

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。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、マウス PTSD モデルや SPS 負荷ラット PTSD モデルを用いて、恐怖記憶固定化、不安定化、再固定化、強化及び消去制御の分子機構の解析、さらに、これらプロセス制御に関わる脳内領域の同定とその役割の解析を進め、同時に PTSD モデルマウスの開発も目指した。記憶の正確な保存を保証するメカニズムであるシナプスタグ仮説を検証した。また、海馬の神経新生が海馬記憶の消去に関与するか否かを、野生型マウスを用いて検討し、その仮説が正しいことを実証した。

一方、臨床研究として、PTSD 患者への持続エクスポージャー療法に対する d-cycloserine の増強効果を検証し、ヒトにおける恐怖記憶想起と非恐怖記憶想起の認知変化パターンを、行動指標と脳機能画像所見から検討しつつある。さらに、PTSD 予防介入試験の実施可能性、 $\omega$ 3脂肪酸の安全性と有効性を検討する予備的な非盲検開放ラベル単群試験を実施した。外傷体験直後の苦痛を包括的に評価する質問紙である PDI 日本語版の信頼性と妥当性を検討した。

### 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

##### 動物モデル

マウス PTSD モデルを用いて、恐怖記憶再固定化では海馬と扁桃体、消去では扁桃体と前頭前野における遺伝子発現を介してそれぞれのプロセスが誘導されることを証明し、海馬及び扁桃

体において再固定化と消去のプロセスが相互作用することも示した(12)。また、恐怖記憶安定性制御に対するカナビノイド受容体 CB1、L 型電位依存性カルシウムチャネル、及び Fyn の重要性を明らかにした(6, 7)。さらに、CaMKIV 過剰発現マウスでは強い恐怖記憶が形成されることを示し(5, 8)、この変異型マウスの PTSD モデルマウスとしての可能性を示唆した。Ves1-1S が恐怖記憶形成のさまざまなステップで重要な役割を果たしていることを明らかにした(16)。

SPS ラットの PTSD モデルとしての妥当性の検証を行い、恐怖条件付け試験による恐怖記憶の消去障害や、d-サイクロセリンによる消去障害の修復を示した(9)。SPS ラット海馬を対象に同試験による恐怖記憶の固定化の亢進の機序を解析し、real-time PCR 法にて BDNF total, exon1, 3 mRNA 発現の亢進を、クロマチン免疫沈降法にて BDNF 遺伝子 exon1, 3 プロモーター上のヒストン・アセチル化の亢進を見出した。恐怖刺激暴露後の BDNF mRNA 発現亢進と同遺伝子プロモーター上のヒストン・アセチル化の亢進が、恐怖記憶の固定化の亢進に密接に関与していることを見出した。

さらに、記憶の正確な保存を保証するメカニズムであるシナプスタグ仮説を検証するとともに、シナプスタグの実体を明らかにした(18)。シナプスタグの異常は、トラウマ記憶をそれとは無関係な種々の記憶と結びつけてしまう PTSD や、幻覚・幻聴・妄想などの症状に関わると想定される。また、神経損傷や脳梗塞などからのリハビリのメカニズムにもシナプスタグが関わっていると想定される。従って、この成果は、記憶の正確な保存メカニズムを明らかにしただけでなく、PTSD を始めとする様々な疾患の予防・治療への波及効果が見込まれる。

## 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予備研究として、治療の feasibility を検証し、次いで同薬剤を用いた増強療法に着手したところである。またヒト特有の恐怖記憶想起過程を明らかとすべく、恐怖記憶想起と非恐怖記憶想起の差異における記憶定着過程と記憶忘却過程双方の認知変化パターンを、行動指標および脳機能画像所見ならびに睡眠剥奪の影響を踏まえて検討し、すでにデータ収集を終え、解析中である。この研究を踏まえ、DCSが情動記憶・条件付け学習に与える影響に関する影響を検討するため、健康被験者を対象に外傷記憶のモデルとなる情動記憶課題および条件付け課題を施行し、課題学習初日・2日目・3日目における情動記憶・条件付け想起時のパフォーマンスおよび脳活動を、機能的磁気画像(FMRI)、近赤外線分光法(NIRS)および脳波を用いて検討する研究に着手した。

## **(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**

本年度は昨年度に引き続き、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 予防介入の予備試験を実施した。

## 動物モデル

本年度は、X 線照射、遺伝子改変マウスによる神経新生阻害と、TTXを海馬実質に注入する実験を組み合わせ、海馬の神経新生の抑制により、恐怖記憶の海馬依存的期間が

長くなることを見出した (図 1)。

また、逆に輪回し環境による神経新生の促進により、恐怖記憶の海馬依存的期間が短くなることを見出した (図 2)。これらの結果は、CaMKII ヘテロ KO マウスを用いて得た昨年度までの結果や、無麻酔自由行動下の LTP 実験から得た結果とも一致する。以上より、生後の神経新生の量は、記憶の海馬依存的期間の決定に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。(論文投稿中)

本年度のこれらの成果は、神経新生を適切に制御することで恐怖記憶をコントロールできる可能性を示唆しており、PTSD 治療法への展開が期待できるものである。

さらに本年度は、生後脳海馬の新生神経細胞の生存維持にアクチビンが必須であることを見出す (1, 15) と同時に、性的成熟期の神経新生が、精神疾患様異常行動の発症脆弱性に関与していることを明らかにした (4, 17)。

神経新生による海馬記憶の消去の機構を明らかにするために、レトロウイルスベクターによる新生神経細胞の特異的標識法と *in vivo* LTP 誘導法を組み合わせた技術を確立した。この系を用いて、新生神経細胞のスパイン形成様式の観察を EGFP- $\beta$ -actin を用いて試みた結果、海馬の情報獲得が、発達時期毎の新生神経細胞の既存回路網への統合様式に異なる影響を与えることを見出した。

### 臨床研究

外傷患者における PTSD 二次予防を目的とした  $\omega$ 3 脂肪酸の非盲検開放ラベル単群試験のプロトコルを、米国 NIH の ClinicalTrials.gov に登録した。本予備試験は1月末に終了し、実施可能性と  $\omega$ 3 脂肪酸の安全性を確認した。外傷体験直後の苦痛を包括的に評価する質問紙 Peritraumatic Distress Inventory (PDI) 日本語版を作成し、その信頼性と妥当性を検討した。その結果、PDI 日本語版は内的一貫性、再試験信頼性、外的妥当性、弁別妥当性がいずれも高いことを示した。

### 3. 研究実施体制

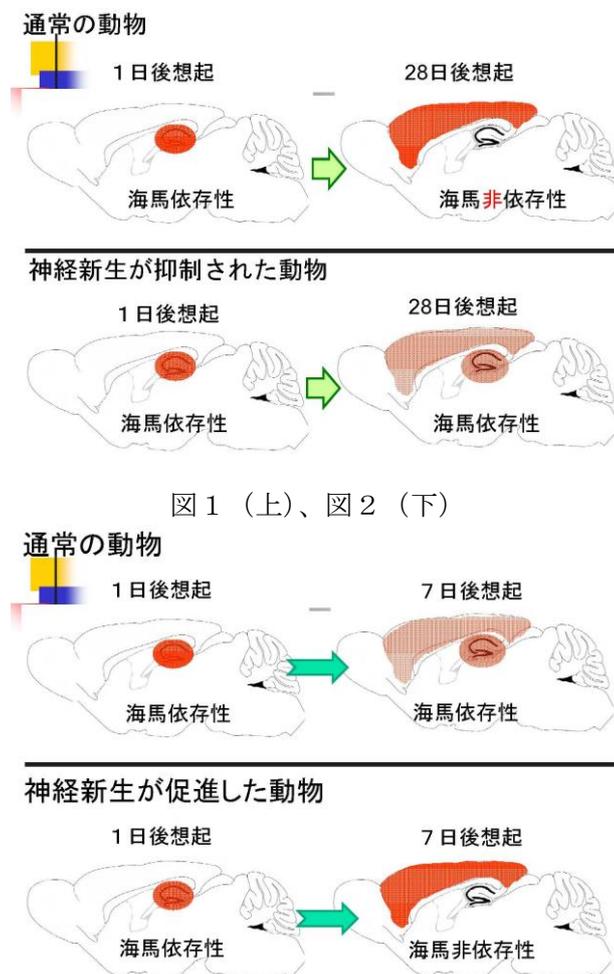


図 1 (上)、図 2 (下)

(1)「井ノ口」グループ

①研究分担グループ長:井ノ口 馨 (㈱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、教授)

②研究項目

- ・ 免疫染色法を用いた恐怖記憶再固定化及び消去、また、「古い」または「強い」恐怖記憶制御に関わる脳内領域の同定
- ・ マウス遺伝学的手法、薬理学的手法を用いた恐怖記憶再固定化及び消去の分子機構の解析
- ・ 受動的回避反応課題を用いた恐怖記憶強化機構の解析
- ・ マウス遺伝学的手法を用いた PTSD モデルマウスの開発と、強い恐怖記憶を形成する CREB 及び CaMKIV 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

- 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

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

(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、医師)

②研究項目

- 1)  $\omega$ 3 脂肪酸の PTSD 二次予防に対する有効性を検討する非盲検開放ラベル単群試験の実施
- 2) Peritraumatic Distress Inventory 日本語版の信頼性・妥当性の検討

