

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24530909

研究課題名(和文)複合ストレス後にみられる恐怖反応増強における視床下部一下垂体-副腎系の役割

研究課題名(英文) Involvement and role of HPA axis in multiple stress-induced enhancement of conditioned fear.

研究代表者

山田 一夫 (YAMADA, Kazuo)

筑波大学・人間系・准教授

研究者番号：30282312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ラットが強いストレスを受けると、その後の条件性恐怖反応が増強する現象は、心的外傷後ストレス障害(PTSD)の有用な動物モデルと考えられている。本研究では、強制水泳とフットショックによる複合ストレスを用いて、ラットの条件性恐怖反応のストレス誘発性増強における視床下部一下垂体-副腎皮質ストレス反応(HPA)系の関与について検討した。HPA系を操作する様々な薬物を複合ストレス前に投与し、その後の条件性恐怖反応を観察したところ、HPA系は、複合ストレス時にグルココルチコイド受容体とアドレナリン受容体の賦活が相補的に作用することで、ストレス誘発性恐怖反応増強の成立に関与していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Exposure to stressful events affects subsequent sensitivity to fear. The stress-induced enhancement of conditioned fear response is thought of as an useful animal model of post-traumatic stress disorder (PTSD). In this study, we investigated whether hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis involved in the stress-induced enhancement of conditioned fear response in rats by using multiple stress (forced swimming and foot shocks) paradigm. As the results, the observation of the conditioned stress response after treatments of a variety of drugs having effects on HPA function have clarified that the complementary interaction of glucocorticoid receptors and adrenergic receptors could facilitate the stress-induced enhancement of conditioned fear response.

研究分野：実験心理学・行動神経科学

キーワード：PTSD ラット HPA系 動物モデル グルココルチコイド受容体 アドレナリン受容体

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 恐怖やストレスと関連した疾患は、1995年の阪神淡路大震災や地下鉄サリン事件、2001年の池田小児童殺傷事件をきっかけとして我が国では注目されるようになった。なかでも特に注目されている疾患は、心的外傷後ストレス障害 (Posttraumatic Stress Disorder: PTSD) であり、たった一度の強度の恐怖体験によって、その後の生活に多大な影響がみられる。PTSD はアメリカでは1980年に初めてDSM-IIIに掲載された。そのきっかけとなったのは、ベトナム戦争帰還兵の中に、金縛りや叫喚、無口、無反応など戦地に赴く前には見られなかった症状を訴える者がおり、精神的に何らかの障害がみられると考えられたことである。その後2001年9月11日のテロ事件後に PTSD はさらに注目を集めるようになった。我が国においても、東日本大震災では PTSD に悩まされる被災者が数多く存在し、今後経済的な復興だけでなく、被災者の心のケアが重要視されているところである。

PTSD の症状には、悪夢、フラッシュバック (再燃現象)、事件の回想に伴う悪寒などが含まれるが、PTSD の主要な特徴として、その後の弱いストレスやトラウマ的事象に関連した些細なきっかけに対する過度の反応が挙げられる。実験動物であるラットにおいてもヒトと同様に、比較的強いストレスを受けるとその後の恐怖条件づけでのフリージング反応がより強くみられることが報告されている。たとえばRauら(2005)は、15回のフットショック (1.0 mA) をあらかじめラットに与えることで、その翌日に行った恐怖条件づけ (UCS として 1.0 mA のフットショック 1回) が増強されることを見出している。これはストレスによる恐怖反応増強効果として知られ、近年 PTSD の動物モデルとして注目されている (図1)。しかしこの恐怖反応増強効果の生起メカニズムについてはまだ明らかになっていない。

(2) ストレス誘発性恐怖反応増強効果を扱った先行研究では、強いストレスを受けた翌日の動物の恐怖反応を測定しているが、症状のトラウマ経験1ヶ月以上の持続が診断基準の1つとなっている PTSD の動物モデルとしての妥当性を考慮すると、ストレス後の恐怖反応のより長期的な観察が必要である。我々はこれまでに、4回のフットショック (1.0 mA, 1 s) と20分間の強制水泳を組み合わせ合わせた複合ストレス (MS) によって、その2~3週間後に行った恐怖条件づけが増強されること、またオープンフィールドテストによって測定した情動反応性についても、ストレスを受けた動物では長期間にわたって情動反応が亢進していることを明らかにしている (Ryoke et al., 2009)。

