

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18591290

研究課題名（和文）PTSD モデルラットを用いた本障害の発生脆弱性や新規治療法開発の研究
 研究課題名（英文）The study of vulnerability for PTSD and the development of newer treatment using PTSD model rats.

研究代表者

小鶴 俊郎（KOZURU TOSHIRO）

広島大学・病院・助教

研究者番号：70346493

研究成果の概要：本研究は、PTSD モデルラットである SPS 負荷ラットを用い、母子分離が PTSD 症状に与える影響や病態形成に関する恐怖記憶の固定化及び消去の分子メカニズムを検討した。その結果、幼少期の不遇な養育環境が成熟後の PTSD 症状を悪化させる可能性や、治療を阻害する可能性が明らかとなった。恐怖記憶の消去障害には、海馬 NMDA 受容体の関与や D-cycloserine の新規治療薬としての可能性が示唆された。また、恐怖記憶の固定化には、海馬 BDNF のエピジェネティックな変化の関与も示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,200,000	0	1,200,000
2007 年度	900,000	270,000	1,170,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	630,000	3,930,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：ストレス、PTSD、母子分離、extinction、BDNF、ヒストン

1. 研究開始当初の背景

現代社会は社会情勢を背景に心理社会的ストレスに起因した、うつ病や外傷後ストレス障害 (PTSD) などのストレス性精神障害が増大している。ストレス性精神障害の発症危険因子として、幼児期の虐待や両親の離婚など幼少期の心的外傷体験が挙げられる。幼少期に長期の虐待体験をもつ PTSD 患者では幼少期虐待体験のない PTSD 患者に比べて、多様な精神症状（不安・恐怖症状、極度の孤立・離人感、希望喪失と絶望の感覚等）の亢進がみられ薬物治療抵抗性であることから、病態

メカニズムの異なる可能性が指摘されている。一方、PTSD の病態機序はまだ明らかになっていないが、最近 PTSD の病態を単に不安・恐怖症状の亢進とみなさず、特に認知行動療法の本疾患への有効性という事実からも示唆されるように、恐怖記憶の固定化の過剰と消去の減弱とみなして、記憶機能の分子メカニズムから本障害の病態を明らかにしようとする試みもある。以上より、PTSD の病態機序、さらには幼少期虐待体験のおよぼす成人期 PTSD 難治化の分子メカニズムを、不安・恐怖記憶の固定 (consolidation) の亢進や消

去 (extinction) の減弱という記憶機能の観点から明らかにすることは、その治療法開発の基盤を築く上で有意義な知見が得られると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、PTSD モデルラットである single prolonged stress (SPS) 負荷ラットを用い、幼少期の不遇な環境が PTSD 症状に与える影響や恐怖記憶の固定化及び消去の分子メカニズム、これらの知見に基づく新規治療法の開発を明らかにすることを目的とする。具体的には、①母子分離により、SPS ラットにみられる不安・恐怖行動の変化、PTSD 治療薬である paroxetine の効果、②SPS ラットにみられる恐怖記憶の消去障害への海馬 NMDA 受容体の関与、NMDA 受容体のアゴニストである D-cycloserine (DCS) の効果、③恐怖記憶の固定化への海馬 BDNF (brain-derived neurotrophic factor) の関与及びヒストンアセチル化の変化、などを検討する。なお、本研究で用いる PTSD モデルラットである、Single Prolonged Stress (SPS) 負荷ラットは、視床下部-下垂体-副腎皮質系の過剰抑制や不安・驚愕反応の亢進など、PTSD 患者にみられる特徴的臨床症状をもつ、現時点で最も臨床病状に類似した病態モデルと考えられている。

3. 研究の方法

PTSD モデルラットである SPS 負荷ラットは、拘束ストレス 2 時間・強制水泳 20 分・エーテル深麻酔、の連続暴露後 7 日間の無接触期間を経て作成した。

課題 1) 母子分離 (NI) の PTSD 症状 (不安・恐怖行動) 及び薬物抵抗性へ及ぼす影響の解析：

NI 群は SD 雄性ラットを生後 2-9 日まで 1 日 1 時間、母親や同胞から分離した。誕生後通常的环境下で飼育したものを Sham 群とした。8 週齢で SPS ストレス負荷を行い、9 週目で以下の行動実験を行った。自発運動量の解析には Open field locomotor (OFL) 試験を行い、48 cm 四方の場にラットを置き、水平方向の運動量をコンピュータにて 5 分間計測した。不安の評価には高架式十字迷路 (EPM) を用い、オープンアームとクローズドアームへの進入回数、滞在時間を 5 分間、計測した。場所記憶に伴う恐怖感の評価は、恐怖条件づけ試験 (CFT) を用いた。ラットをスキナー箱に入れ、3 分経過後 0.8mA、4 秒間のフットショックを与え、24 時間後に再びラットを同じ箱に入れて、3 分間のすくみ行動 (呼吸に関連した動き以外無動の状態) 時間を計測した。薬物抵抗性に関する実験については、SPS 負荷後から 7 日間、飲水中に paroxetine (PRX)

