

「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

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、昨年度に引き続き、動物モデルを用いた研究では、恐怖記憶の再固定化・不安定化・消去の分子メカニズムの解析に重点を置いて研究を進めた。海馬の *in vivo* LTP 系を用いて、シナプス可塑性の再固定化・不安定化を測定する解析系の開発に取り組んだ。また、恐怖記憶制御に関わる脳領野と遺伝子を同定し、これらの役割の解析を進め、さらに恐怖記憶制御における領野間のネットワークを解析した。さらに、恐怖記憶が増強される動物 PTSD モデルを開発し、そのメカニズムを解析した。HDAC 阻害薬である vorinostat による、恐怖記憶の消去の促進に関する脳内機序を解析し、ヒストン・アセチル化の亢進による phospho-CREB の結合増大を介して NMDA 受容体のサブユニット NR2B 遺伝子の転写亢進が導かれることで、消去機能を促進することが分かった。神経新生と恐怖記憶の海馬からの消去に関しては、新生神経細胞は海馬の LTP 誘導に応じて、その後のシナプス結合の作り方が異なることを見出した。

臨床研究として、PTSD のエクスポージャー療法に対する D-cycloserine を用いた増強療法の効果検証、及びヒトのトラウマ記憶の言語、感情、生理的側面の固定と消去過程に関する、睡眠ならびに D-cycloserine の影響ならびに脳神経学的基盤の解明を通じ、恐怖記憶形成の予防的介入法を検討した。また、外傷患者の PTSD 二次予防を目的としたプラセボ対照二重盲検ランダム

化比較試験を継続実施した。平成 23 年 3 月末までに必要症例 140 例中 75 例(54%)を登録した。

§2. 研究実施体制

(1)「井ノ口」グループ(富山大学)

① 研究分担グループ長:井ノ口 馨 (富山大学大学院医学薬学研究部(医学)、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不安定化の細胞機構を解析する。
- ・ 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)「喜田」グループ(東京農業大学)

① 研究分担グループ長:喜田 聡 (東京農業大学応用生物科学部、教授)

② 研究項目

- ・ 初期遺伝子発現等を指標として、再固定化、消去、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を継続し、介入実験の標的領域を同定する。
- ・ 海馬、扁桃体、前頭前野への局所薬剤注入法、遺伝子改変方法等を用いて、恐怖記憶制御に関わる分子群の同定を進める。
- ・ マウス遺伝学的手法、免疫二重染色法、薬理学的手法を用いて恐怖記憶制御に関わる特異的ニューロンを同定する。
- ・ PTSD モデルマウスを開発する。

(3)「森信」グループ(広島大学)

① 研究分担グループ長:森信 繁 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科、准教授)

② 研究項目

- クロマチン構造の制御に基づいた新たな PTSD 治療戦略の開発
- ・ 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

(4)「金」グループ(国立精神・神経医療研究センター)

① 研究分担グループ長:金吉晴 ((独)国立精神・神経医療研究センター、部長)

② 研究項目

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

(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)

③ 研究項目

- ・ ω 3系脂肪酸の PTSD 二次予防に対する有効性を検討する二重盲検ランダム化比較試験
- ・ ω 3系脂肪酸とストレス誘発心臓血管系反応との関連
- ・心的トラウマと外傷後成長との関連

§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

ラット海馬歯状回の *in vivo* LTP 系で、LTP が誘導・成立した後に、神経活動依存的に LTP が不安定化する系の開発に取り組んだ。LTP を誘導するテタヌス刺激としては 400 Hz, 500 パルスを用いた。LTP の固定化が終了する3日後に、0.2Hz, 45 パルス、200 Hz, 90 パルス、400Hz, 500 パルスなどの様々な神経活動誘発刺激を与え、LTP の不安定化が誘導されるか否かを検討中である。

想起によって恐怖記憶が強化されるマウス PTSD モデルにおける恐怖記憶強化機構の解析を進めた結果、恐怖記憶増強時の扁桃体、海馬と前頭前野のネットワークの重要性を示した。また、恐怖記憶制御に関わる特異的ニューロンを同定し、その性状解析を進め、さらに、恐怖記憶制御における前側帯状皮質の重要性を示した(8)。さらに、恐怖記憶制御における CREB-BDNF 経路(11)、及び、カルシニューリンの重要性を示し、これら分子群が PTSD 治療の標的となることを示唆した。想起に伴う恐怖記憶の不安定化を誘発する機構の候補として、樹状突起スパインのオートファジー制御を解析し、神経活動がスパインのオートファジー活性を誘導することを示唆するデータを得た。

HDAC 阻害薬の vorinostat による恐怖記憶の消去促進の脳内機序について、未処置及び SPS ラットを対象に恐怖条件付け試験を用いて解析した。その結果、ヒストン・アセチル化が亢進することでユークロマチン状態が導かれ、転写因子 phospho-CREB のプロモーターへの結合が亢進し、その結果 NMDA 受容体のサブユニット NR2B 遺伝子の転写が活性化し、NR2B のタンパク量も増大することから、消去機能の促進されることが分かった。PTSD 治療に使用されている SSRI のパロキセチンには、消去機能の促進作用はないことが分かった。

