

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16473

研究課題名（和文）PTSDモデルとしての社会的敗北ストレス誘導性トラウマ記憶と不安障害の関連性

研究課題名（英文）Relationship between social defeat stress-induced fear memory and anxiety-like behavior as a PTSD model

研究代表者

石川 理絵（Ishikawa, Rie）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・助教

研究者番号：80776013

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究において、社会的敗北ストレス処置の初日に活性化する海馬ニューロンが、社会忌避記憶痕跡細胞（エンGRAM）として機能することが示唆された。さらに、社会的敗北ストレスを慢性的に与えた後に観察される不安症状が、この社会忌避記憶エンGRAM活性の抑制によって改善されることが示され、社会忌避記憶エンGRAMと不安様症状の関連性が示唆された。また、この社会忌避記憶形成には恐怖条件付け記憶と同様に新規遺伝子発現が必要であることも示され、社会忌避記憶の性状解析が進んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、新規PTSDモデルとしての社会的敗北ストレス処置誘導性トラウマ記憶の理解が進んだ。これまでPTSDモデルとして広く用いられた古典的恐怖条件付けと比較して、社会的敗北ストレス処置では恐怖記憶に伴う精神異常が観察される点異なる。本研究から、社会的敗北ストレス処置によって、恐怖条件付けと同じく新規遺伝子発現依存的に恐怖記憶が形成されることが示され、さらに慢性ストレスによる精神異常がこの恐怖記憶痕跡細胞と関連する可能性を示した。以上から、PTSDモデルとしての社会的敗北ストレス処置の有用性が示された。本処置を用いることでPTSDの新規治療法開発が進むことを期待する。

研究成果の概要（英文）：This study suggested that hippocampal neurons activated on the first day of social defeat stress function as social avoidance memory engram. Furthermore, it was shown that anxiety-like behaviors observed after chronic social defeat stress were ameliorated by suppression of social avoidance memory engram, suggesting a relationship between social avoidance memory engrams and anxiety-like symptoms. The results also indicated that the formation of social avoidance memory requires the new gene expression as in fear conditioned memory.

研究分野：神経科学

キーワード：PTSD 社会的敗北ストレス 記憶エンGRAM 恐怖記憶 社会忌避記憶 海馬

1．研究開始当初の背景

心的外傷後ストレス障害( Post-traumatic stress disorder; PTSD )は恐怖体験の記憶( 恐怖記憶 )を原因とする精神疾患である。PTSD の主症状は、トラウマ記憶の自発的かつ繰り返しの想起( フラッシュバック )、不安やうつなどの情動異常が観察される。現在、PTSD の主要な治療方法は認知行動療法であり、他は対処療法しかなく、簡便な治療方法開発が待たれている。

齧歯類の恐怖条件づけ記憶課題では、マウスに小箱内で電気ショック( 恐怖 )を一回与えるだけで場所と恐怖を関連づける恐怖( ト라우マ )記憶が形成される。そのため、簡便な PTSD モデルとして世界的に広く用いられている。しかし、この恐怖条件づけ後のマウスには PTSD 症状である不安行動の亢進は観察されず、この観点からは PTSD 症状を再現したモデルとは言い難い。

一方、齧歯類の社会的敗北ストレス課題では、攻撃性の高いマウス( 攻撃マウス )から繰り返し攻撃を受ける慢性的な社会的挫折ストレスをマウスに与える。その結果、このマウスは攻撃マウスを避ける社会性の忌避行動のみならず、不安とうつ様行動の亢進も示す( Krishnan et al., Cell, 2007 )。現在、この課題は世界的にうつ病と不安症モデルとして利用されている。

	恐怖記憶の形成	情動行動異常
恐怖条件付け	○	×
社会的敗北ストレス	○	○

図 恐怖条件付けと社会的敗北ストレスの比較  
古典的PTSDモデルである恐怖条件付けは精神異常を誘導しないが、社会的挫折ストレスでは攻撃マウスがいない状況でも慢性的な不安様症状が観察される

申請者は PTSD の改善方法開発を目指して、認知症治療薬であり、海馬神経細胞の増殖( 神経新生 )を劇的に亢進する NMDA 受容体非競合的阻害剤メマンチンを用いて、海馬神経新生亢進が恐怖条件づけ記憶の忘却を促進することを示し、海馬神経新生亢進によって恐怖記憶を忘却させる PTSD 改善方法を提言した( Ishikawa et al., Elife, 2016 )。さらに、社会的敗北ストレスを新規 PTSD モデルとして使用し、メマンチンを投与することで社会性の忌避記憶の忘却のみならず、慢性的な不安様症状をも改善されることを見出した( Ishikawa et al., Mol Brain, 2019 )。しかし、トラウマ記憶の忘却と精神障害の関係性は未だ明らかになっていない。

