

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15996

研究課題名(和文) 海馬亜鉛イオンによる情動記憶の強化とそのメカニズム

研究課題名(英文) Involvement of hippocampal zinc ion in the enhancement of emotional memory

研究代表者

鈴木 美希 (Suzuki, Miki)

静岡県立大学・薬学部・助教

研究者番号：00740200

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)：本研究では、心的外傷後ストレス障害の治療戦略の構築に繋げるため、情動体験時に分泌されるノルアドレナリンとグルココルチコイドを介したZnイオンの作用に着目し、情動記憶が強化される機構の解明を目指した。海馬のZnイオンは、記憶の分子機構とされるシナプスの可塑的な変化に対して、シグナル因子であるとともにシナプス肥大の構成因子でもある。そこで、「情動体験時のノルアドレナリンやグルココルチコイドの作用を介した海馬細胞内Znイオン動態が強固な記憶の形成に重要である」という仮説の元、アドレナリン 受容体活性化条件下ではグルココルチコイドの作用により細胞内Znイオンが減少し強固な記憶を形成することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー型認知症に限らず、PTSDをはじめとする未だに根本的な治療法が存在しない疾患に対して、根本治療法の開発が望まれている。記憶形成に重要であると認識されてきたCaイオンに関する知見に加えて、Znイオンが、ノルアドレナリンやグルココルチコイドと協調し、強固な記憶形成を担うことを示した本研究は、強固な記憶形成に対するさらなる理解深化に繋がり、学術的意義は高い。さらなる検討は必要であるが、PTSDモデルに対して行った本検討は、強固な記憶形成機構の破綻がフラッシュバックやPTSD発症に関与することが考えられ、根本治療に繋がる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：Stress increases intracellular Zinc ion in hippocampal CA1 via the increase in glucocorticoid secretion and affects memory formation. Noradrenaline secretion is increased prior to glucocorticoid secretion after exposure to stress. To clarify the stress-induced modulation of memory formation, the present study examined whether LTP induction is affected by Zn ion signaling via the cooperative action of noradrenaline and glucocorticoid. In anesthetized rats, CA1 LTP was not changed by perfusion of isoproterenol, an adrenergic β -receptor agonist, or 50 ng/ml corticosterone but enhanced by both perfusions. CaEDTA, an extracellular Zn ion chelator, canceled the LTP enhancement. When isoproterenol and corticosterone were added to hippocampal slices, intracellular Zn ion was decreased in the CA1. These data suggested that the decrease in intracellular Zn ion under the cooperation of noradrenaline and glucocorticoid enhances CA1 LTP.

研究分野：脳神経科学

キーワード：情動 記憶 海馬 亜鉛イオン ノルアドレナリン グルココルチコイド PTSD LTP

1. 研究開始当初の背景

恐怖などの情動体験は記憶され強く残る。そのメカニズムには、青斑核や交感神経系の活性化により分泌されるノルアドレナリンや副腎皮質から分泌されるグルココルチコイドが関与する。これまで扁桃体や海馬において細胞内亜鉛イオン (Zn^{2+}) が記憶に必要であること、過剰な細胞内 Zn^{2+} が記憶を障害することを証明している (*Neuroscience* 2015, *Neurochem. Int.* 2017, *Neurochem. Int.* 2018)。強固な記憶の形成機構は数多くの研究がされているにも関わらず、フラッシュバックや心的外傷後ストレス障害 (PTSD) に対する根本的な治療法は確立されていない。それは、シナプスの肥大に伴うシナプス伝達効率の上昇 (シナプス可塑性) という記憶の分子基盤に対して、シナプス肥大を担う細胞内イオンの役割解明が立ち遅れているためである。記憶はグルタミン酸作動性神経回路において誘導される細胞内 Ca^{2+} シグナルがポストシナプスを肥大化することで形成される、と広く認識されている。しかし Ca^{2+} だけでなく海馬に存在する Zn^{2+} はシナプス肥大化のシグナルであるとともにシナプス肥大部の構成因子としても重要である。PTSD 治療法開発のためにも「強固な記憶形成過程における包括的理解」が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、情動体験がもたらされた際に、どのように強固な記憶が形成されるのか解明を目指す。特に、グルココルチコイドは海馬細胞内外において Zn^{2+} 動態を変化させ、記憶に関与することを明らかにした最近の研究基盤に基づき (*Mol. Neurobiol.* 2019)、「恐怖により情動が誘発されるとグルココルチコイドやノルアドレナリンの作用を介して海馬細胞内 Zn^{2+} が制御されることで強固な記憶が形成される」との仮説の元、情動記憶はどのように強化されるのかとの「問い」を明らかにする。最終的に、恐怖体験から PTSD 発症といった不必要に情動記憶が強化される機構の解明に繋げることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 麻酔下ラットの海馬歯状回または CA1 領域における LTP 誘導