(0.1 mg/ml) を溶解して投与後に、上記と同様の方法で CFT を行いすくみ行動を計測した。薬物投与群の対照としては、溶媒である vehicle 投与群を作成した。

課題 2) PTSD モデルラットを用いた恐怖記憶の消去障害のメカニズムの解析：

恐怖記憶の形成には、ケージ (空間記憶) とフットショック (FS) を用いた恐怖条件づけ試験を用い、恐怖記憶の評価はすくみ行動を計測することで行った。消去機能の評価は、SPS 負荷後 7 日目にラットに恐怖条件づけを行い、翌日から連続 5 日間、FS を与えずに 10 分間同じケージに暴露し、すくみ行動時間を計測した。DCS の投与は、フットショック施行直後から extinction (EX) トレーニング最終日までの 6 日間、経口投与にて行った。FS 直前、EX トレーニング 1, 4 回目終了後、及び DCS 投与群の EX トレーニング 4 回目終了後に、ラット海馬を摘出し、NMDA 受容体の各サブタイプ (NR1, NR2A, NR2B, NR2C) の mRNA の発現を real-time PCR 法で解析し、SPS, Sham 群間での発現の差を検討した。

課題 3) PTSD モデルラットを用いた恐怖記憶の固定化亢進のメカニズムの解析：

PTSD の病態形成において、恐怖記憶の固定化の亢進が深く関わっている可能性が提唱されており、その脳内機序について解析を行った。恐怖記憶の形成はフットショックにて行い、フットショック暴露後 2 時間の時点で、記憶の固定化に関与している BDNF の海馬での発現 (total BDNF, exon1, exon2, exon4, exon6) を real-time PCR 法を用いて解析した。実験はコントロール群である Sham 群・Sham+CFT 群・SPS 群・SPS+CFT 群の 4 群にて行った。さらに、BDNF mRNA 発現の亢進機序を解明する目的でクロマチン免疫沈降法を用い、exon 上流の promoter 領域のヒストンのアセチル化亢進の有無を調べた。

4. 研究成果

課題 1) SPS 群は Sham 群に比べ有意に、EPM でオープンアームへの進入回数や進入時間の割合が減少し、CFT でのすくみ時間も長く、不安・恐怖行動の亢進がみられた。自発運動量に、両群間で差はなかった。NI を受けた SPS 負荷ラットは、正常飼育の SPS 負荷ラットに比べ、不安行動の亢進、すくみ行動の亢進がみられた。薬物抵抗性に関する実験については、NI + SPS + PRX 群は NI + SPS + Vehicle 群と比べて、有意にすくみ時間は短縮していた。NI + SPS + PRX 群は Sham + SPS + PRX 群に比べ、有意にすくみ時間は亢進していた。これらの所見は、PTSD 患者での不安、回避、再体験に類似しており、SPS 負荷ラットの PTSD モデルとしての妥当性及び蓋然性を示す。

NIを体験しSPSに暴露されたラットでこれらの所見がさらに亢進したことは、幼少期に不遇な体験をし、その後 PTSD を発症した患者の病状が重篤であるという後方視的な臨床研究を支持している。すなわち、幼少期の不遇な養育環境が成熟後の PTSD 症状を悪化させる可能性や、PTSD 治療薬である paroxetine の効果を阻害する可能性を示唆していると思われる。

課題2) 恐怖条件付け後1日目のすくみ行動には2群間で、差はなかった。恐怖条件付け後2日目から5日間、Sham群と比較してSPS群に有意なすくみ行動の亢進がみられた。DCSの投与により、SPS群にみられたすくみ行動の亢進は、Sham群と同一のレベルにまで改善された。改善効果は持続的で、EXトレーニング終了後7日経過した時点でも認められた。海馬mRNA発現解析の結果、FS直前・EXトレーニング1回目及び4回目終了後のすべてにおいて、Sham群と比較してSPS群ではNMDA受容体の各サブタイプの発現亢進が認められた。しかしDCSの投与により亢進したSPS群のNMDA受容体mRNA発現は、各サブタイプでSham群のレベルにまで改善した。SPSラットのすくみ行動の亢進は、恐怖記憶の消去障害を意味しており、本モデルが行動学的にPTSDモデルとして有用であることを示唆する。同時にDCSによるSPSラットのすくみ行動の改善は、恐怖記憶の消去障害の修復を意味している。これまでにラットを用いた実験で、DCSの消去機能の促進は報告されているが、PTSDモデル動物に対する効果や臨床治療上の有効性についての報告はない。本結果は、PTSDにみられる恐怖記憶の消去障害がNMDA受容体発現の変化を介して引き起こされている可能性や、DCSの治療薬としての可能性を示唆していると思われる。

