

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21591530

研究課題名（和文）脳機能発達臨界期におけるメタ可塑性を基盤とした恐怖記憶制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of emotional regulation underlying metaplasticity during brain development

研究代表者 松本 真知子  
(Machiko Matsumoto)

北海道医療大学・薬学部・准教授

研究者番号：70229574

研究成果の概要（和文）：本研究により、幼若期ストレスによって、成長後恐怖記憶の消去障害が生じることが明らかになった。その背景には海馬 CA 領野ならびに皮質前頭前野(mPFC)のシナプス可塑性の変化すなわちメタシナプス可塑性の変化が生じている可能性がある。この仮説は、海馬 CA1 および mPFC の ERK 活性の変化によっても支持された。以上の結果から幼若期ストレス負荷によって生じた成長後の恐怖記憶制御機構の障害には、脳部位特異的な情動調節の機能変化あるいは情動神経回路網の形成不全により生じている可能性が強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：The present study demonstrated that early postnatal stress caused extinction deficit in adult rats, in which “critical period” exists during brain development. This extinction deficit appears to be associated with dysfunction of hippocampal CA1 field and/or medial prefrontal cortex (mPFC), because synaptic potentiation and ERK activation induced by extinction processes, in a brain specific manner, did not occur in juvenile stress model rats. This impaired synaptic plasticity and suppressed ERK activity, in addition to behavioral deficit were ameliorated by pretreatment with a NMDA receptor agonist D-cycloserine. These results suggest that the different phenotypes in adulthood result from neurodevelopmental perturbations of neural circuits of emotional regulation that elicited by early life stress.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|       | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|-------|-----------|-----------|-----------|
| 21 年度 | 1,900,000 | 570,000   | 2,470,000 |
| 22 年度 | 1,000,000 | 300,000   | 1,300,000 |
| 23 年度 | 600,000   | 180,000   | 780,000   |
| 年度    |           |           |           |
| 年度    |           |           |           |
| 総計    | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：脳機能発達、 幼児期ストレス、 神経可塑性、 臨界期

## 1. 研究開始当初の背景

幼児期の不幸な体験による心的外傷が、不安障害やうつ病などの精神疾患の病態・病因の背景になっている可能性が指摘されている。これらの精神疾患は、情動神経回路である扁桃体－海馬－大脳皮質における階層的情報処理機構の障害あるいは機能不全という側面から捉えることが出来る。すなわち幼児期に受けた過度のストレスが、神経回路網形成過程に障害的に働き、成長後における脳機能障害あるいは不全を引き起こす可能性がある。

不安障害の中でも、心的外傷後ストレス障害(PTSD)は生死にかかわる強い恐怖により発症する病態である。その背景には「獲得・固定・想起(再生)・消去」から成る恐怖記憶制御機構の破綻が指摘されているが、中でも「消去障害」が中核を占めると考えられている。実際、PTSDの治療法として用いられている曝露療法は、恐怖記憶の「消去」に基づいた心理的療法である。一方、PTSD発症の易罹患性には、幼児期におけるストレス体験など後天的な要因が深く関わっている可能性が示唆されている。しかし、そ

の詳細なメカニズムは明らかでない。私たちは、ラット幼若期 [生後2週齢時: 2wFS] に嫌悪刺激 (Footshock; FS) を負荷すると、成長後 (11-14週齢時) に不安水準の低下が生じ、生後3週齢時のストレス負荷 (3wFS) では、消去障害が生じることを見出した。ストレス負荷時期により、恐怖記憶の再生あるいは消去過程における行動変容がみられ、幼若期ストレス負荷には、成長後の情動行動に影響を与える時期すなわち「臨界期」が存在していることが考えられる。これらの事実により幼児期の一定期間のストレス曝露は、脳内神経回路形成不全あるいは機能障害を引き起こし、成長後の恐怖記憶に関わるシナプス可塑性そのものを変化させる、いわゆるメタ可塑性が生じるのではないかと推測した。PTSDの消去障害の背景には、このような後天的な要因が深く関わっており、結果としてPTSDの易罹患性につながるのではないかとこの仮説をもつに至った。

