

「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

平成 21 年度
実績報告

井ノ口 馨

富山大学大学院医学薬学研究部(医学)・教授

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。そのために、動物に普遍的に存在する恐怖記憶形成を PTSD 発症のモデル、また、恐怖記憶想起後に誘導される恐怖記憶消去や神経新生による海馬記憶の消去を PTSD 予防・治療のモデルとして、PTSD 発症と病態のメカニズムを解明し、新規かつ根本的な PTSD 予防法と治療法の創出のための基盤を作ることを目的とする。

本年度は、動物モデルを用いて、恐怖記憶の海馬依存性期間を制御しているメカニズムを解明し、PTSDのトリガーとなるトラウマ記憶が制御できる可能性を示した。また、恐怖記憶の固定化、不安定化、再固定化、強化及び消去等プロセス群に関わる遺伝子群と脳内領域の同定を進め、これらプロセス群の制御機構の解明を進め、受動的回避課題を用いて、動物 PTSD モデルの開発も試みた。さらに、PTSD モデルの SPS ラットを用いて、1) HDAC 阻害薬である vorinostat の単回投与によって、恐怖記憶の消去が促進されること、2) 恐怖記憶の固定化を導く BDNF 発現亢進の機序に、HDAC5 発現減少が関与する可能性があること、3) Vorinostat 投与後に恐怖条件付けを行うことで、SPS ラット同等の恐怖記憶の亢進が得られることを見出し、ヒストンアセチル化の制御が PTSD 病態形成に密接に関与していることを示した。

一方、臨床研究として、トラウマ直後の断眠がトラウマ記憶の強化の予防ならびに PTSD の発症予防に有効であることを示唆した。また、PTSD 予防を目的とした予備的なオープン試験を実施し、 ω 3系脂肪酸が PTSD 症状最小化に有効である可能性を示唆した。PTSD 予防を目的としたプラセボ対照の二重盲検ランダム化比較試験を開始した(49/140 例)。

§ 2. 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(9月まで:三菱化学生命科学研究所、主任研究員・グループディレクター)[10月より富山大学にて研究実施]

② 研究項目

- ・ 恐怖記憶のみを選択的に減弱・消去する方法を開発する。
- ・ 恐怖記憶再固定の分子機構・脳内機構を解析する。
- ・ 想起に伴う恐怖記憶の脆弱化の分子機構を解析する。
- ・ 脳活動が新生神経細胞の既存回路への組み込みにどのような影響を与えるのかを解析する。

(2)「井ノ口」グループ

① 研究分担グループ長:井ノ口 馨(富山大学、教授)

② 研究項目

- ・ 恐怖記憶再固定の分子機構・脳内機構を解析する。
- ・ 想起に伴う恐怖記憶の脆弱化の分子機構を解析する。
- ・ 脳活動が新生神経細胞の既存回路への組み込みにどのような影響を与えるのかを解析する。

(3)「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、教授)

② 研究項目

- ・ 免疫染色法を用いた受動的回避反応課題における恐怖記憶強化に関わる脳内領域の同定及び恐怖記憶制御に関わる神経ネットワークの解析
- ・ 受動的回避反応課題を用いた「古い」または「強い」恐怖記憶制御機構の解析
- ・ 薬理学的手法、生化学的手法を用いた海馬、扁桃体、前頭前野における恐怖記憶再固定化及び消去の分子機構の解析
- ・ マウス遺伝学的手法を用いた記憶関連遺伝子群の恐怖記憶制御に対する役割と機能解析
- ・ PTSD モデルマウスの開発

(4)「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

- ・ ヒストン・アセチル化の亢進を介した恐怖記憶の消去法の開発

- ・ ヒストン・アセチル化の抑制を介した PTSD 予防法の開発

(5)「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

- ・ PTSD のエクスポージャー療法に対する増強療法の開発
- ・ ヒトのトラウマ記憶の慢性化と消去の増強要因の解明

(6)「松岡」グループ

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

②研究項目

- ・ ω3 系脂肪酸の PTSD 二次予防に対する有効性を検討するオープン試験
- ・ ω3 系脂肪酸の PTSD 二次予防に対する有効性を検討するランダム化比較試験の開始
- ・ Peritraumatic Distress Inventory の PTSD 症状予測に対する有用性検討

