

平成30年6月12日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06705

研究課題名(和文) ストレス負荷時の恐怖記憶制御における扁桃体グルココルチコイド受容体の機能解明

研究課題名(英文) Roles of amygdala glucocorticoid receptor in stress-modulated fear conditioning

研究代表者

井上 蘭 (Inoue, Ran)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：70401817

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：扁桃体外側核(LA)は恐怖記憶に関わる神経回路において中心的役割を果たす脳部位である。我々はストレスホルモン受容体の一つであるグルココルチコイド受容体(GR)をLA部位特異的に遺伝子ノックアウトしたマウス(LAGRKO)を作製し、LAGRの活性化が通常時の恐怖記憶の形成に必要である一方、ストレス負荷状態では恐怖記憶の抑制に関わることを明らかにした。さらに、光遺伝学的手法、電気生理学的手法と行動実験を併用し、ストレス負荷後のLAにおけるシナプス伝達効率の低下が、ストレス状態で過剰な恐怖記憶を抑制する細胞内メカニズムであることを実証した。

研究成果の概要(英文)：The lateral nucleus of the amygdala (LA) is a key structure underlying auditory-cued fear conditioning. Glucocorticoid receptor (GR) is crucial for signaling mediated by stress-induced high levels of glucocorticoids. Here, we demonstrate that genetic disruption of GR in the LA (LAGRKO) resulted in an auditory-cued fear memory deficit for strengthened conditioning. Furthermore, the suppressive effect of a single restraint stress (RS) prior to conditioning on auditory-cued fear memory in floxed GR (control) mice was abolished in LAGRKO mice. Optogenetic induction of long-term depression (LTD) at LA reduced fear memory in RS-exposed LAGRKO mice, and in contrast, induction of long-term potentiation (LTP) increased fear memory in RS-exposed floxed GR mice. These findings suggest that prior stress suppresses fear conditioning-induced LTP at auditory inputs to the LA in a GR-dependent manner, thereby protecting animals from encoding excessive cued fear memory under stress conditions.

研究分野：神経科学、脳科学

キーワード：扁桃体 グルココルチコイド受容体 恐怖記憶

1. 研究開始当初の背景

(1) 恐怖記憶は生物が学習を基に危険を予測し、危急時の生存確率を高める防御反応の一つである。一方、必要以上の強い恐怖記憶の形成はヒトの心的外傷後ストレス障害 (PTSD) や不安症などの精神疾患の発症に深く関わる。PTSD は非常に強いストレスを伴う恐怖体験後に発症するが、その発症頻度は 5 ~ 10% にしか過ぎない。これは、非常に強いストレス状態においても過剰な恐怖記憶の形成を抑制する脳内ブレーキ機構が存在する可能性を示唆するが、その実態は不明である。

(2) ストレスや恐怖は、視床下部 下垂体副腎 (HPA) 系を作動させ、副腎皮質からストレスホルモンであるグルココルチコイドを分泌させる。血流で脳内に運ばれたグルココルチコイドは、脳内に広く分布するグルココルチコイド受容体 (GR) を活性化し、ストレス応答や情動記憶の制御のみならず、過剰な心的ストレスが原因となる PTSD の病態にも関わっていることが示唆されている (Frontiers in Neuroendocrinology 30, 358-, 2009)。

(3) 情動の中枢である扁桃体は、異なる機能的特徴を持つ 10 個以上の神経核から形成され、その中でも扁桃体外側核 (LA) は大脳皮質や視床からの感覚情報を受け取る入力核であり、恐怖記憶に関わる神経回路において中心的な役割を果たしている。特に恐怖条件付けなどの連合記憶においては、音や匂いなどの条件刺激と (CS) と足への電気ショックなどの非条件刺激 (US) が LA の神経細胞に入力することで可塑的な変化が生じ、長期的な恐怖記憶が形成されると考えられている (Neuron 44, 75-, 2004)。恐怖記憶の制御機構はストレスの影響を強く受ける。非常に強いストレスを伴う恐怖体験後に起こる

PTSD では、過剰な恐怖記憶の形成ならびに消去不全が病態形成に関与していると考えられている。しかし、ストレス負荷後の恐怖記憶形成過程における LA 内の分子動態や LA ニューロンの機能変化などは明らかにされていない。さらに、これらの変化が恐怖記憶やストレスに関わる神経回路にどのような影響を与えるかは不明である。

(4) LA には GR が多く発現し、GR 複合体シャペロンに含まれる FKBP5 遺伝子の多型が PTSD のリスクファクターのひとつであることから (Biol Psychiatry 71, 309-, 2012) 通常とストレス負荷時の恐怖記憶制御において LAGR が重要な役割を果たす可能性が考えられる。そこで、我々は、GR 遺伝子を扁桃体外側核 (LA) 選択的に欠損させた (LAGRKO) マウス系統を独自に作製し、LAGR が通常時の恐怖記憶形成に必要であること、急性ストレス負荷状態では、恐怖記憶の抑制に関わることを明らかにした。しかし、LAGR がストレス負荷状態で恐怖記憶を抑制する仕組みについては不明であった。

