

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08080

研究課題名(和文) 雌を中心とした治療抵抗性モデルによる恐怖関連疾患の新規治療標的分子の探索

研究課題名(英文) Search for new therapeutic target molecules for fear-related disorders using a model of treatment resistance

研究代表者

松田 真悟 (Matsuda, Shingo)

昭和薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：80723246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は恐怖消去抵抗性を凌駕する新規治療薬開発の基盤を構築することを目的としている。成果として、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体(PPAR)の作動薬であるロシグリタゾンが雌マウスの恐怖消去抵抗性を改善することや免疫抑制剤であるデキサメタゾン(DEX)が雌マウスの恐怖消去記憶を安定化させることを見出した。加えて、恐怖消去抵抗性が背側海馬内免疫活性に起因するという我々の仮説を支持する成果が得られた。さらに、恐怖消去に対して腹側海馬内TrkBが雌雄で真逆の役割を担う可能性が得られ、また、内在性CBである2-AGの恐怖記憶に対する役割にも性差があることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、恐怖消去に対してPPARの役割は調べられていなかった。本研究の成果は、恐怖消去に対するPPARの役割に注目した研究の扉を開くものである。また、恐怖消去抵抗性が背側海馬内免疫活性に起因するという我々の仮説を支持する成果が得られた。この他にもTrkBやCBなど、恐怖記憶やその消去に性別依存的な役割を持つ分子を発見することが出来た。これらの成果は、将来的に心的外傷後ストレス障害などの恐怖関連疾患の病因解明と新規治療法の発見に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to construct the foundation for new therapeutic agents that overcome treatment resistance in fear-related disorders. In this study, we found that a peroxisome proliferator-activated receptor agonist rosiglitazone (i.p.) improved extinction-resistance in female mice and an immunosuppressant dexamethasone (i.p.) augmented extinction memory in the females. Additionally, the results from the present study supported our hypothesis that high immunoactivity in the dorsal hippocampus results in extinction-resistance. Furthermore, we found a possibility that TrkB in the ventral hippocampus play a sex-dependent opposite role in fear extinction, and sex differences in the role of endocannabinoid 2-AG in fear memory.

研究分野：精神・神経薬理学

キーワード：fear fear extinction sex differences neuroimmune

### 1. 研究開始当初の背景

恐怖症や心的外傷後ストレス障害(PTSD)などの恐怖関連疾患の治療薬はモノアミンを標的とした治療薬に限定されている。しかし、モノアミン標的薬に対して抵抗性を示す患者は少なくないため、現在、これまでと異なる分子機構を標的とした新規治療薬の開発が切望されている。申請者らは、恐怖関連疾患の有病率が女性で高いことや思春期以降に増加することに着目し、雌マウスを中心とした2つの治療抵抗性動物実験モデルを開発した。さらに、これら2つのモデルと網羅的遺伝子発現解析法、バイオインフォマティクス解析を組み合わせ、獲得した恐怖記憶の忘却(恐怖消去)に関わる薬物候補を得ている。この薬物候補の中には、これまで恐怖消去との関連性が調べられていない分子を標的とした薬物が含まれているため、この候補薬物を利用することで恐怖関連疾患治療薬の新規標的分子の発見に繋がると考え本研究を着想した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、雌もしくは雌雄の恐怖消去トレーニングを促進する薬物を見出すと共に、その薬物効果に中心的な役割を担う分子を特定し、治療抵抗性を凌駕する新規治療薬開発の基盤を構築することである。

### 3. 研究の方法

文脈的恐怖消去課題と腹腔内薬物投与もしくは脳内薬物投与を組み合わせ、雌の恐怖消去を促進する薬物の探索を行った。使用薬物として、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )作動薬ロシグリタゾン、免疫抑制剤のデキサメタゾン(DEX)、免疫誘発物質のリポポリサッカライド(LPS)、TrKB 受容体作動薬 7,8-ジヒドロキシフラボン(7,8-DHF)とカンナビノイド(CB)受容体関連薬(WIN55,212-2、JZL-184、URB597、SR144528、SR141716)を用いた。また、恐怖消去抵抗性に関連のある分子を絞り込むために、恐怖消去課題後の脳サンプルに対して、定量的 real-time PCR を行った。

### 4. 研究成果

#### 研究 1. 雌の恐怖消去抵抗性を凌駕する恐怖消去促進薬の探索

PPAR $\gamma$  作動薬であるロシグリタゾン(5mg/kg, i.p.)が雌の恐怖消去を促進することがわかった。また、免疫抑制剤のデキサメタゾンは恐怖消去課題中の恐怖反応に影響を及ぼさなかったが、恐怖消去を長期間覚えているかをテストした際、恐怖反応を有意に低下させ、恐怖消去記憶の安定性を高めることがわかった。