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

(3-1) 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

動物モデル

受動的回避課題を用いて、想起によって恐怖記憶が強化されるマウス PTSD モデルを開発した。この課題を用いて、恐怖記憶強化機構の解析を進め、恐怖記憶強化には CaMKIV-CREB 情報伝達経路が必要であること、扁桃体は再固定化、海馬と前頭前野は強化をそれぞれ制御する役割分担の存在を発見した。また、PTSD 治療の分子標的の同定を目的として、恐怖消去に対する Fyn(文献7)、転写因子 BMAL1 の重要性を明らかにして、CaMKIV-CREB(文献8)及び BMAL1(文献6)のニューロン内シグナル情報伝達制御機構を明らかにした。

PTSD モデルである SPS ラットを用いて、以下の研究を行った。HDAC 阻害薬の vorinostat を恐怖条件付け試験(FC)の文脈暴露後に単回投与すると、恐怖記憶の消去が促進され、新規の治療法の基盤を開発した。恐怖記憶の固定化に海馬 HDAC5 発現減少による BDNF 遺伝子ヒストン・アセチル化の亢進と、TrkB mRNA 発現の亢進の関与している可能性を発見した。未処置ラットに vorinostat を投与後に FC に暴露すると、SPS 同等の恐怖記憶の亢進が見られ、ヒストン・アセチル化の亢進が PTSD 病態形成に密接に関与することを示した。

記憶関連たんぱく質 Ves1-1S の神経細胞内での挙動を解析し、Ves1-1S は細胞内全てに配達された後、その時に使用されていたシナプスだけに取り込まれることを明らかにし、シナプスタグ仮説が正しいことを実証した(文献4)。シナプスタグに生じる異常は、トラウマ記憶をそれとは無関係な種々の状況と結びつけてしまう PTSD の症状に関わると想定されるので、シナプスタグ機構を制御

することによるPTSD治療法の開発への展開が期待される。

臨床研究

PTSD 患者への持続エクスポージャー療法に対する d-cycloserine の増強効果を検証するための RCT を実施中である。解離によって治療効果の判定が困難になることが見いだされたため、持続エクスポージャー以外の実験的エクスポージャー法を開発中である。また健常者を対象とした研究により、文脈依存性の記憶想起において、文脈と情動の消去速度の差が明らかとなり、またトラウマ直後の断眠がトラウマ記憶の強化の予防ならびに PTSD の発症予防に有効であることが示唆された。トラウマ記憶消去についてのDCSの有用性が行動データおよびERPにおける脳活動指標において確認された。また、HDAC 阻害作用も持つ valproic acid においても、トラウマ記憶消去に有用であるという証拠を行動データ、脳活動指標にて確認した。d-cycloserine と valproic acid では、トラウマ記憶消去において質的差があることを行動指標、脳活動指標より確認した。(文献 18)

(3-2) 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

動物モデル

物理的あるいは遺伝子改変技術によって生後の海馬神経新生が抑制されたマウス、もしくは海馬神経新生が促進されたマウスを用いて、恐怖記憶の長期的な保持率とその時の記憶想起の海馬依存性を検討した。生後の海馬神経新生が低下したマウスとして、限局した頭部へのX線照射処置をほどこしたマウス、またはフォリスタチンを前脳特異的に過剰発現させた遺伝子改変マウス(FSMマウス)を用い、海馬の神経新生が促進したマウスとして、豊富環境で飼育したマウスを用いた。

これらのマウスを用いて、恐怖記憶の想起が海馬依存性であるか否かを検討するために文脈性恐怖条件付けを行った。マウスに恐怖の体験をさせ、一定時間経過後に、神経活動を不活性化する薬剤を海馬に注入し、直後にその恐怖記憶を想起できるか否かを調べた。すなわち、海馬の神経活動が不活性化状態でも想起すれば記憶は海馬非依存性になっており、想起できなければ海馬依存性な状態であることが分かる。この実験により、以下のことが明らかになった。

