociability and social novelty preference in mice. (A) Effect of LP-NPY on interaction time with the empty cage and the cage containing a stranger mouse in session 2. LP-NPY (50 ng, i.c.v.) was injected 15 min before measurements. (B) Effect of LP-NPY on interaction time with the familiar mouse and a new stranger mouse in session 3. (C) Effect of NPY 13-36 on interaction time with the empty cage and the cage containing a stranger mouse in session 2. NPY 13-36 (50 ng, i.c.v.) was injected 15 min before measurements. (D) Effect of NPY 13-36 on interaction time with the familiar mouse and a new stranger mouse in session 3. Each column represents the mean \pm S.E.M. Saline (A, B): $n = 6$; LP-NPY: $n = 6$; saline (C, D): $n = 7$; NPY 13-36: $n = 6$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. respective interaction time with the empty cage; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. respective interaction time with the familiar mouse; \$ $p < 0.05$ vs. respective interaction time in saline-treated mice.

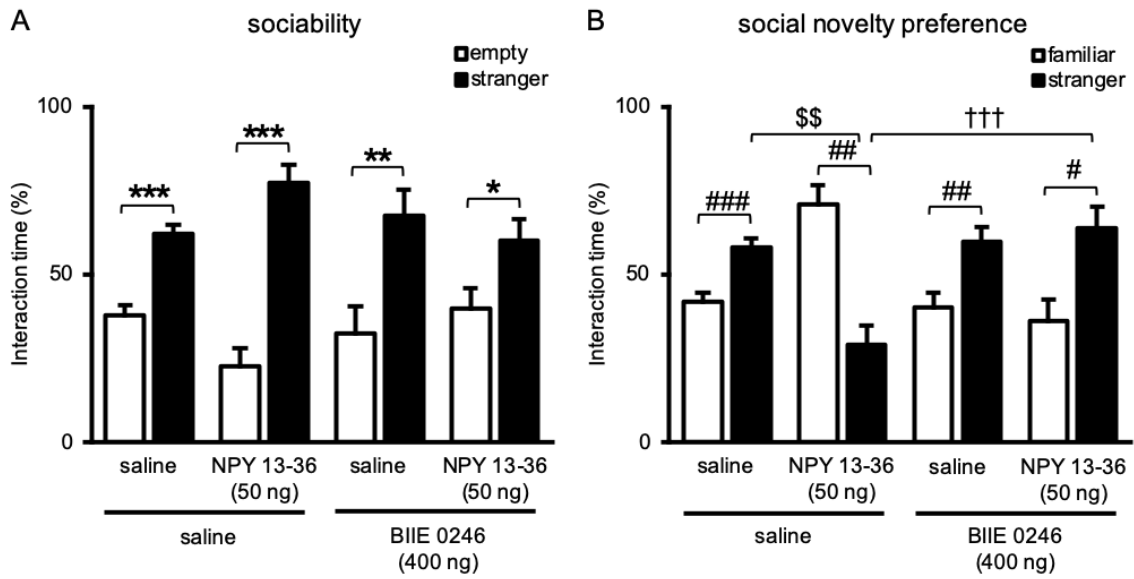


Figure 1-4. Effect of the NPY Y₂ receptor antagonist BIIE 0246 on impairment of social novelty preference induced by the NPY Y₂ receptor agonist NPY 13-36 in mice. (A) Effect of BIIE 0246 and NPY 13-36 on interaction time with the empty cage and the cage containing a stranger mouse in session 2. BIIE 0246 (400 ng, i.c.v.) and NPY 13-36 (50 ng, i.c.v.) were injected 30 and 15 min before measurements, respectively. (B) Effect of BIIE 0246 and NPY 13-36 on interaction time with the cage containing the familiar mouse and the cage containing a new stranger mouse in session 3. Each column represents the mean ± S.E.M. Saline + saline: *n* = 8; saline + NPY 13-36: *n* = 6; BIIE 0246 + saline: *n* = 8; BIIE 0246 + NPY 13-36: *n* = 9. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 vs. respective interaction time with the empty cage; #*p* < 0.05, ##*p* < 0.01, ###*p* < 0.001 vs. respective interaction time with the familiar mouse; \$\$*p* < 0.01 vs. respective interaction time in saline-saline treated mice; †††*p* < 0.001 vs respective interaction time in saline-NPY 13-36 treated mice.

Ueda et al.: Br J Pharmacol 178, 726-740 (2020) より一部改変

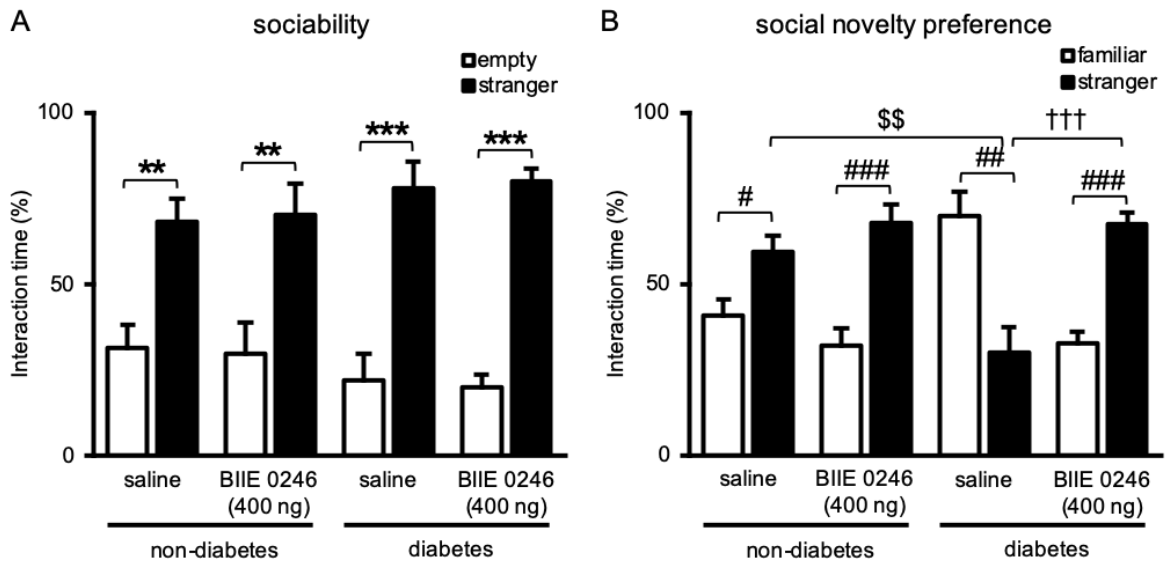


Figure 1-5. Effect of NPY Y₂ receptor antagonist BIIE 0246 on impairment of social novelty preference in diabetic mice. (A) Effect of BIIE 0246 on interaction time with the empty cage and the cage containing a stranger mouse in session 2 in non-diabetic and STZ-induced diabetic mice. BIIE 0246 (400 ng, i.c.v.) was injected 30 min before measurements. (B) Effect of BIIE 0246 on interaction time with the cage containing the familiar mouse and the cage containing a new stranger mouse in session 3 in non-diabetic and STZ-induced diabetic mice. Each column represents the mean \pm S.E.M. Non-diabetes + saline: $n = 8$; non-diabetes + BIIE 0246: $n = 8$; diabetes + saline: $n = 9$; diabetes + BIIE 0246: $n = 10$. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. respective interaction time with the empty cage; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. respective interaction time with the familiar mouse; \$\$ $p < 0.01$ vs. respective interaction time in saline-treated non-diabetic mice; ††† $p < 0.001$ vs. respective interaction time in saline-treated diabetic mice.

Ueda et al.: Br J Pharmacol 178, 726-740 (2020) より一部改変

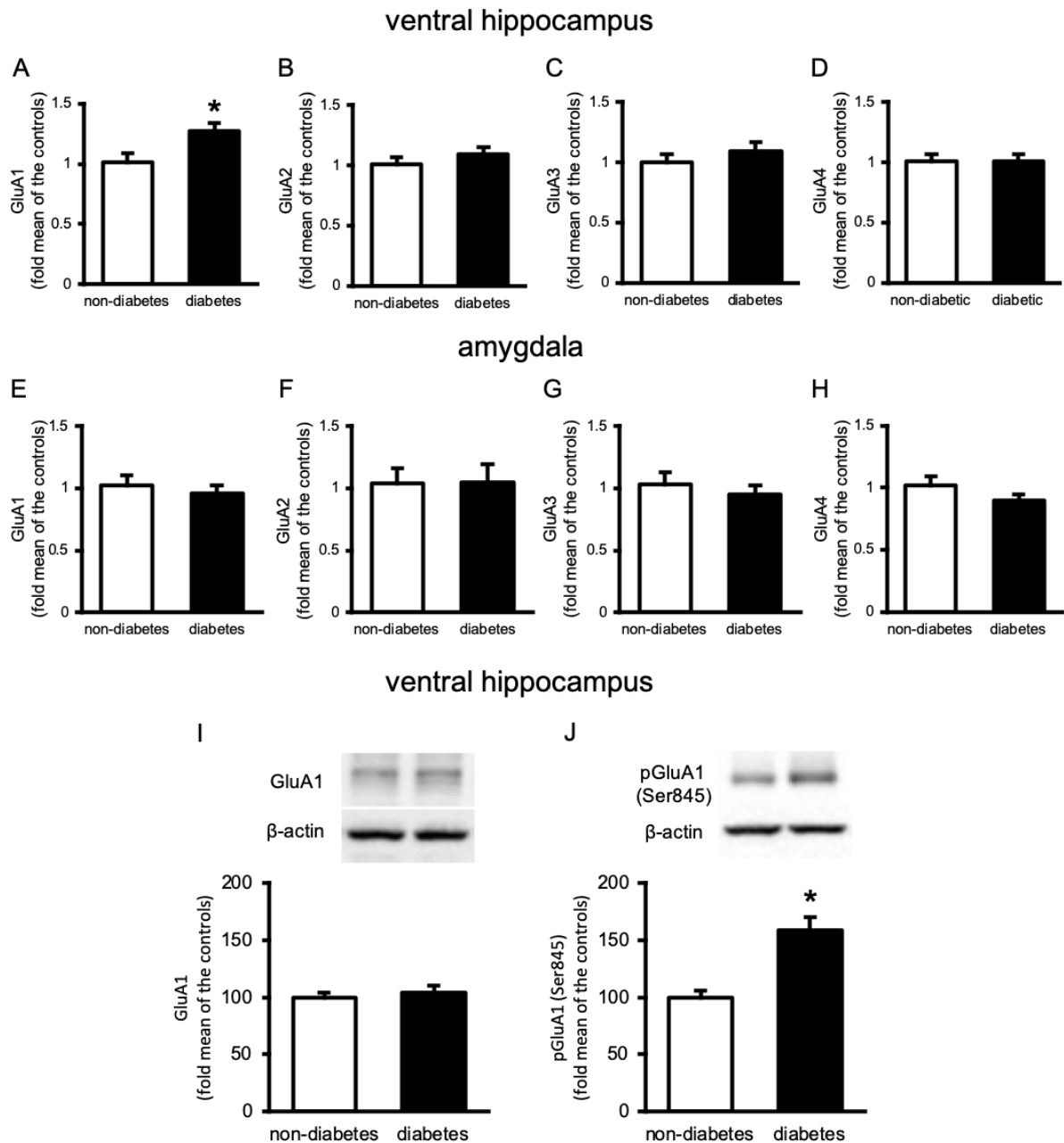


Figure 1-6. (A-H) Changes in mRNA levels of GluA1 (A, E), GluA2 (B, F), GluA3 (C, G) and GluA4 (D, H) subunits of AMPA receptor in ventral hippocampus (A-D) and amygdala (E-H) of non-diabetic and STZ-induced diabetic mice. Each column represents the mean \pm S.E.M. Non-diabetes: $n = 8$; diabetes: $n = 8$. * $p < 0.05$ vs. non-diabetic mice. (I, J) Changes in protein levels of GluA1 subunit (I) and GluA1 subunit phosphorylated at Ser845 (pGluA1(Ser845)) (J) in ventral hippocampus of non-diabetic and STZ-induced diabetic mice. Immunoblots are representatives for GluA1 and pGluA1(Ser845); immunoblots of GluA1 and pGluA1(Ser845) were normalized by β -actin. Each column represents the mean \pm S.E.M. Non-diabetes (I): $n = 8$; diabetes (I): $n = 8$; non-diabetes (J): $n = 8$; diabetes (J): $n = 7$. * $p < 0.05$ vs non-diabetic group.

