

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07125

研究課題名（和文）恐怖記憶の消去学習と再固定化に着目したPTSD曝露療法併用薬の開発

研究課題名（英文）Post-reexposure administration of riluzole attenuates the reconsolidation of conditioned fear memory in rats

研究代表者

山田 光彦（Yamada, Mitsuhiko）

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所 精神薬理研究部・部長

研究者番号：60240040

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）：これまでに我々は、グルタミン酸神経伝達を抑制するリルゾールがラットの恐怖記憶の消去学習を促進することを報告した。本研究では、リルゾールの恐怖記憶の再固定化への影響を再曝露時間を区別した文脈的恐怖条件付け試験により検討した。その結果リルゾールは、消去学習促進作用と再固定化阻害作用を併せ持つことが明らかとなった。また、リルゾールの再固定化阻害作用には、背側海馬が関与することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PTSDの曝露療法併用薬は、認知機能を障害せず、抗不安、消去学習促進、再固定化阻害作用を有することが理想であるが、消去学習を促進する薬物は再固定化も促進するとされている。本研究によりリルゾールは、恐怖記憶の再固定化阻害と消去学習促進作用を併せ持つことが明らかとなり、理想的な併用薬の4つの作用を有することが明らかとなった。以上のことから、リルゾールの曝露療法併用薬としての適用が期待される。

研究成果の概要（英文）：Recently, we demonstrated that riluzole, which has been shown to block the glutamatergic system, facilitates fear extinction in rats. In the present study, we examined the effect of riluzole on reconsolidation of fear memory. Post-reexposure administration of riluzole attenuated the reconsolidation of conditioned fear memory in rats. In addition, attenuating effect of riluzole on the reconsolidation of fear memory involves, at least in part, the dorsal part of the hippocampus.

These findings strongly suggest that riluzole have therapeutic potential when combined with exposure therapy for anxiety disorders including PTSD.

研究分野：精神薬理

キーワード：心的外傷後ストレス障害 曝露療法 リルゾール

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心的外傷後ストレス障害 (PTSD) は、命が脅かされるような出来事 (戦争、天災、事故、犯罪、虐待等) により強い恐怖を感じ、その恐怖体験が何度も思い出され、社会活動が困難となる障害である。PTSD 治療ガイドラインでは、曝露療法が第一選択となっている。これは、安全な環境下で恐怖記憶を想起させる「再曝露」を行い、安全である等の新たな情報を与えることにより、恐怖記憶の消去学習を促す治療法である。しかし、不十分な再曝露では相反する作用の再固定化が起こり、恐怖記憶が増強する。

曝露療法を行う前に、患者の不安の緩和や、曝露療法の効果を高める目的で薬剤の使用が試みられている。ベンゾジアゼピン系薬剤は不安を緩和するが、認知機能を低下させる。さらに、学習・記憶を障害するため、曝露療法に必要な恐怖記憶の消去学習そのものが損なわれてしまう。一方 D-サイクロセリンは、消去学習を促進することから有用性が期待されたが、再固定化も促進するため、再曝露条件によっては恐怖記憶が逆に増強する。また、抗不安作用を有さないため、患者の心的負担が大きい。曝露療法併用薬には、認知機能を障害しないこと、抗不安作用、消去学習促進作用、再固定化阻害作用等が求められるが、消去学習を促進する薬物は再固定化も促進するとされており、これらの利点を併せ持つ薬物の報告はない。

2. 研究の目的

Riluzole は、*in vitro* においてグルタミン酸神経伝達を抑制的に調節する (Zarate, 2010)。我々は、実験動物において、riluzole が学習・記憶を障害せず認知機能を亢進すること、抗不安様作用を有することを報告した (Sugiyama, 2012)。さらに恐怖条件付けを行い、riluzole 投与後に再曝露試験を行った結果、十分な再曝露時間のみならず、不十分な再曝露時間でも恐怖記憶が減弱した (Sugiyama, 2015)。このことから、riluzole が消去学習を亢進し再固定化を阻害する可能性が考えられたが、riluzole には認知機能亢進作用、抗不安様作用があるため、消去学習、再固定化それぞれに対する特異的な作用を明らかにすることはできなかった。そこで本研究では、riluzole の作用を消去学習と再固定化に明確に分離して明らかにすることにより、曝露療法併用薬としての可能性を検討した。

