

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：31602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06959

研究課題名(和文)トラウマ記憶の汎化を制御するコーピング方略決定機序の解明とPTSD治療への可能性

研究課題名(英文)The neurobiological mechanisms of coping strategies avoiding generalization of fear associations in PTSD

研究代表者

関 健二郎 (Seki, Kenjiro)

奥羽大学・薬学部・教授

研究者番号：50342803

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)：本研究で、箱Aで電気ショックした3時間後に異なる新規箱Bを体験したマウスでは24時間後の箱Bでのフリージング時間が、3時間後に箱Bを体験していないマウスの24時間後のフリージング時間よりも長くなった。視床下部CRFをノックダウンしたAAV-KD-AABマウスでは24時間後の箱Bにおけるフリージング時間が顕著に長くなったが、視床下部CRFを過剰発現したAAV-CRF-AABマウスでは3時間後の箱Bでのフリージング時間が既に長くなかった。以上から、視床下部CRF発現がトラウマ記憶の汎化を制御している可能性が示唆された。また、3時間後の箱B内の中央嗜好性が24時間後の過誤の恐怖記憶の増強と相関した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心的外傷後ストレス障害(PTSD)では、関連性の低い状況でもトラウマ記憶が想起され(汎化)、恐怖・回避の連続による精神的苦痛を受ける。実際に恐怖体験した状況や場所と来なる環境で恐怖の再体験を繰り返すのが特徴である。一方、過誤の恐怖記憶の形成は、恐怖体験した場所と異なる環境で恐怖反応を示すという特徴がある。しかし、トラウマ記憶の汎化は恐怖体験から長期間を要するのに対し、過誤の恐怖記憶は3時間で形成されるという決定的な違いがあり、両者の関係はいまだ不明である。今後は過誤の恐怖記憶形成機序とトラウマ記憶の汎化の脳内機序を比較することで恐怖体験後のPTSD発症予防に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) knockdown (Hy-Crf-KD) or overexpression (Hy-CRF-OE) on contextual fear memory, as fear stress-released CRF. Mice were placed in a chamber with an electric footshock as a conditioning stimulus (CS) in Context A, then exposed to a novel chamber without CS, as Context B, at 3 h (B-3h) or 24 h (B-24h). The freezing response in B-3h was intensified in the experimental mice, compared to control mice not exposed to CS, indicating that a false fear memory was formed at 3 h. The within-group freezing level at B-24h was higher than that at B-3h, indicating that false context fear memory was enhanced at B-24h. In Hy-CRF-OE mice, freezing level at B-3h was higher than that of control and Hy-Crf-KD mice, while the freezing level in B-24h was similar to that in B-3h. We hypothesized that Hy-Crf-KD potentiates the induction of false context fear memory, while Hy-CRF-OE enhances the onset of false fear memory formation.

研究分野：行動薬理学

キーワード：過誤の恐怖記憶形成 トラウマ記憶の汎化 PTSD コルチコイド受容体

### 1. 研究開始当初の背景

長年、PTSD 研究は発症後の恐怖記憶を消去する事を主眼に進められてきた。一方、近年心理学分野で広まったレジリエンス(ストレスを跳ね除ける力)がもたらす積極的コーピング( active coping; ストレスに対する積極的対処)が PTSD やうつ病研究でも注目されている(Hourani, 2012)。これは同じ恐怖を体験しても PTSD を発症するのは平均で 10 人に 1 人という事実から、トラウマ記憶に対する active coping が恐怖ストレスを跳ね除けてトラウマ汎化や PTSD・うつ病併発などを阻止するという仮説である(Thompson, 2018)。active coping は既に精神療法で試されているが(Tsai, 2012)。今以上の改善を求めるには精神療法だけでは限界がある。しかしトラウマ記憶に対する active coping に適した coping 方略とそれを誘導する脳内機序が不明なため、上記仮説を PTSD 薬物療法に応用する段階には至っていない。したがって PTSD 薬物療法の確立には、PTSD やうつ病併発を阻止する coping 方略の特定とその神経基盤の解明が不可欠である。しかし、恐怖ストレスに対するコーピング方略と PTSD 発症機序が不明なため、どのコーピングが有効かはいまだ不明である。