- 1) X線照射処置を受けて海馬の神経新生がほぼ消失したマウスは、恐怖記憶の海馬依存性期間が長くなっていた。
- 2) 遺伝的に海馬の神経新生が低下したFSMマウスもまた、恐怖記憶の海馬依存性期間が長くなっていた。
- 3) 一方、豊富環境で飼育されて海馬の神経新生が2倍程度になったマウスでは、恐怖記憶の海馬依存性期間が短縮されていた。

以上の結果から、記憶想起の海馬依存性期間が、さまざまな処置や状況に影響を受けること、さらに上記1)～3)のそれぞれ独立した相関的実験証拠から、海馬の神経新生の活発さが恐怖記憶の海馬依存性期間を決定する重要な要因の1つであることを、世界に先駆けて明らかにした(文献5)。

この成果は、海馬の神経新生を適切に制御することによって、恐怖記憶を保存する脳領域をコントロールできる可能性を示唆している。そこで、トラウマ記憶が原因となる心的外傷後ストレス障

害(PTSD)などの精神疾患の新たな予防法開発への展開を試みた(次項)。

臨床研究

外傷患者における PTSD 二次予防を目的としたオープン試験を実施し(文献 19, 文献 2, 3)、有効性と安全性を予備的に検討した。その結果、神経新生を促進する作用がある ω 3系脂肪酸は PTSD 症状最小化に有効である可能性が示唆され、世界に先駆けて発表した(文献 15)。また、PTSD 発症予防を目的としたプラセボ対照の二重盲検ランダム化比較試験を開始した。サンプル数は140例を計画しており、現在までに 49 例(目標の 35%)を登録した。平行して実施した観察研究(文献 11, 12, 14)において、PTSD 発症のハイリスク者をトラウマ直後に評定する際、Peritraumatic Distress Inventory が有用であることを実証した(文献 16)。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

(国内)

- 1) 松村健太, 松岡豊:外傷後ストレス障害に関する最新の精神生理学研究. 脳と精神の医学 20(2):143-155, 2009
- 2) 西大輔, 臼杵理人, 野口普子, 佐久間香子, 佐野恵子, 星崎裕子, 松岡豊:災害医療センターにおける精神科と救命救急科の包括的な連携. 臨床精神医学 38(9):1227-1232, 2009
- 3) 野口普子, 佐久間香子, 佐野恵子, 西大輔, 松岡豊:救急医療現場において臨床試験を円滑に行うための工夫—CRC の役割を中心に—. 総合病院精神医学(印刷中)

(国際)

- 4) Okada, D., Ozawa, F. & Inokuchi, K. Input-specific spine entry of soma-derived Ves1-1S protein conforms to synaptic tagging. *Science (Research Article)*, 324, 904-909 (2009). DOI:10.1126/science.1171498
- 5) Kitamura, T., Saitoh, Y., Takashima, N., Murayama, A., Niibori, Y., Ageta, H., Sekiguchi, M., Sugiyama, H. & Inokuchi, K. Adult neurogenesis modulates the hippocampus-dependent period of associative fear memory. *Cell* **139**, 814-827 (2009). DOI:10.1016/j.cell.2009.10.020