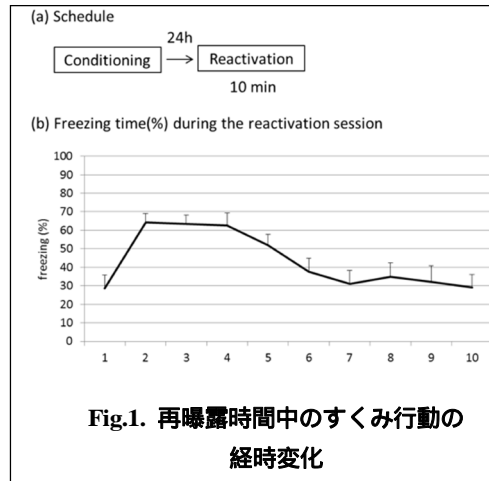
3. 研究の方法

実験動物は全て雄性 Wistar/ST ラットを用いた。文脈的恐怖条件づけ試験は、電気グリッドを設置したチャンバーで電気刺激 (0.4 mA、1 秒間、40 秒間隔を 3 回) を与える「条件づけ」、条件づけの翌日、チャンバーへ 3 分間 (再固定化条件) または 10 分間 (消去学習条件) 再曝露し、直後に試験薬を皮下投与する「再曝露処置」、薬物投与の X 日後にチャンバーへ再び曝露し、6 分間のすくみ行動時間を測定する「すくみ行動測定試験」の 3 つのステップから成る。本研究では X に様々な期間を設定し、恐怖記憶の再固定化・消去学習に対する riluzole の効果を検討した。全身投与の実験には riluzole (3 mg/kg), saline, 陽性対照薬 midazolam (1 mg/kg) を皮下投与した。局所投与実験では、riluzole (2 μ M) または PBS (0.2 μ L/side, 0.2 μ L/min) を両側背側海馬 CA1 領域へ投与した。また、別のコホートを使用し、ウエスタンブロット法を用いて再曝露処置から 30 分後の背側海馬における転写因子 CREB のリン酸化率の測定を行った。

4. 研究成果

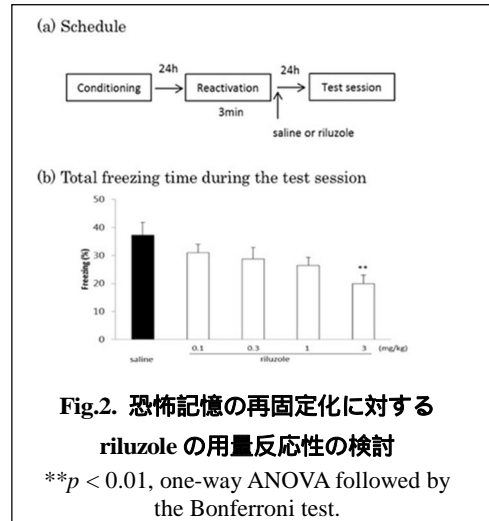
(1) 再固定化・消去学習に適切な再曝露時間の検討

はじめに、先行研究をもとに設定した恐怖条件づけの刺激強度 (0.4 mA、1 秒間、40 秒間隔を 3 回) に対して、再固定化、消去学習の検討に適切な再曝露時間を確定するため、条件づけの翌日に 10 分間の再曝露処置を行い、すくみ行動の経時変化を検討した (Fig. 1a)。再曝露開始から 1 分毎のすくみ行動時間は、最初の 1 分間で増加し、2~4 分間に定常状態になり、5 分以降には減少が見られた (Fig. 1b)。この結果より、再曝露時間 3 分間を再固定化、10 分間を消去学習条件として設定した。