#### 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. & Inokuchi, K. Activin in the brain modulates anxiety-related behavior and adult neurogenesis. *PLoS ONE* 3, e1869 (2008).
2. Okubo-Suzuki, R., Okada, D., Sekiguchi, M. & Inokuchi, K. Synaptopodin maintains the neural activity-dependent enlargement of dendritic spines in hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 38, 266-276 (2008).
3. Ohkawa, N., Sugisaki, S., Tokunaga, E., Fujitani, K., Hayasaka, T., Setou, M. & Inokuchi, K. N-acetyltransferase ARD1-NAT1 regulates neuronal dendritic development. *Genes Cells* 13, 1171-1183 (2008).
4. Hayashi, F., Takashima, N., Murayama, A. & Inokuchi, K. Decreased postnatal neurogenesis in the hippocampus combined with stress experience during adolescence is accompanied by an enhanced incidence of behavioral pathologies in adult mice. *Mol Brain*, 1, 22 (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.* **27**, 1923-32 (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.* **15**, 426-33 (2008)
7. Isosaka, T., Hattori, K., Kida, S., Kohno, T., Nakazawa, T., Yamamoto, T., Yagi, T. & Yuasa, S. Activation of Fyn tyrosine kinase in the mouse dorsal hippocampus is essential for contextual fear conditioning. *Eur. J. Neurosci.* **28**, 973-81 (2008).
8. Fukushima, H., Maeda, R., Suzuki, R., Suzuki, A., Nomoto, M., Toyoda, H., Wu, L.-J., Xu, H., Zhao, M.-G., Ueda, K., Kitamoto, K., Mamiya, N., Yoshida, T., Homma, S., Masushige, S., Zhuo, M. & Kida, S. Up-regulation of CaMKIV improves memory formation and rescues memory loss with aging. *J. Neurosci.* **28**, 9910-19 (2008).
9. Yamamoto S, Morinobu S, Fuchikami M, Kurata 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*, 33: 2108-2116, 2008.
10. Nishi D, Matsuoka Y, Nakajima S, Noguchi H, Kim Y, Kanba S, Schnyder U: Are patients following severe injury who drop out in a longitudinal study at high risk for mental disorder? *Comprehensive Psychiatry* 49 (4):393-8, 2008
11. 野口普子, 松岡豊, 西大輔, 中島聡美, 佐野恵子, 小西聖子, 金吉晴: 交通事故に関する認知と精神的苦痛との関連についての横断研究. *総合病院精神医学* 20(3):279-285, 2008

12. Mamiya, N., Fukushima, H., Suzuki, A., Matsuyama, Z., Homma, S., Frankland, P.W. & Kida, S. Brain region-specific gene expression activation required for reconsolidation and extinction of contextual fear memory. *J. Neurosci.* 29: 402–13, 2009
13. Hasegawa, H., Furuichi, T., Yoshida, Y., Endoh, K., Kato, K., Sado, M., Maeda, R., Kitamoto, A., Miyao, T., Suzuki, R., Homma, S., Masushige, S., Kajii, Y. & Kida, S. Transgenic up-regulation of alpha-CaMKII in forebrain leads to increased anxiety-like behaviors and aggression. *Mol. Brain*, 2: 6 (2009).
14. Nishi D, Matsuoka Y, Noguchi H, Sakuma K, Yonemoto N, Yanagita T, Homma M, Kanba S, Kim Y: Reliability and validity of Japanese version of the Peritraumatic Distress Inventory. *Gen Hosp Psychiatry* 31(1):75–79, 2009
15. Sekiguchi M, Hayashi F, Tsuchida K & Inokuchi K: Neuron type-selective effects of activin on development of the hippocampus. *Neurosci Lett*, 452: 232–237, 2009
16. Inoue N, Nakao H, Migishima R, Hino T, Matsui M, Hayashi F, Nakao K, Manabe T, Aiba A & Inokuchi K: Requirement of the immediate early gene *ves1-1S/homer-1a* for fear memory formation. *Mol Brain*, 2: 7, 2009.
17. Maekawa M, Takashima N, Matsumata M, Ikegami S, Kontani M, Hara Y, Kawashima H, Owada Y, Kiso Y, Yoshikawa T, Inokuchi K and Osumi N: Arachidonic acid drives postnatal neurogenesis and elicits a beneficial effect on prepulse inhibition, a biological trait of psychiatric illnesses. *PLoS One*, 4(4): e5085, 2009.
18. Okada, D., Ozawa, F. and Inokuchi, K. Input-specific spine entry of soma-derived Ves1-1S protein conforms to synaptic tagging. *Science* (research article), in press.

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 0 件)