- 6) Hosoda, H., Kato, K., Asano, H., Ito, M., Kato, H., Iwamoto, T., Suzuki, A., Masushige, S. & Kida, S CBP/p300 is a cell type-specific modulator of CLOCK/BMAL1-mediated transcription. *Mol. Brain*. **2**, 34. (2009) DOI:10.1186/1756-6606-2-34
- 7) Isosaka, T., Kida, S., Kohno, T., Hattori, K. & Yuasa, S. Hippocampal Fyn activity regulates extinction of contextual fear. *Neuroreport*. **20**, 1461-5. (2009)
DOI:10.1097/WNR.0b013e32833203a8
- 8) Wang, H. Fukushima, H., Kida, S. & Zhuo, M. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV links group I metabotropic glutamate receptors to fragile X mental retardation protein in cingulate cortex. *J. Biol. Chem.* **284**, 18953-62. (2009) DOI:10.1074/jbc.M109.019141
- 9) Yamamoto S, Morinobu S, Takei S, Fuchikami M, Matsuki A, Yamawaki S, Liberzon S. Single prolonged stress: toward an animal model of posttraumatic stress disorder. *Depress Anxiety* 2009; 26:1110-1117. DOI:10.1002/da.20629
- 10) Kurata A, Morinobu S, Fuchikami M, Yamamoto S, Yamawaki S. Maternal postpartum learned helplessness (LH) affects maternal care by dams and response to the LH test in adolescent offspring. *Horm Behav* 2009; 56:112-120. DOI:10.1016/j.yhbeh.2009.03.016
- 11) Matsuoka Y, Nishi D, Nakajima S, Yonemoto N, Hashimoto K, Noguchi H, Homma M, Otomo Y, Kim Y: The Tachikawa Cohort of Motor Vehicle Accident Study investigating psychological distress: Design, methods and cohort profile. *Soc Psychiatr Psychiatric Epidemiol* 44(4):333-340, 2009 DOI:10.1007/s00127-008-0438-6
- 12) Matsuoka Y, Nishi D, Nakajima S, Yonemoto N, Noguchi H, Otomo Y, Kim Y: Impact of psychiatric morbidity on quality of life after motor vehicle accident at 1-month follow-up. *Psychiatry Clin Neurosci* 63(2): 235-237, 2009 DOI:10.1111/j.1440-1819.2009.01928.x
- 13) Ageta, H., Ikegami, S., Miura, M., Masuda, M., Migishima, R., Hino, T., Takashima, N., Murayama, A., Sugino, H., Setou, M., Kida, S., Yokoyama, M., Hasegawa, Y., Tsuchida, K., Toshihiko Aosaki, T. & Inokuchi, K. Activin plays a key role in the maintenance of long-term memory and late-LTP. *Learn Mem* **17**, 168-175 (2010). DOI:10.1101/lm.16659010
- 14) Matsuoka Y, Nishi D, Yonemoto N, Nakajima S, Kim Y: Towards an explanation of inconsistent rates of PTSD across different countries: infant mortality rate as a marker of

- social circumstances and basic population health. *Psychother Psychosom* 79(1):56–57, 2010
DOI:10.1159/000259418
- 15) Matsuoka Y, Nishi D, Yonemoto N, Hamazaki K, Hashimoto K, Hamazaki T: Omega-3 fatty acids for the secondary prevention of posttraumatic stress disorder after accidental injury: an open-label pilot study. *J Clin Psychopharmacology* 30(2):217–219, 2010
DOI:10.1097/JCP.0b013e3181d48830
 - 16) Nishi D, Matsuoka Y, Yonemoto N, Noguchi H, Kim Y, Kanba S: The Peritraumatic Distress Inventory as a predictor for the subsequent posttraumatic stress disorder after a severe motor vehicle accident. *Psychiatry Clin Neurosci* 64(2): 149–156, 2010
DOI:10.1111/j.1440-1819.2010.02065.x
 - 17) Kohno Y, Maruyama M, Matsuoka Y, Matsushita T, Koeda H, Matsushima E: Relationship of psychological characteristics and self-efficacy in gastrointestinal cancer survivors. *Psycho-Oncology* 19(1):71–76, 2010 DOI:10.1002/pon.1531
 - 18) Kuriyama K, Soshi T, Fujii T, Kim Y: Emotional memory persists longer than event memory. *Learn. Mem.* 17: 130–133, 2010 DOI:10.1101/lm.1651910
 - 19) Hamazaki T, Itomura M, Hamazaki K, Matsuoka Y: The safety of fish oils for those whose risk of injury is high -Effects of n-3 fatty acids on mood and behavior. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* (in press)
 - 20) Yamamoto S, Morinobu S, Iwamoto Y, Ueda Y, Takei S, Fujita Y, Yamawaki S. Alterations in the hippocampal glycinergic system in an animal model of posttraumatic stress disorder. *J Psychiatric Res* (in press).