

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 31 年 5 月 4 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05371

研究課題名(和文)人工受容体DREADDによる恐怖記憶の制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of neural mechanisms underlying fear memory using DREADD

研究代表者

吉岡 充弘 (Yoshioka, Mitsuhiro)

北海道大学・医学研究院・教授

研究者番号：40182729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は海馬セロトニン神経系と恐怖記憶の関係を明らかにすることであった。5-HT7受容体拮抗薬を腹側海馬に微量注入することで、恐怖記憶想起の指標であるすくみ行動が減少することを見出した。他に、5-HT7受容体作動薬が腹側海馬CA3領域の錐体細胞の神経発火率を増加させること、5-HT7受容体のmRNAがCA3領域に特に強く発現していることを見出した。一方、CA3では5-HT2C受容体も発現している。そこで我々は5-HT2C受容体欠損マウスを用いて実験を行い、これらのマウスにおいて恐怖記憶の消去が早いことを見出した。さらに、CA3領域の神経活動を選択的に操作できるDREADD法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心的外傷後ストレス障害(PTSD)患者に対してはセロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)が主に処方されているが、投薬治療に反応するのは半数程度に過ぎず、十分な効果を得られていない。さらに、その作用機序には不明な点が多く、治療法改善に向けての有力な手掛かりが無い状況が続いている。このように、恐怖記憶の神経基盤を解明し、効果的な治療法開発の方向付けを行うことが重要である。本研究はSSRIの作用機序の一端を解明すると同時に、恐怖記憶の神経メカニズムの詳細を部分的にはあるが明らかにしたものである。

研究成果の概要(英文)：The main aim of the present study is to elucidate the involvement of hippocampal serotonergic systems in fear memory. Microinjection of 5-HT7 receptor antagonist into the rat ventral hippocampus significantly suppressed the expression of freezing behavior, an index of fear memory retrieval in the contextual fear conditioning test. Electrophysiological data indicated that the 5-HT7 receptor agonist increased the frequency of action potentials in the ventral hippocampal CA3 pyramidal neuron. In situ hybridization demonstrated that Htr7 mRNA was abundantly expressed in the CA3 compared with other subregions of the hippocampus. Furthermore, it is known that 5-HT2C receptor is expressed in the CA3 subregion. We found that 5-HT2C receptor knockout mice tended to show rapid within-session extinction of fear, but not between-session extinction, compared to wild-type littermates. Moreover, we established the methods (DREADD) to control the neural activity in the CA3.

研究分野：精神薬理学

キーワード：セロトニン 人工受容体 PTSD

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の大地震・津波のような天災、戦争、虐待などの恐怖の記憶はヒトの脳に深く刻み込まれ、人々を長く苦しめる。特に 2011 年の東日本大震災以降、東北地方での心的外傷後ストレス障害(PTSD)患者の割合は 14.7%にまで達した(引用文献)。PTSD 患者に対してはセロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)が処方されているが、投薬治療に反応するのは半数程度に過ぎず、十分な効果を得られていない(引用文献)。さらに、その作用機序には不明な点が多く、治療法改善に向けての有力な手掛かりが無い状況が続いている。このように、恐怖記憶の神経基盤を解明し、効果的な治療法開発の方向付けを行うことが重要である。

海馬が恐怖記憶の制御に重要であることは広く知られており(e.g. 引用文献)、セロトニン神経起始核である背側縫線核・正中縫線核から神経投射を受けている(引用文献)。さらに上述のように SSRI が PTSD 治療にそれなりの効果はあることから、海馬のセロトニン神経が恐怖記憶の制御に関与している可能性が推定される。実際に応募者らは恐怖記憶の想起時に海馬におけるセロトニン遊離が上昇することを *in vivo* microdialysis 法を用いて見出している(引用文献)。セロトニン遊離は恐怖記憶を想起する刺激に曝露されている 30 分の間、継続的に上昇する。恐怖記憶を想起する刺激に 30 分曝露すると恐怖記憶の消去学習が生じることから(引用文献)、セロトニン遊離の上昇は恐怖記憶の想起・消去の双方に関与しているものと推測される。

しかしながら、この推測は相関研究に基づいたもので、その因果関係は明らかではなく、どのセロトニン受容体はその効果に関与するのかも、受容体下流のカニズムも不明である。これらの問題は従来の薬理学・電気生理学・遺伝工学的的方法(ノックアウトマウス)で解決できるだろう。

