

令和 3 年 5 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07562

研究課題名(和文) PTSDの発症機構に即した予防法と神経活動操作による新規治療法の開発

研究課題名(英文) The development of the novel strategy for the prevention of PTSD, and of the novel treatment using neuromodulation.

研究代表者

淵上 学 (Fuchikami, Manabu)

広島大学・医系科学研究科(医)・講師

研究者番号：40403571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)： PTSD と副腎皮質ホルモンの関連は広く認識されているが、本研究では副腎皮質ホルモン受容体の活性化から海馬のアポトーシスに至るPTSDの病態形成過程をはじめて示すとともに、副腎皮質ホルモン受容体の阻害薬投与によってPTSDの発症を予防できる有望な可能性が示された。

また、精神神経疾患の治療において反復経頭蓋磁気刺激や経頭蓋直流電気刺激などのニューロモデュレーションが注目されており、本研究では、曝露課題を用いるPTSD治療において神経活動を賦活するニューロモデュレーションの併用が恐怖記憶の効果的な消去に有用であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外傷的ストレスによってストレスホルモンが放出され、PTSDの発症に至る分子生物学的機序の一端を明らかにする一方で、形成されたPTSDの神経回路異常を神経活動操作によって修正する方法を提唱するなど、基礎神経科学、臨床精神医学の双方の発展に寄与する重要な知見が得られたと考えられる。

研究成果の概要(英文)： Although the relationship between PTSD and corticosteroids is widely recognized, the present study is the first study indicated that activation of hippocampal glucocorticoid receptor (GR) in response to severe stress triggers the pathophysiological cascade that leads to impaired fear extinction, and the inhibition of hippocampal GR immediately after stress could be useful for preventing the development of PTSD.

In addition, neuromodulation approaches such as deep brain stimulation, may represent a promising treatment option for patients with PTSD who remain symptomatic even after conventional psychotherapy and/or medications, and the combined approach of neuromodulation with exposure-based therapy may lead to better therapeutic responses in PTSD. Our results indicated that neuronal activation with an adjunctive combination of exposure therapy could be useful for treating the impaired fear extinction characteristic of patients with PTSD.

研究分野：精神神経医学

キーワード： PTSDの発症機序 PTSDの予防法 PTSDの新規治療法 PTSDの異常な神経回路

## 1. 研究開始当初の背景

近年、交通事故や自殺、性犯罪や相次ぐ殺人報道、幼小児期の虐待や学校におけるいじめなどの社会問題の増加に加えて、大規模な自然災害やテロリズムも多発し、心的外傷後ストレス障害 (**posttraumatic stress disorder:PTSD**) に対する社会の関心が急速に高まりつつある。**PTSD** は重篤なストレス事象に遭遇後 1 か月以後に診断される疾患であり、ストレスへの曝露から病態の完成に至る過程は複雑で、その機序は十分に解明されておらず、治療の第一選択である持続暴露療法やセロトニン再取り込み阻害薬 (**SSRI**) の効果も限定的とされ、詳細な病態の解明に基づく新たな予防法・治療法の開発が必要とされている。

### PTSD の病態形成に関して

・ **PTSD** の発症過程からは、環境因が緊密に関連するエピジェネティック機構の関与が想定される。即ち、重篤なストレス暴露による副腎皮質ホルモンの過剰分泌を起点に、転写因子であるグルココルチコイド受容体 (**GR**) の核内移行から多様な脳内の遺伝子発現の変動が導かれ、結果として **PTSD** の病態が形成されると推測される。

・ モデル動物研究や患者の **MRI** 研究から **PTSD** における海馬萎縮が多数報告されている。一般に、ストレス負荷による海馬萎縮の機構として「アポトーシス制御機構の恒常性の変化 (抑制因子・ **Bcl-2**/促進因子・ **Bax** の相対的低下)」が提唱されている。