トラウマ記憶の汎化は上述通り、実際に恐怖体験した状況や場所と来なる環境で恐怖の再体験を繰り返すのが特徴である。一方、過誤の恐怖記憶の形成は、恐怖体験した場所と異なる環境で恐怖反応を示すという特徴がある。しかし、トラウマ記憶の汎化は恐怖体験から長期間を要するのに対し、過誤の恐怖記憶は 3 時間で形成されるという決定的な違いがあり、両者の関係はいまだ不明である。

したがって、過誤の恐怖反応の繰り返しがいずれトラウマ記憶の汎化へと発展させる可能性も考えられ、この過誤の恐怖記憶とトラウマ記憶の脳内機序の違いを明確にすることが将来の PTSD 発症予防に重要であると考えられる。

### 2. 研究の目的

上述通り、PTSD 患者の血中コルチゾール濃度は健常者よりも低いのが特徴である。しかし、恐怖体験直後では、血中コルチコトロピン放出ホルモン濃度や血中コルチゾール濃度が高いことが分かっている。トラウマ体験の直後、コルチゾールまたはコルチコステロンのいずれかの分泌が通常増強され、下垂体で CRF を生成する HPA 軸の活性化が抑制される[22]。さらに、HPA 軸の活性化は、自律神経機能、不安、運動活性、認知機能に関連するさまざまな症状を結びつける[23]。したがって、CRF の分泌と HPA 軸の活性化は、過誤の文脈恐怖記憶の形成に寄与する可能性があり、CRF が過誤の文脈恐怖記憶の形成にどのように寄与するのかを明らかにすることが重要である。本研究では、心的外傷的ストレス体験後の過誤の恐怖記憶の形成メカニズムを理解することに挑戦するため、条件付け刺激(CS)後 3 時間以内に 2 つの異なる文脈を使用して起こる恐怖体験時の状況とその状況を不確かに記憶する可能性に焦点を当て、視床下部 Crf のノックダウン(Hy-Crf-KD)および視床下部 CRF の過剰発現(Hy-CRF-OE)を用いた過誤の文脈恐怖記憶の誘導における視床下部 CRF の役割を、アデノ関連ウイルス(AAV)を用いてマウス Crf の shRNA を作成して視床下部の Crf 発現をノックダウン、またはマウス Crf cDNA を挿入した AAV による CRF 過剰発現マウスを用いて調べた。

### 3. 研究の方法

#### トラウマ汎化と PTSD 発症モデル

マウスを Box A に入れ、無条件刺激として電気ショック(2 mA × 3 回)を与えて Box 内環境を条件付けした。対照群として、BoxA の条件付け 3 時間後に BoxA に類似した BoxB に入れ、翌日再度 BoxA に入れてすくみ行動(フリージング)時間を測定した(ABA マウス)。トラウマ記憶の汎化を誘導するために、BoxA の条件付け 3 h 後に BoxB に入れ、さらに翌日(24 時間後)に再度 Box B に入れてフリージングが起こるか否かを調べた(ABB マウス)。また Box B の影響については、BoxA で条件付けした翌日に BoxB に入れ(AB マウス)、ABA マウスと ABB マウスの行動様式と比較した。

#### 行動解析

マウスの行動様式は、ANY maze software version 5.2, Muromachi Kikai Co, Ltd, Tokyo, Japan )を用いて行った。