また、海馬は下位領域(CA1, CA3, Dentate gyrus など)に解剖学的にも機能的にも分かれているため、どの領域の受容体が重要なのか不明である。従来の実験技術では下位領域を区別して研究することが不可能であったが、Cre-loxP システムと人工受容体(Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs: DREADD, 引用文献)を組み合わせることでそれが理論上は可能になる。

人工受容体(DREADD)は端的に言えばあらかじめ *in vitro* で選択性の著しく高い受容体とリガンドを作り出した上で生体に強制発現させるという手法である。もう少し詳しく言えば、人工受容体は元々生体にある受容体に変異を起こし、本来のリガンドへの結合能を失わせ、別のリガンド(通常のマウスの脳内ではどの受容体にも作用しない)への結合能を持たせたものである。一般的には clozapine-N-oxide という通常は不活性の薬を用いて、それに対する結合能を持った G タンパク共役型人工受容体を用意する。後はその人工受容体を遺伝工学的に脳内に発現させれば、clozapine-N-oxide を全身投与することによっていつでも人工受容体を刺激できる。人工受容体を発現する細胞への影響は人工受容体に共役した G タンパクの種類によって変わる。例えば Gq タンパクとカップリングさせた人工受容体を用いれば、clozapine-N-oxide の投与によって細胞の活動を活性化できる。後は、Cre-loxP システムを用いて海馬の下位領域特異的にこの人工受容体を発現させれば、海馬下位領域選択的に神経活動を操作し、恐怖記憶の想起・消去への影響を調べることができる。応募者らは連携研究者である崎村健司教授(新潟大学)より、CA3 領域に選択的に cre タンパクを発現する遺伝子改変マウス(Grik4-cre マウス, 引用文献)を入手している。後は cre タンパクに誘導されて発現する人工受容体の遺伝子を持ったアデノ関連ウイルスベクターを海馬に局所注入すれば、理論上は海馬 CA3 を選択的に操作することができる。