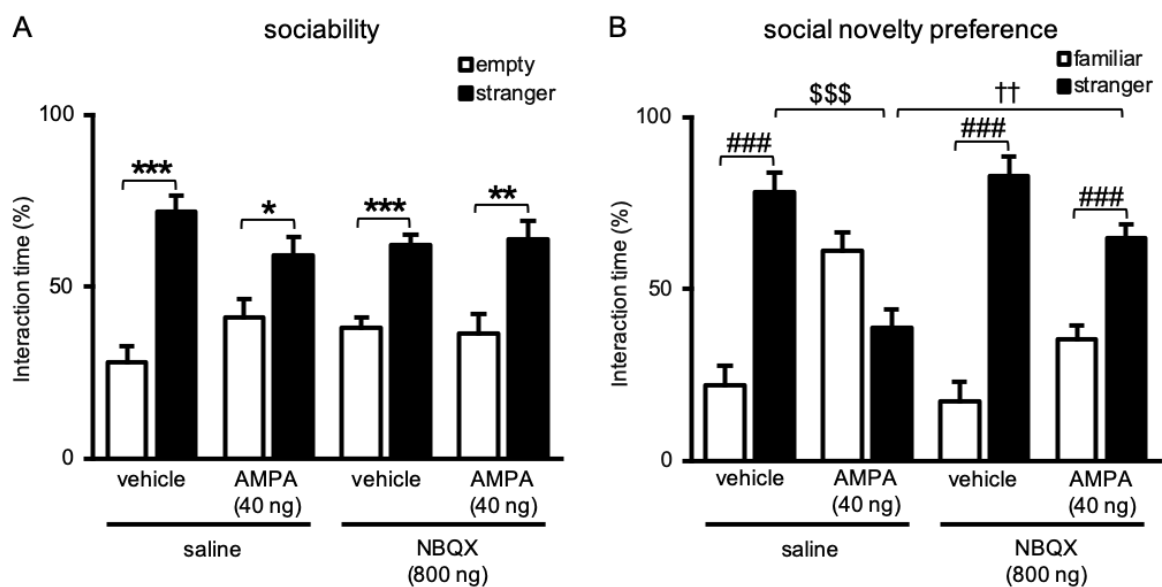


Figure 1-7. Effect of AMPA and the AMPA receptor antagonist NBQX on sociability and social novelty preference in mice. (A) Effect of AMPA and NBQX on interaction time with the empty cage and the cage containing a stranger mouse in session 2. NBQX (800 ng, i.c.v.) and AMPA (40 ng, i.c.v.) were injected 30 and 20 min before measurements, respectively. (B) Effect of AMPA and NBQX on interaction time with the cage containing the familiar mouse and the cage containing a new stranger mouse in session 3. Each column represents the mean \pm S.E.M. Saline + vehicle: $n = 9$; saline + AMPA: $n = 10$; NBQX + vehicle: $n = 10$; NBQX + AMPA: $n = 9$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. respective interaction time with the empty cage; ### $p < 0.001$ vs. respective interaction time with the familiar mouse; \$\$\$ $p < 0.001$ vs. respective interaction time in saline-vehicle treated mice; †† $p < 0.01$ vs. respective interaction time in saline-AMPA treated mice.

Ueda et al.: Br J Pharmacol 178, 726-740 (2020) より一部改変

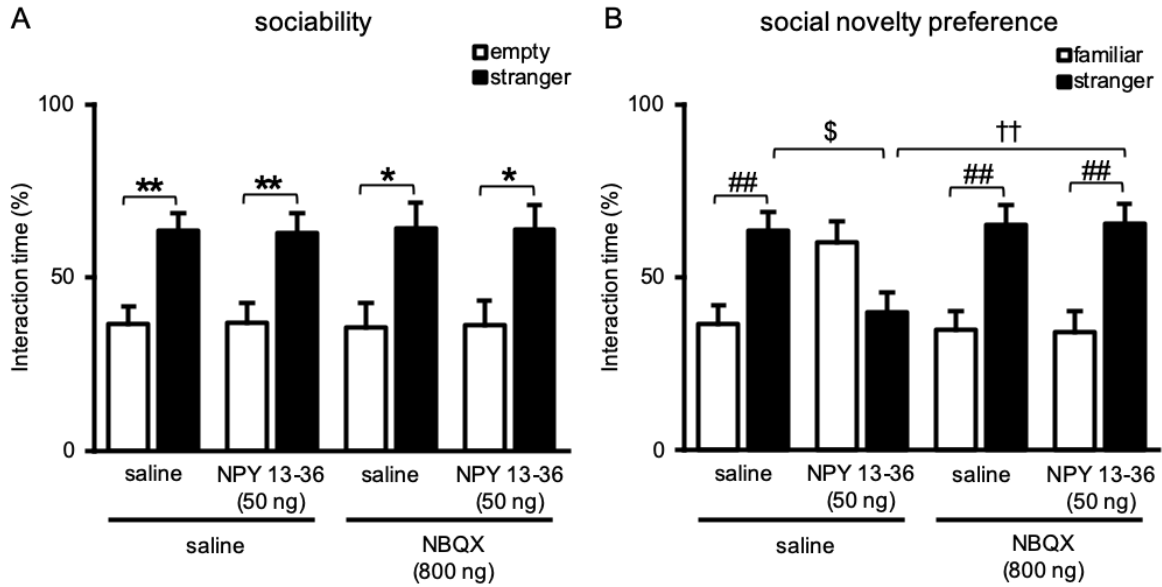


Figure 1-8. Effect of the AMPA receptor antagonist NBQX on impairment of social novelty preference induced by the NPY Y₂ receptor agonist NPY 13-36 in mice. (A) Effect of NPY 13-36 and NBQX on interaction time with the empty cage and the cage containing a stranger mouse in session 2. NBQX (800 ng, i.c.v.) and NPY 13-36 (50 ng, i.c.v.) were injected 30 and 15 min before measurements, respectively. (B) Effect of NPY 13-36 and NBQX on interaction time with the cage containing the familiar mouse and the cage containing a new stranger mouse in session 3. Each column represents the mean ± S.E.M. Saline + saline: *n* = 8; saline + NPY 13-36: *n* = 9; NBQX + saline: *n* = 8; NBQX + NPY 13-36: *n* = 8. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 vs. respective interaction time with the empty cage; ##*p* < 0.01 vs. respective interaction time with the familiar mouse; \$*p* < 0.05 vs. respective interaction time in saline-saline treated mice; ††*p* < 0.01 vs. respective interaction time in saline-NPY 13-36 treated mice.

Ueda et al.: Br J Pharmacol 178, 726-740 (2020) より一部改変

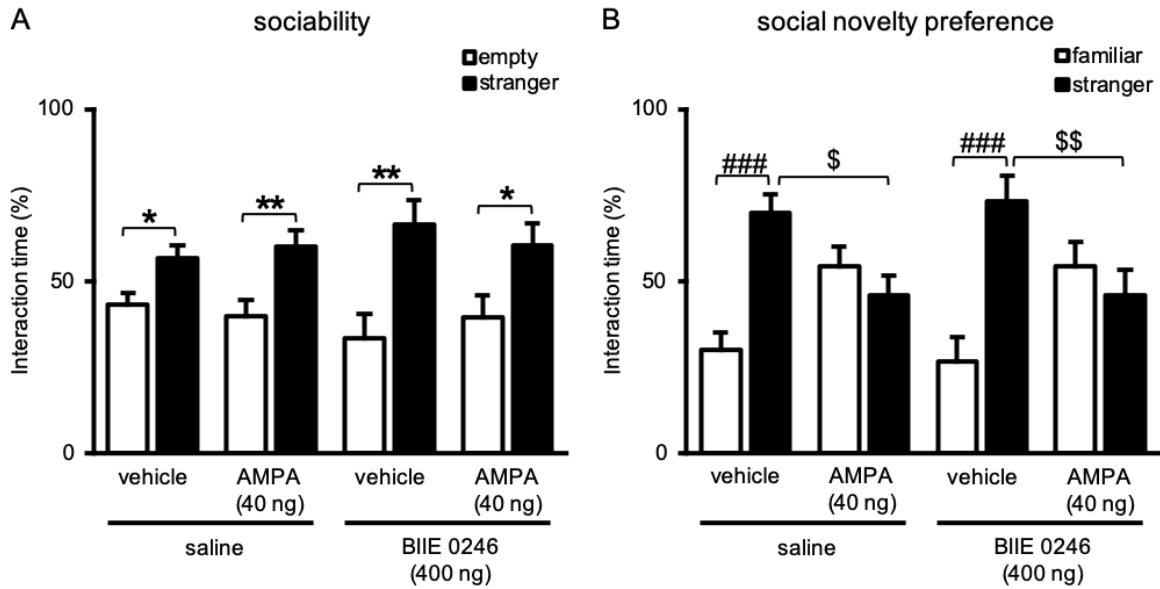


Figure 1-9. Effect of the NPY Y₂ receptor antagonist BIIE 0246 on impairment of social novelty preference induced by AMPA in mice. (A) Effect of AMPA and BIIE 0246 on interaction time with the empty cage and the cage containing a stranger mouse in session 2. BIIE 0246 (400 ng, i.c.v.) and AMPA (40 ng, i.c.v.) were injected 30 and 20 min before measurements, respectively. (B) Effect of AMPA and BIIE 0246 on interaction time with the cage containing the familiar mouse and the cage containing a new stranger mouse in session 3. Each column represents the mean ± S.E.M. Saline + vehicle: *n* = 7; saline + AMPA: *n* = 7; BIIE 0246 + vehicle: *n* = 7; BIIE 0246 + AMPA: *n* = 8. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 vs. respective interaction time with the empty cage; ###*p* < 0.001 vs. respective interaction time with the familiar mouse; \$*p* < 0.05, \$\$*p* < 0.01 vs. respective interaction time in vehicle-treated mice.

