

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25830005

研究課題名(和文) 恐怖記憶の制御機構における扁桃体グルココルチコイド受容体の機能解明

研究課題名(英文) Roles of lateral amygdala glucocorticoid receptor in modulation of fear memory

研究代表者

井上 蘭 (Inoue, Ran)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：70401817

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)：グルココルチコイド受容体(GR)はストレス応答および恐怖記憶の制御に重要な役割を果たすことが示唆されている。恐怖記憶の連合を司る扁桃体外側核(LA)にはGRが高発現しているが、恐怖記憶制御におけるLAGRの機能は明らかにされていない。本研究では、我々が作製したLA選択的GR欠損(LAGRKO)マウスを用いて、LAGRが通常状態の音依存的恐怖記憶の形成に重要な役割を果たすことを明らかにした。また、ストレス負荷1時間後の音依存的恐怖記憶の抑制がLAGRKOマウスでは起こらないことを見出した。これらの結果から、LAGRがストレス状態に応じた音依存的恐怖記憶の制御に重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Glucocorticoid receptor (GR) is critical for signaling mediated by stress-induced levels of glucocorticoids. The action of GR on emotional memory varies depending on its distribution in specific brain regions. However, the region-specific role of GR in the lateral nucleus of the amygdala (LA) in fear learning and memory remains unclear. By using a genetic approach and the paradigm of Pavlovian fear conditioning, we found that disruption of LAGR resulted in an auditory-cued fear memory deficit only when the conditioning was strengthened. In response to a single restraint stress (RS) prior to fear conditioning, both control and LAGR knockout (KO) mice exhibited enhancement in contextual fear memory. In contrast, a suppressive effect of prior RS on auditory-cued fear memory, observed in control mice 1 h before conditioning, was attenuated in LAGRKO mice. These findings suggest that LAGR plays differential roles in different stress-modulated patterns of auditory-cued fear memory.

研究分野：分子神経科学

キーワード：扁桃体 恐怖記憶 ストレス

1. 研究開始当初の背景

ストレスや恐怖は、視床下部 下垂体 副腎軸 (HPA) を作動させ、副腎皮質からストレスホルモンであるグルココルチコイドを分泌させる。血流で脳内に運ばれたグルココルチコイドは、情動の中枢である扁桃体のグルココルチコイド受容体 (GR) を活性化し、恐怖記憶の制御だけでなく、過剰な心的ストレスが原因となる PTSD の病態にも関わっていることが示唆されている (Frontiers in Neuroendocrinology 30, 358-, 2009)。

扁桃体は、異なる機能的特徴を持つ 10 個以上の神経垂核から形成され、その中でも扁桃体外側核 (LA) は大脳皮質や視床からの感覚情報を受け取る入力核であり、恐怖記憶に関わる神経回路において中心的な役割を果たしている。特に恐怖条件付けなどの連合記憶においては、音や匂いなどの条件刺激と (CS) と足への電気ショックなどの無条件刺激 (US) が LA の神経細胞に入力することで可塑的な変化が生じ、長期的な恐怖記憶が形成されると考えられている (Neuron 44, 75-, 2004)。LA には GR が多く発現し、グルココルチコイド作用の重要な標的部位である。しかし、恐怖記憶の制御ならびに PTSD の病態形成における LA 部位特異的な GR の機能は明らかになっていない。

2. 研究の目的

我々が作製した LAGR ノックアウト (KO) マウスを用いて、通常状態ならびにストレス負荷後の恐怖記憶形成における LAGR の機能を明らかにし、LAGR の機能破綻と PTSD の病態との関連性を明らかにする。

3. 研究の方法

1) コントロール (floxed GR) LAGRKO マウスを用いて、通常状態で音依存的恐怖条件付け (音と電気ショックのペアリング 1, 3, 6 回) を行った。24 時間後と 48 時間後に文脈依存的 (contextual test) ならびに手が

かり依存的 (cued test) 恐怖記憶テストを行った。

2) 恐怖条件付け 30 分ならびに 90 分後に脳を採取し、記憶の固定化に関わる転写因子 CREB の活性化レベルを免疫組織化学にて検討した。

3) LAGRKO マウスの LA に GR 発現アデノ随伴ウイルスベクター (GR-AAV) をインジェクションし、LAGRKO マウスで認められた恐怖記憶形成異常のレスキュー実験を行った

4) 拘束ストレス負荷 1 時間後に恐怖条件付けを行い、ストレスが文脈ならびに手がかり依存的恐怖記憶の形成に与える影響を解析した。

5) 通常状態、恐怖条件付け後ならびにストレス負荷後の血中グルココルチコイド量を測定し、LAGRKO マウスで HPA 軸の機能に異常があるかを解析した。

6) オープンフィールドテストを行い、新奇環境下での自発的活動性ならびに不安様行動に差があるかを解析した。

4. 研究成果

1) 6 回の音と電気ショックのペアリングで恐怖条件付けを行った実験で、LAGRKO マウスは floxed GR マウスに比べ、音に対する恐怖反応 (freezing 率) が有意に低かったが、文脈依存的恐怖記憶の形成には差が認められなかった (図 1a, 1b)。1 回あるいは 3 回の音と電気ショックのペアリングでは、文脈、音依存的恐怖記憶ともに LAGRKO マウスとコントロールマウスで差が認められなかった。LAGRKO マウスで認められた音に対する恐怖記憶の異常は、AAV ベクターを用いて LAGRKO マウスの LA に GR を強制発現させることでレスキューできた (図 1c, 1d)。6 回のペアリングを行った条件では、血中のグルココルチコイドレベルが 3 回のペアリングに比べ有意に高いことから (図 1e)、LAGR が強いストレスを伴う音依存的恐怖記憶の形成に重要な役割を果た