2. 研究の目的

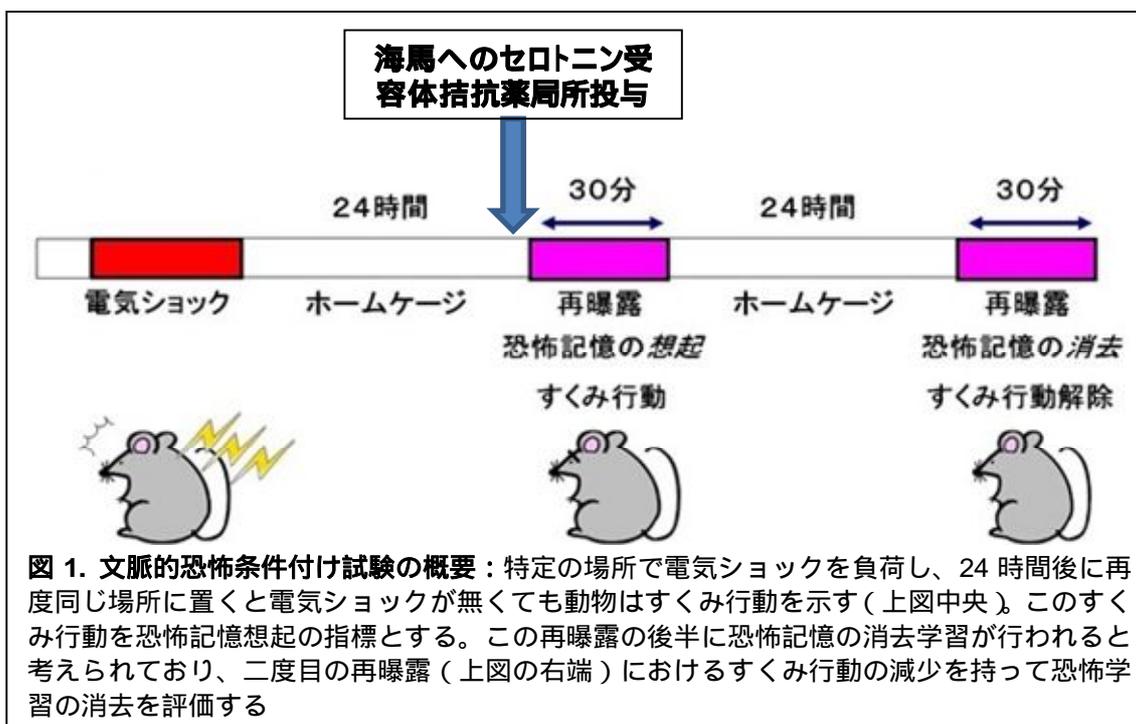
以上を踏まえ、本研究の目的は以下の 3 つとした。

- (1) 行動薬理学的手法により、恐怖記憶の想起・消去に関与する海馬セロトニン受容体を推定し、その詳細なシグナル伝達メカニズムについて電気生理学的手法で明らかにする。
- (2) (1)の知見に基づき、遺伝工学的手法(セロトニン受容体ノックアウトマウスなど)によって恐怖記憶の想起・消去に関与する 5-HT 受容体を同定する。
- (3) 人工受容体と Cre-loxP システムを用いて海馬の下位領域特異的に記憶の想起・消去における役割を解明する。

3. 研究の方法

(1) 海馬には 14 種類のセロトニン受容体のうち、ほぼ全てが発現している(引用文献)。そのうち不安・恐怖や記憶・学習に関与すると推定されている 8 種類の受容体(5-HT_{1A}, 2A, 2C, 3, 4, 5A, 6 and 7)について、それぞれの拮抗薬の海馬局所投与を行い、恐怖記憶の想起・消去に関与するセロトニン受容体を推定する。恐怖記憶の評価には既に確立された文脈的恐怖条件付け試験を用いる(次ページ図 1 参照)。特定の場所で電気ショックを負荷された動物は後日その場所に戻すと(再曝露)電気ショックがなくてもすくみ行動を示す。これは前日の恐怖体験を覚えているからだと考えられるため、このすくみ行動をもって恐怖記憶の想起と見なす。このすくみ行動は徐々に減少することが知られており、その減少が恐怖記憶の消去学習(実際には「こ

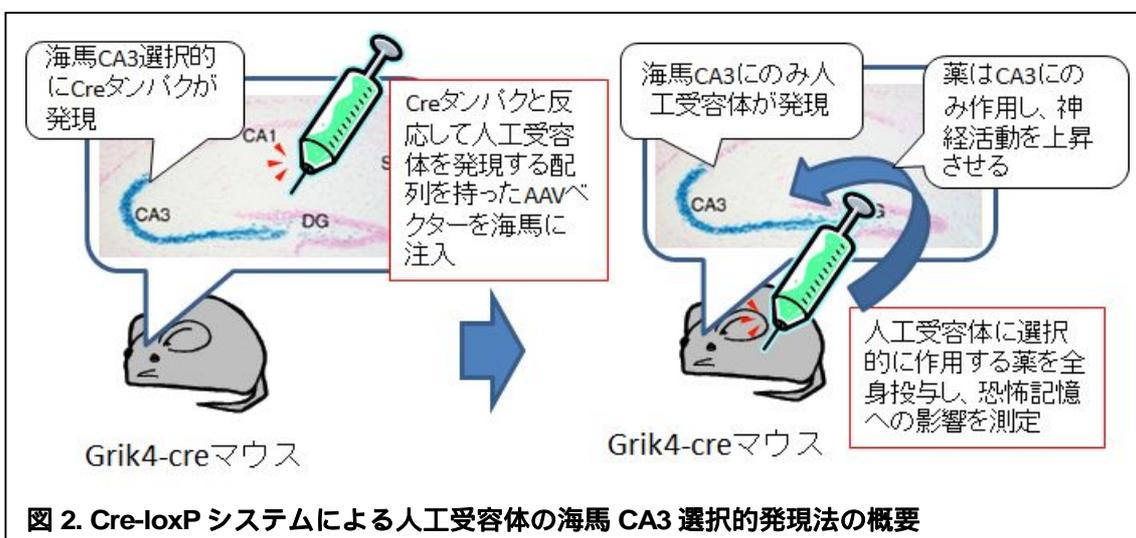
こは安全」という情報の上書きだと考えられているが、便宜上ここでは消去と呼ぶ)を反映していると考えられている。海馬へのセロトニン受容体拮抗薬投与を再曝露の直前に行うことで、恐怖記憶の想起・消去に対するセロトニン受容体の関与を検証する。



