

令和元年6月6日現在

機関番号：35302

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21532

研究課題名(和文) CGRPはPTSDの治療ターゲットになる得るか？

研究課題名(英文) Searching for PTSD treatments

研究代表者

橋川 成美(芳原成美)(Hashikawa-Hobara, Narumi)

岡山理科大学・理学部・准教授

研究者番号：30511159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：心的外傷後ストレス障害(PTSD)はショック体験後時間が経過しても、ある条件下により強い恐怖を感じることをいう。本研究はマウスを用いてPTSDに対する治療法としてCGRPの投与が有効ではないかと考え実験を行なった。CGRPは分子量が小さく体内で様々な生理作用を行なっている。その結果、CGRP投与によりマウスが恐怖を覚えなくなることを明らかにした。この理由は脳のドパミン神経系による変化によるものではないかと考えたが、直接的なものではなく、二次的なものであることが示唆された。そこで他の遺伝子群を調べたところ、Npas4とArcの増加が見られた。今後は、これらの遺伝子の変化について研究を進めていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国は自然災害が多く、心的外傷後ストレス障害(PTSD)の患者が増えつつある。東日本大震災発生から半年後の調査結果によるとPTSDに該当する患者が15%であり、一般的には生涯有病率が9%であることを考えると重要な社会問題である。PTSDにおける唯一の薬物療法はセロトニン選択的再取り込み阻害剤であるが、この薬物に対する治療効果は相対的に小さく、新たな治療薬開発が求められている。本研究ではCGRPをマウスに脳室内投与することにより、恐怖記憶の保持を抑制することが明らかとなった。今後はCGRPがどのようにして恐怖記憶に関するかを明らかにし、新たな創薬ターゲットとなることを目的とする。

研究成果の概要(英文)：Post-traumatic stress disorder (PTSD) is a condition that can manifest when an individual has experienced an extremely traumatic event. In this study, we examined whether CGRP administration could be effective as a treatment for PTSD. CGRP has a small molecular weight and performs various physiological actions in the body. We have observed CGRP administration reduced mice freezing time. The gene expression data implicated dopamine in the erasure of fear memories, however, extensive experimentation forced to reject this hypothesis. Then, we found increase of Npa4 and Arc gene expression in mouse brain. Further work to elucidate the exact mechanism is needed.

研究分野：薬理学

キーワード：PTSD 恐怖記憶 マウス CGRP

## 1. 研究開始当初の背景

### 1) 恐怖記憶制御における CGRP の役割を検討する

カルシトニン遺伝子関連ペプチド ( calcitonin-gene related peptide; CGRP ) は強力な血管弛緩作用をもつ神経伝達物質であり、近年では中枢神経系に関する報告が増加してきている。たとえば、恐怖や不安に関与する分界条床核(BNST)に CGRP を投与すると、不安様行動を誘発すること(Sink et al., 2011 J Neurosci.)や、NMDA 受容体拮抗薬投与により障害された学習記憶力が CGRP により改善された(Bouchard et al., 1997 Eur. J. Neurosci.)など報告がなされている。しかしながら、CGRP と恐怖記憶行動における報告はまだない。

### 2) なぜ恐怖記憶制御の研究が求められているのか？

外傷性のストレスは恐怖を呼び起こさせる出来事からなる。例えば、事故や災害、戦争、性的暴力などが心的外傷後ストレス障害(posttraumatic stress disorder; PTSD)を引き起こす。一般人口における PTSD の生涯有病率は 9%前後である。東日本大震災発生から 6 か月後に調査を行った結果では、PTSD に該当する患者が 14.7%であり、男性より女性の方で多く見られた(Circ J 2015; 79:664-667)。症状は、再体験(フラッシュバック)、回避(体験を思い出すような場面を避け続ける)、過覚醒(睡眠障害など)の 3 群に分類される。アメリカ食品医薬品局(FDA)が承認する唯一の薬物治療法は、セロトニン選択的再取り込み阻害剤(selective serotonin reuptake inhibitors; SSRIs)である。しかしながら、この薬物に対する治療効果は相対的に小さく、特に男性の退役軍人においては、治療抵抗性を示す報告もされている(Hertzberg et al., 2000)。もし、恐怖記憶制御の機序が明らかとなれば、PTSD に対する治療薬開発につながる可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

