

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20867

研究課題名(和文) 恐怖体験によって引き起こされる恐怖刺激鋭敏化の進行の神経基盤の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the neural mechanisms of the progression of stress-induced fear sensitization

研究代表者

領家 梨恵 (Ryoke, Rie)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：10737464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：1995年の阪神・淡路大震災から、心的外傷後ストレス障害(PTSD)と呼ばれる慢性的ストレス関連精神疾患が知られるようになり、PTSD発症は社会的問題となっている。本研究は、PTSD発症要因を明らかにするため、PTSDモデル動物の脳形態変化と行動変化を繰り返し観察した。小動物用核磁気共鳴画像法(MRI)を用いて、同一個体のトラウマストレス前後の脳形態変化を比較し、トラウマストレスによって引き起こされる異常を観察した。今後、強いストレス曝露後のストレス脆弱性を生じさせる脳内メカニズムと個体差のメカニズムを明らかにするとともに、PTSDの新規バイオマーカーおよび、効果的な治療法の発展を目指す。

研究成果の概要(英文)：Posttraumatic Stress Disorder (PTSD) has been well recognized from 1995 when the big disaster of earthquake occurred in Hanshin area. People who exposed such a traumatic events possibly develop PTSD that shows long-lasting distress. Then, we studied longitudinal morphological experiment and behavioral experiment using PTSD animal model to clarify the mechanisms of PTSD symptom's developments. We conducted structural MRI before and after the PTSD model paradigm. In the results, certain brain region related to learning and memory was decreased in PTSD animal model compared to control animals. Further study should clear the mechanism of individual susceptibility in stress-related mental disorders like PTSD.

研究分野：行動神経科学

キーワード：恐怖条件づけ 心的外傷後ストレス障害 ラット 形態MRI 経時的観察

1. 研究開始当初の背景

1995年の阪神・淡路大震災から、心的外傷後ストレス障害 (PTSD) と呼ばれる慢性的ストレス関連精神疾患が知られるようになり、PTSD 発症は社会的問題となっている。慢性的な苦痛を伴う PTSD の発症は深刻な問題であり、PTSD の病態解明が求められている。あらゆる疾患において、動物モデルは、侵襲的検査が可能であり、PTSD 発症の生物学的基盤の解明に有用である。そして、トラウマストレスから時間をおいたとき (2 週間以上) に生じる条件性恐怖反応増強を引き起こす動物モデルを調べることで、より PTSD の病態学に即した検討ができると期待される。研究代表者はこれまでに、強いストレス経験がその後のストレス脆弱性をもたらす要因を調べるための長期行動変容 (条件性恐怖反応増強) を示す動物モデルを作成した (Ryoke et al., *Physiology & Behavior*, 2014)。強いストレスを受けた後に、PTSD を発症する人とならない人が存在し、ストレス脆弱性 (susceptibility)・抵抗性 (resilience) に個人差があることが知られており、動物研究においても個体差の研究に注目が集まりつつある (Cohen et al., 2011, *European Neuropsychopharmacology*)。ストレス脆弱性をもたらす候補は挙げられているものの、脳領域をまたいだ包括的な脳内変化の解明には至っていない。本研究は、小動物用核磁気共鳴画像法 (MRI) を用いることで、トラウマストレスによる異常の発生の原因を包括的にかつ経時的に検討可能である。これにより、他の要因を無くした純粋なトラウマストレスの影響によるストレス脆弱性をもたらす原因を明らかにすることが期待される。

2. 研究の目的

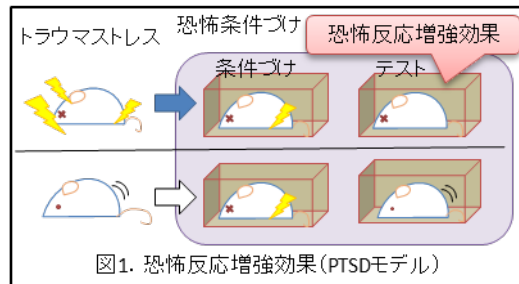
- (1) 研究代表者が作成した PTSD 動物モデルを用いて、MRI 撮像を組み合わせた適切な実験計画を検討することを目的とした。
- (2) PTSD 動物モデルである複合ストレスの一つの強制水泳ストレス単体が脳形態と行動に及ぼす長期的影響を明らかにすることを目的とした。

小動物用 MRI を用いることで、同一個体の脳形態変化を経時的に観察でき、トラウマストレス前後の行動変容と脳形態変化の因果関係を明確にできると考えた。本研究は、小動物用 MRI を用いることで、トラウマストレスによる脳機能変化の原因を網羅的にかつ経時的に検討できる。