## 2. 研究の目的

本研究は、脳発達臨界期における幼児期ストレスにより、脳内神経回路網の形成不全あるいは機能的異常が生じ、成長後の消去記憶に関わる神経可塑性が変化すると仮説のもとに、可塑性の変化いわゆるメタ可塑性という新たな視点から恐怖記憶制御機構の解明を試みることを目的とした。このため、消去障害を生じている幼若期 (3 週令時) ストレス負荷ラットを用い、行動解析と同時に電気生理学的ならびに分子生物学的検討を行った。

## 3. 研究の方法

生後3週齢のラットに嫌悪刺激である電撃ストレス(FS)を負荷し、幼若期ストレスモデル動物を作成した。成長後 (11-14 週齢時) に条件恐怖試験 (Conditioned fearconditioning:CFC) を不安水準の評価系として用い、「消去」を中心とした行動解析を行った。すなわち、CFC 後、FS なしで電撃箱に再曝露し、context 依存性の消去試行を1日3回3時間毎行い、24時間後に消去記憶の「想起」を試みた(図1)。

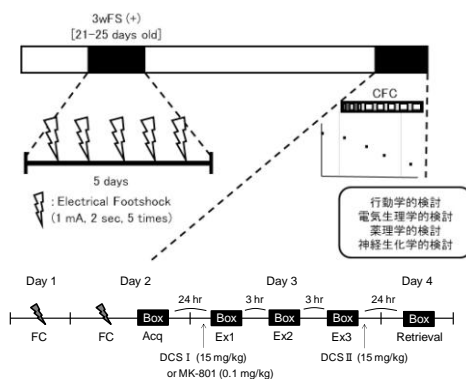


図1: 実験プロトコル

電気生理学的検討は、麻酔下にて海馬 Schaffer 側枝に刺激電極、CA1 領域に記録電極を、あるいは海馬 subicular 部位に刺激電極、皮質前頭前野 (mPFC) に記録電極を挿入し、手術後約1週間の回復期間後に海馬 CA1 領域ならびに mPFC の誘発電位を覚醒下にて経時的に測定した。さらに消去過程における海馬 CA1 ならびに mPFC の extracellular signal-related kinase(ERK)の活性化 (リン酸化) ERK の発現量をウエスタンブロット法を用い、分子生物学的検討を行った。薬理的検討として、NMDA 受容体拮抗薬 MK-801 (0.1 mg/kg, i.p.) (消去試行前に投与) および NMDA 受容体部分作動薬 D-cycloserine (DCS) (15 mg/kg, i.p.) (消去試行前後に投与) を用いた。

## 4. 研究成果

Control 群 (Non-FS 群) では、「消去試行」に伴い Freezing 発現率は減少し(図2)、海馬シナプス伝達効率は徐々に増強した(図3)。「消去試行」24時間後の「想起」時には、海馬シナプス伝達効率の変化は認められなかった。MK-801 (0.1 mg/kg, i.p.) 前処置により、Freezing 発現は増加し、海馬シナプス伝達効率の増強は有意に抑制された(図3)。

一方、3wFS 群では、Control 群でみられた消去試行に伴う Freezing 発現の減少は有意に減弱し(図2)、海馬シナプス伝達効率増強反応は認められなかった(図4)。消去試行24時間後の「想起」時には Control 群と同様、海馬シナプス伝達効率の変化は認められなかった。

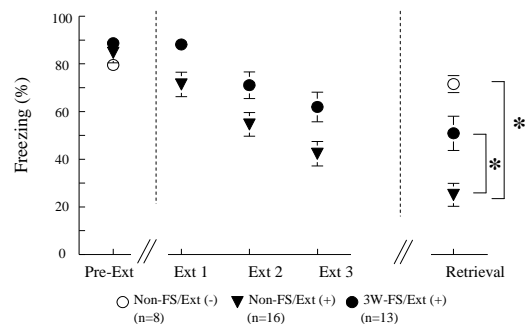


図2: 消去過程における freezing の変化と幼若期ストレスの影響

しかしながら、消去試行後の「想起」時には、Control 群の mPFC のシナプス伝達効率は増強し、長期増強 (LTP) 様反応がみられた。すなわち、海馬 CA1 のシナプス伝達は消去試行に伴い増強するが、24 時間後の「想起」においては、海馬ではなく、mPFC のシナプス伝達が亢進する、という脳部位特異的の反応がみられた。3wFS 群では mPFC のシナプス増強反応はみられなかった(図5)。