#### 研究 2. 恐怖消去の性差を担う分子機構の解明

##### 2-1. 免疫システム(図 1)

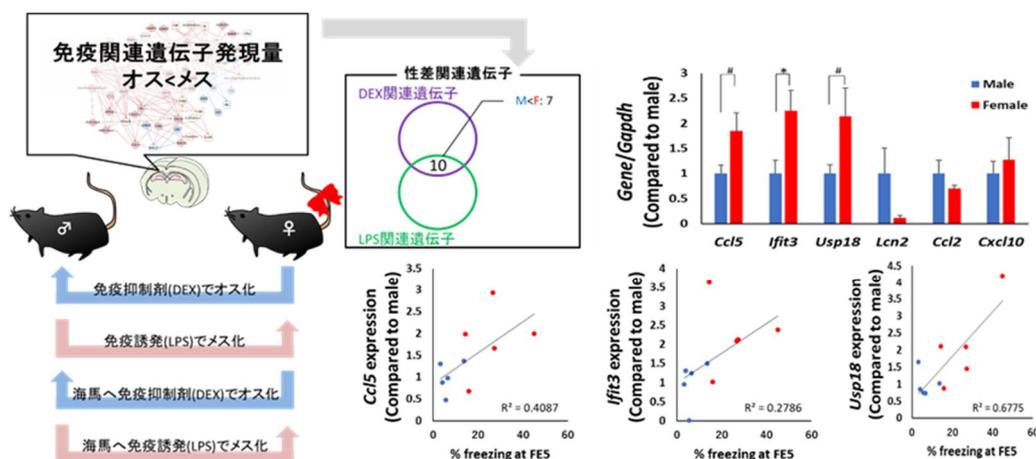


図1 恐怖消去の性差における免疫システムの役割

我々は、恐怖消去課題と DNA マイクロアレイ法、バイオインフォマティクスを組み合わせ、『雌は背側海馬内免疫活性が高いことで恐怖消去抵抗性が生じる』と仮説を立て、研究に取り組んだ。仮説を支持するように、背側海馬内 LPS (1.25  $\mu$ g/side)投与が雄マウスの恐怖消去を阻害し、背側海馬内 DEX(1  $\mu$ g/side)投与が雌マウスの恐怖消去抵抗性を改善した。さらに、上述の実験から得ていた恐怖消去課題後に発現量に性差のある遺伝子の中から、LPS と DEX に関連のある遺伝子に絞り込んだ結果、10 個の遺

伝子を得られた。そのうち、*Ccl5*, *Ifit3*, *Usp18* は定量的 real-time PCR を用いた方法でも、雌の方が発現量が高い、もしくは高い傾向が得られた。さらに、それら 3 つの遺伝子の発現量と恐怖消去課題中の恐怖反応の間に中-強程度の正の相関が認められた。

## 2-2. TrkB シグナル

TrkB 作動薬である 7,8-DHF (5mg/kg, i.p.) が雄の恐怖消去を促進し、雌の恐怖消去を阻害することを見出した (Tohyama et al., 2020)。さらに、腹側海馬へ 7,8-DHF (1.5 $\mu$ M/side) を投与することで、雄は恐怖消去が促進する傾向が得られ、雌は阻害された。

## 2-3. CB システム

恐怖記憶の想起や消去といった恐怖記憶制御に対する CB 受容体作動薬 (WIN55,212-2) の効果も拮抗薬 (SR141716) の効果も性差はないが、内在性 CB である 2-AG を増加させる JZL-184 (4-8 mg/kg, i.p.) が雌のみ恐怖記憶の想起を増強し、それが CB1 受容体を介することを明らかにした (表 1, Mizuno et al., 2022)。さらに、別の内在性 CB である AEA を増加させる URB597 の恐怖消去に対する効果に性周期が影響を及ぼすことがわかった。

表1 これまでの結果

薬物 (作用機序)	恐怖記憶	
	オス	メス
SR141716 (CB1拮抗薬)	—	—
WIN55,212-2 (CB1作動薬)	増強	増強
JZL184 (2-AG分解酵素阻害薬)	—	増強
JZL184 (2-AG分解酵素阻害薬) +SR141716 (CB1拮抗薬)	×	—
JZL184 (2-AG分解酵素阻害薬) +SR144258 (CB2拮抗薬)	×	増強

— 薬物効果なし × 該当実験なし

## 3. 性周期自動判定アルゴリズムの開発

雌を使用した研究では性周期判定のデータが求められる。一般的に、性周期は膣細胞の染色画像を使用して判定する。これまでヒトの目で判定していたが、精度と効率を考え、deep learning を利用した自動判定アルゴリズムの構築に取り組み、100 枚の性周期画像を性周期判定に熟練したヒトと同程度の精度で、ヒトよりも約 30 倍の速度で判定できるアルゴリズムの構築に成功した (図 2; Sano et al., 2020)。