2. 研究の目的

(1) 血中コルチゾール濃度の低下、HPA 系のネガティブフィードバック機構の異常などが PTSD 患者で報告されており (Brain, Behavior, and Immunity 30, 12-21, 2013) ストレスによる恐怖記憶制御機構に HPA 系が密接に関わっていることが示唆されている。従って、ストレス負荷前後と恐怖条件付け前後の血中グルココルチコイド濃度を測定し、LAGRKO マウスにおける HPA 系の機能異常の有無を明らかにする。

(2) ストレスや恐怖条件付け後では、扁桃体ニューロンのシナプス伝達効率が変化することが報告されている (PNAS 107, 14449-14454, 2010) ことから、LAGRKO マウスを用いて、通

常状態とストレス負荷後の LA ニューロンにおけるシナプス伝達効率の変化を電気生理学的に解析し、これらの変化と LAGRKO マウスで認められた恐怖記憶制御異常との関連性を明らかにする。

(3) LAGRKO マウスを用いて PTSD モデルを作製し、LAGR の機能欠損が PTSD 様の行動発現に与える影響を評価し、PTSD の発症機構における LAGR の関連性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) HPA 系の機能評価

コントロール (Floxed GR) と LAGRKO マウスに拘束ストレスを 20 分間与え、1 時間後に血液を採取した。

Floxed GR と LAGRKO マウスに拘束ストレスを 20 分間与え、1 時間後に音依存的恐怖条件付け (3CSXUS, CS: ホワイトノイズ 65 dB、30 秒; US: 電気ショック 0.5 mA、2 秒) を行い、90 分後に血液を採取した。

以上の血液サンプルから血漿を調製し、市販の Corticosterone Assay キットを用いてそれぞれのサンプルにおけるグルココルチコイド濃度を測定した。

(2) 光遺伝学的手法を用いて人為的に LTP 或いは LTD を誘導する実験系を用い、ストレスによる LA のシナプス伝達効率の変化と恐怖記憶の強さの変化との因果関係を検討した。

音依存的恐怖条件付けの時、音の情報は聴覚皮質 (AC) と内側膝状体 (MGN) から LA に入力される。そこで、脳定位装置を用いて Floxed GR と LAGRKO マウスの両側の AC と MGN にチャンネルロドプシン oChIEF を発現するアデノ随伴ウィルスベクター (AAV-oChIEF-tdTomato) を注入した。ウィルス注入 4 週後、青光レーザーの高頻度光刺激 (100Hz、100 パルス/回、90 秒間隔で 10 回繰り返す) により LTP、或いは低頻度光刺

激 (1Hz、2 ms パルス、900 回) により LTD を人為的に誘導できるかを In vivo 電気生理学的手法にて確認した。

脳定位装置を用いて、Floxed GR と LAGRKO マウスの両側の AC と MGN に AAV-oChIEF-tdTomato を注入し、LA に光ファイバーを通すためのカニューレを設置した。4 週後、マウスに拘束ストレスを与え、一時間後に音依存的恐怖条件付け (3CSXUS, CS: ホワイトノイズ 65 dB、30 秒; US: 電気ショック 0.5 mA、2 秒) を行った。24 時間後、恐怖記憶のテストを行い、その直後に光照射により人為的に LTP 或いは LTD を誘導した。24 時間後、恐怖記憶のテストを行った。

(3) PTSD モデルを作製し、LAGR 欠損が PTSD 様の行動発現に与える影響を解析した。

Floxed GR と LAGRKO マウスを用いて、強い恐怖条件付け (3CSXUS, CS: ホワイトノイズ 65 dB、30 秒; US: 電気ショック 0.8 mA、2 秒) を行い、その直後に拘束ストレスを 20 分間与えた。24 時間後に、文脈 (context) に対する恐怖反応を測定し、さらに 24 時間後音 (cue) に対する恐怖反応を測定した。

Floxed GR と LAGRKO マウスを用いて、強い恐怖条件付けを行い、その直後に拘束ストレスを 20 分間与えた。90 分後に血液を採取し、Corticosterone Assay キットを用いて血漿中のグルココルチコイド濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) LAGRKO マウスの HPA 系の機能評価

拘束ストレス負荷 1 時間後、Floxed GR と LAGRKO マウスの血漿中グルココルチコイド濃度は有意差がなかった。

拘束ストレス負荷 1 時間後に音依存的恐怖条件付け (3CSXUS, CS: ホワイトノイズ 65 dB、30 秒; US: 電気ショック 0.5 mA、2 秒) を受けた Floxed GR と LAGRKO マウスの血漿中グルココルチコイド濃度は有意差がな

かった。

強い恐怖条件付け(3CSXUS, CS : ホワイトノイズ 65 d b、30 秒 ; US: 電気ショック 0.8 mA、2 秒)後に拘束ストレスを受けた LAGRKO マウスの血漿中グルココルチコイド濃度は Floxed GR マウスに比べ有意に高かった。