透析膜プローブを介してアドレナリン β 受容体作動薬であるイソプロテレノール (100 μ M) およびラットの主要なグルココルチコイドであるコルチコステロン (5-500 ng/ml) を灌流し、内側貫通線維-歯状回顆粒細胞シナプス経路 (歯状回) またはシャーファー側枝-CA1 錐体細胞シナプス経路 (CA1) にて LTP を誘導した。

(2) ラット海馬スライスにおける細胞内亜鉛イオンの測定

ラットから海馬スライスを作製し、細胞内 Zn^{2+} 蛍光プローブを取り込ませた後、共焦点レーザー顕微鏡を用いてイソプロテレノールおよびコルチコステロンを添加し、海馬 CA1 放線層における細胞内 Zn^{2+} を測定した。

(3) ラット海馬膜上の AMPA 受容体の検出

ラット海馬より膜画分を調整し、ウエスタンブロッティングにて AMPA 受容体のサブタイプを検出した。

(4) SPS ストレス負荷による PTSD モデルの作出

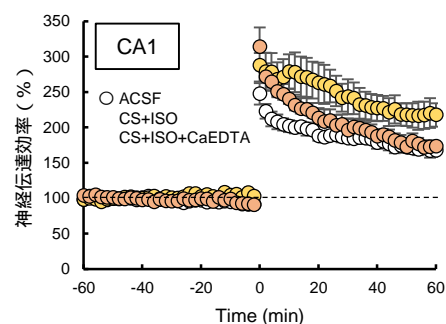
Wistar 系ラット雄に対して、拘束ストレス 2 時間および強制水泳 20 分間後に深麻酔に暴露させ、2 週間個別飼育した。その後、高架式十字迷路試験、明暗試験、オープンフィールド試験を行い、不安様行動を測定し、PTSD 症状の有無を解析した後、各種検討を行った。

4. 研究成果

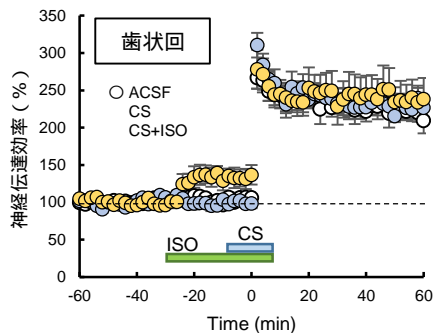
(1) 強固な記憶形成 (LTP 誘導の促進) に対するノルアドレナリンやグルココルチコイドを介した亜鉛イオン制御の関与を検討

情動体験時のノルアドレナリンやグルココルチコイドの増加によって海馬細胞内亜鉛イオンが変化することで強固な記憶が形成されるのかを検討するため、海馬においてアドレナリン β 受容体活性化条件でグルココルチコイドを負荷し、記憶の分子メカニズムである長期増強 LTP の促進を指標に解析した。ストレスの影響を受けやすい部位とされる海馬の CA1 領域において、アドレナリン β 受容体活性化条件においてグルココルチコイドは LTP を増大させ、その増大は細胞外 Zn^{2+} キレーターである CaEDTA によりキャンセルされた。アドレナリン β 受容体活性化条件でグルココルチコイドは長期増強 LTP を増大すること、その増大には海馬細胞外から細胞内への亜鉛イオン流入が関与することが示された。

また、海馬へ情報が入力される主要な領域である歯状回においては、アドレナリン β 受容体活性化条件において、海馬 CA1 領域とは異なり、グルココルチコイドによって増強されることはなかった。また、神経伝達効率の指標である興奮性シナプス後電位 (fEPSP) は、アドレナリン

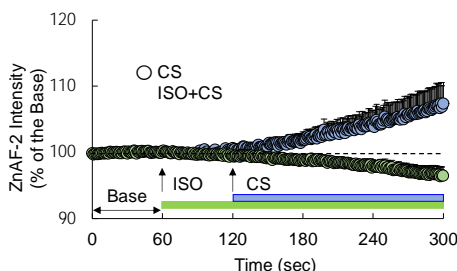


β 受容体の活性化により増大し、海馬 CA1 領域と比較し、ノルアドレナリンに対する反応性が高いことが示唆された。しかしこの増大は、細胞外亜鉛キレーターにより減弱せず、細胞外亜鉛イオンの直接的な関与は見られなかった。したがって、海馬 CA1 領域と比較し、歯状回の LTP は、アドレナリン β 受容体活性化条件においてもグルココルチコイドにより増強されないことが示唆された。