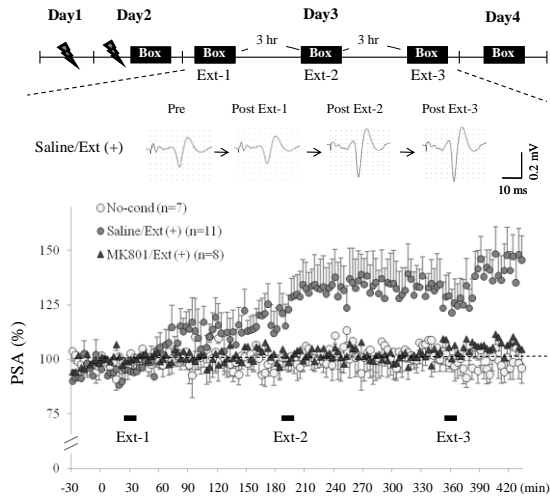


図 3: 消去試行における海馬 CA1 のシナプス伝達効率の変化ならびに MK801 の影響

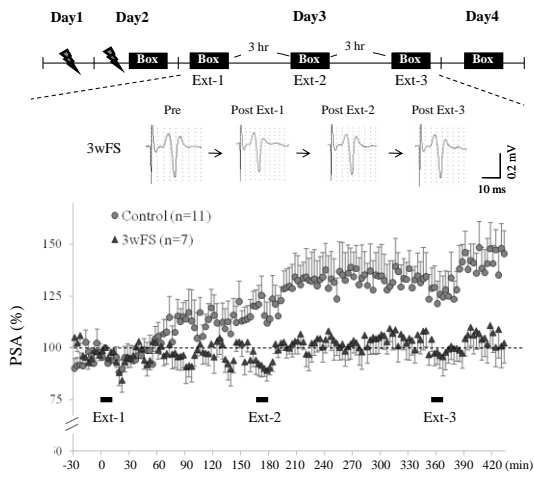


図 4: 幼若期ストレス負荷ラットの消去試行における海馬 CA1 のシナプス伝達効率の変化

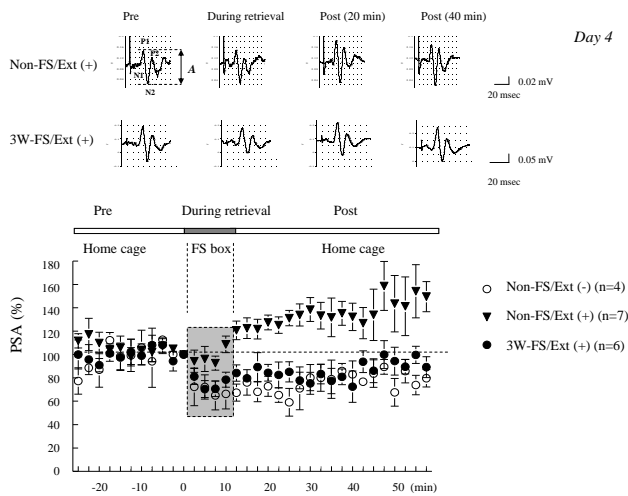


図 5: 消去の「想起」における mPFC のシナプス伝達効率の変化と幼若期ストレスの影響

また Control 群では、「消去試行」を繰り返す毎に CA1 の ERK 活性が上昇したのに対し、「消去試行」24 時間後の「想起」においては、CA1 ではなく mPFC の ERK 活性が上昇した。一方、3wFS 群では、「消去試行」および「想起」に伴う ERK 活性の上昇は認められなかった (図 6 および図 7)。