#### アデノ随伴ウイルス(アデノ随伴ウイルス(AAVAAV))

本実験は、組み換え遺伝子実験の承認を得て行われた(No. 2(No. 019004)。pAAV-PHP.eB ベクターベクター(Addgene #103005, Watertown, MA, USA)(両端を ITR 部分)の U6 プロモータの 5' に shRNA-CRF(AGATTATCGGGAAATGAAA)を、CAGCAG プロモプロモータの 5' 側に EGFP タグ配列を挿入して pAAVCrf-KD 遺伝子を作成した(#85741, Addgene)。また、pAAV-PHP.eB ベクター(両端を ITR 部分)の U6 プロモータの 5' 側に CAG プロモータを挿入し、

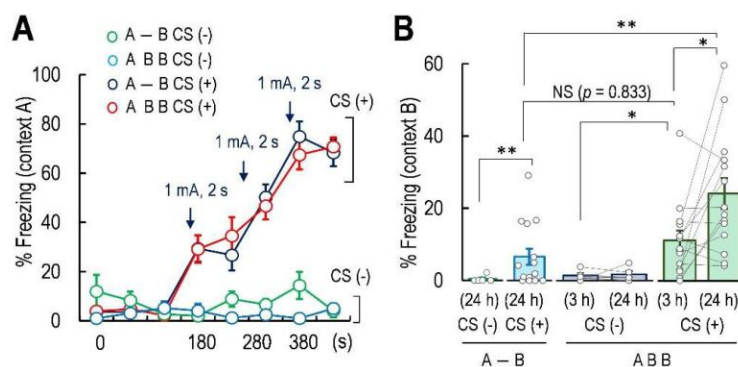
CRF 遺伝子と T2A-RFP 遺伝子と FLAG タグ遺伝子 (pCAGGS) を挿入して pAAV-CAGGS-CRFCRF-OE (pAAV-CRF-OE) 遺伝子を作成した。これを HEK29T 細胞に PEI キットにてトランスフェクションし、得られたウイルスを AAVpro Concentrator Concentrator (密度勾配遠心分離法) にて目的の濃度 ( $1 \times 10^{12}$  vg/mL, real time PCR にて力価を測定) まで濃縮した。CRF 遺伝子の発現レベルは、プラスミドの挿入した FLAG タグに対する一次抗体 (#015(#015--22391, 22391, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp, Tokyo, Japan)を検出することで確認した。

#### 脳内脳内ウイルスウイルス投与法投与法

全身麻酔薬 (塩酸メドミジン 0.3mg/kg, ミダゾラム 4mg/kg, 酒石酸ブトルファンール 5mg/kg) で麻酔したマウスを脳定位固定装置 (Narishige group, SR-6M, Tokyo, Japan) に装着し、視床下部 (AP:+1.10, L:0, L±2.50, DV:3.54mm) に、片側 0.125  $\mu$ L  $\mu$ L のウイルスを両側に投与した。ウイルス投与 2 週間後に行動実験を行い、行動実験後に脳を採取して、後日に投与部位が視床下部であるか否かの確認は、GFP または RFP の一次抗体と CRF の一次との共染色を行い、CRF がノックダウンされたか、hy-CRF-OE しているかを確認した。