さらに、恐怖記憶の想起・消去への関与が推定されたセロトニン受容体について、そのシグナル伝達の詳細をパッチクランプ法によって追求する。セロトニン受容体刺激による効果に hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels が関与することが指摘されている(引用文献)。HCN サブタイプのうち HCN2, 4 の mRNA が海馬に強く発現するという予備的結果を得ているため、HCN channels の関与も voltage sag の変化などを調べることで検証する。

(2) (1)によれば、5-HT_{2C} 受容体が消去学習に関与する可能性が高いため、5-HT_{2C} 受容体ノックアウトマウスを Jaxson Laboratory から入手し、(1)と同様の行動試験を実施する。

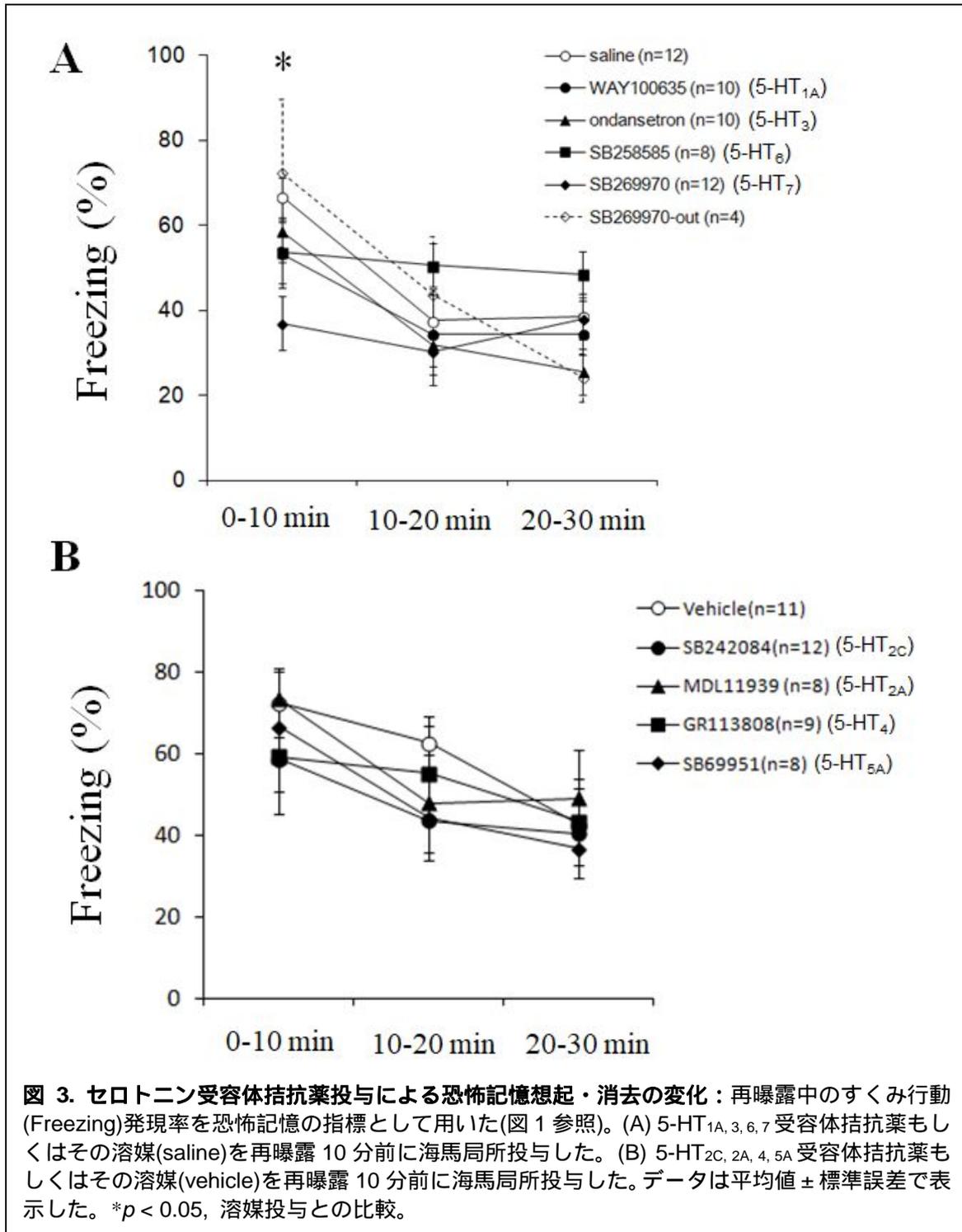
(3) 5-HT_{2C} 受容体は比較的海馬の CA3 領域に強く発現しているという先行知見(引用文献)を基に、本研究では、CA3 領域の錐体細胞選択的に cre タンパクを発現する遺伝子改変マウス(Grik4-cre マウス, Akashi et al., 2009)を用いる。このマウスの海馬に cre タンパクに誘導されて発現する人工受容体の遺伝子配列を持ったアデノ関連ウイルス(AAV)ベクターを注入する。この組み合わせによって海馬 CA3 領域選択的に人工受容体を発現させることができる(下図 2 参照)。今回用いる人工受容体はヒト M3 ムスカリン様アセチルコリン受容体をベースとして、アセチルコリンに対する親和性を除去し、通常は不活性の薬剤 clozapine-N-oxidase に対してのみ反応するような変異を加えた受容体(hM3Dq)を予定している。この受容体は Gq タンパ