Ueda et al.: Br J Pharmacol 178, 726-740 (2020) より一部改変

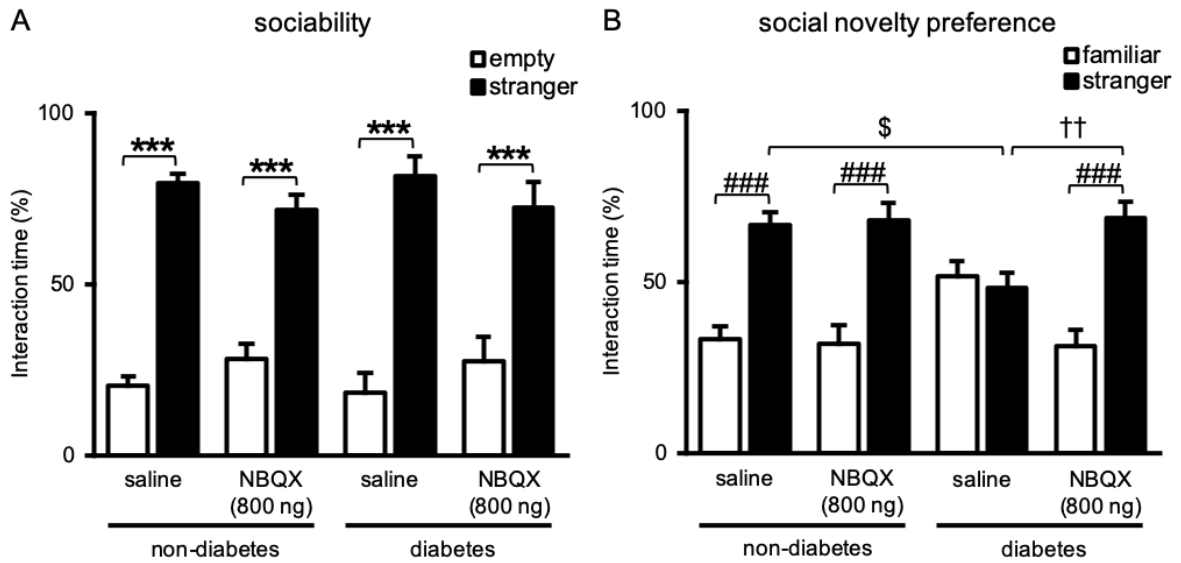


Figure 1-10. Effect of the AMPA receptor antagonist NBQX on impairment of social novelty preference in diabetic mice. (A) Effect of NBQX on interaction time with the empty cage and the cage containing a stranger mouse in session 2 in non-diabetic and STZ-induced diabetic mice. NBQX (800 ng, i.c.v.) was injected 30 min before measurements. (B) Effect of NBQX on interaction time with the cage containing the familiar mouse and the cage containing a new stranger mouse in non-diabetic and STZ-induced diabetic mice. Each column represents the mean \pm S.E.M. Non-diabetes + saline: $n = 12$; non-diabetes + NBQX: $n = 12$; diabetes + saline: $n = 12$; diabetes + NBQX: $n = 12$. *** $p < 0.001$ vs. respective interaction time with the empty cage; ### $p < 0.001$ vs. respective interaction time with the familiar mouse; $^{\$}p < 0.05$ vs. respective interaction time in saline-treated non-diabetic mice; $^{\dagger\dagger}p < 0.01$ vs. respective interaction time in saline-treated diabetic mice.

Ueda et al.: Br J Pharmacol **178**, 726-740 (2020) より引用

考察

本章では、糖尿病における社会性の変化とそれに対する NPY およびグルタミン酸神経の関与について検討した。

はじめに、STZ 誘発糖尿病マウスを用いて、social interaction test により社会性が変化するか検討した。その結果、STZ 誘発糖尿病マウスでは対照マウスと比べて session 2 における新奇マウスへの接触時間は変化しなかった。このことから、STZ 誘発糖尿病マウスでは sociability は低下しないことが示唆された。STZ 誘発糖尿病マウスでは不安様行動やうつ様行動が増加することが報告されていることから³⁰⁻³²⁾、sociability は不安やうつ様行動とは異なることが考えられる。一方、session 3 では STZ 誘発糖尿病マウスにおける新奇マウスへの接触時間は、対照マウスと比べて有意に低下した。この結果から、STZ 誘発糖尿病マウスでは social novelty preference が低下していることが示唆された。しかし、糖尿病では認知機能が低下することが報告されていることから^{33,34)}、social novelty preference の低下が認知機能の低下によるものか検討するため、novel object recognition test を行った。その結果、STZ 誘発糖尿病マウスにおいて物体認知力の低下は認められなかった。過去の報告において、糖尿病における認知機能の低下は STZ 投与後 4 週後に検討しており、本研究では STZ 投与後 2 週後に実験を行った。これらの結果から、糖尿病による認知機能の低下は高血糖状態が長期にわたって持続した場合に起こることが考えられる。以上のことから、STZ 誘発糖尿病マウスでは social novelty preference が低下することが示された。

次に、糖尿病における social novelty preference の低下に NPY が関与するか検討した。NPY 神経は視床下部に存在し、脳内へ広く投射することが報告されている²¹⁾。また、社会性には扁桃体や腹側海馬が関与することも報告されている¹⁰⁾。以上を踏まえ、本研究では視床下部、腹側海馬および扁桃体における NPY mRNA 発現量を測定した。その結果、STZ 誘発糖尿病マウスの視床下部でのみ対照マウスと比

べて NPY mRNA 発現量の増加が認められた。このことから、糖尿病では視床下部の NPY 神経の活性が亢進することが示唆された。

NPY 受容体には Y₁、Y₂、Y₄、Y₅ および Y₆ の 5 つのサブタイプが存在することが知られ、そのうち Y₁ および Y₂ 受容体は脳内に広く分布する^{35,36)}。これらの受容体は情動に関与することが報告されており、NPY Y₁ 受容体の刺激は抗不安作用を示し¹⁷⁾、NPY Y₂ 受容体の刺激は不安を惹起することが示されている²⁶⁾。本研究において、LP-NPY の投与では sociability および social novelty preference に変化はなかったが、NPY 13-36 を投与したところ、social novelty preference が低下した。また、NPY 13-36 の投与による social novelty preference の低下は BIIE 0246 の併用によって抑制されたことから、NPY Y₂ 受容体の刺激は social novelty preference を低下させることが示された。さらに、STZ 誘発糖尿病マウスに BIIE 0246 を投与したところ、social novelty preference の低下が改善した。このことから、糖尿病では NPY 神経が活性化することにより NPY Y₂ 受容体を介して social novelty preference が低下することが示唆された。

扁桃体から腹側海馬へ投射するグルタミン酸神経が社会性に関与することが報告されていることから¹⁰⁾、糖尿病において扁桃体や腹側海馬のグルタミン酸神経機能に変化している可能性が考えられる。社会性にはグルタミン酸受容体のうち AMPA 受容体に関与することが指摘されている³⁷⁾。AMPA 受容体は 4 つのサブユニットから構成されており、サブユニットには GluA1 から GluA4 が存在する³⁸⁾。そこで、各脳部位における AMPA 受容体サブユニットの mRNA 発現量を検討したところ、STZ 誘発糖尿病マウスの腹側海馬では対照マウスと比べて GluA1 mRNA 発現量の増加が認められた。一方、扁桃体では各 AMPA 受容体サブユニットの mRNA 発現量に変化は認められなかった。そこで、STZ 誘発糖尿病マウスの腹側海馬における GluA1 のタンパク量を測定したところ、STZ 誘発糖尿病マウスにおいて GluA1 のタンパク量は対照マウスと比べて有意な差はなかったものの、pGluA1(Ser845) のタンパク量は有意に増加した。GluA1 は Ser845 部位がリン酸化されるとシナプス

表面に移行することから³⁹⁾、糖尿病では腹側海馬の AMPA 受容体機能が亢進することが示唆された。今回、腹側海馬の GluA1 mRNA 発現量は増加したにもかかわらず、GluA1 のタンパク量は変化が見られなかった。この理由としては、GluA1 のタンパク量が STZ 投与後 2 週以降に増加することや、STZ 誘発糖尿病マウスでは GluA1 の代謝が亢進する可能性が考えられる。一方、STZ 誘発糖尿病マウスにおいて pGluA1 が増加した理由として、1 型糖尿病ラットでは海馬のプロテインホスファターゼが減少するという報告があることから⁴⁰⁾、腹側海馬のプロテインホスファターゼが減少することにより GluA1 のリン酸化が亢進することが考えられる。

次に、社会性における AMPA 受容体の関与について検討したところ、AMPA の投与により social novelty preference は低下し、その低下は NBQX の併用によって抑制された。このことから、AMPA 受容体の刺激は social novelty preference を低下させることが示唆された。さらに、STZ 誘発糖尿病マウスに NBQX を投与したところ、social novelty preference の低下が改善した。したがって、糖尿病ではグルタミン酸神経機能が亢進することによって社会性が低下することが示唆された。

さらに、社会性に対する NPY およびグルタミン酸神経機能の関連を検討したところ、NPY 13-36 の投与による social novelty preference の低下は NBQX の併用によって抑制されたが、AMPA による social novelty preference の低下は BIIE 0246 の併用によって抑制されなかった。これらのことから、NPY Y₂ 受容体の刺激は、グルタミン酸神経機能の亢進を介して social novelty preference を低下させることが示唆された。これまでに、海馬において NPY Y₂ 受容体の刺激はグルタミン酸の遊離を抑制することが報告されている^{41,42)}。一方、本研究の結果から NPY Y₂ 受容体の刺激によりグルタミン酸神経が活性化することが示唆されるため、NPY Y₂ 受容体によるグルタミン酸神経の抑制により social novelty preference が制御されるとは考えにくい。その一方で、扁桃体では NPY Y₂ 受容体の刺激によって GABA 遊離が抑制されることが報告されている^{43,44)}。また、扁桃体から腹側海馬へ投射するグルタミン酸神経を活性化すると社会性が低下することから¹⁰⁾、扁桃体の NPY Y₂ 受容体の刺

激によって GABA 遊離が抑制され、腹側海馬へ投射するグルタミン酸神経の活性が亢進することによって social novelty preference が低下する可能性が考えられる。

本研究によって、STZ 誘発糖尿病マウスでは sociability に変化は認められなかったが、social novelty preference が低下することが示唆された。このことから、sociability と social novelty preference を調節するメカニズムは異なることが考えられる。実際に、腹側被蓋野のドーパミン神経を抑制すると social novelty preference のみが低下することが報告されている⁴⁵⁾。また、AMPA 受容体の発現を調節する neuregulin 1 が過剰発現または欠損したマウスでも、social novelty preference のみが低下することが報告されている^{46,47)}。一方、海馬の NMDA 受容体を欠損させたマウスでは、sociability のみが低下することが報告されている⁴⁸⁾。このように、sociability と social novelty preference に関与する神経は異なることが示されていることから、糖尿病における NPY やグルタミン酸神経機能の亢進は social novelty preference に特異的に影響を及ぼすものと考えられる。

糖尿病には 1 型と 2 型に大別され、そのどちらにおいても精神疾患の罹患率が健常者と比べて高いことが指摘されている^{2,49)}。また、本研究では 1 型糖尿病モデルを用いたが、2 型糖尿病モデルでも視床下部の NPY mRNA 発現量が増加することが報告されていることから⁵⁰⁾、2 型糖尿病においても NPY やグルタミン酸神経機能が増加することによって、社会性が低下する可能性が考えられる。この点については、今後さらなる検討が必要である。

以上の本研究の結果、糖尿病では視床下部の NPY 神経の活性が亢進し、NPY Y₂ 受容体を介してグルタミン酸神経機能を亢進することによって、social novelty preference が低下することが示唆された。

第 2 章

糖尿病マウスに認められる社会性の低下に対する
腹側海馬および扁桃体の関与

緒言

第1章より、糖尿病では視床下部の NPY 神経の活性が亢進し、NPY Y₂ 受容体の刺激を介して、グルタミン酸神経機能を亢進することによって social novelty preference が低下することを示唆する結果を得た。

社会性には扁桃体および腹側海馬のグルタミン酸神経機能が関与すると考えられる。これまでに、腹側海馬に投射するグルタミン酸神経を活性化すると社会性が低下し、その低下は AMPA 受容体拮抗薬で抑制されることが報告されている¹⁰⁾。また、扁桃体に投射するグルタミン酸神経を活性化しても社会性が低下することが報告されている⁵¹⁾。さらに、当研究室では扁桃体基底外側核の AMPA 受容体を拮抗すると STZ 誘発糖尿病マウスにおける恐怖記憶の増強が抑制されることを報告している⁷⁾。したがって、糖尿病では扁桃体および腹側海馬の AMPA 受容体を介して社会性が低下する可能性が考えられる。

一方、NPY 神経は扁桃体を含む脳内に広く投射することが報告されている²¹⁾。また、海馬や扁桃体には NPY Y₂ 受容体が局在することが示されている⁵²⁾。さらには、第1章において、NPY Y₂ 受容体の刺激によりグルタミン酸神経機能が亢進することを示唆する結果を得ていることから、糖尿病では扁桃体および腹側海馬の NPY Y₂ 受容体を介して社会性が変化する可能性が考えられる。

そこで第2章では、糖尿病による social novelty preference の低下に腹側海馬および扁桃体の AMPA および NPY Y₂ 受容体がどのような役割を果たすか検討した。

実験材料および実験方法

実験動物

実験には ICR 系雄性マウス (4-7 週齢: 18-39 g; 東京実験動物) を用い、第 1 章と同様の条件で飼育した。また、糖尿病マウスの作製も第 1 章と同様の方法で行った。なお、本研究を遂行するにあたり、星薬科大学動物実験指針に従い、星薬科大学動物実験委員会の承認を得たうえで、動物に対する倫理面を十分に考慮して全ての実験を行った。

使用薬物

実験には、NPY Y₂ 受容体拮抗薬の BIIE 0246 ((N-[(1S)-4-[(aminoiminomethyl)amino]-1-[[[2-(3,5-dioxo-1,2-diphenyl-1,2,4-triazolidin-4-yl)ethyl]amino]carbonyl]butyl]-1-[2-[4-(6,11-dihydro-6-oxo-5H-dibenz[b,e]azepin-11-yl)-1-piperazinyl]-2-oxoethyl]-cyclopentaneacetamide; Tocris Biosciences)、および AMPA 受容体拮抗薬の NBQX (1,2,3,4-tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxo-benzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide; Sigma-Aldrich) を使用した。薬物は生理食塩液に溶解した。

ガイドカニューレ植立手術

過去の報告に従って行った⁵³⁾。マウスを sodium pentobarbital (60 mg/kg, i.p.; Sigma-Aldrich) 麻酔下で、脳定位固定装置 (成茂科学) に固定した後、アトラス⁵⁴⁾ に従い、ガイドカニューレ (腹側海馬: EKC-0502A; 扁桃体基底外側核: EKC-0504A; バイオリサーチセンター) を両側の腹側海馬 (耳間線より、前方 0.40 mm、垂直方向 4.00 mm、矢状面より側方 3.25 mm) または扁桃体基底外側核 (耳間線より、前方 2.34 mm、垂直方向 2.20 mm、矢状面より側方 2.75 mm) に植立した。投与部位の損傷を最小限に留めるため、目的とする部位の 1.2 mm 上方にガイドカニューレの先端が来るようにした。ガイドカニューレは、維持用ステンレス製ビスと共に歯科

用セメントで固定した。手術から3日間以上の回復期間をおいた後、実験を行った。

脳内微量投与

無麻酔下でマウスを保定し、閉鎖用ネジを外し、hamilton microsyringe に接続したニードル (直径: 0.27 mm; Hamilton) をガイドカニューレの先端から 1.2 mm の位置に挿入した。0.2 μ l の薬液を 20 秒間かけて投与し、薬液の逆流を防止するためさらに 20 秒間留置してから、閉鎖用ネジを装着した。

Social interaction test

第1章と同様の方法で行った。

NPY 量の測定

腹側海馬および扁桃体は分画後、液体窒素で凍結し、使用するまで -80 °C で保存した。脳サンプルは Bio-Plex Cell Lysis Kit (Bio-Rad Laboratories) を用いてホモジナイズし、4,500 \times g、4 °C で 4 分間遠心分離し、上清をサンプルとした。サンプル中の NPY 量の測定は competitive ELISA kit (Phoenix Pharmaceuticals) を用いてプロトコルに従って行った。

統計処理

第1章と同様の方法で行った。

結果

腹側海馬の AMPA 受容体の拮抗が糖尿病における social novelty preference の低下に与える影響

腹側海馬のグルタミン酸神経機能が糖尿病における social novelty preference の低下に関与するか、AMPA 受容体拮抗薬を用いて検討した。腹側海馬におけるガイドカニューレの植立位置は、Fig. 2-1A, B に示した通りである。Session 1 (habituation) において対照マウスおよび STZ 誘発糖尿病マウスにおける左右の区画の空のチャンバーへの接触時間に差はなかった (Fig. 2-1C)。また、NBQX (800 ng/side) を腹側海馬に投与したところ、session 2 (sociability) において対照マウスおよび STZ 誘発糖尿病マウスにおける新奇マウスへの接触時間に変化は見られなかった (Fig. 2-1D)。一方、session 3 (social novelty preference) において、対照マウスでは NBQX (800 ng/side) を腹側海馬に投与しても新奇マウスへの接触時間は影響を受けなかったが、NBQX (800 ng/side) を腹側海馬に投与した STZ 誘発糖尿病マウスでは新奇マウスへの接触時間の減少が改善した (two-way ANOVA, $F_{(1,22)} = 5.44$, $p < 0.01$; Fig. 2-1E)。

扁桃体基底外側核の AMPA 受容体の拮抗が糖尿病における social novelty preference の低下に与える影響

糖尿病における social novelty preference の低下に扁桃体基底外側核のグルタミン酸神経機能が関与するか検討した。扁桃体基底外側核におけるガイドカニューレの植立位置は、Fig. 2-2A, B に示した通りである。Session 1 (habituation) における左右の区画の空のチャンバーへの接触時間は対照マウスおよび STZ 誘発糖尿病マウスで差は認められなかった (Fig. 2-2C)。NBQX (800 ng/side) を扁桃体基底外側核に投与したところ、session 2 (sociability) において対照マウスおよび STZ 誘発糖尿病マウスにおいて新奇マウスへの接触時間に変化は見られなかった (Fig. 2-2D)。一方、

session 3 (social novelty preference) において、NBQX (800 ng/side) を対照マウスの扁桃体基底外側核に投与しても新奇マウスへの接触時間は影響を受けなかったが、STZ 誘発糖尿病マウスにおける新奇マウスへの接触時間の減少は NBQX (800 ng/side) を扁桃体基底外側核に投与することにより改善した (two-way ANOVA, $F_{(1,28)} = 6.29, p < 0.01$; Fig. 2-2E)。

糖尿病における腹側海馬および扁桃体の NPY 量の変化

糖尿病において腹側海馬および扁桃体の NPY 量が増加するか検討した。Table 2-1 に示した通り、STZ 誘発糖尿病マウスの扁桃体では対照マウスと比べて有意な NPY 量の増加が見られた。一方、腹側海馬では STZ 誘発糖尿病マウスの NPY 量と対照マウスの NPY 量に有意な差は見られなかった。

腹側海馬の NPY Y₂ 受容体の拮抗が糖尿病における social novelty preference の低下に与える影響

腹側海馬の NPY 機能が糖尿病における social novelty preference の低下に関与するか、NPY Y₂ 受容体拮抗薬を用いて検討した。腹側海馬におけるガイドカニューレの植立位置は、Fig. 2-3A, B に示した通りである。Session 1 (habituation) において対照マウスおよび STZ 誘発糖尿病マウスにおける左右の区画の空のチャンバーへの接触時間に差はなかった (Fig. 2-3C)。BIIE 0246 (400 ng/side) を腹側海馬に投与したところ、session 2 (sociability) において対照マウスおよび STZ 誘発糖尿病マウスにおける新奇マウスへの接触時間に変化は見られなかった (Fig. 2-3D)。また、session 3 (social novelty preference) においても、対照マウスでは BIIE 0246 (400 ng/side) を腹側海馬に投与しても新奇マウスへの接触時間は影響を受けず、STZ 誘発糖尿病マウスにおける新奇マウスへの接触時間の低下も BIIE 0246 (400 ng/side) の腹側海馬への投与により影響を受けなかった (Fig. 2-3E)。

扁桃体基底外側核の NPY Y₂ 受容体の拮抗が糖尿病における social novelty preference の低下に与える影響

糖尿病における social novelty preference の低下に扁桃体基底外側核の NPY 機能が関与するか検討した。扁桃体基底外側核におけるガイドカニューレの植立位置は、Fig. 2-4A, B に示した通りである。Session 1 (habituation) において左右の区画の空のチャンバーへの接触時間は対照マウスおよび STZ 誘発糖尿病マウスにおいて差はなかった (Fig. 2-4C)。BIIE 0246 (400 ng/side) を扁桃体基底外側核に投与したところ、session 2 (sociability) において対照マウスおよび STZ 誘発糖尿病マウスでは新奇マウスへの接触時間に変化は見られなかった (Fig. 2-4D)。一方、session 3 (social novelty preference) では、BIIE 0246 (400 ng/side) を対照マウスの扁桃体基底外側核に投与しても新奇マウスへの接触時間は影響を受けなかったが、BIIE 0246 (400 ng/side) を扁桃体基底外側核に投与した STZ 誘発糖尿病マウスでは新奇マウスへの接触時間の減少が改善した (two-way ANOVA, $F_{(1,26)} = 4.76$, $p < 0.01$; Fig. 2-4E)。

Table 2-1. NPY levels in ventral hippocampus (vHC) and amygdala in non-diabetic and STZ-induced diabetic mice.

	NPY (ng/mg tissue)		
	Non-diabetes	Diabetes	p
vHC	6.21 ± 0.27	6.97 ± 0.45	0.166
Amygdala	10.44 ± 0.57	13.06 ± 1.05	0.047

Data are expressed as mean ± SEM of 8 mice per group.

Ueda et al. Behav Brain Res より引用

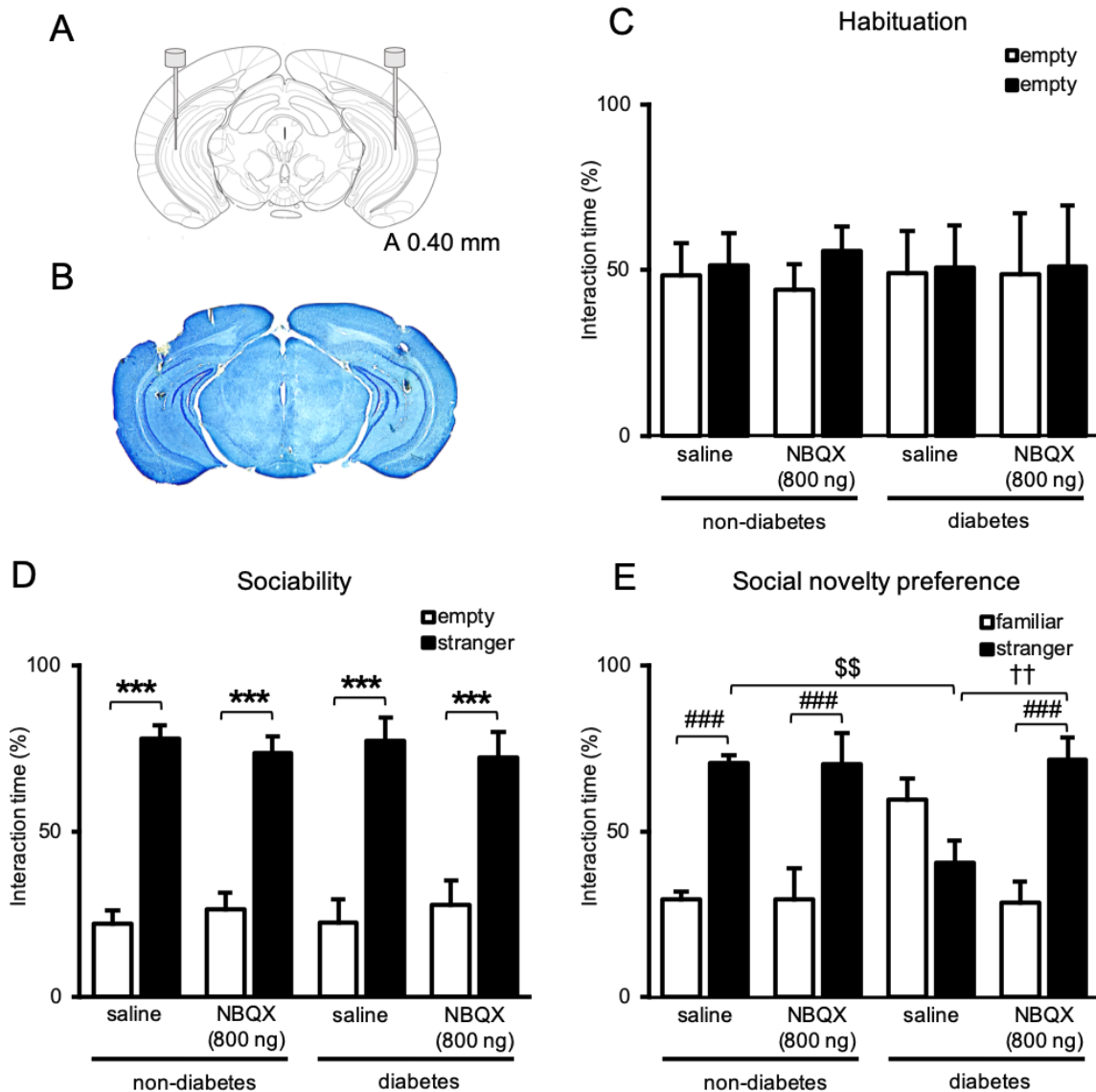


Figure 2-1. Effect of the AMPA receptor antagonist NBQX injected into the ventral hippocampus (vHC) on sociability and social novelty preference in diabetic mice. (A) Schematic illustration of injection sites in vHC according to the atlas of Paxinos and Franklin (2001). (B) Representative brain section indicating injection sites in vHC. (C) Interaction time with empty cages in session 1 (habituation) in non-diabetic and STZ-induced diabetic mice before they received either saline or NBQX into the vHC. (D) Effect of NBQX injected into vHC on interaction time with the empty cage and the cage containing a stranger mouse in session 2 (sociability) in non-diabetic and STZ-induced diabetic mice. NBQX (800 ng/side) was injected 30 min before measurements. (E) Effect of NBQX injected into vHC on interaction time with the cage containing the familiar mouse and the cage containing a new stranger mouse in session 3 (social novelty preference) in non-diabetic and STZ-induced diabetic mice. Each column represents the mean \pm S.E.M. Non-diabetes + saline: $n = 6$; non-diabetes + NBQX: $n = 6$; diabetes + saline: $n = 7$; diabetes + NBQX: $n = 7$. *** $p < 0.001$ vs. respective interaction time with the empty cage; ### $p < 0.001$ vs. respective interaction time with the familiar mouse; \$\$ $p < 0.01$ vs. respective interaction time in saline-treated non-diabetic mice; †† $p < 0.01$ vs. respective interaction time in saline-treated diabetic mice.

Ueda et al. Behav Brain Res より引用

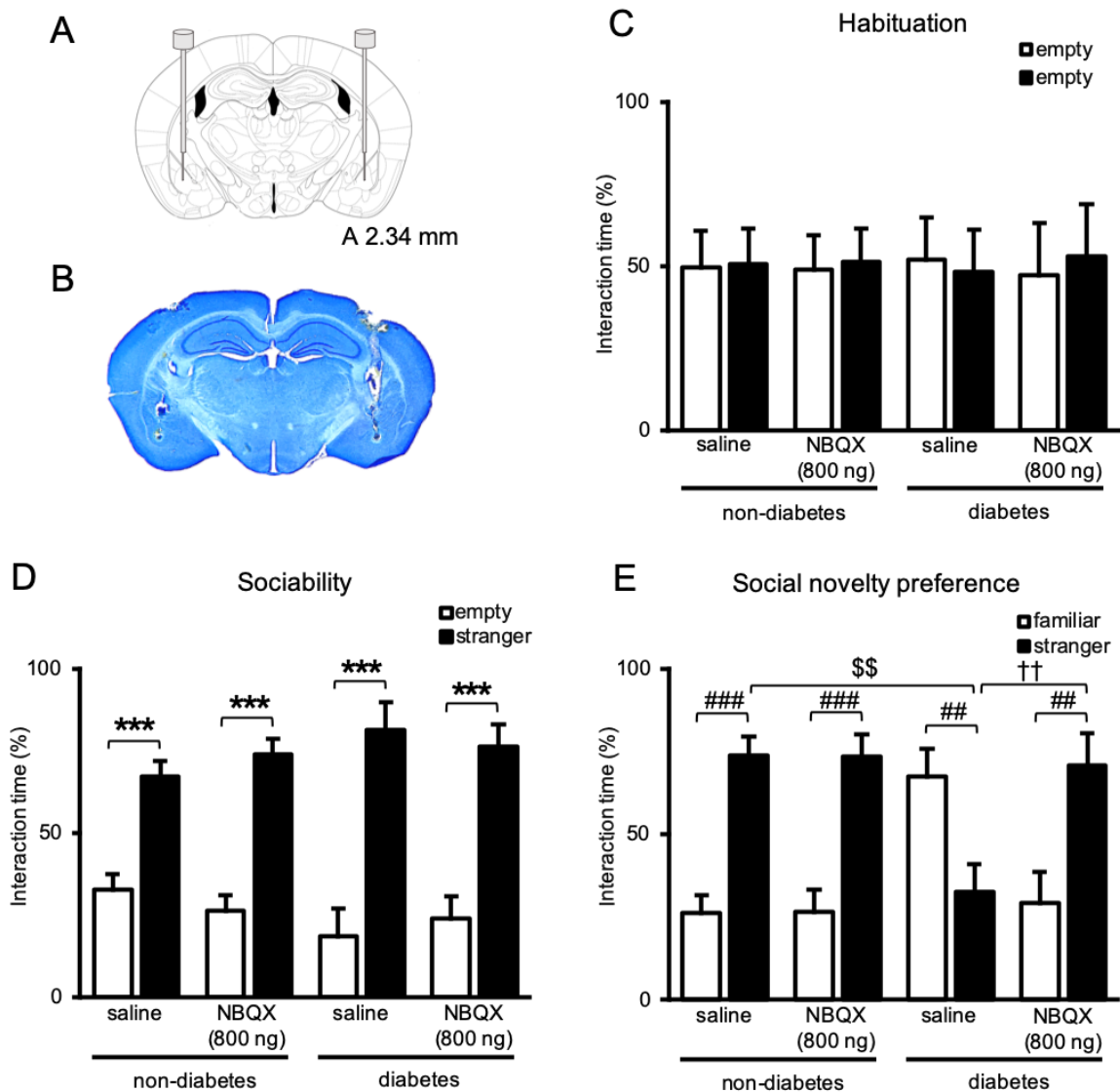
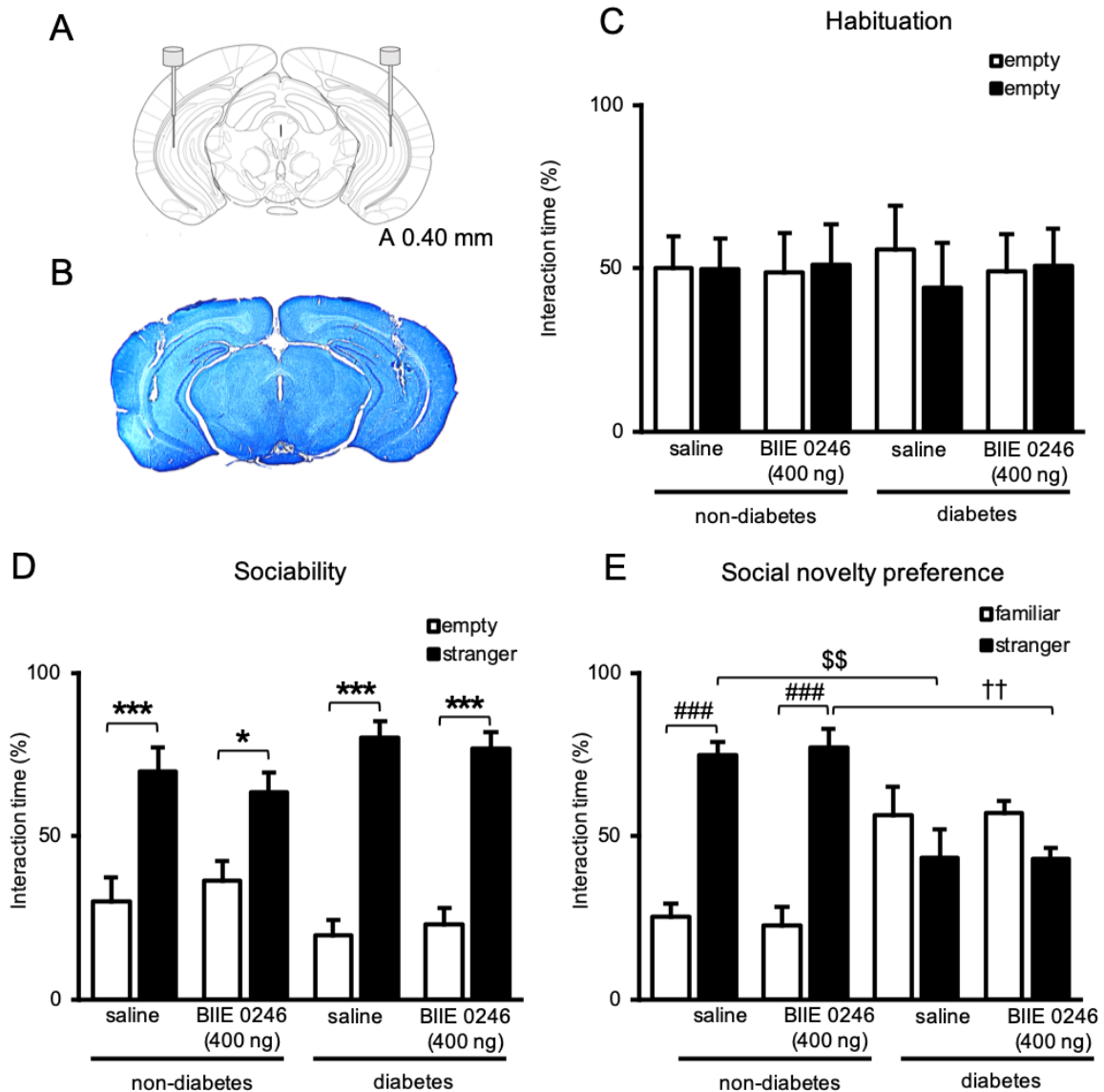