3. 研究の方法

- (1) PTSD 動物モデルパラダイムの前後 (複合ストレス前および、文脈恐怖条件づけの 3 回目の保持テスト終了後) に小動物用 MRI を用いて、脳形態画像を測定した。これにより、被験体の生来持っていた脳

の個体差を鑑みることができ、トラウマストレスによって引き起こされた脳形態変化と行動変化の関連を解析した。PTSD 動物モデルとして、研究代表者の作成したトラウマストレスから時間をおいたときに生じる条件性恐怖反応増強を引き起こすモデルを用いた。長期間観察を行うモデルは、PTSD の病態額に即した神経メカニズムを明らかにすると予想されるため用いた。条件性恐怖反応増強について下記に図示する (図 1)。



被験体として、成体の Wistar 雄ラットを用いた。本研究で用いた PTSD 動物モデルは、トラウマストレスとして複合ストレス (足底部への電気ショック [1.0 mA・1 秒を 25 分間に 4 回] と強制水泳ストレス [20 分間] を連続して与える) を用いた 1 か月の経時観察計画であった。トラウマストレスの 1 週間後に、身体的苦痛を与えないがトラウマストレスを思い出させるリマインダー操作を行った。リマインダーとは、トラウマストレス曝露の際に用いた小動物運搬箱に、ラットを再度 3 分間入れる操作であった。その後の行動評価課題として、オープンフィールドテストおよび文脈恐怖条件づけを用いた。オープンフィールドテストとは、ラットの生得的特性を利用した不安様行動および活動性を検査するために広く用いられている行動課題であ



図 2. ラット用オープンフィールド

る (図 2)。トラウマストレスの即時的影響および、トラウマストレスから時間が経過したときの影響を測定するため、トラウマストレスの翌日および、21 日後にオープンフィールドテストを 10 分間行った。つづいて、恐怖反応増強効果を測定するため、トラウマストレスとは異なる装置を用いて文脈恐怖条件づけを行った。文脈恐怖条件づけとは、個体の周りの環境 (文脈) と嫌悪刺激 (電撃) を一緒に提示することで、文脈と電撃を関連するものとしてラットに覚えさせる記憶課題である。もしラットが文脈と電

撃を関連する出来事として記憶していたら、電撃という嫌悪刺激無しで同一の環境に曝露したときにも再び嫌悪反応をしめす。ラットは嫌悪刺激を受けるとすくみ反応であるフリージングをしめすことから、フリージング表出時間が記憶の指標として用いられた。条件づけには非常に弱い足底部電撃 (0.1 mA・2 秒、2 回、提示間隔：60 秒) を用い、1 試行の時間は 3 分であった。記憶の強さを測定する保持テストは、電撃箱にラットを 3 分間入れて行われた。保持テストは、条件づけの翌日、7 日後および 14 日後に実施された。

生体の脳形態を観察する方法として、小動物用 7T-MRI (PharmaScan, Bruker 社製) を用いた構造画像取得を行った (図 3)。苦痛を最小限にするため、イソ



図 3. 小動物用 MRI

フルレン吸入麻酔下で、呼吸数を常にモニタリングしながら約 30 分間の MRI 撮像を行った。MRI 撮像は、撮像の影響を抑えるため、トラウマストレスの前週および、文脈恐怖条件づけの最後の保持テストが終了した翌週に実施された。実験の流れを下記に図示する (図 4)。

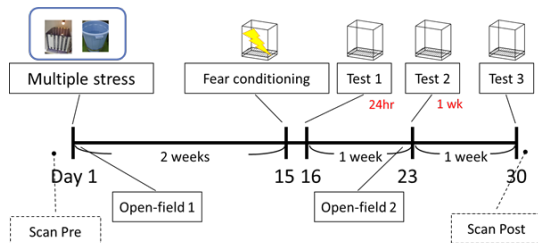


図 4. 実験期間全体の流れ。

- (2) ラットに与えるストレスラーとして、強制水泳 (20 分間) を用いた。強制水泳を行う前および 14 日後に構造 MRI による生体脳画像の取得を行った。その後、情動における変化を検討するため、オープンフィールドテスト (10 分間/試行) を 1 週間間隔で計 2 回行った。

4. 研究成果

- (1) 経時的構造 MRI 測定を行った PTSD 動物モデルにおける恐怖反応鋭敏化

① 遅延して表出されるうつ様行動。

トラウマストレスである複合ストレスの翌日および 21 日後に同一個体を用いたオープンフィールドテストを行った。その結果、トラウマ

ストレスから遅延した活動性の低下傾向を示した (図 5)。また、ラッ

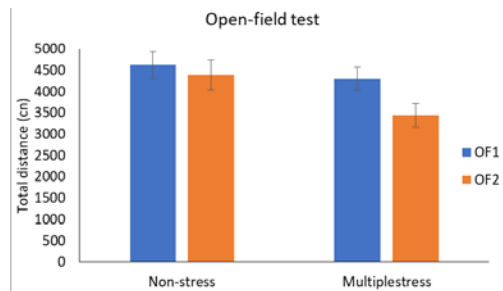


図 5. 各群の総移動距離 (cm) を示す。青のバーは、1 回目のオープンフィールドテスト、オレンジのバーは、オープンフィールド 2 回目の結果を示す。トラウマストレスを受けた群 (右側は、ストレスを受けていない群に比べて、活動性が低くなっていた。