(2) 海馬におけるノルアドレナリンやグルココルチコイドを介した亜鉛イオン動態の変化を検討

ノルアドレナリンやグルココルチコイドによって海馬細胞内亜鉛イオンが変化するのかを検討するために、海馬においてアドレナリン β 受容体活性化条件でグルココルチコイドを負荷し、細胞内 Zn^{2+} を検出した。LTP の増強が見られた CA1 領域において、グルココルチコイド単体では細胞内 Zn^{2+} が増加したのに対し、アドレナリン β 受容体活性化条件では、海馬細胞内亜鉛イオンレベルの増加が抑制され、むしろ減少傾向であることが明らかとなった。アドレナリン β 受容体活性化条件においてグルココルチコイドは、細胞内 Zn^{2+} の利用を促進する可能性がある。詳細な検討がさらに必要であると考えられる。

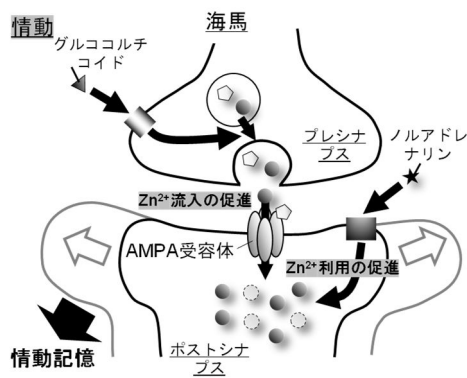


(3) SPS (Single Prolonged Stress) ストレス負荷によるラット PTSD モデルの作出および解析

SPS ストレス負荷 2 週間後において、高架式十字迷路・明暗 BOX・オープンフィールドを用いて、不安様行動を測定した。Open arm の滞在時間、明暗室にいる時間、探索時間を測定し各個体の不安様行動レベルを測定した後、LTP を測定し、海馬サンプルを作製した。SPS ストレス負荷群において、不安様行動は有意に増加したが、個体差も見られた。SPS 負荷群では、海馬の歯状回領域において、神経伝達効率は減弱傾向が見られた一方で、LTP 誘導は促進傾向が見られた。SPS ストレス負荷モデルに対して、アドレナリン β 受容体活性化やグルココルチコイド暴露時の LTP 誘導を合わせて検討し、さらに各個体の不安レベルと比較した考察が必要になると考えられる。

また、Ca 透過型 AMPA 受容体は、LTP 誘導により海馬膜上で増加し、海馬細胞内への主要な Zn イオン流入経路でもあるため、LTP 誘導後の海馬膜上で AMPA 受容体のサブユニットである GluR1 および GluR2 を検出した。LTP 誘導後の海馬細胞膜上の AMPA 受容体発現量は、Control と比較し PTSD モデルにおいて減弱した。本検討から、PTSD では、Control とは異なる機構で LTP が誘導され、Zn イオン制御機構も変化することで、強固な記憶形成に繋がる可能性が示された。

本検討より、情動体験により分泌されるノルアドレナリンやグルココルチコイドの作用が協調して、海馬において細胞内 Zn^{2+} を減少させ、LTP 誘導を促進することが示唆された。海馬 CA1 領域で見られたこの現象は、情報の入り口である歯状回領域では見られず、部位による脆弱性・特異性にも違いがあることが想定される。これら強固な情動記憶の形成過程が破綻することで PTSD といった疾患発症に繋がると考えられ、SPS ストレス負荷モデルを用いたさらなる検討も行っていきたい。さらに Ca 透過型 AMPA 受容体欠損マウスの作出を視野に入れた展開を行い、PTSD 発症機構解明を介して新規治療戦略の提唱、さらなる脳神経科学の発展に貢献したい。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡邊慧、鈴木美希、原雄二、武田厚司
2. 発表標題 ストレス負荷時の海馬長期増強と亜鉛イオンの関与
3. 学会等名 第68回日本薬学会東海支部大会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 渡邊慧、待寺りさ子、鈴木美希、武田厚司、原雄二
2. 発表標題 ノルアドレナリンおよびグルココルチコイド共存下での海馬亜鉛イオンによるLTPの促進
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 待寺りさ子、鈴木美希、玉野春南、武田厚司
2. 発表標題 ノルアドレナリンおよびグルココルチコイド共存下での海馬CA1細胞内Zn ²⁺ レベルと長期増強
3. 学会等名 第31回 日本微量元素学会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 鈴木美希、待寺りさ子、玉野春南、武田厚司
2. 発表標題 ストレス負荷時のノルアドレナリンとグルココルチコイドの協調作用による海馬CA1シナプスZn ²⁺ の動態変化とストレス記憶への影響
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2020年～2021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
---------	---------