

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16649

研究課題名（和文）ヒストン・メチル化障害による恐怖記憶の消去障害の機序解明とPTSD治療法の開発

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of impaired fear memory extinction due to the impairment of histone methylation and development of novel treatment for PTSD

研究代表者

片岡 努（Kataoka, Tsutomu）

広島大学・医系科学研究科（医）・専門研究員

研究者番号：10868805

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）：PTSDモデルであるSPSラットにおける恐怖記憶の消去障害に関する海馬の脳由来神経栄養因子（BDNF）低下の機序を解明することを目的とした。恐怖記憶消去訓練後2時間の時点でBDNF mRNA発現はSPSラットで有意に減少しており、その機序としてBDNFプロモーターのH3K9ジメチル化亢進が示唆された。また、ヒストンメチル化酵素の阻害薬の投与で、SPSラットの消去訓練後のBDNF発現低下の回復や恐怖記憶の消去障害の改善が認められた。以上より、SPSラットの恐怖記憶の消去障害の機序として海馬におけるH3K9メチル化変化を介したBDNF遺伝子の発現調節の関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、PTSDの病態に關与するH3K9メチル化障害を証明するとともに、ヒストンメチル化酵素阻害薬の投与がPTSDの恐怖記憶の消去障害の治療法となり得ることを示した。これは、これまでのヒストン・アセチル化の亢進を標的としたヒストン脱アセチル化酵素阻害薬によるPTSD治療薬の開発に対して、新たなエピジェネティック作動薬の治療薬としての可能性を示したものである。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to elucidate the mechanism of hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) reduction associated with impaired fear memory extinction in SPS rats, a model of PTSD. Two hours after fear memory extinction training, BDNF mRNA expression was significantly decreased in SPS rats, and the decrease might be due to the increase in the H3K9 dimethylation at BDNF promoter IV region. In addition, administration of a histone methyltransferase inhibitor reversed the decrease in BDNF expression after extinction training in SPS rats and improved the impairment of fear memory extinction. These results suggest that the regulation of BDNF gene expression mediated by H3K9 methylation in the hippocampus is involved in the impairment of fear memory extinction in SPS rats.

研究分野：精神神経医科学

キーワード：PTSD 動物モデル エピジェネティクス 新規治療薬

1. 研究開始当初の背景

PTSD (外傷後ストレス障害) は DSM-5 の診断基準が示すように、重篤なストレスに遭遇後 1 か月以後に診断される疾患であり、主要な臨床症状として発症の契機となったトラウマ体験の持続的侵入があげられる。トラウマ体験に由来する恐怖記憶(FM)の持続的侵入は、FM の消去障害 (安全な記憶への置き換えの障害) と考えられ、PTSD 難治化の大きな要因となっている。FM の消去障害のメカニズムとして、ストレス曝露による FM の固定化の亢進や新たな記憶の形成障害などが推測されている。

近年の記憶に関する分子生物学的な研究から、FM の固定化や消去には扁桃体や海馬での遺伝子の発現の変動が必要であり、その機序に核内タンパクであるヒストン修飾や DNA メチル化の変動などの、epigenetic 機構の変化を介した遺伝子発現の変動が重要な鍵と考えられている。なかでもヒストン・アセチル化の亢進はクロマチン構造をゆるやかにすることを介して、転写因子の遺伝子プロモーター領域への結合を促進する機序によって遺伝子の転写を亢進させる。このためヒストン・アセチル化を促進する histone deacetylase (HDAC) 阻害薬の投与による、内側前頭前野のアセチル化ヒストンの BDNF 遺伝子プロモーター領域への結合亢進を介した、BDNF 遺伝子の亢進が FM の消去を促進する事や、ヒストン・アセチル化亢進による CREB binding protein 発現亢進を介した FM の消去の促進が報告されている。その一方でヒストンを構築する 9 番目のリジン残基(H3K9)の dimethylation (以下、メチル化と略す) 亢進も、クロマチン構造を密にして遺伝子転写を抑制することから、記憶の形成や消去に關与する事が示唆されているが、そのメカニズムはアセチル化に比べて未解明の点が多い。この H3K9 のメチル化は、ヒストン methyltransferases のグループに属する SUV39h1, G9a によって行われている事が最近の研究からわかってきた。H3K9 メチル化によるクロマチン構造の変化から、H3K9 メチル化亢進は遺伝子の転写を抑制するために記憶の形成に抑制的に、H3K9 メチル化低下は転写を亢進させるために記憶の形成に促進的に働くと考えられる。しかしながらヒストン・アセチル化とは異なり、哺乳類を対象とした H3K9 メチル化の記憶に関する役割は未解明の点が多く、わずかに海馬で H3K9 メチル化が FM の固定化に、扁桃体で FM の形成に關与することが報告されているが、FM の消去についての研究は見られない。そのことから本申請者は PTSD モデルである Single prolonged stress (SPS) 負荷ラットにみられる FM の消去障害について、H3K9 メチル化の亢進が、脳由来神経栄養因子(BDNF)遺伝子の転写を抑制して、FM の消去の障害を引き起こしているのかという課題を揚げた。