#### 4. 研究成果

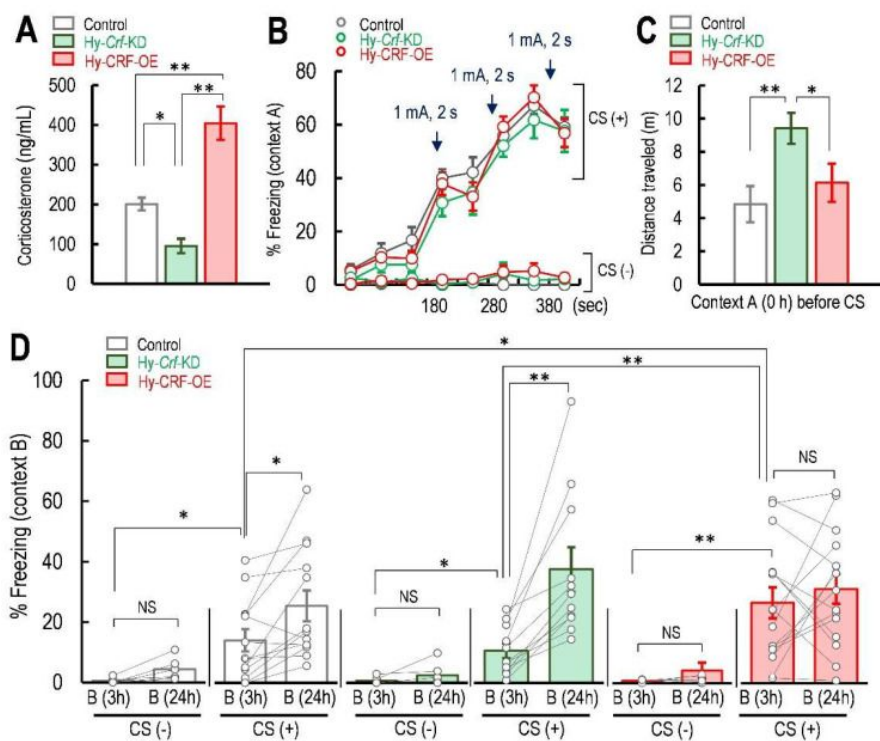
A-B CS (+)マウスと ABB CS (+)マウスでは、Box A の Context A でのフリージングレベルは同程度であることが観察された (図 1A)。一方、A-B CS (-)マウスと ABB CS (-)マウスではフリージング行動は観察されなかった (図 1A)。2 要因の反復測定分散分析 (ANOVA) によると、電気ショックと時間がフリージングレベルに影響を与えたことが示された ( $F(3, 37) = 15.01, p < 0.01$ , 図 1B)。我々は、過誤の恐怖記憶が 3 時間後の Box B で形成されたことを観察した。これは CS によって恐怖条件付けされていない ABB CS (-)マウスの Box B での 3 時間後のフリージングレベルよりも、CS 後の 3 時間の ABB CS (+)マウスのフリージングレベルが有意に高かったためと考えている ( $F(5, 52) = 7.09, p < 0.01$ ; Tukey の多重比較検定: ABB CS (+) 3 時間後のフリージングレベルの平均 vs. ABB CS (-) 3 時間後のフリージングレベルの平均,  $p < 0.05$ , 図 1B)。CS 後 24 時間の新しい Box B (Box B) でのフリージングレベルは、A-B CS (+)マウスの方が A-B CS (-)マウスよりも高かった (Tukey の多重比較検定: A-B CS (+) 24 時間,  $p < 0.01$  vs. A-B CS (-) 24 時間, 図 1B)。これは、過誤の恐怖記憶が CS 後 24 時間に誘発されたことを示している。ABB CS (+)マウスの 3 時間後の Box B でのフリージングレベルは、A-B CS (+)マウスの 24 時間後の Box B でのフリージングレベルと同程度であった (Tukey の多重比較検定: A-B CS (+) 24 時間,  $p = 0.01$  vs. ABB CS (+) 24 時間, 図 1B)。これは、Context B における過誤の恐怖記憶が CS 後 3 時間以内に形成され、過誤の恐怖記憶の形成後に CS と類似した環境を経験すると 24 時間後の Box B でのフリージングレベルが増強される可能性があることを示している (Tukey の多重比較検定: ABB CS (+)マウスの 24 時間後のフリージングレベル vs. ABB CS (+)マウスの 3 時間後のフリージングレベル:  $p < 0.05$ ; ABB CS (+)マウスの 3 時間後のフリージングレベル vs. A-B CS (+)マウスの 3 時間後のフリージングレベル:  $p = 0.833$ , 図 1B)。これらの結果から、Box B の過誤の恐怖記憶は CS 後 3 時間以内に誘発され、過誤の恐怖記憶が形成された後、CS と似た環境を経験した場合、24 時間後の Box B での過誤の恐怖記憶が増幅されることが示唆された。