すことが明らかとなった。

2) LAGRKO マウスでは恐怖条件付け後の CREB の活性化レベルの維持時間がコントロールマウスに比べ顕著に短縮した (図 1f)。LAGRKO マウスでは、恐怖条件付け 2 時間後の短期記憶に形成には異常がないことから、LAGR が CREB との相互作用を介し、記憶の固定化過程を制御することが示唆された。

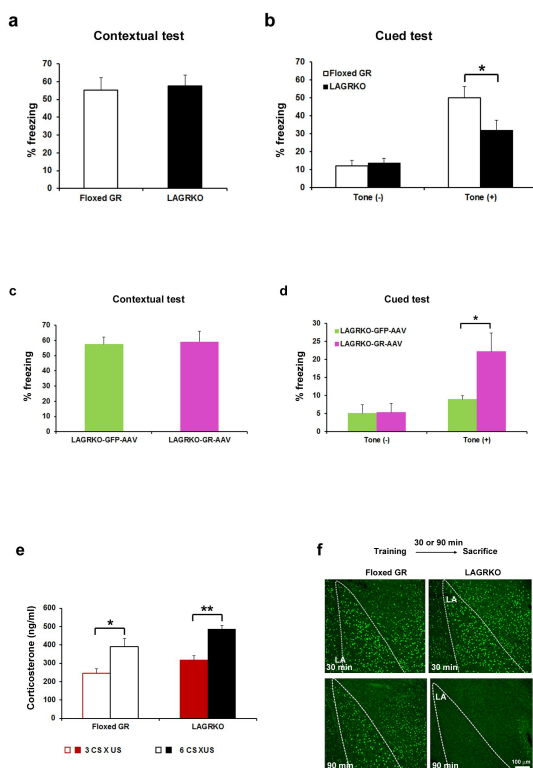


図 1. 恐怖記憶形成における LAGR の役割

3) LAGRKO マウスでは新奇環境下での自発的活動性 (図 2a)、不安様行動 (図 2b) ならびに HPA 軸の機能に異常が認められなかった。

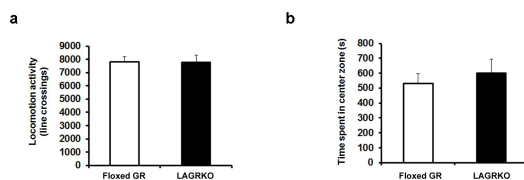


図 2. オープンフィールドテスト

4) 拘束ストレスの 1 時間後 (RS1 h) に恐怖条件付けを行った条件では、コントロールマ

ウスでは文脈依存的恐怖記憶が増強し、音依存的恐怖記憶が抑制された。ストレス負荷による音依存的恐怖記憶の抑制は LAGRKO マウスで認められなかった (図 3a, 3b)。PTSD では、恐怖とは関連性の低い音などの手がかりに対する記憶増強、文脈に対する記憶障害などの特徴がある。これらのことから、ストレス負荷後の一定時間までは、ストレスが過剰な手がかり依存的恐怖記憶を抑制するメカニズムが存在し、その抑制機構に LAGR が重要な役割を果たすことが示唆された。また、ストレスによる手がかり依存的恐怖記憶の抑制機構の破綻が PTSD の病態形成に関わる可能性が示唆された。

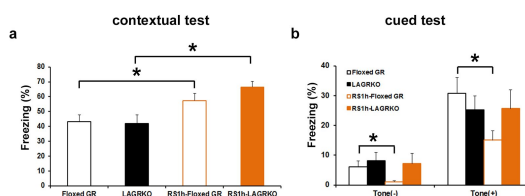


図 3. ストレス負荷時の恐怖記憶形成における LAGR の役割

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 井上蘭, 田中-林亜由美, 森寿. ストレスによる恐怖記憶制御における扁桃体外側核グルココルチコイド受容体の役割; 第 37 回日本神経科学大会; 2014 Sep 11; 横浜.

2. 井上蘭, 田中亜由美, 森寿. 恐怖記憶制御における扁桃体外側核グルココルチコイド受容体の役割; 第 43 回日本神経精神薬理学会; 2013 Oct 26; 宜野湾.

3. Inoue, R., Tanaka, A., and Mori, H.: Attenuation of tone-conditioned freezing in lateral amygdale-selective glucocorticoid receptor knockout mice.

Society For Neuroscience's 42th annual meeting, 2012, 10, New Orleans, Louisiana.

〔図書〕(計 1 件)

1 .井上蘭, 森寿. 「情動学習の分子機構、情動の仕組みとその異常」 p2-17(山脇成人、西条寿夫編集、情動学シリーズ2、朝倉書店 2015年5月25日).

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

6 . 研究組織

(1)研究代表者

井上 蘭 (INOUE Ran)
富山大学・大学院医学薬学研究部・助教
研究者番号：70401817

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし