

「精神・神経疾患の分子病態理解に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出」  
平成 19 年度採択研究代表者

井ノ口 馨

(株) 三菱化学生命科学研究所研究部門・グループディレクター

恐怖記憶制御の分子機構の理解に基づいた PTSD の根本的予防法・治療法の創出

## 1. 研究実施の概要

トラウマ記憶そのものを減弱・消去させることに因る PTSD の根本的な予防・治療法を開発するための基盤を作ることを最終的な目標とする。そのために本年度は、動物モデルを用いて、いったん強固に固定化された恐怖記憶を減弱させる方法の実現可能性を明らかにすること、再固定と消去に関わる脳内領域を同定すること、さらに、海馬の神経新生が恐怖記憶の消去にどのように関わるのかを明らかにすることを重点ポイントとして研究を進めた。また、臨床研究として、エクスポージャー療法 (PE) の増強療法開発の準備、ならびに PTSD 予防介入試験の実験計画を策定することを目指した。

動物モデル： 恐怖記憶の再固定化時に前脳のアクチビン機能を阻害したり、NMDA 受容体発現の改善を伴う d-cycloserine (D-CS) を投与したりすることで、いったん強固に成立した恐怖記憶を減弱させることができることを明らかにした。また、恐怖条件付け文脈学習課題を用いて、恐怖記憶の再固定化には海馬と扁桃核、消去には扁桃核と前頭前野が関与することを明らかにした。さらに、生後脳海馬の神経新生が、海馬に蓄えられた恐怖記憶の消去を促進することを、CaMKII ヘテロマウスと X 線照射を用いた実験系で明らかにした。

臨床研究： D-CS を用いたエクスポージャー療法の増強効果の研究のため、研究協力施設の倫理委員会を通し、かつ独立した評定者と治療担当者の訓練をほぼ終えた。また、 $\omega 3$  脂肪酸による PTSD 予防介入試験の研究計画書を倫理委員会に提出し承認された。

以上、動物モデルを用いた本年度の成果により、アクチビンなどの分子を標的として、いったん強固に固定化された恐怖記憶を減弱させる方法を開発することが実現可能であることが明らかとなった。

## 2. 研究実施内容

(文中にある参照番号は 4. (1)に対応する)

### (2-1) 恐怖記憶の再固定・消去の分子メカニズムに基づいた PTSD 予防・治療法の開発

本年度は、動物モデルを用いて、いったん強固に固定化された恐怖記憶を減弱させる方法の実現可能性を明らかにすることと、再固定と消去に関わる脳内領域を同定することを重点ポイントとして研究を進めた。また、臨床研究として、エクスポージャー療法 (PE) の増強療法開発の準備を行った。

#### 動物モデル

海馬の長期増強 (LTP) により誘導される分子の一つであるアクチビンの機能を時期特異的・前脳特異的に制御できるトランスジェニックマウスを用いて、恐怖記憶の再固定化時にアクチビン機能を阻害することで恐怖記憶が減弱するか否かを検討した。学習課題として文脈依存的恐怖条件付けを用いた。Tet-OFF system を利用して、アクチビン阻害タンパク質フォリスタチン (fo1) の発現を前脳特異的に DOX で ON/OFF 制御できる transgenic mice を用いた。fo1/OFF で恐怖条件付けを行うと、恐怖記憶は正常に形成され 1 週間以上保持された。この条件で記憶を形成させたあと、fo1/ON、すなわち前脳のアクチビン機能が阻害された状態で恐怖記憶を想起させると、その後の恐怖記憶の抑制が観察された。このことは、想起時にアクチビン機能を阻害することで一度形成された恐怖記憶が抑制できる事を示しており、恐怖記憶の再固定化にアクチビンが重要な働きをしていることを示唆している。また、脳のアクチビンが阻害されたマウスでは不安行動が亢進し、アクチビンが抑制されたマウスではハイパーアクティブな行動を示すことから、アクチビンが不安行動を制御する新たな分子であることが明らかになった (1)。さらに、アクチビンなどの LTP 応答性の分子がニューロンの樹状突起スパインの形態を制御していることを示し (2, 3)、恐怖記憶の再固定に樹状突起スパインの形態制御が関与している可能性を示唆した。

Single prolonged stress (SPS) 負荷による PTSD モデルラットに恐怖条件付け試験 (CFT) を行い、恐怖記憶の固定化の亢進や消去障害が見られることを証明した。恐怖記憶の消去障害の改善には、海馬 NMDA 受容体発現の改善を伴う d-cycloserine 投与が有効であることを示した (4)。固定化の亢進には、海馬 BDNF 遺伝子 exon 1, 3 発現を介した BDNF mRNA 発現亢進の関与していることを示した。

次に、恐怖条件付け文脈学習課題をマウス PTSD モデルとして、最初期応答遺伝子群の発現誘導を指標にして恐怖記憶制御に関わる脳内領域を解析した。その結果、再固定化には海馬と扁桃核、消去には扁桃核と前頭前野が関与することが明らかとなった。また、薬剤局所注入法を用いた解析から、想起後の恐怖記憶不安定化には海馬におけるカナビノイド受容体 CB1 及び L 型電位依存性カルシウムチャネルの活性化が必要とされることが明らかとなった (5)。さらに、マウス遺伝学的手法を用いて、Anterior Cingulate Cortex における CaMKIV が恐怖記憶形成に重要

であることを示した(6)。

#### 臨床研究

D-CS を用いたエクスポージャー療法 (PE) の増強効果の研究のため、研究協力施設の倫理委員会を通し、かつ独立した評定者と治療担当者の訓練をほぼ終えた。外傷記憶の強化過程、認知療法による再学習過程を調べるために、外傷記憶のモデルとなる情動刺激を開発した。

#### (2-2) 生後脳の神経新生促進の分子メカニズムに基づいた PTSD 予防・治療法の開発

本年度は、海馬の神経新生が恐怖記憶の消去にどのように関わるのかを明らかにすることを重点ポイントとして研究を進めた。また、臨床研究として、PTSD 予防介入試験の実験計画を策定することを目指した。

#### 動物モデル

$\alpha$ CaMK II +/-マウスは大脳皮質での記憶形成に顕著な障害を持つため、海馬の記憶情報のみを学習行動試験で評価するのに有用である。そこで、このヘテロマウスを用いて、海馬依存的な文脈性恐怖条件付けを行い、訓練後の記憶保持率に、X線照射による神経新生阻害の影響が見られるかを検討した。その結果、訓練1日後では、X線照射、非照射のヘテロマウスは共に、電気ショックを受けた部屋において、すくみ反応(恐怖を感じる際に現れる反応)を示したが、訓練30日後には全く反応を示さなかった。ここで、これらのヘテロマウスに恐怖記憶に関する痕跡が在るかどうかを調べるため、電気ショックを受けた部屋で微弱電流刺激を再体験させ(思い出し刺激)、1時間後その部屋に再暴露した。その結果、X線照射群では、再暴露時にすくみ反応を示したが、非照射群では反応を示さなかった。また、恐怖条件付けされていないX線照射、非照射のヘテロマウスでは、思い出し刺激は、すくみ反応を誘発しなかった。

次に、海馬非依存的である音恐怖条件付けの記憶保持率へのX線照射の影響を検討した。その結果、訓練30日後のX線照射のヘテロマウスの音に対するすくみ反応の程度は、非照射のヘテロマウスと差が認められなかった。オープンフィールド試験、明暗選択試験、高架式十字迷路試験、電気ショック感受性試験の結果、情動性、一般活動性、痛覚感受性について、野生型マウス、及びヘテロマウスではX線照射の影響は認められなかった。

以上のことから、X線照射による海馬の神経新生の阻害は、 $\alpha$ CaMK II +/-マウスの海馬依存的学習に関わる記憶保持を促進することが分かり、生後脳の神経新生が海馬に蓄えられた恐怖記憶の消去に関わることが示された。

## 臨床研究

PTSD 予防介入試験を円滑かつ適切に開始できる基盤を整備することを目的に、追跡調査から脱落する者の特徴を検討したところ、男性、事故時の意識消失、協調志向性が低さ、身体的重症度の低さが関連していた（7）。また交通事故に関する認知と PTSD 症状との関連について検討したところ、交通外傷患者の自己と世界に関する否定的認知は、PTSD 症状と正の相関があることを見出した。また、 $\omega$ 3 脂肪酸による PTSD 予防介入試験の研究計画書を作成した。本画書は災害医療センター倫理委員会において審議され、承認を受けた。