以上の結果から、ストレスレベルが一定の閾値を越えた条件では、LAGR が血中グルココルチコイド濃度の制御に関わることが明らかとなった。

(2) Floxed GR と LAGRKO マウスの LA で、光遺伝学的手法にて LTP 或いは LTD を誘導できることを電気生理学的に確認した。

(3) 拘束ストレスを負荷した Floxed GR マウスでは、LA で光刺激により LTP を誘導すると恐怖記憶が増加したが、LAGRKO マウスでは変化が見られなかった。一方、拘束ストレスを負荷した LAGRKO マウスでは、LA で光刺激により LTD を誘導すると恐怖記憶が低下した。これらの結果から、ストレス負荷状態では音依存的恐怖条件付け後の LA で LTP が誘導しにくくなり、恐怖記憶が抑制されるとの我々の仮説が実証された。また、このようなストレスによるシナプス可塑性の変化(メタ可塑性)には、LAGR の機能が必要であることが明らかとなった。

(4) 強い恐怖条件付け(3CSXUS, CS : ホワイトノイズ 65 d b、30 秒 ; US: 電気ショック 0.8 mA、2 秒)直後に拘束ストレスを受けた LAGRKO マウスでは、音に対する恐怖反応が Floxed GR マウスに比べ有意に強かった。一方、文脈依存的恐怖反応は両遺伝子型で有意差がなかった。この結果から、ストレスレベルが一定の閾値を越えた条件では、LAGR が恐怖記憶の抑制に関わることが強く示唆された。

本研究は扁桃体 GR の機能に着目し、ストレス負荷状態において過剰な恐怖記憶を抑制する脳内ブレーキメカニズムが存在することを世界で初めて提唱し、PTSD の新規治療戦略の開拓に新しい視点を提示できると考えられる。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

Inoue R, Abdou K, Hayashi-Tanaka A, Muramatsu S, Mino K, Inokuchi K, Mori H. Glucocorticoid receptor-mediated amygdalar metaplasticity underlies adaptive modulation of fear memory by stress. *eLife*, in press. (査読あり)

Inoue R, Talukdar G, Takao K, Miyakawa T, Mori H. Dissociated role of D-serine in extinction during consolidation vs. reconsolidation of context conditioned fear. *Front Mol Neurosci*. 11:161, 2018. (査読あり)

Talukdar G, Inoue R, Yoshida T, Mori H. Impairment in extinction of cued fear memory in syntenin-1 knockout mice. *Neurobiol Learn Mem*. 149: 58-67, 2018. (査読あり)

Ozaki H, Inoue R, Matsushima T, Sasahara M, Hayashi A, Mori H. Serine racemase deletion attenuates neurodegeneration and microvascular damage in diabetic retinopathy. *PLoS One*. 13: e0190864, 2018. (査読あり)

Talukdar G, Inoue R, Yoshida T, Ishimoto T, Yaku K, Nakagawa T, Mori H. Novel role of serine racemase in anti-apoptosis and metabolism. *Biochim*

Biophys Acta. 1861:3378-3387, 2017. (査読あり)

Ishimoto T, Ninomiya K, Inoue R, Koike M, Uchiyama Y, Mori H. Mice lacking BCAS1, a novel myelin-associated protein, display hypomyelination, schizophrenia-like abnormal behaviors, and upregulation of inflammatory genes in the brain. *Glia*. 65: 727-739, 2017. (査読あり)

[学会発表](計 3 件)

Inoue R, Abdou K, Tanaka-Hayashi A, Inokuchi K, Mori H. Roles of glucocorticoid receptor in stress-induced amygdalar metaplasticity and auditory fear conditioning. (第 47 回日本神経精神薬理学会年会、9/28~30, 2017, 札幌)

Inoue R, Tanaka-Hayashi A, Mori H. Differential role of lateral amygdala glucocorticoid receptors in auditory fear conditioning under basal and stress conditions. (第 39 回日本神経科学大会 7/20~22, 2016, 横浜)

Inoue R, Mori H. Influence of lateral amygdala-selective disruption of glucocorticoid receptors on auditory fear conditioning under basal and stress conditions. (第 46 回日本神経精神薬理学会年会、7/2~7/3, 2016, 韓国ソウル)

[図書](計 2 件)

井上 蘭、森 寿. 「興奮性神経伝達物質とそれらの受容体のダイナミクス」 p44-54 (森泰生、尾藤晴彦編集、脳神経化学 - 脳はいま化学の言葉でどこまで語れるか、化学同人、2018 年 3 月 30 日)

井上 蘭、森 寿. 「情動学習の分子機構、情動の仕組みとその異常」 p2-17 (山脇成人、西条寿夫編集、情動学シリーズ 2、朝

倉書店

2015 年 5 月 25 日).

6 . 研究組織

(1)研究代表者

井上 蘭 (INOUE, Ran)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・
助教

研究者番号 : 70401817