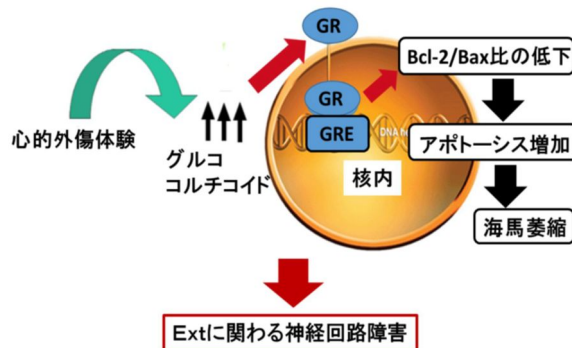
これらの知見から、**PTSD** の病態形成過程では「**GR** 系の亢進 海馬におけるアポトーシス関連遺伝子の発現変動 アポトーシスの促進と海馬の萎縮」という機序が想定される。

### PTSD の症候的側面から

・ **PTSD** の症状は多々あるが、その本質は恐怖記憶の消去 (**Extinction**: 以下 **Ext**) の障害が主要症状であることが提唱されている。

・ **PTSD** 治療の第一選択薬である **SSRI** は、**PTSD** における **Ext** 障害には有効ではなく、**Ext** の促進が新たな **PTSD** 治療の機序として注目されている。

以上 から想定される **PTSD** の発症機転、病態の仮説を右図に示す。



## 2. 研究の目的

本研究では、課題 1) として「**PTSD** の病態形成の契機となる詳細な脳内機構を解明し、機構に即した新規の予防法を開発すること」を、課題 2) として「**PTSD** における **Ext** 障害の異常な神経回路を同定し、その異常を神経活動操作によって修正するという新規の治療法を模索すること」を目的とする。

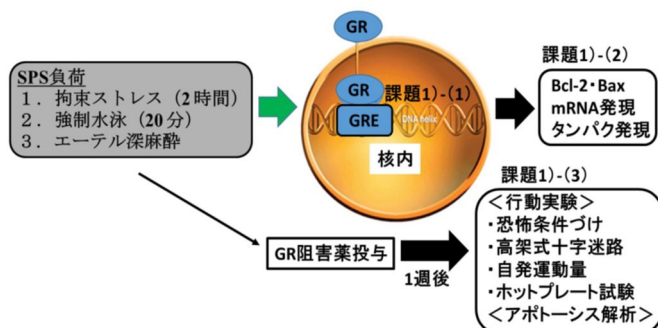
## 3. 研究の方法

本研究では、**Ext** 障害を呈する PTSD モデルである Single Prolonged Stress (SPS) ラットを用いた。SPS ラットは、視床下部 - 下垂体 - 副腎皮質系の過剰抑制や不安・驚愕反応の亢進及びストレス誘発鎮痛など、PTSD 患者の臨床特徴を持った動物モデルである。

**課題 1)(1)** SPS 負荷後、海馬での **GR** の核内移行が最大の 2 時間後とその後で、**GR** の **Bcl-2** と **Bax** 遺伝子プロモーターへの結合を解析する。

**課題 1)(2)** **Bcl-2** と **Bax** の mRNA 発現、タンパク発現の変化を解析する。

**課題 1)(3)** SPS 負荷前後の急性期の様々な時点で **GR** 阻害薬を投与し、SPS ラットで報告されている行動異常・アポトーシスの改善効果を検証する。



**課題 2)** **Ext** の障害は PTSD の病態における中核的な症状と考えられているが、その脳内メカニズムは解明されておらず、十分に有効な治療的介入法も確立されていない。脳局所の破壊実験や神経活動に影響を及ぼす薬物の局所投与と実験などから、消去の過程には扁桃核、腹側海馬、及び内側前頭前野皮質 (Medial prefrontal cortex: mPFC) が関与し、特に下辺縁皮質 (Infralimbic cortex: IL) 領域の神経活動の亢進が必要である事が報告されている。課題 2) では、SPS ラットを用いて、IL の興奮性神経細胞の賦活による **Ext** 障害の改善効果を検証した。