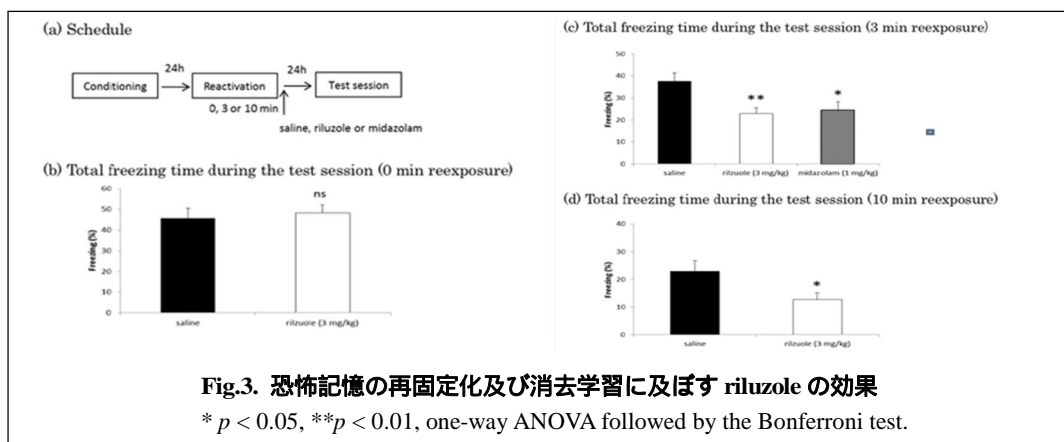
(2) 恐怖記憶の再固定化に対する riluzole の用量反応性の検討

これまでに、riluzole (3 mg/kg, p.o.) が恐怖記憶の消去学習を促進することを報告した (Sugiyama et al., 2015)。本研究では、恐怖記憶の再固定化に対する riluzole の用量反応性を検討した。条件づけの翌日に 3 分再曝露を行い、直後に saline または riluzole (0.1, 0.3, 1, 3 mg/kg) を皮下投与し、さらにその翌日に 6 分間のすくみ行動測定試験を行った (Fig. 2a)。その結果、すくみ行動合計時間は riluzole の用量依存的に減少した (Fig. 2b)。さらに riluzole (3 mg/kg) 群は saline 群と比較してすくみ行動が有意に減少した。よって、これ以降の実験には 3 mg/kg の riluzole を使用した。



(3) 恐怖記憶の再固定化および消去学習に及ぼす riluzole の効果

本研究で設定した再固定化条件 (3 分再曝露) および消去学習条件 (10 分再曝露) における riluzole の効果を検討した。条件づけの翌日に 0 分、3 分または 10 分の再曝露を行い、直後に saline または riluzole を皮下投与し、さらにその翌日に 6 分間のすくみ行動測定試験を行った (Fig. 3a)。再固定化の検討においては、陽性対照薬として midazolam を使用した。



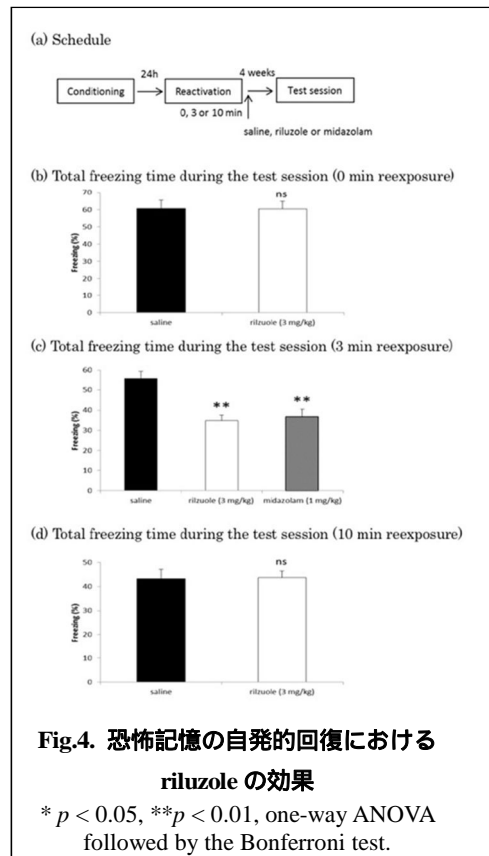
再曝露を行わずに riluzole を投与した群（0分再曝露群）では、翌日のすくみ行動の合計時間が、saline 群と同程度だった（Fig. 3b）。一方、3分再曝露後に riluzole または midazolam を投与した群では、翌日のすくみ行動の合計時間が saline 群に比較して有意に減少した（Fig. 3c）。また、10分再曝露後に riluzole を投与した群では、saline 群と比較してすくみ行動の合計時間が有意に減少した（Fig. 2d）。