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などの治療上の工夫を行っている。また健常者を対象とした研究により、言語記憶、情動記憶、身体記憶(反応性)のそれぞれが異なった消去、固定の過程を持つことを、睡眠剥奪実験によって見出した(15)。すなわち睡眠剥奪の有無は出来事一文脈記憶に影響を与えず、事故体験が安全運転体験よりも文脈との連合が比較的長く残る傾向を示した。他方で、交通事故に関連した情動一文脈記憶は長く保持される傾向にあった。しかし、睡眠剥奪により情動般化の減弱が促され、事故体験以外の類似の文脈では恐怖感情は惹起されなくなった。さらに、恐怖条件付け記憶は睡眠を経ると強化され、より強い生理反応を示す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。ま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。(16, 17, 18, 19, 20)

(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

昨年度に引き続き、マウスモデルやラットモデルを用いて恐怖記憶の形成における神経新生の役割を解析した。昨年度までの研究で、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が明らかとなった。新生神経細胞は新たなシナプス結合を作ることで既存の神経回路網に組み込まれ、海馬記憶の消去に関わっていると想定されるため、新生した神経細胞をレトロウィルスベクターにより特異的に標識する技術を用いて、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した。その結果、新生後に海馬歯状回 LTP が誘導されると、新生神経細胞は LTP が誘導された時期に応じて、その後のシナプス結合の作り方が異なることを見出した。

臨床研究

外傷患者の PTSD 二次予防を目的としたプラセボ対照二重盲検ランダム化比較試験を継続実施した。平成 23 年 3 月末までに必要症例 140 例中 75 例(54%)を登録した。オープン試験の二次解析より、 ω 3 系脂肪酸による血清 BDNF 増加が PTSD 症状緩和に何らかの役割を演じている可能性が示唆された(24)。外傷後成長を構成する因子のうち、「人生・生命に対する感謝」と「精神的変容」は PTSD 症状と深く関連し、「人間としての強さ」「他者との関係」「新たな可能性」はレジリエンスと深く関連していることが示唆された(21)。健常者を対象に魚食習慣とストレス負荷時の心臓血管系機能の関連を検討する実験を実施した。

§4. 成果発表等

(4—1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. 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., Aosaki T., and Inokuchi K. “Activin plays a key role in the maintenance of long-term memory and late-LTP”, Learning and Memory vol. 17, No. 4, pp.176-185, 2010 (DOI: 10.1101/lm.16659010)

2. Kitamura T., Saitoh Y., Murayama A., Sugiyama H., and Inokuchi K. “LTP induction within a narrow critical period of immature stages enhances the survival of newly generated neurons in the adult rat dentate gyrus”, *Mol. Brain* Vol 3, 13, 2010 (DOI: 10.1186/1756-6606-3-13)
3. Kitanishi T., Sakai J., Kojima S., Saitoh Y., Inokuchi K., Fukaya M., Watanabe M., Matsuki N., and Yamada MK. “Activity-dependent localization in spines of the F-actin capping protein CapZ screened in a rat model of dementia” *Genes Cells* Vol 15, No. 7, pp. 737-747, 2010 (DOI: 10.1111/j.1365-2443.2010.01411.x)
4. Umeda T., Takashima N., Nakagawa R., Maekawa M., Ikegami S., Yoshikawa T., Kobayashi K., Okanoya K., Inokuchi K., and Osumi N. “Evaluation of Pax6 mutant rat as a model for autism” *PloS One* Vol 5, No. 12, pp. e15500, 2010 (DOI: 10.1371/journal.pone.0015500)
5. Toyoda, H., Zhao, M.G., Mercaldo, V., Chen, T., Descalzi, G., Kida, S. & Zhuo, M. Calcium/calmodulin-dependent kinase IV contributes to translation-dependent early synaptic potentiation in the anterior cingulate cortex of adult mice. *Mol. Brain.* 3, 27. (2010) doi:10.1186/1756-6606-3-27
6. Steenland, H.W., Wu, V., Fukushima, H., Kida, S. & Zhuo, M. CaMKIV over-expression boosts cortical 4-7 Hz oscillations during learning and 1-4 Hz delta oscillations during sleep. *Mol. Brain.* 3, 16. (2010) doi:10.1186/1756-6606-3-16
7. Uchida, S., Hara, K., Kobayashi, A., Fujimoto, M., Otsuki, K., Yamagata, H., Hobara, T., Abe, N., Higuchi, F., Shibata, T., Hasegawa, S., Kida, S., Nakai, A. & Watanabe, Y. Impaired hippocampal spinogenesis and neurogenesis and altered affective behavior in mice lacking heat shock factor 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 1681-6 (2011) doi: 10.1073/pnas.1016424108
8. Zhang, Y., Fukushima, H. & *Kida, S Induction and requirement of gene expression in the anterior cingulate cortex and medial prefrontal cortex for the consolidation of inhibitory avoidance memory. *Mol. Brain.* 4, 4 (2011) doi:10.1186/1756-6606-4-4
9. Kim, R., Moki, R. & *Kida, S Molecular mechanisms for the destabilization and restabilization of reactivated spatial memory in the Morris water maze. *Mol. Brain.* 4, 9 (2011) doi:10.1186/1756-6606-4-9
10. Hosoda, H., Miyao, T., Uchida, S., Sakai, S., S. & *Kida, S Development of tightly regulated tetracycline-dependent transcriptional activator and repressor co-expression system for the strong induction of transgene expression. *Cytotechnology.* 63, 211-6. doi:10.1007/s10616-011-9335-z