Figure 2-2. Effect of the AMPA receptor antagonist NBQX injected into the basolateral amygdala (BLA) on sociability and social novelty preference in diabetic mice. (A) Schematic illustration of injection sites in BLA according to the atlas of Paxinos and Franklin (2001). (B) Representative brain section indicating injection sites in BLA. (C) Interaction time with empty cages in session 1 (habituation) in non-diabetic and STZ-induced diabetic mice before they received either saline or NBQX into the BLA. (D) Effect of NBQX injected into BLA on interaction time with the empty cage and the cage containing a stranger mouse in session 2 (sociability) in non-diabetic and STZ-induced diabetic mice. NBQX (800 ng/side) was injected 30 min before measurements. (E) Effect of NBQX injected into BLA on interaction time with the cage containing the familiar mouse and the cage containing a new stranger mouse in session 3 (social novelty preference) in non-diabetic and STZ-induced diabetic mice. Each column represents the mean \pm S.E.M. Non-diabetes + saline: $n = 8$; non-diabetes + NBQX: $n = 8$; diabetes + saline: $n = 8$; diabetes + NBQX: $n = 8$. *** $p < 0.001$ vs. respective interaction time with the empty cage; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. respective interaction time with the familiar mouse; \$\$ $p < 0.01$ vs. respective interaction time in saline-treated non-diabetic mice; †† $p < 0.01$ vs. respective interaction time in saline-treated diabetic mice.

Ueda et al. Behav Brain Res より引用



Figures 2-3. Effect of the NPY Y_2 receptor antagonist BIIE 0246 injected into the ventral hippocampus (vHC) on sociability and social novelty preference in diabetic mice. (A) Schematic illustration of injection sites in vHC according to the atlas of Paxinos and Franklin (2001). (B) Representative brain section indicating injection sites in vHC. (C) Interaction time with empty cages in session 1 (habituation) in non-diabetic and STZ-induced diabetic mice before they received either saline or BIIE 0246 into the vHC. (D) Effect of BIIE 0246 injected into vHC on interaction time with the empty cage and the cage containing a stranger mouse in session 2 (sociability) in non-diabetic and STZ-induced diabetic mice. BIIE 0246 (400 ng/side) was injected 30 min before measurements. (E) Effect of BIIE 0246 injected into vHC on interaction time with the cage containing the familiar mouse and the cage containing a new stranger mouse in session 3 (social novelty preference) in non-diabetic and STZ-induced diabetic mice. Each column represents the mean \pm S.E.M. Non-diabetes + saline: $n = 6$; non-diabetes + BIIE 0246: $n = 6$; diabetes + saline: $n = 6$; diabetes + BIIE 0246: $n = 6$. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. respective interaction time with the empty cage; ### $p < 0.001$ vs. respective interaction time with the familiar mouse; $^{ss}p < 0.01$ vs. respective interaction time in saline-treated non-diabetic mice; $^{††}p < 0.01$ vs. respective interaction time in BIIE 0246-treated non-diabetic mice.

Ueda et al. Behav Brain Res より引用

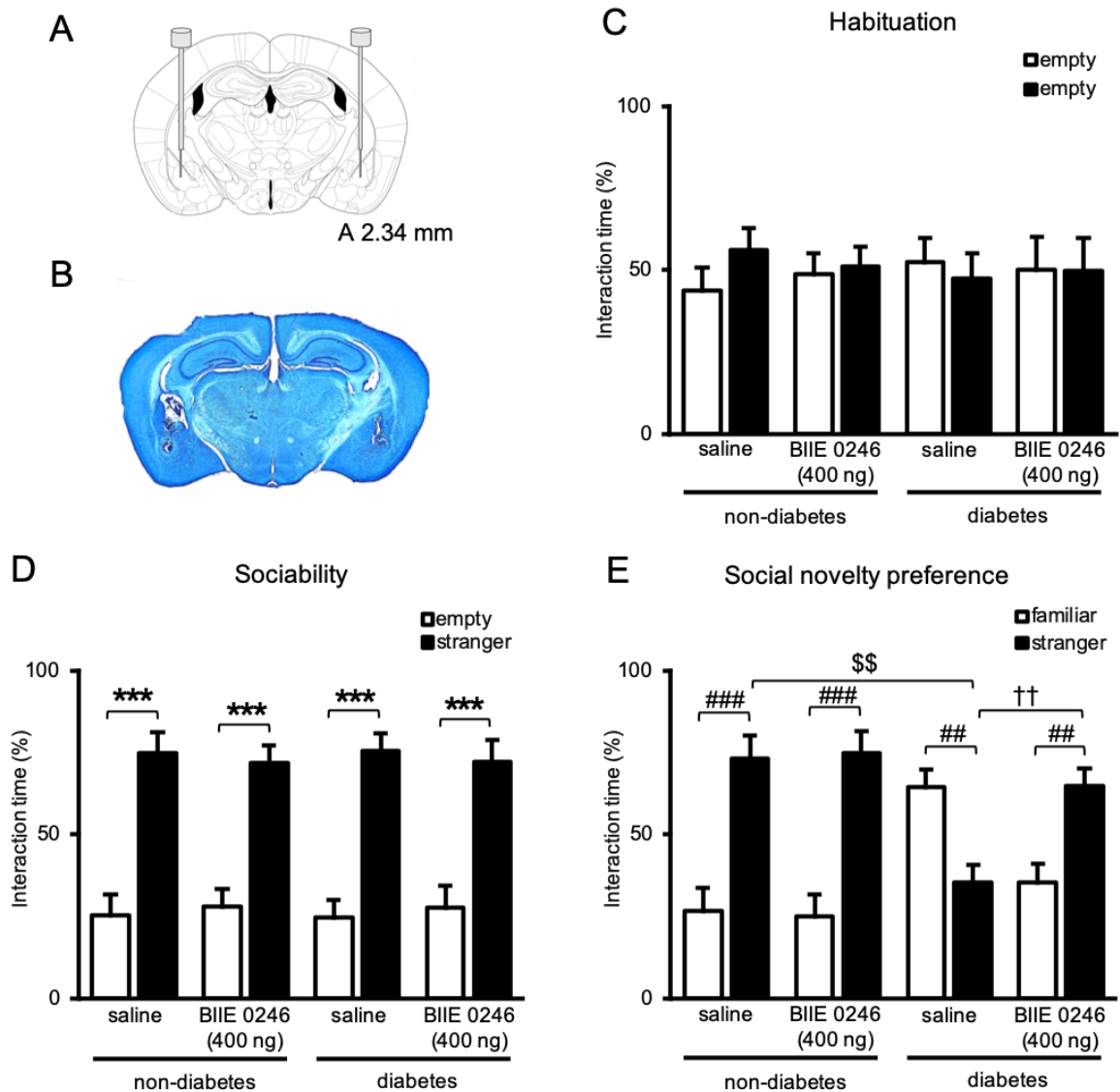


Figure 2-4. Effect of the NPY Y_2 receptor antagonist BIIE 0246 injected into the basolateral amygdala (BLA) on sociability and social novelty preference in diabetic mice. (A) Schematic illustration of injection sites in BLA according to the atlas of Paxinos and Franklin (2001). (B) Representative brain section indicating injection sites in BLA. (C) Interaction time with empty cages in session 1 (habituation) in non-diabetic and STZ-induced diabetic mice before they received either saline or BIIE 0246 into the BLA. (D) Effect of BIIE 0246 injected into BLA on interaction time with the empty cage and the cage with a stranger mouse in session 2 (sociability) in non-diabetic and STZ-induced diabetic mice. BIIE 0246 (400 ng/side) was injected 30 min before measurements. (E) Effect of BIIE 0246 injected into BLA on interaction time with the cage containing the familiar mouse and the cage containing a new stranger mouse in session 3 (social novelty preference) in non-diabetic and STZ-induced diabetic mice. Each column represents the mean \pm S.E.M. Non-diabetes + saline: $n = 8$; non-diabetes + BIIE 0246: $n = 8$; diabetes + saline: $n = 7$; diabetes + BIIE 0246: $n = 7$. *** $p < 0.001$ vs. respective interaction time with the empty cage; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. respective interaction time with the familiar mouse; \$\$ $p < 0.01$ vs. respective interaction time in saline-treated non-diabetic mice; †† $p < 0.01$ vs. respective interaction time in saline-treated diabetic mice.