クとカップリングしているので、clozapine-N-oxide の全身投与によって海馬 CA3 の錐体細胞を選択的に活性化させることになる。AAV ベクターは連携研究者の山中章弘教授(名古屋大学)より供与してもらう。

4. 研究成果

(1) 8 種類の受容体(5-HT_{1A}, 2A, 2C, 3, 4, 5A, 6 and 7)について、それぞれの拮抗薬の海馬局所投与を行った結果、恐怖記憶の想起には 5-HT₇ 受容体が関与することが見出された(下図 3A 参照)。恐怖記憶の消去については、5-HT_{2C} 受容体が関与する可能性が示唆された(下図 3B 参照)。



さらに、5-HT₇ 受容体の機能をパッチクランプ法によって追究し、海馬 CA3 領域の錐体細胞に発現する 5-HT₇ 受容体を刺激することで HCN channels の機能が亢進し、入力に対する感度が上昇する(反応しやすくなる)ことが見出された。また、この感度が恐怖条件付けによっても上昇することが見出されたことから、恐怖体験が海馬の入力応答感度を 5-HT₇ 受容体を介して上昇させ、その後の関連刺激に対する応答を過敏にしていることが推測された。

(2) これまでの薬理的結果におおよそ一致する結果を得ることができた。つまり、5-HT_{2C} 受容体ノックアウトマウスにおいて恐怖記憶消去の促進が見られることが判明した。恐怖記憶の想起そのものには変化が見られなかった。しかし、この促進効果は翌日の恐怖記憶想起には影響しなかったことから、恐怖記憶の消去記憶獲得が促進されてもその記憶の固定は促進されず、5-HT_{2C} 受容体は PTSD(心的外傷後ストレス障害)などの疾患に対する治療標的としてはあまり期待できないことが示唆された。また、別の行動試験を実施することで、自発運動量が 5-HT_{2C} 受容体ノックアウトマウスにおいて高く、特に新奇環境において馴化が遅いことが分かった。さらに、5-HT_{2C} 受容体ノックアウトマウスでは不安水準も低いことも見出した。このように、5-HT_{2C} 受容体は、記憶に関わる PTSD のような疾患よりもむしろ全般性不安障害のような疾患の治療標的として期待できることが示唆された。なお、このデータは論文投稿準備中であるため、具体的なデータ図表の掲載は控えたい。

(3) 神経活動上昇のマーカーとして c-Fos タンパクを用い、免疫染色法によって確認した。人工受容体を発現させたマウスに clozapine を投与した場合においてのみ、海馬 CA3 領域における c-Fos タンパク発現が上昇した。なお、当初の計画では clozapine-N-oxide を人工受容体の刺激薬として使用する予定であったが、その後 clozapine-N-oxide が血液脳関門を通過できないとする論文が発表されたことを踏まえ(引用文献)、代替案として低用量の clozapine を人工受容体の刺激薬として用いることとした。

さらに、少数例ながら人工受容体と低用量 clozapine を用いた海馬 CA3 領域の選択的活性化によって、恐怖記憶の消去が阻害される傾向が見られた。この活性化操作は恐怖記憶想起の直後(消去記憶獲得の直後)に実施されたことから、海馬 CA3 領域は消去記憶の固定化に關与しているものと推測される。なお、このデータは論文投稿準備中であるため、具体的なデータ図表の掲載は控えたい。

< 引用文献 >

Onose T, Nochioka K, Sakata Y, Miura M, Tadaki S, Ushigome R, Yamauchi T, Sato K, Tsuji K, Abe R, Miyata S, Takahashi J, Shimokawa H; CHART-2 Investigators. Predictors and prognostic impact of post-traumatic stress disorder after the great East Japan earthquake in patients with cardiovascular disease. *Circ J.* 2015;79:664-7.