トの特性から、オープンフィールドの中心滞在時間が短いほど不安傾向が高いと示されることから、トラウマ宇トレスを受けたラットは時間が経過するほどに総じて不安が高くなる傾向がみられた (図 6)。

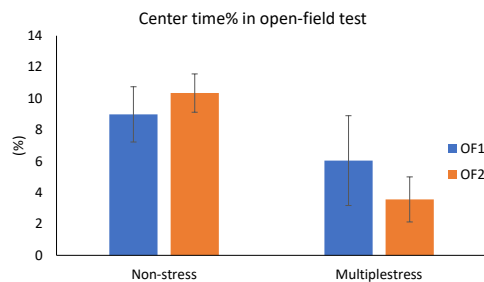


図 6. 各群のオープンフィールド中心滞在割合 (%) を示す。トラウマストレスを受けた群 (右側) は、受けていない群に比べて、中心滞在時間が低く、不安様行動が高い傾向にあった。

② 長期間の恐怖反応増強効果。

トラウマストレスである複合ストレスの 2 週間後に文脈恐怖条件づけを行った。その結果、非常に弱い嫌悪刺激を用いた条件づけは、ストレスを受けていない群にほとんど恐怖条件づけを成立させなかったにもかかわらず、トラウマストレスを受けた群は、条件づけから 2 週間にもわたって恐怖反応を示した (図 7)。

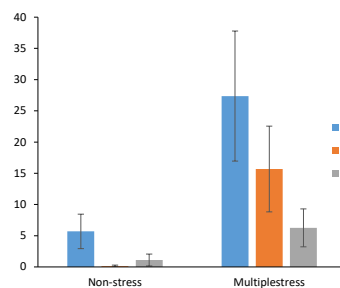


図 7. 各群の文脈恐怖条件づけにおける保持テスト 1 回目、2 回目、3 回目のフリージング率を示す。トラウマストレスを受けた群は、強い恐怖条件づけが生じ、維持された。

先行研究と一致する結果が得られた。このことから、トラウマストレス前に MRI 撮像を行ったとしても、恐怖反応増強効果がみられ、遅延性のうつ様症状がみられると確認され、本実験パラダイムは PTSD の病態モデルを探索するために適していると示唆された。

- ③ トラウマストレスにより引き起こされた脳部位委縮。
ラットが複合ストレスを与えられる前、および PTSD モデルパラダイムの終了後に形態 MRI 撮像を行った。ヒト画像の全脳解析と同様に、灰白質、白質または脳脊髄液それぞれの voxel-based morphometry (VBM) による脳形態解析を行った。T2 強調画像を取得した (TR = 2700 ms、TE = 30 ms、flip angle = 90 度、voxel size = 0.15 x 0.15 x 1 mm、slice gap = 1 mm、32 slices)。トラウマストレス前の脳からトラウマストレス後の脳までどれほどの割合で変化が生じたかを voxel 毎に算出し、変化率を対応のない t 検定にて統計解析を行った (Sumiyoshi et al., Neuroimage, 2014)。取得した構造画像の解析に用いたソフトウェアは SPM8 (Wellcom Trust Centre for Neuroimaging, London, UK) であった。その結果、一次運動野および嗅内野に有意な脳体積の減少がみられた (voxel-level: uncorrected $p < .0001$, cluster-level: FEW $p < .05$ 、図 8、図 9)。先行研究において、都市部における暴力的犯罪被

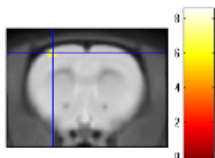


図 8. VBM 解析の結果、トラウマストレス群で減少した一次運動野を示す。十字の中心がピーク。

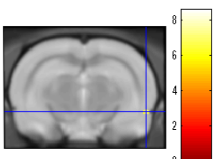


図 9. VBM 解析の結果、ストレス前後で減少していた嗅内野を示す。十字の中心がピーク。

害 PTSD 患者の一次運動野の委縮がみられたことと本研究結果は一致していた (Rocha-Rego et al., 2012)。また、嗅内野は記憶に重要な脳部位である海馬と皮質を繋ぐ脳部位であり、これら側頭葉の機能低下と PTSD の発症の関連が示唆されている (Lebois et al., 2012)。