11. Suzuki, A., Fukushima, H., Takuya Mukawa, T., Toyoda, H., Wu, L-J., Zhao, M-G., Hui Xu, H., Shang, Y., Endoh, K., Iwamoto, Mamiya, N., Okano, E., Hasegawa, H., Mercaldo, V., Yue Zhang, Y., Maeda, R., Ohta, M., Josselyn, S.A., Zhuo, M., & *Kida, S. Up-regulation of CREB-mediated transcription enhances both short- and long-term memory. *J. Neurosci.* in press
12. Shigeto Yamamoto, Shigeru Morinobu, Yasuyuki Iwamoto, Yuto Ueda, Shiro Takei, Yosuke Fujita and Shigeto Yamawaki, "Alterations in the hippocampal glycinergic system in an animal model of posttraumatic stress disorder." *Journal of Psychiatric Res*, vol. 44, No. 4, pp. 1069-1074, 2010. (DOI: 10.1016/j.jpsychires.2010.03.013.)
13. Manabu Fuchikami M, Shigeto Yamamoto, Shigeru Morinobu, Shiro Takei, Shigeto Yamawaki, "Epigenetic regulation of BDNF gene in response to stress." *Psychiatry Investig*, Vol 7, No. 4, pp. 251-256, 2010. (DOI: 10.4306/pi.2010.7.4.251.)
14. Shiro Takei, Shigeru Morinobu, Shigeto Yamamoto, Manabu Fuchikami, Tomoya Matsumoto and Shigeto Yamawaki, "Enhanced hippocampal BDNF/TrkB signaling in response to fear conditioning in an animal model of posttraumatic stress disorder." *Journal of Psychiatric Res.* (in press).
15. Kuriyama K, Soshi T, Kim Y. Sleep deprivation facilitates extinction of implicit fear generalization and physiological response to fear. *Biological Psychiatry* 68(11): 991-998. 2010.DOI:10.1016/j.biopsych.2010.08.015
16. Kuriyama K, Soshi T, Fujii T, Kim Y. Emotional memory persists longer than event memory. *Learning and Memory*. 17(3): 130-133; 2010.DOI:10.1101/lm.1651910
17. Honma M, Soshi T, Kim K, Kuriyama K. Right prefrontal activity reflects the ability to overcome sleepiness during working memory tasks: a functional near-infrared spectroscopy study. *PLoS ONE* 5(9): e12923: 2010. DOI:10.1371/journal.pone.0012923
18. Aritake-Okada S, Higuchi S, Suzuki H, Kuriyama K, Enomoto M, Soshi T, Kitamura S, Watanabe M, Hida A, Matsuura M, Uchiyama M, Mishima K. Diurnal fluctuations in subjective sleep time in humans. *Neurosci Res* 68: 225-231, 2010. DOI:10.1016/j.neures.2010.07.2040
19. Soshi T, Kuriyama K, Aritake S, Enomoto M, Hida A, Tamura M, Kim Y, Mishima K. Sleep Deprivation Influences Diurnal Variation of Human Time Perception with Prefrontal Activity Change: A Functional Near-Infrared Spectroscopy Study. *PLoS ONE*. 5(1): e8395, 2010. DOI:10.1371/journal.pone.0008395

20. Kuriyama K, Mishima K, Soshi T, Honma M, Kim Y. Effects of sex differences and regulation of the sleep-wake cycle on aversive memory encoding. *Neurosci Res.* 2011 (in press) DOI:10.1016/j.neures.2011.01.012
21. Nishi D, Matsuoka Y, Kim Y: Posttraumatic growth, posttraumatic stress disorder and resilience of motor vehicle accident survivors. *Biopsychosocial Med* 2010, 4:7 [doi:10.1186/1751-0759-4-7]
22. Nishi D, Uehara R, Kondo M, Matsuoka Y: Reliability and validity of the Japanese version of the Resilience Scale and its short version. *BMC Research Notes.* 2010 Nov 17;3(1):310 [doi:10.1186/1756-0500-3-310]
23. Matsuoka Y: Clearance of fear memory from the hippocampus through neurogenesis by omega-3 fatty acids: A novel preventive strategy for posttraumatic stress disorder? *Biopsychosocial Med* 2011 February 8; 5:3 [doi:10.1186/1751-0759-5-3]
24. Matsuoka Y, Nishi D, Yonemoto N, Hamazaki K, Hamazaki T, Hashimoto K: Potential role of brain-derived neurotrophic factor in omega-3 fatty acid supplementation to prevent posttraumatic distress after accidental injury: An open-label pilot study. *Psychother Psychosom* (2011, in press)

(4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 0件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 0件)