Alexander S, Kuntz S. PTSD-related sleep disturbances: is there evidence-based treatment? *JAAPA.* 2012; 25:44, 47-8, 50-1.

Holt W, Maren S. Muscimol inactivation of the dorsal hippocampus impairs contextual retrieval of fear memory. *J Neurosci.* 1999;19:9054-62.

Trivedi MA, Coover GD. Lesions of the ventral hippocampus, but not the dorsal hippocampus, impair conditioned fear expression and inhibitory avoidance on the elevated T-maze. *Neurobiol Learn Mem.* 2004;81:172-84.

Azmitia EC, Segal M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol.* 1978;179:641-67.

Ohmura Y, Izumi T, Yamaguchi T, Tsutsui-Kimura I, Yoshida T, Yoshioka M. The serotonergic projection from the median raphe nucleus to the ventral hippocampus is involved in the retrieval of fear memory through the corticotropin-releasing factor type 2 receptor. *Neuropsychopharmacology.* 2010;35:1271-8.

Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, Masushige S, Silva AJ, Kida S. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci.* 2004;24:4787-95.

Mamiya N, Fukushima H, Suzuki A, Matsuyama Z, Homma S, Frankland PW, Kida S. Brain region-specific gene expression activation required for reconsolidation and extinction of contextual fear memory. *J Neurosci.* 2009;29:402-13.

Armbruster BN, Li X, Pausch MH, Herlitze S, Roth BL. Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potentially activated by an inert ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:5163-8.

Akashi K, Kakizaki T, Kamiya H, Fukaya M, Yamasaki M, Abe M, Natsume R, Watanabe M, Sakimura K. NMDA receptor GluN2B (GluR epsilon 2/NR2B) subunit is crucial for channel function, postsynaptic macromolecular organization, and actin cytoskeleton at hippocampal CA3 synapses. *J Neurosci.* 2009;29:10869-82.

Tanaka KF, Samuels BA, Hen R. Serotonin receptor expression along the dorsal-ventral axis of mouse hippocampus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2012;367:2395-401.

Chapin EM, Andrade R. A 5-HT(7) receptor-mediated depolarization in the anterodorsal thalamus. II. Involvement of the hyperpolarization-activated current I(h). *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;297:403-9.

Gomez JL, Bonaventura J, Lesniak W, Mathews WB, Sysa-Shah P, Rodriguez LA, Ellis RJ, Richie CT, Harvey BK, Dannals RF, Pomper MG, Bonci A, Michaelides M. Chemogenetics revealed: DREADD occupancy and activation via converted clozapine. *Science.*

2017;357:503-507.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Kumamoto H, Yamaguchi T, Konno K, Izumi T, Yoshida T, Ohmura Y, Watanabe M, Yoshioka M. Repeated fluvoxamine treatment recovers early postnatal stress-induced hypersociability-like behavior in adult rats. *Journal of Pharmacological Sciences*, 136: 1-8, 2018. DOI:10.1016/j.jphs.2017.12.002. 査読有

Ohmura Y, Yoshida T, Konno K, Minami M, Watanabe M, Yoshioka M. Serotonin 5-HT7 receptor in the ventral hippocampus modulates the retrieval of fear memory and stress-induced defecation. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 19: pyv131. 2016. DOI:10.1093/ijnp/pyv131. 査読有

他 6 件

〔学会発表〕(計 17 件)

大村優, 吉田隆行, 吉岡充弘: 恐怖記憶の想起・消去に関わるセロトニン神経系回路. 第 90 回日本薬理学会, 2017

Ohmura Y, Tanaka F K, Yamanaka A, Yoshioka M. Distinct serotonergic systems regulate anxiety, depression, and impulsivity. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, 2018.

他 15 件

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：吉田 隆行

ローマ字氏名：Yoshida Takayuki

所属研究機関名：北海道大学

部局名：医学研究院

職名：助教

研究者番号 (8 桁): 60374229

研究分担者氏名：大村 優

ローマ字氏名：Ohmura Yu

所属研究機関名：北海道大学

部局名：医学研究院

職名：講師

研究者番号 (8 桁): 80597659

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。