**Figure 1**) Freezing level in the contextual fear conditioning. (A) Percentage (%) of time spent in freezing during Context A, when the electric shocks (CS (+)) were delivered at 100 s after the mice were placed in the box. Arrows represent electric shock delivery at 180, 280, and 380 s after the mouse was put in the box. Freezing time was recorded every 1 min. (B) Bar graphs showing the percentage of freezing level in Box B 24 h in A-B CS (-) ( $n = 5$ ), Box B at 3 and 24 h in ABB CS (-) ( $n = 5$ ), Box B 24 h in A-B CS (+) ( $n = 15$ ), and Box B 3 and 24 h in ABB CS (+) mice ( $n = 14$ ). Data are represented by mean  $\pm$  SEM. NS represents no significant difference. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

視床下部特異的 Crf ノックアウトマウスでは、正常なグルココルチコイドの日内リズムが報告されている[24]。そのため、マウスにおける日常的なグルココルチコイドの最大濃度の半分に対応する時間帯である 12:00-14:00 h に、血漿コルチコステロン濃度を測定した[25]。予想通り、Hy-Crf-KD マウスの血漿コルチコステロン濃度は対照群のマウスよりも有意に低かった (一方向の ANOVA,  $F(2, 12) = 31.68, p < 0.01$ , Fisher の LSD, Hy-Crf-KD:  $p < 0.05$  vs. 対照群, 図 2A)。それ

に対して、Hy-CRF-OE マウスの血漿コルチコステロン濃度は対照群よりも有意に高かった (Fisher の LSD、Hy-CRF-OE:  $p < 0.01$  vs. 対照群、Hy-Crf-KD:  $p < 0.01$  vs. Hy-CRF-OE、図 2A)。フリージングレベルは ABB-対照、ABB-KD、ABB-OE マウスの 3 グループ間で類似していた (図 2B)。AAV の注入は、CS が与えられる直前の 3 分間のボックス A における活動に影響を与えた ( $F(2, 35) = 4.787$ ,  $p < 0.05$ 、図 2C)。Fisher-LSD テストでは、Hy-Crf-KD マウスの運動量は対照群および Hy-CRF-OE マウスよりも高かった (対照群:  $p < 0.01$  vs. Hy-Crf-KD; Hy-CRF-OE:  $p < 0.05$  vs. Hy-Crf-KD,  $p = 0.277$  vs. 対照群、図 2C)。Hy-Crf-KD マウスでは対照群および Hy-CRF-OE マウスよりも運動活動が高く、不安レベルは同じであった。Tukey の多重比較検定では、対照群、Hy-Crf-KD、Hy-CRF-OE マウスのいずれも CS を与えていないマウスに比べて、CS 後の 3 時間後の Box B のフリージングレベルが高かったことを示している (対照 CS (+) 3 h:  $p < 0.05$  vs. 対照 CS (-) 3 h; Hy-Crf-KD CS (+) 3 h:  $p < 0.05$  vs. Hy-Crf-KD CS (-) 3 h; Hy-CRF-OE CS (+) 3 h:  $p < 0.01$  vs. Hy-CRF-OE CS (-) 3 h; 図 2D)。これは、対照、Hy-Crf-KD、および Hy-CRF-OE マウスの Box B で 3 時間後に過誤の恐怖記憶が形成されたことを示している。一方、対照群および Hy-Crf-KD マウスの 24 時間後の CS 後のフリージングレベルは、3 時間後のフリージングレベルよりも高かったが (対照、24 時間:  $t = 3.022$ ,  $df = 12$ ,  $p < 0.05$  vs. 3 h; Hy-Crf-KD マウス、24 時間:  $t = 4.467$ ,  $df = 10$ ,  $p < 0.01$  vs. 3 h; 図 2D)。Hy-CRF-OE マウスの Box B での 24 時間後のフリージングレベルは、3 時間後の自身のフリージングレベルと類似していた (Hy-CRF-OE、24 時間:  $t = 0.828$ ,  $df = 14$ ,  $p = 0.422$  vs. 3 h; 図 2D)。Hy-CRF-OE CS (+) での 3 時間後のフリージングレベルは、CS (+) での 3 時間後のフリージングレベルおよび Hy-Crf-KD CS (+) での 3 時間後のフリージングレベルよりも有意に高かった (Hy-CRF-OE CS (+) 3 h:  $p < 0.05$  vs. 対照 CS (+) 3 h;  $p < 0.01$  vs. Hy-Crf-KD CS (+) 3 h; 図 2D)。これは Hy-CRF-OE によって過誤の文脈的恐怖記憶の形成が促進されたことを示している。



**Figure 2)** Effect of hypothalamic Crf knockdown or overexpression on freezing level during and after contextual fear conditioning. (A) Concentration of plasma corticosterone in control ( $n = 5$ ), Hy-Crf-KD ( $n = 5$ ), and Hy-CRF-OE ( $n = 5$ ) mice during 12:00–14:00 h in the light phase. (B) Freezing level during Context A with (+) or without (-) the conditioning stimulations (CS). Arrows represent the electric shocks delivered at 180, 280, and 380 s after the mouse was placed in the center of the bottom of Box A. (C) Effect of hypothalamic Crf knockdown or CRF overexpression on locomotor activity. Distance (m) traveled in Box A before CS in ABB CS (+) mice group with Hy-Crf-control ( $n = 13$ ), Hy-Crf-KD ABB ( $n = 11$ ), and Hy-CRF-OE ( $n = 15$ ). (D) Percentage (%) of freezing level in Context B at 3 and 24 h for ABB CS (+) mice with Hy-Crf-control ( $n = 13$ ), Hy-Crf-KD ABB ( $n = 11$ ), and Hy-CRF-OE ( $n = 15$ ) and ABB CS (-) and with Hy-Crf-control ( $n = 5$ ), Hy-Crf-KD ABB ( $n = 7$ ), and Hy-CRF-OE ( $n = 5$ ) at 3 and 24 h after CS.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Emi Kasama, Miho Moriya, Ryuma Kamimura, Tohru Matsuki, Kenjiro Seki	4. 巻 23(11)
2. 論文標題 Formation of False Context Fear Memory Is Regulated by Hypothalamic Corticotropin-Releasing Factor in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23116286	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Rino Hashimoto, Toshiya Murakami, Ryuma Kamimura, Tohru Matsuki, Kenjiro Seki	4. 巻 21(6)
2. 論文標題 High Salt Intake Induces Active Coping Behaviors by Enhancing the Resilience against Psychological Stress in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Integrative Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.31083/j.jin2106173	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 笠間 恵美、森谷 美穂、上村 龍摩、村上 聖弥、松木 亨、関 健二郎
2. 発表標題 PTSDモデルマウスのトラウマ記憶の汎化を制御する視床下部コルチコトロピン放出因子の役割
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 笠間 恵美、森谷 美穂、上村 龍摩、村上 聖弥、松木 亨、関 健二郎
2. 発表標題 PTSDモデルマウスのトラウマ記憶の汎化を制御する視床下部コルチコトロピン放出因子の役割
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森谷 美穂, 橋本 璃乃, 前田 桜, 松木 亨, 関 健二郎
2. 発表標題 トラウマ恐怖記憶の汎化における心的外傷後ストレス 障害 (PTSD) モデルマウスの学習性無力感形成の促進
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会 (横浜)
4. 発表年 2020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	松木 亨  (Tohru Matsuki)  (90332329)	愛知県医療療育総合センター発達障害研究所・細胞病態研究部・主任研究員    (83902)	

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