

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06902

研究課題名（和文）扁桃体グルココルチコイド受容体を介する遠隔恐怖記憶の調節機構

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

研究代表者

井上 蘭（Inoue, Ran）

富山大学・学術研究部医学系・助教

研究者番号：70401817

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：グルココルチコイド受容体(GR)を扁桃体外側核(LA)選択的に欠損させた(LAGRKO)マウスでは、音依存性の遠隔恐怖記憶が有意に増強される。遠隔恐怖記憶の制御に関わる内側前頭前野(mPFC)ならびに聴覚皮質(AC)の記憶痕跡細胞の動態を検討したところ、LAGRKOマウスのmPFCでは遠隔恐怖記憶の想起に関わる記憶痕跡細胞が恐怖条件付け時に多く形成され、ACでは逆に少なく形成されることが明らかとなった。これらの結果から、mPFCとACにおける記憶痕跡細胞の形成と変遷過程の異常が過剰な遠隔恐怖記憶の原因となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遠隔恐怖記憶の異常な増強を示すLAGRKOマウスを用いた研究により、mPFCとACにおける記憶痕跡細胞の形成と変遷過程の異常が過剰な遠隔恐怖記憶の形成に関与することを明らかにした。また、LAからACへ強い投射があることを初めて明らかにし、LA-ACシナプスの情報伝達異常が過剰な遠隔恐怖記憶を形成する原因の一つである可能性を示唆した。本研究の成果は、PTSDの発症・悪化防止のための新規介入療法の提示に繋がる医学社会的波及効果があるだけでなく、恐怖記憶調節の基本原理の理解に貢献する学術的な波及効果があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：A key feature of post-traumatic stress disorder (PTSD) is an intense and enduring memory for the trauma. However, the abnormalities in engram cells and circuits that underlie excessive remote fear memories has not been clarified. Lateral amygdala-selective glucocorticoid receptor knockout (LAGRKO) mice exhibit enhanced remote auditory fear memory. In this study, we found that in the auditory cortex (AC), the number of remote fear memory engram cells activated during fear conditioning was significantly smaller in LAGRKO mice than in control mice. By contrast, in the medial prefrontal cortex (mPFC), the number of remote fear memory engram cells activated during fear conditioning was significantly larger in LAGRKO mice than in control mice. These results suggest that abnormal organization of engrams in the AC and mPFC is associated with excessive remote fear memory after the trauma.

研究分野：神経科学、脳科学

キーワード：遠隔恐怖記憶 扁桃体 グルココルチコイド受容体 記憶痕跡細胞

## 1. 研究当初の背景

非日常的な強いストレス体験後に発症する PTSD が現在、精神保健的ならびに社会的な問題となっている。PTSD では、トラウマ体験時の音や匂いなどの感覚刺激と恐怖との連合記憶が一ヶ月以上経っても強いレベルで維持され、それが PTSD の主な症状である侵入記憶や過度な回避行動、不安を引き起こす手がかりとなることが知られている。恐怖記憶は危急時の生存確率を高める防御反応の一つであるが、それが有益に働くためには恐怖を形成する脳の働きに加え、過剰な恐怖記憶の形成を抑制する脳の働きも必要である。しかしながら、PTSD の原因となる過剰な遠隔恐怖記憶の形成を防ぐための脳内機構はほとんど不明である。扁桃体外側核 (LA) は大脳皮質や視床からの各種感覚情報を受け取り、恐怖記憶の制御に関わる神経回路において中心的な役割を果たす脳部位である。我々はストレス制御に関わるグルココルチコイド受容体 (GR) を LA 選択的に欠損させたマウス (LAGRKO) を作製し、音依存的恐怖条件付け 28 日後の遠隔恐怖記憶が LAGRKO マウスにおいて異常に増強されることを見出した。一方、音依存的恐怖条件付け 1 日後の恐怖記憶はコントロール (Floxed GR) マウスと同程度であることから、LAGR が過剰な遠隔恐怖記憶の抑制機構において重要な役割を果たすことが示唆された。この結果から、LAGR 依存的な分子変化や神経回路網の機能、構造変化などを解析することで過剰な遠隔恐怖記憶の形成に関わる脳内機構の一端を解明できると考えられ本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

1) 過剰な遠隔恐怖記憶形成に関与する音情報伝達系の異常を特定する。

音依存的恐怖条件付けの際、音情報は内側膝状体 (MGN) からの直接経路と聴覚皮質 (AC) を介する間接経路により LA に入力される。LAGRKO マウスではこれらの音情報伝達系に変調が生じたことで、過剰な遠隔恐怖記憶が形成される可能性がある。この仮説を実証するため、MGN と LA の記憶痕跡細胞 (記憶が蓄えられている入力依存的 c-fos 発現細胞) 間ならびに AC と LA の記憶痕跡細胞間で作られるシナプスを dual-eGRASP 手法を用いて可視化し、二つの音伝達経路のシナプスの数と大きさを比較検討することで、LAGRKO マウスのどの経路にシナプス伝達の異常があるかを明らかにする。

2) 遠隔恐怖記憶の制御に関わる脳部位における記憶痕跡細胞の形成と変遷過程を明らかにする。

## 3. 研究の方法

1) 2 か月齢の LAGRKO と Floxed GR マウスを用いて音依存的恐怖条件付けを行い、28 日後に遠隔恐怖記憶テストを行った。90 分後に脳を摘出し、神経活動マーカーである c-Fos の免疫染色を行った。

2) 記憶を符号化している記憶痕跡細胞をラベルするため、c-fos のプロモーターの制

御下で rtTA を発現するアデノ随伴ウイルス (AAV c-fos-rtTA) と doxycycline 存在下で赤色の蛍光蛋白 mScarlet の発現を制御できる AAV (AAV Tet0-mScarlet-post eGRASP) を作製した。AAV c-fos-rtTA と AAV Tet0-mScarlet-post-eGRASP を LAGRKO マウスと Floxed GR マウスの mPFC あるいは AC に注入し、2 カ月後に音依存的恐怖条件付けを行った。音依存的恐怖条件付けの 1 時間前に doxycycline を腹腔内投与し、恐怖条件付け時に活性化する記憶痕跡細胞 (mCherry 陽性細胞) をラベルする。28 日後の遠隔恐怖記憶テストを行い、90 分後に脳を摘出 c-Fos の免疫染色を行った。

3) 記憶痕跡細胞間で作られるシナプスを dual-eGRASP 手法を用いて可視化するため、AAV Tet0-Yellow pre-eGRASP を作製した。

4) 記憶痕跡細胞の活動を抑制し、遠隔恐怖記憶に与える影響を検討するため、AAV-Tet0-hM4D-mcherry を作製した。

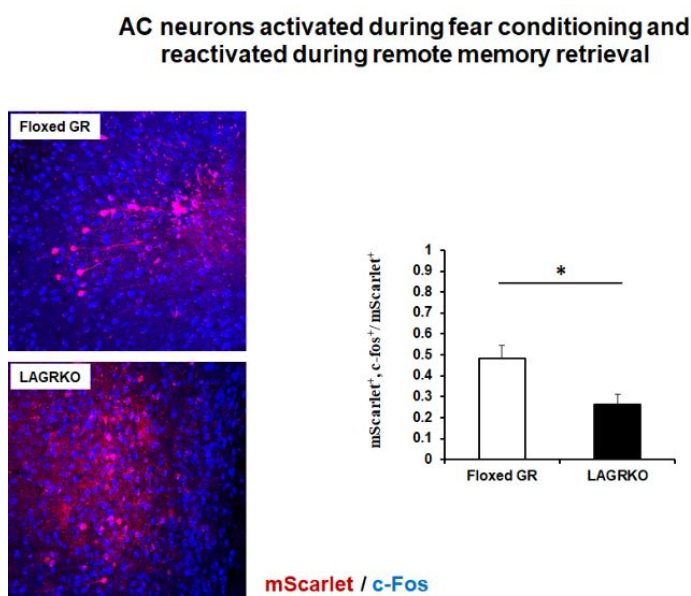
5) LA から AC へ直接投射があるかどうかを調べるため、AAV hSyn-mcherry を LAGRKO マウスの LA にインジェクションし、1 か月後に脳を摘出し、mcherry の発現を検討した。

#### 4. 研究の成果

1) LAGRKO マウスでは AC における c-Fos 陽性細胞数が Floxed GR マウスに比べ有意に少なく、逆に mPFC では c-Fos 陽性細胞数が有意に多かった。MGN と LA における c-Fos 陽性細胞数は両遺伝子型の間で有意な差が認められなかった。

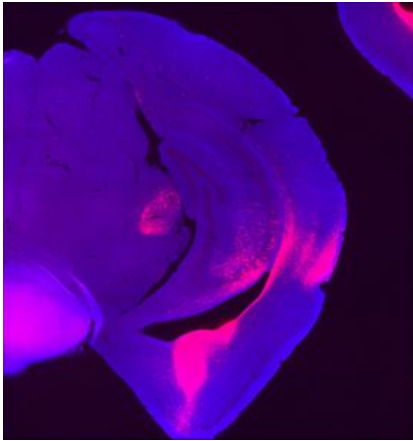
2) LAGRKO マウスの mPFC では遠隔恐怖記憶の想起に関わる記憶痕跡細胞が恐怖条件付け時に多く形成され、AC では逆に少なく形成された (図 1)。これらの結果から、mPFC や AC など遠隔恐怖記憶の制御に関わる脳部位における記憶痕跡細胞の形成と変遷過程の異常が過剰な遠隔恐怖記憶を引き起こす原因となる可能性が示唆された。

図 1 .



3) LA から AC の第一層への投射が報告されている。本研究では初めて LA から AC の全層へ直接投射があり (図 2)、尾側になるにつれて LA-AC 投射が強くなることを明らかにした。この結果から、LAGR 欠損により LA-AC への情報伝達に異常が生じ、過剰な遠隔恐怖記憶が形成される可能性が示唆された。

図 2.



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
---------	---------