2. 研究の目的

これまでに SPS 負荷ラットのように PTSD の病態解明を目的とした研究ではないが、BDNF 遺伝子の転写にはリン酸化 CREB の BDNF 遺伝子 exon IV プロモーター上への結合が重要であるという報告はあるが、本研究のように H3K9 メチル化による BDNF 遺伝子の転写の制御機構を提唱する実験計画は、これまでに報告のない極めて独創的な試みである。同時に H3K9 メチル化亢進による BDNF 遺伝子をはじめとした記憶に關与する遺伝子群の転写抑制を、FM の消去の障害とする仮説はこれまでにない独創的なヒストン修飾障害による PTSD 病態形成機序の解明となる。

このような PTSD の病態に關与する H3K9 メチル化障害の証明と G9a 阻害薬による FM の消去障害の治療開発は、これまでのヒストン・アセチル化の亢進を標的とした HDAC 阻害薬による PTSD 治療薬の開発に対して、新たなヒストン修飾作用を持つ薬物の治療薬としての可能性を示唆する。

3. 研究の方法

課題 1) FM の消去の障害に關与する BDNF 低下の機序の解明:

FM の消去障害を呈する PTSD モデルである SPS 負荷ラットにみられる BDNF 低下のメカニズムに關して、BDNF 遺伝子プロモーターの H3K9 メチル化亢進によって BDNF 遺伝子転写の抑制が引き起こされる事を、Real-time PCR 法、Western blot 法、抗 H3K9 抗体を用いた Chromatin immunoprecipitation assay を用いて明らかにする。

課題 2) H3K9 メチル化亢進を介した新規 FM 消去障害機序の発見:

課題 1 にて SPS ラット脳内で H3K9 メチル化の亢進を証明した上で、最も H3K9 メチル化の亢進している時期及び脳部位を選び、抗 H3K9 抗体を用いて ChIP-seq を行い、海馬で転写の抑制されている記憶関連遺伝子群を探索する。

課題 3) G9a 阻害薬による H3K9 メチル化抑制を介した FM 消去障害の修復効果の検証:

課題 1 にて SPS ラットの FM の消去障害に H3K9 メチル化亢進による、記憶関連遺伝子の転写障

害の関与が証明された上で、H3K9 メチル化を司る G9a の選択的阻害薬 BIX01294 が FM の消去障害への修復作用を有するかを検証する。

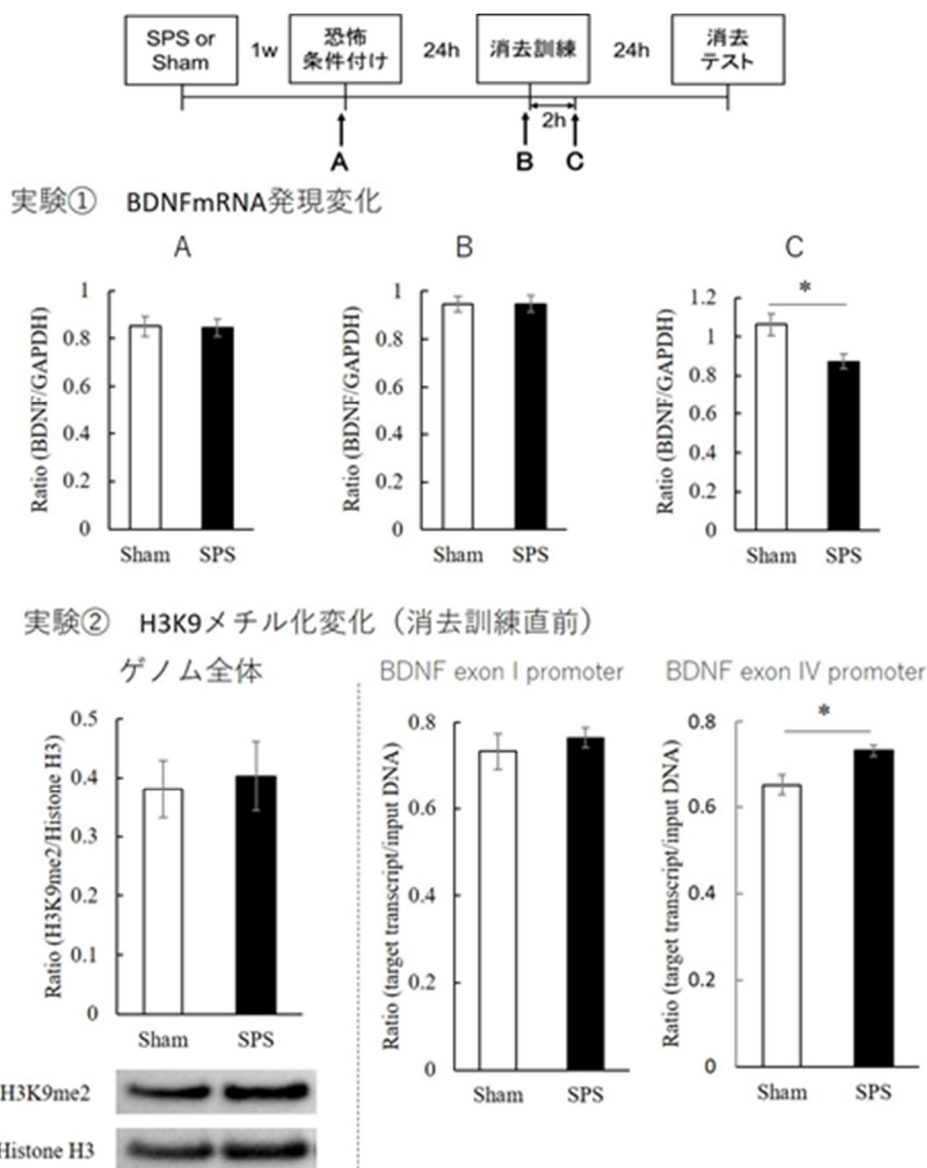
4. 研究成果

課題 1) FM の消去の障害に関与する BDNF 低下の機序の解明

実験 まず SPS 負荷による恐怖条件付け前後の海馬 BDNF 発現に及ぼす影響を調べた。BDNF mRNA 発現は SPS 群で消去訓練 2 時間後の時点で有意な減少を認めた。

実験 では実験 で示した BDNF mRNA 発現低下と H3K9 メチル化の関連を検討した。ゲノム全体における H3K9 メチル化亢進に変化は見られなかった。一方で EFM に関連した BDNF の発現制御領域として示唆される exon I と exon IV のプロモーター領域での H3K9 メチル化亢進は消去訓練直前において exon IV のプロモーター領域の H3K9 メチル化亢進がみられたことから、H3K9 メチル化亢進による BDNF の発現低下が SPS ラットの FM の消去の障害に関与する可能性が示唆された。(図 1)

図 1



課題 2) H3K9 メチル化亢進を介した新規 FM 消去障害機序の発見

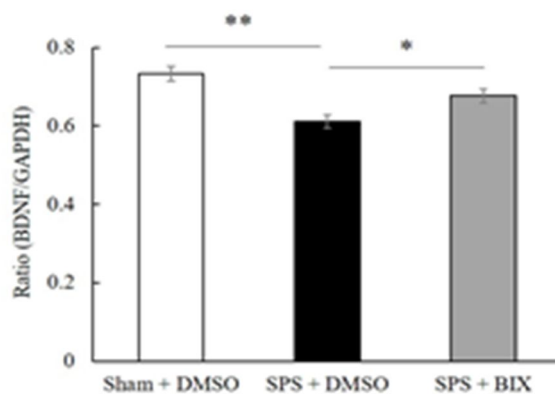
課題 1) によって SPS ラットにおいて H3K9 メチル化亢進が記憶関連因子である BDNF の発現を抑制していることは明らかになった。しかし、課題 1) の結果から SPS ラットにおける H3K9 メチル化亢進は消去訓練前後において一時的かつ部分的に機能制御される可能性が示唆された。現在 BDNF 以外の FM の消去の学習に関連する遺伝子の発現調節に対して H3K9 メチル化亢進の関与については見つかっていないが、今後の課題として消去訓練前後における BDNF 以外の新たな消去学習に関連する遺伝子発現変動を伴う調節機構の探索が必要である。

課題 3) G9a 阻害薬による H3K9 メチル化抑制を介した FM 消去障害の修復効果の検証

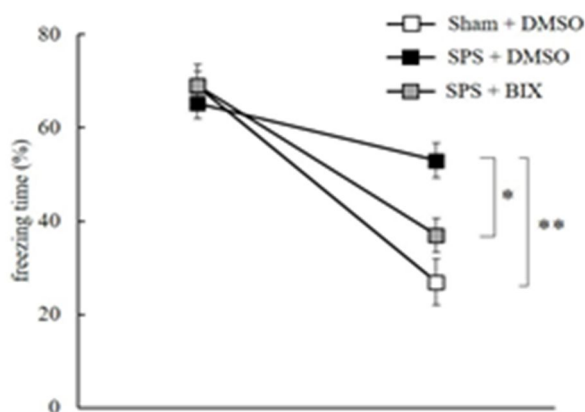
課題 1) によって明らかになった消去訓練後の H3K9 メチル化亢進による BDNF mRNA 発現低下に対する修復実験として、訓練の 16 時間前に G9a に対する選択的阻害薬である BIX01294 を脳内投与し、H3K9 メチル化を抑制した状態で消去訓練を行ったところ、消去訓練 2 時間後の BDNF mRNA 発現の回復を認め、加えて 24 時間後の消去確認試験において freezing の減少を認めたことから、SPS ラットの FM の消去障害において、消去訓練時における BDNF mRNA 発現低下は G9a を介した H3K9 メチル化亢進が関与することが明らかになり、消去訓練時に G9a を選択的に阻害することで FM 消去の障害の修復効果が得られることを明らかにした。(図 2)

図 2

G9a阻害によるBDNFmRNA発現低下の回復



G9a阻害による恐怖記憶消去障害の修復効果



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------