

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009年度～2011年度

課題番号：21500344

研究課題名（和文）恐怖消去に関連するエピジェネティックな転写調節の検索

研究課題名（英文）Search for the epigenetic transcription factor related to fear extinction

研究代表者 清水 栄司

(SHIMIZU EIJI)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：00292699

研究成果の概要（和文）：脳内DNAメチル化変化のもたらす行動変化とその基盤を探るため、メチル化反応に使われるメチルドナーを欠乏させた食事をマウス生後3-6週に与えた。これによる行動変化の背景にはNMDA受容体NR2Bサブユニットの海馬における発現の差があると考えられた。ついで、人における恐怖条件付けと恐怖消去において、P50抑制の変化は、信号の性質によって異なり、危険であると判断されるような状態ではP50抑制率が弱まることがわかった。

研究成果の概要（英文）：To investigate what the change of DNA methylation in the brain alter behavior, mice were fed with methyl donor deficient diet in their 3wk to 6wk age. Difference in expression of NMDA receptor NR2B subunit in the hippocampus was considered as a cause of the behavioral change after the diet. In human, our results suggested that auditory evoked potential P50 differed according to the cognition of the properties (potentially dangerous or safe) of the perceived signal.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学 神経化学・神経薬理学

キーワード：恐怖消去、感覚ゲート機構、NMDA受容体、DNAメチル化、調整誘発電位 P50

1. 研究開始当初の背景

恐怖の消去を促進する分子メカニズムの解明は、自殺のリスクが高い不安障害の治療法の開発に重要な意義を持つ。申請者は、NMDA 信号伝達の強化が、恐怖記憶の消去促進につながることを発見した (Nature, 1999) が、依然恐怖消去の詳細なメカニズムは、まだ明らかにされていない。一方、Epigenetics の観点から、マウスの生育環境の違いが、遺伝子発現調節に影響を与え

て、恐怖消去の差異が生じることが予測できる。全く同一の遺伝子型を持つとされる、一卵性双生児でも、幼児期では、DNAメチル化に変化はないが、異なる環境での生育による影響のためか、老年期になると、DNAメチル化のパターンが大きく異なっていることが米国の研究者によって報告されている。また、生活スタイルの違いによっても、DNAメチル化は、3か月程度の間に変化することが示されている。そこで、

我々は、恐怖の消去という数日間の過程によって、DNAメチル化が変化するかどうかを検証することとした。一方、申請者らは、これまでのマウスとヒトを用いた感覚ゲート機構に関する研究(平成18-20年度科学研究費補助金(基盤研究(C))「神経栄養因子ミドカイン機能低下と統合失調症における感覚運動ゲート機構障害」研究代表者)を通じて、統合失調症のみならず、不安障害(強迫性障害)でも聴覚誘発電位P50抑制異常があることを見出している。

2. 研究の目的

心的外傷後ストレス障害(PTSD)などに代表される不安障害圏の精神疾患は、持続する不安や恐怖といった精神症状と、それによる行動範囲の限定などの行動障害が問題となる。発症原因となる恐怖体験はしばしば僅かな回数でしかなく、加えて症状の発現、治療反応性に個人差が大きい。そのような発症に対する脆弱性や、回復の個人差に対する背景に個々の遺伝子の違い、殊に特定の遺伝子の発現調節の差異が反映していることが考えられる。そこで、本研究は、マウスモデルを用いて、獲得した恐怖とその消去過程に関連してその発現が変化する遺伝子を探索し、特にDNAメチル化による転写調節がされているものを同定し、変化のあった遺伝子の発現調節を明らかにする。さらに、マウスでは、メチルドナー欠乏食によるDNAメチル化の障害と恐怖消去の関連を検討する。Igorら(2008)は、発達期の葉酸、メチオニン、コリンなどのメチルドナー欠乏食により、ラットの大脳皮質のDNAメチル化パターンが変化したことを報告している。DNAのメチル化は、その領域に含まれる遺伝子の発現を抑制することが知られており、この反応において、メチルドナーは重要な代謝因子として考えられている。しかし、我々の知る限り発達期のメチルドナー欠乏食が成体期の行動変化へ与える影響を示した報告はない。本研究の目的は、発達期のメチルドナー欠乏によるDNAメチル化の変化と恐怖記憶との関連を検討することである。さらに、ヒトでは、古典的恐怖条件づけの獲得と消去によって変化する聴覚誘発電位P50抑制を感覚ゲート機構の指標として、安全な信号(青色のLEDランプ)と安全でない信号(赤色のLEDランプ)の条件で比較し、恐怖消去の個人差のメカニズムを検討する。