Ext の評価は、初日に恐怖条件付け [Foot Shock (FS) を 2 回] を行い、翌日に FS 無しで同じケージに暴露する Ext 訓練を行い、翌々日には同様の暴露を行う Ext 試験を行い、すくみ時間を計測した。神経細胞の賦活には化学遺伝的手法である DREADDs (designer receptors exclusively activated by designer drugs) を用いた。概要としては、興奮性神経細胞に極めて優位に発現する Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase のプロモーター配列を組み込んだ Adeno-associated virus を用いて、Clozapine-N-Oxide (CNO) によって特異的に活性化する human M3 muscarinic cholinergic Gq-coupled receptor を mPFC に遺伝子導入し、Ext 訓練の直前に CNO を腹腔内投与して mPFC を賦活する手法である。まず通常飼育 (Sham) ラットの mPFC を賦活し、Ext を促進するために適切な賦活のタイミング、脳部位を検討した。その後、Sham ラットを用いて設定した適切な賦活条件を適用し、SPS ラットの Ext 障害に対する IL 賦活の影響を検証した。続いて、IL 賦活による Ext の促進効果、SPS ラットの Ext 障害と IL 賦活によるその改善効果の機序を検討するため、multi-unit recording を用いて Sham ラット、SPS ラットそれぞれの IL 錐体細胞の電気活動を測定した。加えて、TUNEL 法を用いて SPS ラットにおける mPFC 領域のアポトーシスを解析した。

#### 4. 研究成果

##### 課題 1)

GR の核内移行は SPS 直後に増加し、2 時間後にピークとなった。その際、SPS ラットの Bcl-2 遺伝子のプロモーター領域への GR 結合は亢進し、Bcl-2 mRNA の発現は低下した。これに対して Bax 遺伝子のプロモーター領域への GR 結合および mRNA 発現とも有意な変化を認めなかった。RU486 投与により、SPS ラットの核内 GR 移行の増加と Bcl-2 mRNA 発現低下は阻害された。さらに、RU486 投与により、SPS ラットの SPS1 週間後の海馬のアポトーシスの増加と恐怖記憶の消去の障害は阻害された。

本研究の結果から、SPS ラットで生じる海馬アポトーシスの増加には、SPS 直後の GR の核内移行および Bcl-2 遺伝子上のグルココルチコイド応答配列 (glucocorticoid response element : GRE) への結合増加を介した Bcl-2 mRNA 発現低下が関与することが示唆された。核内 GR による遺伝子発現調節には亢進と抑制の双方方向への機序が存在し、抑制には negative GRE と呼ばれる配列が関与するとされる。Bcl-2 遺伝子はこの negative GRE を有し、グルココルチコイドの投与でその発現が抑制されることが報告されており、本研究でも GR 阻害薬投与で SPS ラットにおける海馬のアポトーシス増加も抑制されたことから、この経路を介した Bcl-2 の発現低下が、アポトーシス制御機構の恒常性の変化につながったと考えられた。海馬は扁桃体や内側前頭前野皮質などの脳部位と共に恐怖記憶の消去を担う神経回路を形成しており、GR 阻害薬による海馬のアポトーシス抑制が SPS における恐怖記憶の消去障害の改善につながったと考えられた。

PTSD と副腎皮質ホルモンとの関連は広く認識されているが、本研究では GR 系の亢進から海馬のアポトーシスに至る PTSD の病態形成過程をはじめて示すとともに、GR 阻害薬投与によって PTSD の発症を予防できる有望な可能性が示された。

##### 課題 2)

Sham ラットの mPFC 賦活では、IL の賦活を Ext 訓練と組み合わせた場合のみ Ext を促進させる効果を認め、IL に近接する前辺縁皮質賦活では Ext の促進効果は認めなかった。IL 賦活による Ext 促進効果は、Sham ラットでは Ext 訓練、Ext 試験で共に認めしたが、SPS ラットでは Ext 試験でのみ認められた。IL の興奮性神経細胞の活動は、非刺激時点では Sham 群と SPS 群において有意な変化を認めなかったが、DREADDs によって賦活される神経活動の亢進レベルが SPS で有意に低下していた。また、SPS ラットの Ext 訓練直前時点での IL の神経細胞のアポトーシス亢進を認めた。