Ueda et al. Behav Brain Res より引用

考察

本章では、糖尿病における social novelty preference の低下に対する腹側海馬および扁桃体の NPY Y₂ 受容体および AMPA 受容体の関与について検討した。

まず、腹側海馬に NBQX を投与したところ、対照マウスでは social novelty preference に変化は認められなかったが、STZ 誘発糖尿病マウスでは social novelty preference の低下が改善した。これまでに、扁桃体から腹側海馬へ投射するグルタミン酸神経を活性化すると社会性が低下し、その低下は腹側海馬に AMPA 受容体拮抗薬を投与することにより抑制されることが報告されている¹⁰⁾。これらのことから、糖尿病では腹側海馬に入力するグルタミン酸神経が活性化し、social novelty preference が低下することが考えられる。

また、STZ 誘発糖尿病マウスの扁桃体基底外側核への NBQX の投与によっても social novelty preference の低下が改善した。当研究室では STZ 誘発糖尿病マウスにおいて認められる恐怖記憶の増強が扁桃体基底外側核への NBQX の投与によって抑制されることを報告している⁸⁾。これらのことから、糖尿病マウスにおいて扁桃体のグルタミン酸神経機能は亢進し、AMPA 受容体を介して social novelty preference の低下や恐怖記憶の増強をひき起こすことが考えられる。また、扁桃体から腹側海馬へ投射するグルタミン酸神経の活性化は社会性を低下させることから¹⁰⁾、扁桃体の AMPA 受容体の刺激は扁桃体から腹側海馬へ投射するグルタミン酸神経を活性化させることによって social novelty preference を低下させる可能性が考えられる。

次に、腹側海馬および扁桃体の NPY 量を測定したところ、STZ 誘発糖尿病マウスの扁桃体において NPY 量の増加が認められた。第 1 章において、NPY mRNA 量は STZ 誘発糖尿病マウスの腹側海馬および扁桃体では変化がなかったが、視床下部では増加した。また、視床下部から扁桃体に NPY 神経が投射することが報告されていることから²¹⁾、糖尿病では視床下部から扁桃体へ投射する NPY 神経の活性が亢進していることが示唆された。

さらに、腹側海馬と扁桃体の NPY Y₂ 受容体が STZ 誘発糖尿病マウスにおける social novelty preference の低下に関与するか検討したところ、腹側海馬への BIIE 0246 の投与では social novelty preference に変化は認められなかったが、扁桃体基底外側核への BIIE 0246 の投与では STZ 誘発糖尿病マウスにおける social novelty preference の低下が改善した。このことから、糖尿病における social novelty preference の低下には扁桃体基底外側核の NPY Y₂ 受容体に関与することが示された。これまでに、前頭前皮質から扁桃体へ投射するグルタミン酸神経が活性化すると社会性が低下することが報告されている⁵¹⁾。さらに、扁桃体の NPY Y₂ 受容体の刺激は GABA 遊離を抑制することが報告されていることから⁴⁴⁾、糖尿病では扁桃体へ投射する NPY 神経が活性化し、これが NPY Y₂ 受容体を介して GABA 遊離を抑制し、その結果として扁桃体のグルタミン酸神経が活性化することで social novelty preference が低下することが考えられる。

以上の本研究の結果、糖尿病では腹側海馬および扁桃体のグルタミン酸神経機能が亢進し、これが AMPA 受容体を刺激することで social novelty preference が低下することが示唆された。さらに、糖尿病では扁桃体の NPY 神経機能が亢進することで NPY Y₂ 受容体を介して social novelty preference が低下することが示唆された。

総括

本研究では、糖尿病における社会性の低下およびそのメカニズムを明らかにすることを目的とし、糖尿病における社会性の低下に NPY およびグルタミン酸神経機能がどのような役割を果たすか検討したところ、以下の結果を得た。

第 1 章:

第 1 章では、糖尿病における社会性が低下するか明らかにし、その変化に NPY およびグルタミン酸神経が関与するか検討した。その結果、STZ 誘発糖尿病マウスでは social novelty preference が低下することが明らかになった。また、STZ 誘発糖尿病マウスにおける視床下部の NPY mRNA 発現量は増加した。社会性における NPY の役割を検討したところ、NPY 13-36 を脳室内投与すると social novelty preference が低下し、その低下は BIIE 0246 を併用することで抑制された。さらに、STZ 誘発糖尿病マウスに BIIE 0246 を脳室内投与すると social novelty preference の低下が改善した。一方、STZ 誘発糖尿病マウスの腹側海馬の GluA1 mRNA 量は増加し、pGluA1 のタンパク量も増加した。また、AMPA の脳室内投与は social novelty preference を低下させ、その低下は NBQX の併用で抑制された。さらに、NPY 13-36 による social novelty preference の低下も NBQX により抑制されたが、AMPA による social novelty preference の低下は BIIE 0246 の併用では抑制されなかった。同様に、STZ 誘発糖尿病マウスにおける social novelty preference の低下も NBQX の脳室内投与により改善した。以上の結果より、糖尿病では視床下部の NPY 神経の活性が亢進し、NPY Y₂ 受容体を介してグルタミン酸神経機能が亢進することによって social novelty preference が低下することが示唆された。

第 2 章:

第 2 章では、糖尿病における social novelty preference の低下に対する腹側海馬お

よび扁桃体の NPY Y₂ 受容体および AMPA 受容体の関与について検討した。腹側海馬または扁桃体基底外側核に NBQX を投与したところ、どちらへの投与によっても STZ 誘発糖尿病マウスにおける social novelty preference の低下が改善した。また、STZ 誘発糖尿病マウスの腹側海馬では NPY 量に変化は認められなかったが、扁桃体における NPY 量は増加した。さらに、腹側海馬に BIIE 0246 を投与しても STZ 誘発糖尿病マウスにおける social novelty preference の低下に変化は認められなかったが、扁桃体基底外側核に BIIE 0246 を投与した場合には、STZ 誘発糖尿病マウスにおける social novelty preference の低下が改善した。以上の結果より、糖尿病では腹側海馬および扁桃体のグルタミン酸神経機能が亢進し、これが AMPA 受容体を刺激することで social novelty preference が低下することが示唆された。さらに、糖尿病では扁桃体の NPY 神経機能が亢進することで NPY Y₂ 受容体を介して social novelty preference が低下することが示唆された。

結論:

本研究の結果より、糖尿病では社会性が低下し、その低下に NPY 神経が重要な役割を果たすことが明らかになった。また、糖尿病における NPY 神経の活性亢進は、扁桃体の NPY Y₂ 受容体の刺激を介して扁桃体および腹側海馬のグルタミン酸神経を活性化することで、social novelty preference を低下させることが示唆された。

糖尿病における精神疾患の発症は、患者の QOL を低下させ、糖尿病治療の服薬アドヒアランスを低下させる。本研究のような研究がこの先発展し、糖尿病における精神疾患の発症メカニズムが明らかになることで、将来的には糖尿病による精神疾患の予防法や治療法の確立に貢献できると考える。

論文目録

Daiki Ueda, Naomi Yonemochi, Tomohiro Kamata, Masahiro Shibasaki, Junzo Kamei, John L. Waddington, Hiroko Ikeda. Increase in neuropeptide Y activity impairs social behaviour in association with glutamatergic dysregulation in diabetic mice. *Br J Pharmacol* **178**, 726-740 (2020): 第 1 章

Daiki Ueda, Naomi Yonemochi, Tomohiro Kamata, Junzo Kamei, John L. Waddington, Hiroko Ikeda. Neuropeptide Y and glutamatergic mechanism in the amygdala and ventral hippocampus differentially mediate impaired social behavior in diabetic mice. *Behav Brain Res*, received: 第 2 章

謝辞

本研究を進めるにあたり、日々の研究に対する姿勢から遂行、論文の作成に至るまで終始多大なる御指導、御鞭撻を賜りました薬物治療学研究室教授、池田弘子先生に深く感謝致しますと共に、謹んで厚く御礼申し上げます。

本研究に際し、基礎的な実験手技を含む研究に関する様々な御指導と温かい御助言、御協力を賜りました薬物治療学研究室助手、米持奈央美先生に感謝申し上げます。

また、本研究を進めるにあたり、御協力と様々なご助言を賜りました薬物治療学研究室講師、芝崎真裕先生に感謝申し上げます。

本研究に際し、日々の御協力と力強い言葉を賜りました生体分子薬理学研究室教授、亀井淳三先生に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行に当たり、数々の具体的なご助言を賜り、有益な議論と後押しをしてくださいました Royal College of Surgeons in Ireland の Molecular and Cellular Therapeutics 教授、John L. Waddington 先生に厚く御礼申し上げます。

さらに、本研究の遂行に対して、日夜多大なる献身的な御協力を頂きました、薬物治療学研究室の皆様へ深く感謝致します。

本研究のために御協力頂きました動物センターの皆様へ深く感謝致します。また、本研究の遂行に当たり、犠牲となった多くの命に哀悼の意を表し、心より御冥福をお祈り致します。

最後に、今日まで温かい目で見守り、支援してくださいました家族、友人そして先生方に心より感謝致します。

引用文献

- 1) Anderson RJ, Freedland KE, Clouse RE, Lustman PJ. The prevalence of comorbid depression in adults with diabetes. *Diabetes Care* **24**, 1069-1078 (2001)
- 2) Anderson RJ, Grigsby AB, Freedland KE, de Groot M, McGill JB, Clouse RE, Lustman PJ. Anxiety and poor glycemic control: a meta-analytic review of the literature. *Int J of Psychiatry Med* **32**, 235-247 (2002)
- 3) Lin E, Katon W, VonKorff M, Rutter C, Simon G, Oliver M, Ciechanowski P, Ludman EJ, Bush T, Young B. Relationship of depression and diabetes self-care, medication adherence, and preventive care. *Diabetes Care* **27**, 2154-2160 (2004)
- 4) Werner-Seidler A, Afzali MH, Chapman C, Sunderland M, Slade T. The relationship between social support networks and depression in the 2007 National Survey of Mental Health and Well-being. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol* **52**, 1463-1473 (2017)
- 5) Namvarpour Z, Amini A, Nasehi M, Zarrindast MR. The effects of early exposure to thimerosal on impairments of social and stereotyped behaviors and the number of purkinje cells of cerebellum in rats. *J Appl Biotechnol Rep* **5**, 105-111 (2018)
- 6) Jimenez JC, Su K, Goldberg AR, Luna VM, Biane JS, Ordek G, Zhou P, Ong SK, Wright MA, Zweifel L, Paninski L, Hen R, Kheirbek MA. Anxiety cells in a hippocampal-hypothalamic circuit. *Neuron* **97**, 670-683 (2018)
- 7) Becker A, Grecksch G, Bernstein H, Hollt V, Bogerts B. Social behaviour in rats lesioned with ibotenic acid in the hippocampus: quantitative and qualitative analysis. *Psychopharmacology (Berl)* **144**, 333-338 (1999)
- 8) Ikeda H, Ikegami M, Kai M, Kamei J. Cannabinoid functions in the amygdala contribute to conditioned fear memory in streptozotocin-induced diabetic mice: Interaction with glutamatergic functions. *Exp Neurol* **269**, 233-241 (2015)

- 9) Wang Y, Zhao S, Liu X, Fu O. Effects of the medial or basolateral amygdala upon social anxiety and social recognition in mice. *Turk J Med Sci* **44**, 353-359 (2014)
- 10) Felix-Ortiz AC, Tye KM. Amygdala inputs to the ventral hippocampus bidirectionally modulate social behavior. *J Neurosci* **34**, 586-595 (2014)
- 11) Thorens B. Brain glucose sensing and neural regulation of insulin and glucagon secretion. *Diabetes Obes Metab* **13**, 82-88 (2011)
- 12) Williams KW, Elmquist JK. Lighting up the hypothalamus: coordinated control of feeding behavior. *Nat Neurosci* **14**, 277-278 (2011)
- 13) Clark JT, Kalra PS, Crowley WR, Kalra SP. Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology* **115**, 427-429 (1984)
- 14) Sahu A, Kalra PS, Kalra SP. Food deprivation and ingestion induce reciprocal changes in neuropeptide Y concentrations in the paraventricular nucleus. *Peptides* **9**, 83-86 (1988)
- 15) Heilig M, Söderplam B, Engel A, Widerlöv E. Centrally administered neuropeptide Y (NPY) produces anxiolytic-like effects in animal anxiety models. *Psychopharmacology (Berl)* **98**, 524-529 (1989)
- 16) Redrobe JP, Dumont Y, Fournier A, Quirion R. The neuropeptide Y (NPY) Y₁ receptor subtype mediates NPY-induced antidepressant-like activity in the mouse forced swimming test. *Neuropsychopharmacology* **26**, 615-624 (2002)
- 17) Sørensen G, Lindberg C, Wörtweon G, Bolwig TG, Woldbye PD. Differential roles for neuropeptide Y Y₁ and Y₅ receptors in anxiety and sedation. *J Neurosci Res* **77**, 723-729 (2004)
- 18) Bacchi F, Mathé AA, Jiménez P, Stasi L, Arban R, Gerrard P, Caberlotto L. Anxiolytic-like effect of the selective neuropeptide Y Y₂ receptor antagonist BIIE0246 in the elevated plus-maze. *Peptides* **27**, 3202-3207 (2006)
- 19) Helgeson VS, Reynolds KA, Escobar O, Siminerio L, Becker D. The role of friendship in the lives of male and female adolescents: Does diabetes make a difference? *J*