(3) 条件性恐怖反応に代表されるラットの

嫌悪性情動記憶には、視床下部-下垂体-副腎ストレス反応系 (HPA 系) が深く関与していることが数多くの先行研究によって報告されている。HPA 系の亢進が条件性恐怖反応や回避学習成績を増強する一方、HPA 系の抑制はそれらを低下させる。我々の過去の研究においても、同様の知見が得られている (山田・岩崎, 1994 など)。さらにヒトの臨床的知見から、PTSD 患者は健常者と比較して脳脊髄液中の副腎皮質ホルモン放出ホルモン (CRH) 濃度が高いことが知られており、扁桃体や海馬といった嫌悪性情動記憶に関与すると考えられている脳領域における CRH の神経調節作用が注目されている。したがって、ストレス誘発性恐怖反応増強効果においても、これら HPA 系が関与している可能性が高いと考えられる。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、MS を与える前に HPA 系を薬理的に操作することによって、ストレス誘発性恐怖反応増強効果にどのような影響を及ぼすのかについて明らかにする。具体的には以下の(1)~(4)について行動神経学的、行動薬理学的手法を用いて検討する。

(1) MS を与える直前に、副腎皮質ホルモン (グルココルチコイド) 合成阻害薬である metyrapone を腹腔内投与することにより HPA 系の活動を抑制し、その後の条件性恐怖反応に及ぼす影響を検討する。

(2) グルココルチコイドの嫌悪性情動記憶促進効果には、急性ストレス反応としてのノルアドレナリン分泌の関与が指摘されている (Roosendaal et al., 2006) ことから、MS を与える直前に アドレナリン受容体遮断薬である propranolol を腹腔内投与し、その後の条件性恐怖反応に及ぼす影響を検討する。

(3) CRH は HPA 系の活動を調節するだけでなく、より直接的な中枢作用、とりわけ扁桃体や海馬に対する神経調節作用を持つことが知られている。そこで MS を与える前に、CRH 受容体遮断薬を脳室内投与し、その後の条件性恐怖反応に及ぼす効果を検討する。

(4) 脳内のグルココルチコイド受容体 (GR) の関与を検討するために、MS を与える前に、GR 遮断薬を脳室内投与し、その後の条件性恐怖反応に及ぼす効果を検討する。

(5) GR および  $\beta$ -NER を同時に不活性化することで、MS による恐怖反応増強効果形成にストレス反応の複数が相互作用しているかどうかを検討した。RU38486 および propranolol の両方を MS 前に末梢投与し、その文脈恐怖条件づけに及ぼす影響を検討した。

### 3. 研究の方法

被験体として、Wistar-Imamich 系雄ラットを用いた。MS は、20 分間の強制水泳と 4 回のフットショック (1.0 mA, 1 s) から構成されていた。MS の 1 週間後に、被験体はレマインダー (複合ストレス時に入れられた箱) に曝された。MS の 2 週間後から、恐怖条件づけ装置に対する装置馴化試行 (5 min) を 4 日間行った。装置馴化終了の翌日に文脈恐怖条件づけ (0.1 mA, 2s × 2) を行い、その翌日、1 週間後および 2 週間後に保持テスト (5 min) を行った。装置馴化試行および保持テストではコンピュータによる画像解析ソフトを用いてフリージング反応を計測した。

(1) 被験体を MS 処置 × 薬物投与 (metyrapone 25 mg/kg (MET25), MET 100 mg/kg (MET100) or vehicle (VEH)) および NMS + VEH の 4 群に振り分けた (NMS + VEH 群 (n = 8), MS + VEH 群 (n = 8), MS + MET25 群 (n = 8), MS + MET100 群 (n = 8))。各被験体は、MS 処置の 30 分前に薬物の腹腔内投与を受けた。