Sham ラットにおいて光遺伝学を用いた IL 賦活によって Ext が促進されることが報告されており、本研究で用いた化学遺伝学による賦活でも同様に IL 賦活によって Ext 促進効果が示された。これに対し、SPS ラットでは IL 賦活による Ext 促進効果は限定的であった。この効果の差異には、本研究で示された SPS による IL でのアポトーシス増加と神経興奮性の低下が寄与していることが示唆された。Ext 訓練と Ext 試験では共に IL の神経活動亢進が重要とされるが、特に安全な記憶の再想起過程である Ext 試験での促進効果には IL 賦活に引き続く可塑的变化が必要とされる。これらの知見と本研究の結果から、SPS ラットに対する IL 賦活は、即時的な Ext の促進は得られないものの、安全な記憶の定着を引き起こすには十分な神経活動亢進が得られることが示唆された。

精神神経疾患の治療において、反復経頭蓋磁気刺激や経頭蓋直流電気刺激などのニューロモデュレーションが注目されている。本研究の結果は、曝露課題を用いる PTSD 治療において神経活動を賦活するニューロモデュレーションの併用が Ext 障害の効果的な改善に有用であることを示唆した重要な知見と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Omura Jun, Fuchikami Manabu, Araki Motoaki, Miyagi Tatsuhiro, Okamoto Yasumasa, Morinobu Shigeru	4. 巻 108
2. 論文標題 Chemogenetic activation of the mPFC alleviates impaired fear memory extinction in an animal model of PTSD	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry	6. 最初と最後の頁 110090 ~ 110090
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pnpbp.2020.110090	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Araki Motoaki, Fuchikami Manabu, Omura Jun, Miyagi Tatsuhiro, Nagashima Nobuyuki, Okamoto Yasumasa, Morinobu Shigeru	4. 巻 237
2. 論文標題 The role of glucocorticoid receptors in the induction and prevention of hippocampal abnormalities in an animal model of posttraumatic stress disorder	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Psychopharmacology	6. 最初と最後の頁 2125 ~ 2137
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00213-020-05523-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Motoaki Araki, Manabu Fuchikami, Jun Omura, Tatsuhiro Miyagi, Nobuyuki Nagashima, Shigeru Morinobu, Yasumasa Okamoto
2. 発表標題 The role of glucocorticoid receptor in the induction and the prevention of the hippocampal abnormalities in an animal model of PTSD
3. 学会等名 第40回日本生物学的精神医学会・第61回日本神経化学会大会 合同年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Jun Omura, Manabu Fuchikami, Motoaki Araki, Tatsuhiro Miyagi, Sigeru Morinobu
2. 発表標題 Chemogenetic activation of medial prefrontal cortex excitatory neurons alleviated the impaired fear extinction of an animal model of PTSD.
3. 学会等名 第40回日本生物学的精神医学会・第61回日本神経化学会大会 合同年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Motoaki Araki, Manabu Fuchikami, Jun Omura, Tatsuhiro Miyagi, Nobuyuki Nagashima, Shigeru Morinobu, Yasumasa Okamoto
2. 発表標題 The role of glucocorticoid receptor in the induction and the prevention of the hippocampal abnormalities in an animal model of PTSD
3. 学会等名 Society for Neuroscience 2018 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Jun Omura, Manabu Fuchikami, Motoaki Araki, Tatsuhiro Miyagi, Sigeru Morinobu, Yasumasa Okamoto
2. 発表標題 Chemogenetic activation of medial prefrontal cortex excitatory neurons alleviated the impaired fear extinction of an animal model of PTSD.
3. 学会等名 Society for Neuroscience 2018 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------