記憶痕跡とは、学習時に獲得された記憶情報を貯蔵する細胞集団ネットワークであり、記憶貯蔵の実態である。記憶痕跡細胞を人工的に活性化させるとマウスはその記憶を思い出すことが示唆されている。しかし、社会的敗北ストレスによって形成される社会性忌避記憶痕跡細胞についてはほとんど解析されておらず、急性ストレスによって形成された社会性忌避記憶痕跡細胞が慢性ストレス時にどのように変化するのか、さらにはこの記憶痕跡細胞と不安様症状との関連性はわかっていない。

以上の背景から、本研究テーマにおける未解決な点は、( 1 ) 社会性忌避記憶痕跡細胞の存在、及び( 2 ) 社会性忌避記憶痕跡細胞と精神異常の関係性である。

2．研究の目的

社会的敗北ストレス誘導性不安症状に対する社会性忌避記憶痕跡細胞の役割の解明を

目的として、社会性忌避記憶痕跡細胞の同定及びその操作がマウスの精神状態に与える影響について解析し、恐怖記憶と慢性的不安症状の関係性を解明する。

そのため、以下のことを明らかにしていく。

- (1) 社会的敗北ストレスによって形成されるトラウマ記憶痕跡細胞の同定
- (2) 社会性忌避記憶痕跡細胞の機能解析及び精神異常との関係性

### 3. 研究の方法

#### (1) 社会的敗北ストレスによって形成されるトラウマ記憶痕跡細胞の同定

10 日間の慢性的な社会的敗北ストレスでは社会性忌避記憶形成及び不安様行動が誘発される一方で、1 回の急性社会的ストレスでは社会性忌避記憶は形成されるが、不安様症状は誘発されない。従って、トラウマ記憶から不安様症状を誘発する仕組みについて理解するためには、急性ストレスを受けてから慢性にいたるまでの脳内変化を捉えることが重要である。

始めに、急性ストレス処置（社会的敗北ストレス処置 1 日目）で活性化したニューロン集団と、慢性ストレス処置（社会的敗北ストレス処置 10 日目）で活性化したニューロン集団を神経活性化マーカーである c-fos 発現を指標にして同定し、この違いを観察する。そのために c-fos タグシステムを使用する。このシステムは、c-fos の活性依存的にテトラサイクリントランスアクトベーター（tTA）を発現するマウスと、テトラサイクリンレスポンスエレメント（TRE）プロモーター制御下でヒストン 2B 融合型緑色蛍光タンパク質（H2BGFP）を発現するマウスを掛け合わせたダブルトランスジェニックマウスを用いる。このマウスはドキシサイクリン（Dox）非存在下において、c-fos 発現依存的に H2BGFP を発現するため、その時活性化したニューロンを蛍光タンパク質で長期的にラベルすることができる（Tayler et al., *Curr Biol*, 2013）。

このシステムを利用し、急性ストレス処置時に活性化したニューロンを H2BGFP でラベルし、慢性ストレス処置時に活性化したニューロンを抗 c-fos 抗体を用いた免疫染色で検出する。これらニューロン集団を複数の脳領域で網羅的に観察する。その手法として、凍結脳



図 トラウマ痕跡細胞の同定 実験概略

切片の観察、或いは脳の透明化技術を用いて、全脳イメージングを行う。急性ストレス時と慢性ストレス時の両方でニューロン集団が観察された領域では、これらが同一のニューロン集団か、それとも異なるニューロン集団であるかを観察する。同一であった場合、社会性忌避記憶形成（急性ストレス時）と記憶の思い出（慢性ストレス時）で活性化するニューロンが同一となるため、その細胞が社会性忌避記憶痕跡細胞である可能性が示される。

#### (2) 社会性忌避記憶痕跡細胞の機能解析及び精神異常との関係性

(1) で同定されたニューロンに c-fos タグシステムを用いて光感受性タンパク質 Channelrhodopsin-2 (ChR2) または Archaelrhodopsin-T (ArchT) を発現させることで、記憶痕跡細胞特異的なイメージング及び光操作を試みる。

社会性忌避記憶痕跡細胞の光操作 上記と同様に、c-fos タグシステムを用いて急性ストレス処置時または慢性ストレス処置時に活性化した細胞にのみ光感受性タンパク質で