- Adolesc Health **40**, 36-43 (2007)
- 20) Helgeson VS, Lopez LC, Kamarck T. Peer relationships and diabetes: Retrospective and ecological momentary assessment approaches. *Health Psychol* **28**, 273-282 (2009)
 - 21) Zhang L, Hernandez-Sanchez D, Herzog H. Regulation of feeding-related behaviors by arcuate neuropeptide Y neurons. *Endocrinology* **160**, 1411-1420 (2019)
 - 22) Desai SJ, Borkar CD, Nakhate KT, Subhedar NK, Kokare D. Neuropeptide Y attenuates anxiety and depression like effects of cholecystinin-4 in mice. *Neuroscience* **277**, 818-830 (2014)
 - 23) Wang X, Ye P, Lv J, Zhou L, Qian Z, Huang Y, Mu Z, Wang X, Liu X, Wan Q, Yang Z, Wang F, Zou F. Expression changes of NMDA and AMPA receptor subunits in the hippocampus in rats with diabetes induced by streptozotocin coupled with memory impairment. *Neurochem Res* **44**, 978-993 (2019)
 - 24) Nadler JJ, Moy SS, Dold G, Trang D, Simmons N, Perez A, Young NB, Barbalo RP, Piven J, Magnuson TR, Crawley JN. Automated apparatus for quantitation of social approach behaviors in mice. *Genes Brain Behav* **3**, 303-314 (2004)
 - 25) Nakatani J, Tamada K, Hatanaka F, Ise S, Ohta H, Inoue K, Tomonaga S, Watanabe Y, Chung YJ, Banerjee R, Iwamoto K, Kato T, Okazawa M, Yamauchi K, Tanda K, Takao K, Miyakawa T, Bradley A, Takumi T. Abnormal behavior in a chromosome-engineered mouse model for human 15q11-13 duplication seen in autism. *Cell* **137**, 1235-1246 (2009)
 - 26) Nakajima M, Inui A, Asakawa A, Momose K, Ueno N, Teranishi A, Baba S, Kasuga M. Neuropeptide Y produces anxiety via Y2-type receptors. *Peptides* **19**, 359-363 (1998)
 - 27) Nakamura K, Kurasawa M, Shirane M. Impulsivity and AMPA receptors: aniracetam ameliorates impulsive behavior induced by a blockade of AMPA receptors in rats. *Brain Res* **862**, 266-269 (2000)

- 28) Santos VV, Santos DB, Lach G, Rodrigues A, Farina M, Lima T, Prediger RD. Neuropeptide Y (NPY) prevents depressive-like behavior, spatial memory deficits and oxidative stress following amyloid- β (A β (1-40)) administration in mice. *Behav Brain Res* **244**, 107-115 (2013)
- 29) Ikegami M, Ikeda H, Ohashi T, Kai M, Osada M, Kamei A, Kamei J. Olanzapine-induced hyperglycemia: Possible involvement of histaminergic, dopaminergic and adrenergic functions in the central nervous system. *Neuroendocrinology* **98**, 224-232 (2013)
- 30) Kamei J, Ohsawa M, Tsuji M, Takeda H, Matsumiya T. Modification of the effects of benzodiazepines on the expiratory behaviors of mice on a hole-board by diabetes. *Jpn J Pharmacol* **86**, 47-54 (2001)
- 31) Miyata S, Hirano S, Kamei J. Diabetes attenuates the antidepressant-like effect mediated by the activation of 5-HT_{1A} receptor in the mouse tail suspension test. *Neuropsychopharmacology* **29**, 461-469 (2004)
- 32) Ramanathan M, Jaiswal AK, Bhattacharya SK. Differential effects of diazepam on anxiety in streptozotocin induced diabetic and non-diabetic rats. *Psychopharmacology (Berl)* **135**, 361-367 (1998)
- 33) Ahmed A, Zeng G, Jiang D, Lin H, Azhar M, Farooq AD, Choudhary MI, Liu X, Wang Q. Time-dependent impairments in learning and memory in streptozotocin-induced hyperglycemic rats. *Metab Brain Dis* **34**, 1431-1446 (2019)
- 34) Farajpour R, Sadigh-Eteghad S, Ahmadian N, Farzipour M, Mahmoudi J, Majdi A. Chronic administration of *Rosa canina* hydro-alcoholic extract attenuates depressive-like behavior and recognition memory impairment in diabetic mice: a possible role of oxidative stress. *Med Princ Pract* **26**, 245-250 (2017)
- 35) Gustafson EL, Smith KE, Durkin MM, Walker MW, Gerald C, Weinshank R, Branchek TA. Distribution of the neuropeptide Y Y₂ receptor mRNA in rat central nervous

- system. *Mol Brain Res* **46**, 223-235 (1997)
- 36) Kishi T, Aschkenasi CJ, Chol BJ, Lopez ME, Lee CE, Liu H, Hollenberg AN, Friedman JM, Elmquist JK. Neuropeptide Y Y₁ receptor mRNA in rodent brain: distribution and colocalization with melanocortin-4 receptor. *J Comp Neurol* **482**, 217-243 (2005)
 - 37) Kim JW, Park K, Kang RJ, Gonzales ELT, Kin DG, Oh HA, Seung H, Ko MJ, Kwon KJ, Kim KC, Lee SH, Chung C, Shin CY. Pharmacological modulation of AMPA receptor rescues social impairments in animal models of autism. *Neuropsychopharmacology* **44**, 314-323 (2019)
 - 38) Dias RB, Ribeiro JA, Sebastião AM. Enhancement of AMPA currents and GluR1 membrane expression through PKA-coupled adenosine A_{2A} receptors. *Hippocampus* **22**, 276-291 (2012)
 - 39) Diering GH, Huganir RL. The AMPA receptor code of synaptic plasticity. *Neuron* **100**, 314-329 (2018)
 - 40) Liao MH, Xiang YC, Huang JY, Tao RR, Tian Y, Ye WF, Zhang GS, Lu YM, Ahmed MM, Liu ZR, Fukunaga K, Han F. The disturbance of hippocampal CaMKII/PKA/PKC phosphorylation in early experimental diabetes mellitus. *CNS Neurosci Ther* **19**, 329-336 (2013)
 - 41) Colmers WF, Lukowiak K, Pittman QJ. Neuropeptide Y action in the rat hippocampal slices: Site and mechanism of presynaptic inhibition. *J Neurosci* **8**, 3827-3837 (1988)
 - 42) Greber S, Schwarzer C, Sperk G. Neuropeptide Y inhibits potassium-stimulated glutamate release through Y₂ receptors in rat hippocampal slices in vitro. *Br J Pharmacol* **113**, 737-740 (1994)
 - 43) Kash TL, Winder DG. Neuropeptide Y and corticotropin-releasing factor bi-directionally modulate inhibitory synaptic transmission in the bed nucleus of the stria terminalis. *Neuropharmacology* **51**, 1013-1022 (2006)

- 44) Wood J, Verma D, Lach G, Bonaventure P, Herzog H, Sperk G, Tasan RO. Structure and function of the amygdaloid NPY system: NPY Y₂ receptors regulate excitatory and inhibitory synaptic transmission in the centromedial amygdala. *Brain Struct Funct* **221**, 3373-3391 (2016)
- 45) Bariselli S, Hörnberg H, Prévost-Solié C, Musardo S, Hatstatt-Burklé L, Scheiffele P, Bellone C. Role of VTA dopamine neurons and neuroligin 3 in sociability traits related to nonfamiliar conspecific interaction. *Nat Commun* **9**, 3173 (2018)
- 46) Olaya JC, Heusner CL, Matsumoto M, Sinclair D, Kondo MA, Karl T, Weickert CS. Overexpression of neuregulin 1 type III confers hippocampal mRNA alterations and schizophrenia-like behaviors in mice. *Schizophr Bull* **44**, 865-875 (2018)
- 47) O'Tuathaigh CMP, Babovic D, O'Sullivan GJ, Clifford JJ, Tighe O, Croke DT, Harvey R, Waddington JL. Phenotypic characterization of spatial cognition and social behavior in mice with 'knockout' of the schizophrenia risk gene neuregulin 1. *Neuroscience* **147**, 18-27 (2007)
- 48) Finlay JM, Dunham GA, Isherwood AM, Newton CJ, Nguyen TV, Reppar PC, Snitkovski I, Paschall SA, Greene RW. Effects of prefrontal cortex and hippocampal NMDA NR1-subunit deletion on complex cognitive and social behaviors. *Brain Res* **1600**, 70-83 (2015)
- 49) Lustman PJ, Anderson RJ, Freedland KE, de Groot M, Carney RM, Clouse RE. Depression and poor glycemic control. A meta-analytic review of the literature. *Diabetes Care* **23**, 934-942 (2000)
- 50) Zhang QJ, Yang CC, Zhang SY, Zhang LH, Li J. Alteration of NPY in the hypothalamus and its correlation with leptin and ghrelin during the development of T2DM in a rat model. *Springerplus* **5**, 1913 (2016)
- 51) Tan Y, Singhal SM, Harden SW, Cahill KM, Nguyen DM, Colon-Perez LM, Sahagian TJ, Thinschmidt JS, deKloet AD, Febo M, Frazier CJ, Krause EG. Oxytocin receptors

- are expressed by glutamatergic prefrontal cortical neurons that selectively modulate social recognition. *J Neurosci* **39**, 3249-3263 (2019)
- 52) Stanić D, Brumovsky P, Fetissov S, Shuster S, Herzog H, Hökfelt T. Characterization of neuropeptide Y2 receptor protein expression in the mouse brain. I. Distribution in cell bodies and nerve terminals. *J Comp Neurol* **499**, 357-390 (2006)
- 53) Ikeda H, Ardianto C, Yonemochi N, Yang L, Ohashi T, Ikegami M, Nagase H, Kamei J. Inhibition of opioid system in the hypothalamus as well as the mesolimbic area suppresses feeding behavior of mice. *Neuroscience* **311**, 9-21 (2015)
- 54) Paxinos G, Franklin KBJ. *The mouse brain in stereotaxic coordinates, compact 3rd ed.* New York: Academic Press (2008)