## 3. 研究実施体制

### (1)「井ノ口」グループ

- ① 研究分担グループ長:井ノ口 馨((株)三菱化学生命科学研究所、グループディレクター)
- ② 研究項目
  - ・ 恐怖記憶の再固定化に関わる分子の機能解析。
  - ・ 海馬の恐怖記憶と生後脳の神経新生。

### (2)「喜田」グループ

- ① 研究分担グループ長:喜田 聡(東京農業大学、准教授)
- ② 研究項目
  - ・ 免疫染色法を用いた初期遺伝子発現を指標とした恐怖記憶強化、「古い」または「強い」恐怖記憶制御に関わる脳内領域の同定
  - ・ タンパク質合成阻害剤、MAP キナーゼ阻害剤及び CB1 阻害剤等の海馬、扁桃体、前頭前野への局所注入法、免疫二重染色法及び選択的ニューロン除去法を用いた恐怖記憶制御機構の解析
  - ・ 強い恐怖記憶を形成する CREB 活性型変異体過剰発現マウスの PTSD モデルマウスとしての有効性の検討

### (3)「森信」グループ

- ① 研究分担グループ長:森信 繁(広島大学、准教授)
- ② 研究項目
  - ・ PTSD モデルラットにみられる恐怖記憶の固定化亢進の機序解明
  - ・ PTSD モデルラットにみられる恐怖記憶の消去障害の機序解明

### (4)「金」グループ

- ① 研究分担グループ長:金 吉晴(国立精神・神経センター、部長)

②研究項目

- ・ 記憶消去メカニズムを応用した PTSD の認知行動療法の効果検討と、  
D-cycloserine による治療効果増強の検討
- ・ ヒトにおける D-cycloserine の記憶消去に与える影響の検討

(5)「松岡」グループ

①研究分担グループ長:松岡 豊((独) 国立病院機構災害医療センター、精神科医師)

②研究項目

- ・ 追跡調査脱落者の属性に関する検討
- ・ PTSD 予防介入試験の実施プロトコールの作成

#### 4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

1. Ageta, H., Murayama, A., Migishima, R., Kida, S., Tsuchida, K., Yokoyama, M. and Inokuchi, K. Activin in the Brain Modulates Anxiety-Related Behavior and Adult Neurogenesis. *PLoS ONE*, 3 (4), e1869 (2008)
2. Okubo-Suzuki, R., Okada, D., Sekiguchi, M. and Inokuchi, K. Synaptopodin Maintains the Neural Activity-dependent Enlargement of Dendritic Spines in Hippocampal Neurons. *Mol. Cell. Neurosci.*, in press (2008)
3. Shoji-Kasai, Y., Ikegami, S., Ageta, H., Hasegawa, Y., Hirai, K., Tsuchida, K., Sugino, H., Ozawa, F. and Inokuchi, K. Activin increases the number of synaptic contacts and the length of dendritic spine necks by modulating spinal actin dynamics. *J. Cell Sci.*, 120, 3830-3837 (2007)
4. Yamamoto S, Morinobu S, Fuchikami M, Murata A, Kozuru T, Yamawaki S: Effects of Single Prolonged Stress and D-Cycloserine on Contextual Fear Extinction and Hippocampal NMDA Receptor Expression in a Rat Model of PTSD. *Neuropsychopharmacology*, in press (2008)
5. Wu, L.-J., Zhang, X-H., Fukushima, H., Zhang, F., Wang, H., Toyoda, T., Li, B.-M., Kida, S. & Zhuo, M. Genetic Enhancement of Trace Fear Memory and Cingulate Potentiation in Mice Overexpressing Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase IV. *Eur. J. Neurosci.* in press (2008)
6. Suzuki, A., Mukawa, T., Tsukagoshi, A., Frankland, P.W. & Kida, S. Activation of LVGCCs and CB1 receptors required for destabilization of reactivated contextual fear memories. *Learn. Mem.* in press (2008)
7. Daisuke Nishi, Yutaka Matsuoka, Satomi Nakajima, Hiroko Noguchi, Yoshiharu Kim, Shigenobu Kanba, Ulrich Schnyder: Are patients following severe injury who drop out in a longitudinal study at high risk for mental disorder? *Comprehensive Psychiatry*, in press (2008)