(2) 被験体を MS 処置 × 薬物投与 (propranolol 20 mg/kg (PRO) or 0.9% 生理食塩水 (SAL)) の 4 群に振り分けた (NMS + SAL 群 (n = 8), NMS + PRO 群 (n = 7), MS + SAL 群 (n = 14), MS + PRO 群 (n = 13))。各被験体は、MS 処置の 30 分前に薬物の腹腔内投与を受けた。

(3) ペントバルビタールナトリウム (35 mg/kg, i.p.), ケタミン (10 mg/kg, i.m.) による麻酔下で被験体を脳定位固定装置に固定し、薬物のマイクロインジェクションを行うためのガイドカニューレを片側側脳室に埋め込んだ。約 1 週間の回復期間の後、被験体を MS 処置 × 薬物投与 (a/hCRF 5 μg (a/hCRF5), a/hCRF 20 μg (a/hCRF20) または 0.9% 生理食塩水 (SAL)) の 6 群に振り分けた (NMS + SAL 群 (n = 8), NMS + a/hCRF5 群 (n = 7), NMS + a/hCRF20 群 (n = 7), MS + SAL 群 (n = 9), MS + a/hCRF5 群 (n = 7), MS + a/hCRF20 群 (n = 6))。各被験体は、MS 処置の 15 分前に薬物投与を受けた。ガイドカニューレにインジェクションカニューレを刺入し、マイクロインジェクションポンプを用いて、薬物ないし溶媒を脳室内投与した。脳内投与は 1 分あたり 1 μl の速度で 2 分間、合計 2 μl 投与した。

(4) (3) と同様の方法でガイドカニューレを側脳室内に埋め込んだ後、被験体を MS 処置 × 薬物投与 (RU38486 または溶媒 (VEH)) の 4 群に振り分けた (NMS + VEH 群 (n = 4), NMS + RU38486 群 (n = 4), MS + VEH 群 (n = 4), MS + RU38486 群 (n = 4))。薬物投与方法は (3) と同様であった。

(5) 被験体を MS 処置 × 薬物投与 (RU38486

および PRO (RU+PRO) または DMSO および SAL (VEH)) の 4 群に振り分けた (NMS VEH 群 (n = 13), NMS RU+PRO 群 (n = 8), MS VEH 群 (n = 8), MS RU+PRO 群 (n = 9))。被験体はまず、RU38486 (100 mg/kg) または溶媒を皮下投与された (0.5 ml/kg)。その 15 分後に PRO または SAL を腹腔内投与され (1 ml/kg)、さらに 25 分間の待機時間の後 MS 処置を受けた。

### 4. 研究成果

(1) MS 処置は、ストレス誘発性恐怖反応増強効果を引き起こすことが確認されたが、MET によって MS 時のグルココルチコイド分泌を抑制したとしても恐怖反応増強効果は阻害されないことが示された。

その一方で、装置馴化においては MET 投与の影響がみられた。MET100 mg/kg 投与群は、装置馴化 1 試行目におけるフリージング反応をほとんど示さなかった。MS 装置にはフットショックを与えるための金属グリッドが備わっており、文脈恐怖条件づけ装置もまたフットショックを使用するための金属グリッドが備わっている。恐怖条件づけ文脈はバックグラウンドノイズ、照明、装置内壁およびグリッドの太さや本数、さらに動物を出し入れする扉の方向といった点で MS 文脈と全く異なっていたものの、MS 装置に対する恐怖反応は恐怖条件づけ装置に対して般化したと考えられる。そのため、フリージングを示さず MS 処置を受けた群がフリージングを示さなかったということは、恐怖反応増強効果に影響は示さなかったものの、MS 前 MET 投与は MS 時の恐怖条件づけが 2 週間後の文脈恐怖条件づけに対して般化するのを阻害したと考えられる。グルココルチコイドはストレス場面における記憶固定を促進させる効果があるため (Roosendaal et al., 2009), MET 投与による GC 合成阻害は、MS 文脈での恐怖記憶の固定を阻害した可能性がある。つまり、MS を受けた環境の記憶固定を阻害された MS + MET100 群は、装置馴化でフリージングを生じるのに必要な恐怖記憶を保持していなかったため、般化が生じなかったと示唆される。装置馴化において般化が生じなかったにも関わらず、恐怖反応増強が生じたことを併せて考えると、文脈記憶の表象自体が恐怖反応増強効果に関わっているのではなく、感覚を司る部位における神経伝達の変容あるいは、恐怖反応を引き起こす神経伝達回路の変容が生じたために、ストレス誘発性恐怖反応増強効果が形成される可能性が示唆された。