これらの結果から、本実験の PTSD 動物モデルは再現性があることが示された。さらに、PTSD モデルパラダイムを行う前にイソフルレン麻酔下 MRI 撮像を行ったとしても、個体の行動異常を観察可能で

あることが示唆された。他の原因を排除した、強いストレスによる脳形態変化を検討することは、ヒトの研究では困難であることから、本研究は PTSD 病態を明らかにするために有益な研究結果を得られたと考えられる。

- (2) 強制水泳をストレスラーとして用いた経時的脳形態変化の検討

本実験は、ストレスラーとして強制水泳を用いて、強制水泳を行う前、2 週間後に構造 MRI 撮像を行った。そのご、1 週間ごとにオープンフィールドテストを実施した。その結果、強制水泳群は、有意ではなかったものの、オープンフィールドに対する慣れが生じにくい傾向を示した。実験 1 と比較し、オープンフィールドを行う間隔が短かったことから、統制群がオープンフィールドに対する慣れを見せたため、強制水泳ストレスによる活動性の低下をみるというよりも装置に対する慣れの能力を観察する結果となったと考えられる。

強制水泳ストレスの前後の構造 MRI を実験 1 と同様の手法で全脳網羅的に解析した。その結果、voxel-level または cluster-level においても有意な形態差はみられなかった。多重比較補正なしにて傾向を検討したところ、強制水泳群の視覚野にまとまった減少傾向がみられた。

行動および脳構造画像の両方に傾向が観察されたことから、今後は被験体数を増やすこと、これらの結果の再現性および、群間比較の違いを明らかにすることが期待される。

当初、ストレス脆弱性の個体差を示す要因を検討することを目的としたものの、研究を進めるにあたり、実験装置の改良の必要性が生じたため、実験進捗が遅れが生じた。行動実験結果の正確性・再現性を高めるために、実験環境整備は非常に重要である。そのため、本研究の確実な結果を得る目的を主目的におき、実験環境と MRI を用いたプロトコルの確立を重点的に行った。今後の研究において、個性差を示す要因を明らかにすることを目標とする。

<引用文献>

- (1) Ryoike, R., Yamada, K., & Ichitani, Y. (2014). Long-term effects of traumatic stress on subsequent contextual fear conditioning in rats. *Physiology & Behavior*, 129, 30-35.
- (2) Cohen, H., Kozlovsky, N., Matar, M. A., Zohar, J., & Kaplan, Z. (2011). The Characteristic Long-Term Upregulation of Hippocampal NF- κ B Complex in PTSD-Like Behavioral Stress Response Is Normalized by High-Dose Corticosterone and

Pyrrolidine Dithiocarbamate
Administered Immediately after
Exposure. *Neuropsychopharmacology*,
36(11), 2286-2302.

- (3) Sumiyoshi, A., Taki, Y., Nonaka, H., Takeuchi, H., & Kawashima, R. (2014). Regional gray matter volume increases following 7 days of voluntary wheel running exercise: A longitudinal VBM study in rats. *NeuroImage*.
- (4) Rocha-Rego, V., Pereira, M. G., Oliveira, L., Mendlowicz, M. V., Fiszman, A., Marques-Portella, C., ... Volchan, E. (2012). Decreased Premotor Cortex Volume in Victims of Urban Violence with Posttraumatic Stress Disorder. *PLoS ONE*, 7(8).
- (5) Lebois, L. A. M., Wolff, J. D., & Ressler, K. J. (2016). Neuroimaging genetic approaches to Posttraumatic Stress Disorder. *Experimental neurology*, 284(Pt B), 141-152.

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)

[学会発表] (計 4 件)

- (1) 領家梨恵、「シンポジウム2「学習と条件づけの生理心理学」 強いストレス経験がその後の恐怖条件づけを増強させる生理学的基盤」、第34回日本生理心理学会大会、2016
- (2) 領家梨恵、「認知・意思決定における心理生物学的アプローチ - 神経内分泌に注目した研究 -、一度のストレス経験が引き起こす恐怖反応増強効果： PTSD 動物モデルとして」、日本心理学会第79回大会、2015
- (3) 領家梨恵、「ラットにおける先行ストレスが後の恐怖条件づけに及ぼす影響：単一ストレスと複合ストレスの比較」、第4回東北脳科学ウィンタースクール、2015
- (4) 領家梨恵、「ラットにおける一度のストレス経験が引き起こす恐怖反応増強効果」、東北ライフサイエンス若手の会第3回勉強会、2015

6. 研究組織

(1) 研究代表者

領家 梨恵 (Ryoke, Rie)
東北大学・加齢医学研究所・助教
研究者番号：10737464

(2) 研究協力者

住吉 晃 (Sumiyoshi, Akira)
野中 博意 (Nonaka, Hiroi)