申請者は CGRP の中枢神経における作用発現の解明を目指し、マウスの行動試験を展開している。CGRP がうつ様行動を改善すること、これには神経栄養因子の増加を CGRP が促進していることを世界に先駆けて報告してきた(Scientific Reports, 2015; Cell Mol. Bio., 2015)。これらの研究結果をもとに、CGRP がうつ様行動を改善するならば、恐怖体験により示すうつ様行動にも効果があるのではないかとという着想に至った。そこで、CGRP を脳室内投与し、受動的回避反応課題あるいは恐怖条件づけ文脈学習を行ったところ、有意に恐怖記憶形成の消去が見られた。また、他の記憶行動試験(空間学習能力や作業記憶)においては影響を見せなかったことから、CGRP は恐怖記憶に特異的に作用すると考えられた。そこで、本研究では、CGRP による恐怖記憶制御に関わる情報伝達経路及び遺伝子群の同定と、遺伝子発現制御機構の解明を行うことを目的とする。

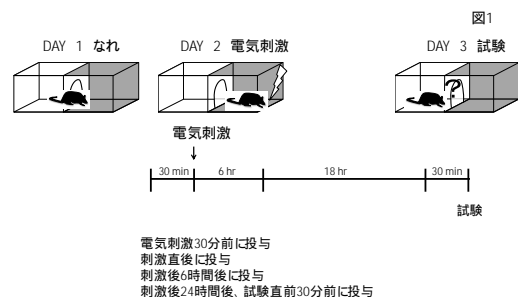
## 3. 研究の方法

### 恐怖記憶の消去に対する CGRP 脳室内投与の効果及び機序の解明を検証する。

記憶は、学習 獲得 保持 想起により形成されることが明らかとなっている。恐怖記憶を形成するには、記憶を思い出し、恐怖を感じることで、脳内に記憶が固定化(貯蔵)される。その後、記憶の想起により恐怖を感じる必要がなくなれば、恐怖感が薄れる。これを「恐怖記憶消去」という。この流れを受動的回避反応試験あるいは、条件づけ文脈学習試験において C57BL6/J 雄性マウスを用いて実験を行う。

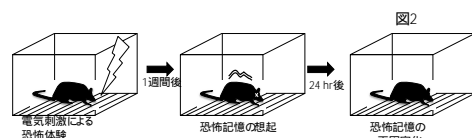
#### 1. 受動的回避反応試験

マウスは暗いところを好む習性がある。明箱から暗箱に入ると、足に軽い電気ショック(0.3mA)がかかるように設定し、恐怖体験を負荷する。電気刺激から 24 時間後、同じチャンパーに入れると、恐怖記憶の想起が起こり、恐怖記憶が増強される。その後、暗箱に移動しても電気ショックが与えられなければ、恐怖記憶の消去が誘導される。そこで、どのタイミングで CGRP が記憶形成に関与するかマウスを 4 群に分けて調査する。図 1 におけるポイント①-④でそれぞれ脳室内投与を行い、試験日に暗箱に入るまでの時間を計測することで、CGRP の記憶形成機序について検討を行う。



#### 2. 条件付け文脈学習試験

次に、CGRP が恐怖記憶消去に関与している可能性について検討を行う。記憶は思い出すことで不安定な状態となり、安定な記憶として脳内に再び貯蔵されるか、あるいは消去されるか分かれる。そこで、条件づけ文脈学習法(図 2)により、記憶の再固定化あるいは消去の CGRP 投与の影響をマウスのすみ行動を観察することで変化を調査する。CGRP 投与ポイントは、電気刺激後、恐怖記憶の想起後、想起後 24 時間後の試験直前とし、す



くみ行動の時間が投与により減少するかどうか調べる。

#### 4. 研究成果

##### **CGRP 投与時期により恐怖記憶に与える影響は異なる**

条件付け文脈学習試験において、恐怖を与えた1週間後に、記憶を想起させる前に CGRP を脳室内投与しても恐怖記憶の保持に変化は見られなかった。一方、恐怖記憶を想起させた直後に CGRP を脳室内投与すると、恐怖記憶消去作用が有意に抑制されていた。つまり、CGRP 投与により恐怖記憶を長く覚えていた。この効果は CGRP を投与してさらに1週間経っても継続して記憶の保持が見られ、対照群である生理食塩水投与群と比べて、有意な差が見られた。このメカニズムに アミノ酪酸 (GABA) 作動性神経の関与を考えたため、GABA 受容体阻害薬である picrotoxin を投与した。その結果、CGRP の恐怖記憶保持の抑制が見られた。これらの結果は論文番号 1 に報告済みである。また、この結果は CGRP 投与による記憶の影響には投与する時期が非常に重要であることが示唆された。

##### **恐怖記憶直後に投与した CGRP による恐怖記憶保持の抑制はドパミン神経によるものではない**

受動回避試験、条件付け文脈学習試験において、CGRP の記憶への影響をより詳細に調べるため、恐怖を与えた直後に CGRP 脳室内投与を行うと、くみ行動の有意な低下が観察された。この CGRP の作用機序に、ドパミン神経系が関与するのではないかと仮説をたて、ドパミン受容体阻害薬としてよく知られる、ハロペリドールを投与し、実験を行なった。その結果、ハロペリドールによりくみ行動の延長が見られ、CGRP の作用を抑制している結果が得られた。さらに、脳海馬におけるドパミン産生酵素の遺伝子発現変化をリアルタイム PCR により解析した結果、ドパデカルボキシラーゼの有意な増加が CGRP 脳室内投与により見られた。しかしながら、海馬中のドパミン量を測定すると CGRP により減少する傾向 ( $p=0.052$ ) が見られた。この異なる結果を明らかにするため、ドパミン代謝酵素の MAOb を測定した。MAOb はドパミンを代謝、分解することそうである。MAOb は mRNA, protein いずれも有意に CGRP 投与により増加していた。これらの結果より、海馬中のドパミン量が少ないのは、MAOb の増加により代謝される量が増えたためではないかと考えた。そこで、MAOb 阻害薬であるセレギリンをマウスに投与し、CGRP の恐怖記憶への影響が抑制されればドパミン神経系への関与かどうかを明らかにするのではないかと考えた。その結果、セレギリンは CGRP 非依存的に恐怖記憶を減少させることが明らかとなった。それでは、ハロペリドールの恐怖記憶への影響は何が起こっていたのかをさらに詳細に検討するため、マウスの不安様行動を観察した。不安様行動として汎用されている試験系のオープンフィールドテスト、Light transition test, hole board test を行なったところ、ハロペリドールを投与することで、不安様行動を誘発することが示唆された。以上の結果より CGRP 脳室内投与によるくみ行動の減少はドパミン量が変化したために起こったのではなく、別の機構が働いた結果、二次的にドパミン代謝酵素が変化したためと考えられた。

CGRP による恐怖記憶保持の抑制に何が関与しているか予想をたてるため、マイクロアレイ解析をおこなった。その結果、CGRP により 1284 の遺伝子が2倍以上に増加し、そのうち 538 の遺伝子が3倍以上に増加した。その中で着目したのが、3~4 倍に増加した Npas4 と6倍に増加した Arc 遺伝子である。これらの遺伝子はうつ病や神経疾患そして恐怖記憶と関連のある遺伝子として知られている。今後は CGRP 投与によりなぜこれらの遺伝子が変化するのか、これらの遺伝子が恐怖記憶保持の抑制に関与しているかどうか実験を行う予定である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. 三島脩太、松内省太、大塚青海、橋川直也、橋川成美 「カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) と恐怖記憶に関する研究」 岡山理科大学紀要. A, 自然科学 (2018)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 三島脩太、大塚青海、松内省太、福将花奈、西村航輝、橋川直也、橋川成美  
恐怖記憶学習における CGRP と Npas4 の関係性に関する研究  
第 134 回日本薬理学会近畿部会 2018, 11.23 神戸
2. S. Mishima, A. Otsuka, K. Fukumochi, K. Nisihimura, N. Hashikawa, N. Hashikawa-Hobara  
Effects of intracerebroventricular administration of CGRP on fear response  
Society for Neuroscience 2018, San diego CA USA, Nov. 3-7.
3. Shuta Mishima, Ami Otsuka, Naoya Hashikawa, Naumi Hashikawa-Hobara  
Effects of intracerebroventricular administration of CGRP on fear memory in mice  
18th world congress of basic and clinical pharmacology WCP2018 KYOTO, 2018, July 1-6

4. 三島脩太、大塚青海、橋川直也、橋川成美  
CGRP 脳室内投与がマウス脳海馬に与える影響  
第 138 回日本薬理学会関東部会 2018, 03.10 東京

5. 三島脩太、長瀬清太郎、森田慶志、橋川直也、橋川成美  
カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)脳室内投与がマウス恐怖記憶に与える影響  
第 56 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会 2017. 10.21-22  
徳島

6. 三島脩太、長瀬清太郎、森田慶志、橋川直也、橋川成美  
カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)脳室内投与がマウス恐怖記憶に与える影響  
日本組織培養学会第 90 回大会 2017. 6.30, 7.1 岡山

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：橋川直也

ローマ字氏名：Naoya Hashikawa

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。