これらのことから、riluzole は再固定化を阻害し、消去学習を促進する可能性が示唆された。また、riluzole 群において観察されたすくみ行動の減少は、再曝露依存的に起こったことが確認された。

（4）恐怖記憶の自発的回復における riluzole の効果

設定した 3 分、10 分の異なる再曝露時間に対して現れた riluzole の効果が、それぞれ再固定化の阻害、消去学習の促進を示しているかを確認するため、恐怖反応の自発的回復を用いた実験を行った。この実験は、消去学習により減弱された恐怖反応は長期間経過すると自発的に回復するが、再固定化の阻害により減弱した恐怖反応は自発的回復が起こらないことを利用したものである (Duvarci and Nader, 2004; Monfils et al., 2009)。

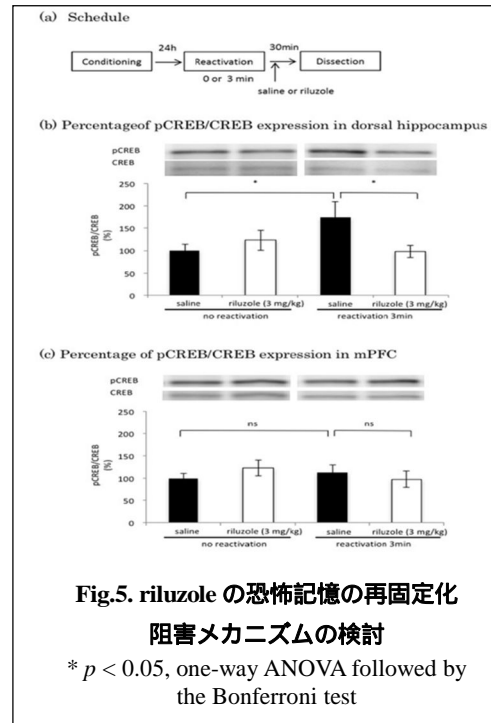
再曝露処置後 4 週間経過した時点ですくみ行動測定試験を行った(Fig. 4a)。その結果、再曝露を行わず riluzole を投与した群では、すくみ行動は saline 群と同程度だった（Fig. 4b）。3 分再曝露条件では riluzole 群において恐怖記憶の自発的回復が抑制され (Fig. 4c)、再固定化を阻害した可能性が強く示唆された。一方 10 分再曝露条件では、riluzole 群においてコントロール群と同程度のすくみ行動が見られ自発的回復が観察されたことから (Fig. 4d)、消去学習が促進されたことが明らかとなった。



(5) Riluzole の恐怖記憶の再固定化阻害メカニズムの検討

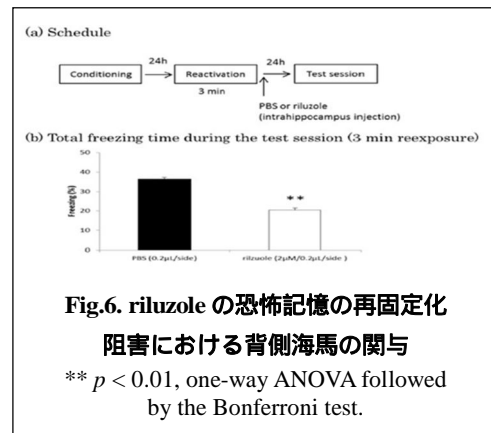
恐怖記憶の再固定化が起こると、背側海馬のリン酸化 CREB が増加することが報告されている (Miyama et al., 2009)。そこで、条件付け翌日の再曝露 (0 分、3 分) 後に試験薬を投与したラットの背側海馬および内側前頭前野におけるリン酸化 CREB をウエスタンブロット法により定量した (Fig.5a)。