課題 3) mRNA 発現については、total BDNF 及び BDNF exon1, 2, 4 mRNA の発現が、SPS+CFT 群で有意に亢進していた。BDNF mRNA 発現の亢進機序を解明する目的でクロマチン免疫沈降法を行ったところ、SPS+CFT 群で BDNF 遺伝子の exon 1, 2, 4 の promoter 領域で histone 3, 4 のアセチル化が有意に亢進していることが判明した。このような結果は、PTSD の病態機序の一つと考えられている恐怖記憶の固定化の亢進に、海馬の BDNF 遺伝子発現の亢進が密接に関与していることを示している。そして BDNF 遺伝子発現の機序には、exon 上流の promoter 領域の histone アセチル化の亢進というエピジェネティックな変化の関与していることを示唆している。

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)

1. 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*, 査読有, 33, 2008, 2108-2116.
2. Imanaka A, Morinobu S, Toki S, Yamamoto S, Matsuki A, Kozuru T, Yamawaki S. Neonatal tactile stimulation reverses the effect of neonatal isolation on open-field and anxiety-like behavior, and pain sensitivity in male and female adult Sprague-Dawley rats. *Behav Brain Res*, 査読有, 186, 2008, 91-97.
3. 森信繁, 岩本泰行, 高橋輝道, 小鶴俊郎, 山脇成人
外傷後ストレス障害 (PTSD) の分子病態メカニズム — 病態モデル動物を用いた解析から —
実験医学, 査読無, 25, 2007, 2067-2072.
4. Iwamoto Y, Morinobu S, Takahashi T, Yamawaki S. Single prolonged stress increases contextual freezing and the expression of glycine transporter 1 and vesicle-associated membrane protein 2 mRNA in the hippocampus of rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 査読有, 31, 2007, 642-651.
5. Takahashi T, Morinobu S, Iwamoto Y, Yamawaki S. Effect of paroxetine on enhanced contextual fear induced by single prolonged stress in rats. *Psychopharmacology*, 査読有, 189, 2006, 165-173
6. Imanaka A, Morinobu S, Toki S, Yamawaki S. Importance of early environment in the development of post-traumatic stress disorder-like behaviors. *Behav Brain Res*, 査読有, 173, 2006, 129-137.

[学会発表] (計 7 件)

1. 森信繁

PTSD 動物モデルからみた恐怖記憶の障害の
脳内メカニズム。
第82回日本薬理学会年会 2009年3月17日、
横浜

2. Yamamoto S.

Effects of Single Prolonged Stress and
D-Cycloserine on Contextual Fear
Extinction and Hippocampal NMDA Receptor
Expression in a Rat Model of PTSD.
Neuroscience 2008, 2008/11/17, Washington
DC, USA.

3. 岩本泰行

Single prolonged stress (SPS) ラットを用い
た PTSD の分子生物学的研究
第29回日本生物学的精神医学会・第37回日
本神経精神薬理学会合同年会 2007年7月
13日、札幌

4. 山本茂人

PTSD にみられる恐怖記憶の消去障害に関す
る分子生物学的検討。
第29回日本生物学的精神医学会、2006年9
月15日、名古屋

5. 森信繁

外傷後ストレス障害動物モデルと記憶の消
去機能の障害
第29回日本神経科学大会 2006年7月19
日、京都

6. Yamamoto S

Impaired extinction and its molecular
mechanism in an animal model of PTSD.
XXV CIN Congress 2006/7/9, Chicago, USA.

7. Imanaka A

Importance of early environment in the
development of PTSD-like behaviors.
XXV CIN Congress 2006/7/9, Chicago, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小鶴 俊郎 (KOZURU TOSHIRO)

広島大学・病院・助教

研究者番号：70346493

(2) 研究分担者

森信 繁 (MORINOBU SHIGERU)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教
授

研究者番号：30191042

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

山本 茂人 (YAMAMOTO SHIGETO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科精神神
経医学部・研究員

武井 史朗 (SHIRO TAKEI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科精神神
経医学部・大学院生

岩本 泰行 (IWAMOTO YASUYUKI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科精神神
経医学部・大学院生

今中 章弘 (IMANAKA AKIHIRO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科精神神
経医学部・大学院生

松木 文 (MATSUKI AYA)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科精神神
経医学部・研究補助員