ある ChR2 または ArchT を発現させる。まず、Social interaction 課題中に光照射を行なうことで、社会性忌避記憶に対するラベル細胞の活性化・不活性化の影響を観察し、その細胞が社会性忌避記憶の情報を持っているか（記憶痕跡細胞であるか）を確認する。次に、高架式ゼロ迷路課題中に光照射を行なうことで、ラベル細胞の活性化・不活性化が不安様行動に与える影響を解析する。例えば、Social interaction 課題中に、特定のニューロン集団を不活性化すると社会性忌避記憶が喪失され、且つ高架式ゼロ迷路課題中に同じニューロン集団を不活性化することで不安様行動が改善された場合、そのニューロン集団は社会性忌避記憶痕跡細胞であり、さらに不安様症状を制御している細胞集団であることがわかる。

#### 4．研究成果

本研究は社会的敗北ストレス誘導性不安症状に対する社会性忌避記憶痕跡細胞（記憶エンGRAM）の役割の解明を目的として、社会性忌避記憶エンGRAMの同定及びその操作がマウスの精神状態に与える影響について解析した。

社会的敗北ストレスを1日（急性ストレス）あるいは10日間連続して与えた（慢性ストレス）後に活性化する脳領域を c-fos 発現を指標として観察した結果、急性ストレス後では扁桃体、腹側被蓋野、視床室傍核などで c-fos 発現が観察された。さらに、海馬では急性及び慢性ストレス後の両方において c-fos 発現が誘導されることが示され、これら脳領域に社会性忌避記憶エンGRAMが存在する可能性が示唆された。

そこで、海馬における社会性忌避記憶エンGRAM活性が不安行動に与える影響について解析した。c-fos タグシステムを用いて、社会的敗北ストレスを初めて受けた時に海馬で活性化したニューロンを抑制性オプシン ArchT でラベルした。その後、社会的敗北ストレス処置を10日以上連続して与えることで慢性ストレスを与えた。不安様行動を測定した結果、ストレスを受けたマウス群は強い不安様症状を示したのに対し、光照射を行ったマウス群（海馬でラベルされたニューロンを抑制した群）ではストレスを受けていないマウスと同程度の不安様行動を示すことが観察された。以上の結果から、初日のストレス処置時に海馬で活性化したニューロン集団が慢性ストレス時の不安様行動を制御することが示唆された。

次に、このマウスを用いて社会性忌避記憶課題中に光照射を行い、海馬ニューロン活性が社会性忌避記憶に与える影響を調べた。その結果、対照群のマウスは攻撃したマウス（攻撃マウス）を避ける行動をとった一方で、ラベルしたニューロンの光不活性化を行うと対照マウスよりも攻撃マウスにより近づく行動が観察され、社会性忌避記憶の減弱が観察された。また、海馬に抑制性の DREADD である hM4Di を発現するウイルスを投与し、社会的敗北ストレス処置の1時間前にリガンドである CNO を投与することで海馬活性を抑制した結果においても、その後の社会性忌避記憶課題にて対照マウスよりも攻撃マウスに近づく行動が観察された。以上の結果から、社会的敗北ストレス課題を初めて受けた時に海馬で活性化するニューロンが社会性忌避記憶エンGRAMとして機能する可能性が示された。

ここまでの結果から、海馬における社会性忌避記憶エンGRAMが不安行動異常に関与することが示唆された。次に、この不安行動異常発症の起点となる社会性忌避記憶の形成メカニズムを理解する端緒として、社会性忌避記憶形成時における新規遺伝子発現の必要性について検証した。社会的敗北ストレス処置を受けたマウスにタンパク質合成阻害剤ア

ニソマイシンを投与し、社会忌避記憶課題に供した結果、対照マウスと比較して攻撃マウスにより長い時間近づく行動を示した。以上の結果から、これまで恐怖条件付け記憶において報告されていたのと同様に、社会忌避記憶においても記憶形成時に遺伝子発現が必要であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 石川理絵、武生優花、喜田聡
2. 発表標題 海馬の社会忌避記憶エングラムの光遺伝学的抑制はトラウマ記憶誘導性PTSD様行動を改善する
3. 学会等名 第51回日本神経精神薬理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松村 京香、石川 理絵、喜田 聡
2. 発表標題 遺伝子発現依存的な社会的敗北ストレス誘導性社会忌避記憶の形成
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Rie ISHIKAWA, Yuka TAKYU, Satoshi KIDA
2. 発表標題 Hippocampal traumatic memory engram associated with PTSD-like behaviors in social defeat stress paradigm
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武生 優花、石川 理絵、喜田 聡
2. 発表標題 海馬の社会忌避記憶エングラムの光遺伝学的抑制はPTSD様行動を改善する
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武生 優花、石川 理絵、喜田 聡
2. 発表標題 社会敗北ストレス課題においてPTSD様行動を惹起する海馬トラウマ記憶エンGRAM
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

#### 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
---------	---------