背側海馬において、再曝露を行わない saline 群に比べて、3 分再曝露 saline 群でリン酸化 CREB の増加が認められた。興味深いことに、このリン酸化 CREB の増加は、3 分再曝露 riluzole 群では抑制されていた (Fig.5b)。一方、内側前頭前野では、発現変化は認められなかった。これらの結果から、riluzole の恐怖記憶の再固定化阻害作用には背側海馬が関与する可能性が示唆された。



(6) Riluzole の恐怖記憶の再固定化阻害における背側海馬の関与の検討

Riluzole の再固定化阻害作用における背側海馬の関与を明らかにするため、条件付け翌日の再曝露 (3 分) 後に riluzole を背側海馬に局所投与した (Fig.6a)。その結果、翌日のすくみ行動の有意な減少が観察された (Fig.6b)。このことから、riluzole の再固定化阻害作用には少なくとも背側海馬が関与していることが明らかとなった。



(7) 遠隔恐怖記憶に及ぼす riluzole の効果

臨床における不安性障害の曝露療法は、恐怖体験から長期間経過した後に開始するケースが多い。そこで、遠隔恐怖記憶に及ぼす riluzole の効果を検討した。その結果、条件づけから 8 週間経過した恐怖記憶に対しても恐怖記憶を減弱させることが明らかとなった。

以上の結果より、riluzole は、恐怖記憶の再固定化阻害作用と消去学習促進作用を併せ持つことが明らかとなった。PTSD の曝露療法併用薬には、認知機能を障害しないこと、抗不安作用、消去学習促進作用、再固定化阻害作用が求められるが、riluzole はこれらのすべての作用を有することから、曝露療法併用薬としての有用である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Akagi, K., Yamada, M., Saitoh, A., Oka, JI. and Yamada, M. | 4. 巻 131 |
| 2. 論文標題 Post-reexposure administration of riluzole attenuates the reconsolidation of conditioned fear memory in rats | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Neuropharmacology | 6. 最初と最後の頁 1-10 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuropharm.2017.12.009. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 山田光彦, 赤木希衣, 山田美佐, 斎藤顕宜, 岡淳一郎 | 4. 巻 29 |
| 2. 論文標題 恐怖記憶の処理過程を制御する新規薬物療法の開発 | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 日本生物学的精神医学会誌 | 6. 最初と最後の頁 60-63 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11249/jsbpjpp.29.2_60 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 古家宏樹, 赤木希衣, 山田美佐, 岡淳一郎, 山田光彦 |
| 2. 発表標題 リルゾールは恐怖条件づけ文脈学習課題において遠隔恐怖記憶を減弱する |
| 3. 学会等名 第41回日本神経科学大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 赤木希衣, 山田美佐, 岡淳一郎, 山田光彦 |
| 2. 発表標題 古い文脈的恐怖記憶に対するリルゾールの効果 |
| 3. 学会等名 第138回日本薬理学会関東部会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 川島義高、山田美佐、古家宏樹、國石洋、野田隆政、山田光彦 |
| 2. 発表標題 不安を主症状とする精神疾患に対するRiluzoleの効果についての検討：システマティックレビュー |
| 3. 学会等名 第28回日本臨床精神神経薬理学会、第48回日本神経精神薬理学会合同年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 赤木希衣、山田 美佐、齋藤 顕宜、岡 淳一郎、山田光彦 |
| 2. 発表標題 リルゾールはラットの恐怖記憶再固定化を阻害する |
| 3. 学会等名 第19回応用薬理シンポジウム |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山田光彦、赤木希衣、山田美佐、川島義高、齋藤顕宜、岡淳一郎 |
| 2. 発表標題 嫌悪記憶の消去学習を巡るトランスレーショナル研究 |
| 3. 学会等名 39回日本生物学的精神医学会・第47回日本神経精神薬理学会 シンポジウム |
| 4. 発表年 2017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 |
|-------------------|--|---|----|
| 研究 分 担 者 | 古家 宏樹 (Furuie Hiroki) (90639105) | 国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所 精神薬理研究部・室長 (82611) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 氏名 (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 山田 美佐 (Yamada Misa) (10384182) | 国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所 精神薬理研究部・科研費研究員 (82611) | |
| 研究分担者 | 斎藤 顕宜 (Saitoh Akiyoshi) (00366832) | 国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所 精神薬理研究部・室長 (82611) | 削除 |