3. 研究の方法

(1) DNAメチル化の障害が起こることが

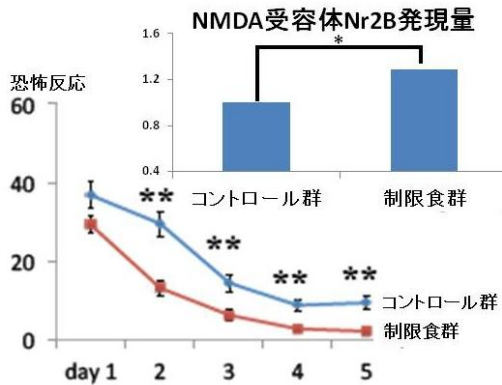
予測される、葉酸欠乏食によって育成したマウスの恐怖消去の差異を検討する。C57BL/6Jマウス(3週齢)にメチルドナー欠乏食を3-6週齢まで摂取させ、その後、通常の餌を12週齢まで与える群と3-12週齢まで通常食で飼育した群(3週齢)を用意する。この両群(12週齢)に対し行動学的解析として古典的恐怖条件づけと消去トレーニングを10日間のスケジュールで施行。1、2日目に恐怖刺激を与えられる箱にマウスを入れ慣らした後、3日目は脚への電気ショックにより恐怖の獲得を行う。4-10日目は、再びマウスをショック箱へ入れ、恐怖の消去を行う。このパラダイムでは、メチルドナー欠乏食による恐怖の感受性変化と獲得した恐怖の消去過程への影響を評価する。行動学的懐石としては他に、Open field試験と高架式十字迷路を用い、不安の評価も行う。分子生物学的解析として、DNAメチル化解析、遺伝子発現解析を実施する(6週齢、n=10、12週齢)。不安、恐怖の情動に関連の深い海馬を6、12週齢時に摘出し、Quantitative methylation-sensitive arbitrarily primed PCR(MS-AP-PCR)法、real time PCR法を用いてNMDA受容体遺伝子を対象にそれぞれ行う。

(2) ヒトの健常コントロール群において、古典的恐怖条件づけにおける獲得と消去の過程における、感覚ゲート機構である聴覚誘発電位P50抑制およびN100抑制の差異を、安全な信号(青色のLEDランプ)と安全でない信号(赤色のLEDランプ)とで、比較して、検討する。同時に皮膚電気反応を測定し、恐怖による身体的な反応とP50抑制およびN100抑制との関連についても検討する。

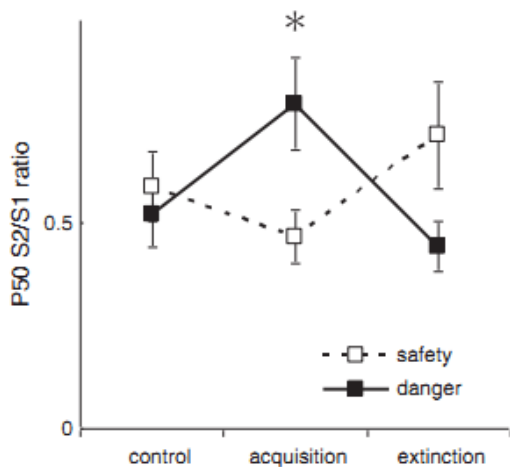
4. 研究成果

(1) 不安を測定するOpen field試験では6週令時には差がないが、12週令時には欠乏食群で、移動距離に差があった。高架式十字迷路では、6週令時には不安が少なく、12週令時には不安が強い結果であった。恐怖条件付け後の消去では、6週令時には恐怖消去が早く進行する意外な結果を得、12週令時にはコントロール群との差はなくなった。その背景にはNMDA受容体NR2Bサブユニットの海馬における発現の差があると考えられる結果をRT-PCR法から得た。下図に示す通り、6週令時では、欠乏食群でNR2Bの海馬での発現が高いことがその背景にあると考えられた。一方、MS-AP-PCRではメチル化に差が無く、NR2Bの発現量の差は少なくともNR2B遺伝子のメチル化変化によるものではないようである。メチルドナー欠乏食を発達期に一定期間課した後に成長後の行動解析まで行った研究はこれまでに無いため一定のインパクトを持った結果であると考えているが、今後は行

動解析の結果を説明する分子的メカニズムを解明することで、新たな創薬へとつなげていきたいと考えている。



(2) ヒトの恐怖条件づけと感覚ゲート機構の関連は、強迫性障害における聴性誘発電位P50の異常があることを申請者の研究室で示していたが、マウスにおいて、感覚運動ゲート機構であるプレパルス抑制が、恐怖条件づけによって、増強し、恐怖消去によっても回復しないことを発見した (Ishii et al., 2010)。これらの結果から、恐怖条件づけと感覚ゲート機構および感覚運動ゲート機構との関連性が示唆された。その上で、ヒトにおいて、恐怖条件付けと恐怖消去によって変化する聴性誘発電位P50の変化について更に新しいパラダイムを用いて結果を得た。健常者において、安全でない信号条件で、P50抑制が弱まる一方で、安全条件ではそのような変化が見られなかったことにより、恐怖条件付けと恐怖消去において、P50抑制の変化(=感覚ゲート機構の変化)は、信号の性質(安全か危険かによって異なり、危険であると判断されるような状態ではP50抑制率が弱まること、恐怖や不安の獲得に役割を果たしていることがうかがえた。これに関して、International Journal of Psychophysiology誌に投稿し、アクセプトされた。



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 3 件)

① Kurayama T, Matsuzawa D, Komiya Z, Nakazawa K, Yoshida S, Shimizu E. P50 suppression in human discrimination fear conditioning paradigm using danger and safety signals. International Journal of Psychophysiology. 2012;84(1):26-32. 査読あり
doi: 10.1016/j.ijpsycho.2012.01.004

② Ishii D, Matsuzawa D, Kanahara N, Matsuda S, Sutoh C, Ohtsuka H, Nakazawa K, Kohno M, Hashimoto K, Iyo M, Shimizu E. Effects of aripiprazole on MK-801-induced prepulse inhibition deficits and mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. Neuroscience Letters 26;471(1):53-57. 査読あり
doi: 10.1016/j.neulet.2010.01.010

③ Nanbu M, Kurayama T, Nakazawa K, Matsuzawa D, Komiya Z, Haraguchi T, Ogura H, Hashimoto T, Yoshida S, Iyo M, Shimizu E. Impaired P50 suppression in fear extinction in obsessive-compulsive disorder. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2010 17;34(2):317-22. 査読あり。
doi: 10.1016/j.pnpbp.2009.12.005

[学会発表] (計 6 件)

① 清水栄司. 不安障害の曝露療法の生物学と新薬の開発 第 13 回日本サイコセラピー学会 (シンポジウム) 大阪国際会議場 2012/3/17-18

② 清水栄司. 強迫性障害の診断と治療 第 1 回埼玉うつ・不安障害治療研究会 埼玉精神神経センター 2011/11/10

③ 石井大典. Effects of methionine, choline and folic acid-deficient diet at the developmental period on anxiety and fear in mice 第 40 回 NEUROSCIENCE 2010 San Diego Convention Center 2010 年 11 月 13 日

④ 清水栄司. パニック障害の診断と治療 パニック障害セミナー2010 ACU (札幌) 2010 年 8 月 28 日

⑤ 清水栄司. パニック障害の認知行動療法 第 6 回うつ病・不安障害フォーラム 西鉄グランドホテル (福岡) 2010 年 5 月 27 日

⑥ 清水栄司. OCD の病態仮説と治療理論 OCD の事象関連電位と感覚ゲート機構 心理職とのこれからの協働を考える 専門的治療 (認知行動療法) の立場から 第 106 回日本精神神経学会学術総会 広島国際会議場 (広島) 2010 年 5 月 20 日~5 月 22 日

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/phys1/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 栄司 (SHIMIZU EIJI)

千葉大学大学院医学研究院・教授

研究者番号：00292699