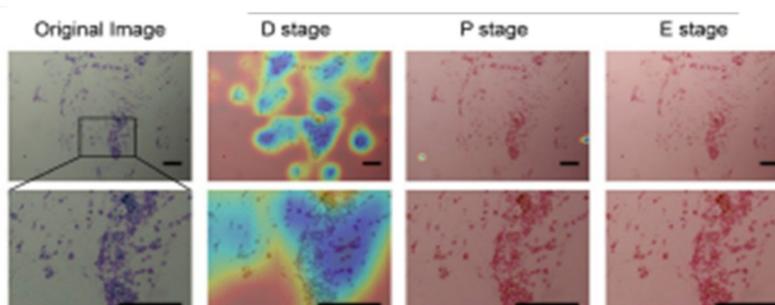


図2 性周期自動判定アルゴリズム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Suguru Tohyama, Shingo Matsuda, Akihiro Mizutani	4. 巻 715
2. 論文標題 Sex-dependent opposite effects of a tropomyosin-related kinase B receptor (TrkB) agonist 7,8-dihydroxy&#64258;avone on cued fear extinction in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience letters	6. 最初と最後の頁 134670
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2019.134670	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 Ikumi Mizuno, Shingo Matsuda, Suguru Tohyama, Akihiro Mizutani	4. 巻 138
2. 論文標題 The role of the cannabinoid system in fear memory and extinction in male and female mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Psychoneuroendocrinology	6. 最初と最後の頁 105688
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.psyneuen.2022.105688	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 Daisuke Ishii, Daisuke Matsuzawa, Shingo Matsuda, Haruna Tomizawa-Shinohara, Chihiro Sutoh, Eiji Shimizu	4. 巻 129
2. 論文標題 Spontaneous recovery of fear differs among early - late adolescent and adult male mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The International journal of neuroscience.	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/00207454.2018.1501049	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 松田真悟	4. 巻 32
2. 論文標題 恐怖消去の性差を担う脳内分子機構の解明に向けて	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本生物学的精神医学会誌	6. 最初と最後の頁 203
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kyohai Sano, Shingo Matsuda, Suguru Tohyama, Daisuke Komura, Eiji Shimizu, Chihiro Sutoh	4. 巻 10
2. 論文標題 Deep learning-based classification of the mouse estrous cycle stages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-68611-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ikumi Mizuno, Shingo Matsuda	4. 巻 73
2. 論文標題 The role of endocannabinoids in consolidation, retrieval, reconsolidation, and extinction of fear memory	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmacological Reports	6. 最初と最後の頁 984-1003
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s43440-021-00246-y	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 Shingo Matsuda	4. 巻 21
2. 論文標題 Neurobiological mechanism of a new pharmacological candidate to be combined with behavioral therapy for treating post-traumatic stress disorder: BDNF-TrkB signaling and fear extinction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Rehabilitation Neurosciences	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24799/jrehabilneurosci.200829	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 松田真悟
2. 発表標題 性差と週齢差に着目した恐怖記憶の脳内制御機構の解明
3. 学会等名 第50回日本神経精神薬理学会年会・第42回日本生物学的精神医学会年会・第4回日本精神薬学会総会・学術集会合同年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水野郁美, 松田 真悟, 古屋 裕理, 小川祥実, 遠山 卓, 水谷 顕洋
2. 発表標題 カンナビノイドシステム関連薬が雌雄マウスの恐怖記憶に与える影響
3. 学会等名 第50回日本神経精神薬理学会年会・第42回日本生物学的精神医学会年会・第4回日本精神薬学会総会・学術集会合同年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松田真悟
2. 発表標題 性差と週齢差に着目した恐怖記憶の脳内制御機構の解明
3. 学会等名 第30回神経行動薬理若手研究者の集い
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水野郁美, 松田 真悟, 古屋 裕理, 小川祥実, 遠山 卓, 水谷 顕洋
2. 発表標題 2-アラキドノイルグリセロール(2-AG)による恐怖記憶調節の性差
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水野郁美, 松田真悟, 古屋裕理, 小川祥実, 遠山卓, 水谷顕洋
2. 発表標題 カンナビノイドシステムによる恐怖記憶調節の性差
3. 学会等名 第43回日本生物学的精神医学会・第51回日本神経精神薬理学会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田真悟
2. 発表標題 Sex differences in biological mechanism of fear regulation
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水野 郁美, 松田 真悟, 古屋 裕理, 小川祥実, 水谷 顕洋
2. 発表標題 内在性カンナビノイドによる恐怖消去調節に対する性別および性周期の影響について
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022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
---------	---------