(2) PRO によって MS 時に -NER を抑制したとしても、恐怖反応増強効果は阻害されないことが示された。しかし (1) での MET と同様に、ストレス誘発性恐怖反応増強効果に薬物の効果はみられなかったものの、装置馴化において PRO 投与の影響がみられた。MS + PRO20 mg/kg 投与群は、装置馴化 1 試行目に

おけるフリージング反応をほとんど示さなかった。

(3) MS 前 a/hCRF 投与に関わらずストレス誘発性恐怖反応増強効果はみられたため、MS 時の中枢におけるストレス応答性 CRFR 活性は、恐怖反応増強の形成調節の主要な因子ではないことが示唆された。

(4) MS 誘発性恐怖反応増強に対して、MS 前 RU38486 脳室内投与は何ら影響をもたらさなかった。

(5) MS 誘発性恐怖反応増強効果は、GR および -NER 両方の遮断によって阻害された。したがって、GR と -NER の両者が相乗的に作用することによって、ストレス誘発性恐怖反応増強を生起させる可能性を示唆する。MS 時に GR または -NER いずれかの活性が減弱したとしても、片方の強い賦活によって、ストレス誘発性恐怖反応増強を形成しうるほどの神経伝達が生じるため、上記の実験で検討した MET による GC 合成阻害、PRO による -NER 遮断、または RU38486 による GR 遮断のいずれかの MS 前薬物処置によっても MS 誘発性条件性恐怖反応増強効果の形成に影響を及ぼさなかった可能性が考えられた。

#### 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 12 件)

Ishikawa, H., Yamada, K., Pavlides, C. & Ichitani, Y. (2014) Sleep deprivation impairs spontaneous object-place but not novel-object recognition in rats. *Neuroscience Letters*, 580, 114-118. (査読有)

Yamada, K., Ueno, M., Takano, E. & Ichitani, Y. (2014) Retrieval-induced forgetting in rats. *Animal Cognition*, 17(6), 1407-1411. (査読有)

Hori, M., Yamada, K., Ohnishi, J., Sakamoto, S., Takimoto-Ohnishi, E., Miyabe, S., Murakami, K., & Ichitani, Y. (2014) Tickling during adolescence alters fear-related and cognitive behaviors in rats after prolonged isolation. *Physiology & Behavior*, 131, 62-67. (査読有)

Ryoke, R., Yamada, K. & Ichitani, Y. (2014) Long-term effects of traumatic stress on subsequent contextual fear conditioning in rats. *Physiology & Behavior*, 129, 30-35. (査読有)

Ozawa, T., Yamada, K. & Ichitani, Y. (2014) Hippocampal BDNF treatment facilitates consolidation of spatial memory in spontaneous place recognition in

rats. *Behavioral Brain Research*, 263, 210-216. (査読有)

山田一夫・領家梨恵・一谷幸男 (2014) 齧歯類を用いた心的外傷後ストレス障害 (PTSD) 動物モデル: ストレス誘発性恐怖反応増強効果に着目して 認知神経科学, 15(3), 198-204. (査読無)

Furuie, H., Yamada, K. & Ichitani, Y. (2013) MK-801-induced and scopolamine-induced hyperactivity in rats neonatally treated chronically with MK-801. *Behavioral Pharmacology*, 24, 678-683. (査読有)

Kaku, M., Yamada, K. & Ichitani, Y. (2013) Can rats control previously acquired spatial information? Evidence of "directed forgetting" phenomenon in delay-interposed radial maze behavior. *Behavioral Brain Research*, 248, 1-6. (査読有)

Sugita M, Yamada K, Ichitani Y. (2013) Effects of number of items and interval length on the acquisition of temporal order discrimination in radial maze in rats. *Learning & Memory*, 20, 125-129. (査読有)

高野越史・山田一夫・一谷幸男 (2012) ラットの放射状迷路行動における作業記憶と参照記憶に対する NMDA 受容体遮断薬 MK-801 の効果 筑波大学心理学研究, 44, 17-22. (査読有)

Hori, M., Yamada, K., Ohnishi, J., Sakamoto, S., Takimoto-Ohnishi, E., Miyabe, S., Murakami, K., & Ichitani, Y. (2013) Effects of repeated tickling on conditioned fear and hormonal responses in socially isolated rats. *Neuroscience Letters*, 536, 85-89. (査読有)

Iwata, K., Izumo, N., Matsuzaki, H., Manabe, T., Ishibashi, Y., Ichitani, Y., Yamada, K., Thanseem, I., Anitha, A., Vasu, M.M., Shimmura, C., Wakuda, T., Kamenon, Y., Takahashi, T., Iwata, Y., Suzuki, K., Nakamura, K., & Mori, N. (2012) Vldlr overexpression causes hyperactivity in rats. *Molecular Autism*, 3:11 doi:10.1186/2040-2392-3-11. (査読有)

[学会発表](計 8 件)

Yamada, K., Ueno, M., Takano, E. & Ichitani, Y. (2014) Retrieval-induced forgetting in rats' spontaneous object recognition. Society for Neuroscience, 44th Annual Meeting (Washington, DC) (米国, 11/19).

Hori, M., Yamada, K., Ohnishi, J., Furuie, H., Murakami, K., & Ichitani, Y. (2014) Tickling alters fear-related and cognitive behaviors in rats isolated during adolescence. Society for

Neuroscience, 44th Annual Meeting (Washington, DC) (米国, 11/18).

Takano, E., Yamada, K. & Ichitani, Y. (2014) Effects of hippocampal administration of AMPA receptor antagonist NBQX on the retrieval of spontaneous object recognition memory. Society for Neuroscience, 44th Annual Meeting (Washington, DC) (米国, 11/19).

山田一夫・領家梨恵・一谷幸男 (2013) 齧歯類を用いた心的外傷後ストレス障害 (PTSD) 動物モデル: ストレス誘発恐怖反応増強効果に着目して. 第18回認知神経科学会学術集会 (教育講演), 東京大学 (東京都・文京区, 7/27).

Royle, R., Yamada, K. & Ichitani, Y. (2013) Effects of propranolol,  $\alpha$ -adrenergic receptor antagonist on stress-induced enhancement of conditioned fear response in rats. Society for Neuroscience, 43rd Annual Meeting (San Diego, CA) (米国, 11/10).

Takano, E., Yamada, K. & Ichitani, Y. (2013) Role of hippocampal AMPA receptors in the retrieval of long-term spontaneous object recognition memory. Society for Neuroscience, 43rd Annual Meeting (San Diego, CA) (米国, 11/11).

Royle, R., Yamada, K. & Ichitani, Y. (2012) Effects of propranolol,  $\alpha$ -adrenergic receptor antagonist on stress-induced enhancement of conditioned fear response in rats. Society for Neuroscience, 42nd Annual Meeting (New Orleans, LA) (米国, 10/14).

Takano, E., Yamada, K. & Ichitani, Y. (2012) Role of hippocampal NMDA receptors in the retrieval of long-term spontaneous object recognition memory. Society for Neuroscience, 42nd Annual Meeting (New Orleans, LA) (米国, 10/14).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kansei.tsukuba.ac.jp/~ichitanilab/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山田 一夫 (YAMADA, Kazuo)

筑波大学・人間系・准教授

研究者番号: 30282312

### (2) 研究分担者

一谷 幸男 (ICHITANI, Yukio)

筑波大学・人間系・教授

研究者番号: 80176289