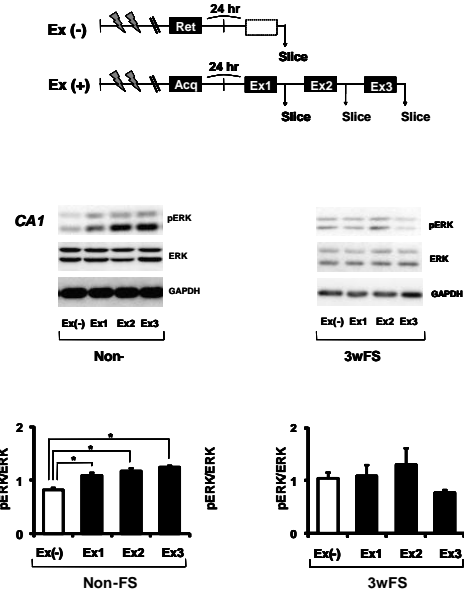


図 6: 消去試行における海馬 CA1 の ERK 活性の変化と幼若期ストレスの影響

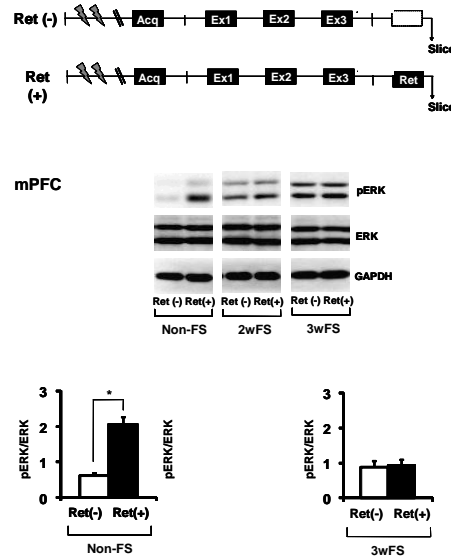


図 7: 消去の「想起」における mPFC の ERK 活性の変化と幼若期ストレスの影響

3wFS 群でみられた消去障害 (消去過程における freezing 減少率の低下) は、DCS (15 mg/kg, i.p.) 投与によって Control 群と同程度まで改善された。「消去試行」時の海馬シナプス伝達効率は Control 群と同様に増強し (図 8)、「想起」

後の mPFC のシナプス伝達効率も DCS より改善された。また 3wFS 群における CA1 および mPFC の ERK 活性は、DCS 投与によって有意に上昇した (図 9)。

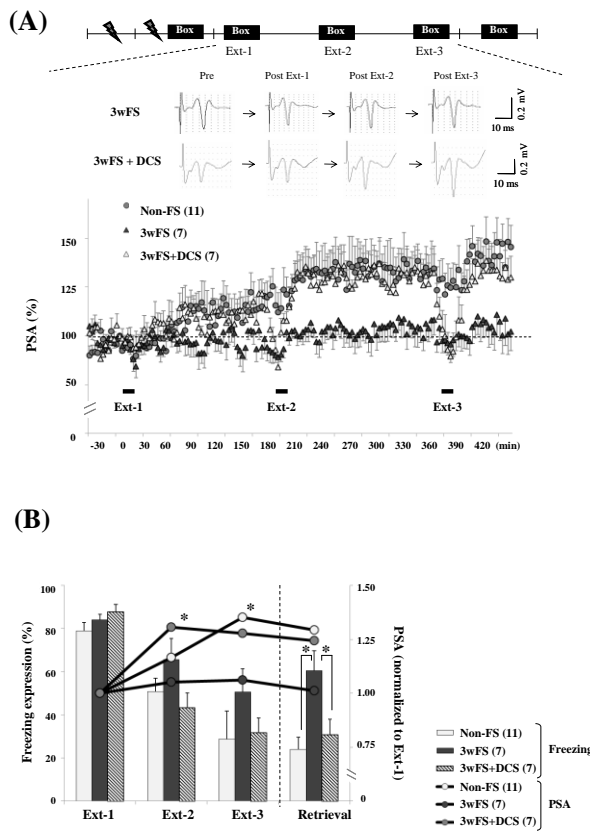


図 8: 幼若期ストレス負荷ラットの消去過程における海馬 CA1 のシナプス伝達効率 (A)ならびに Freezing (B)の変化と DCS の影響

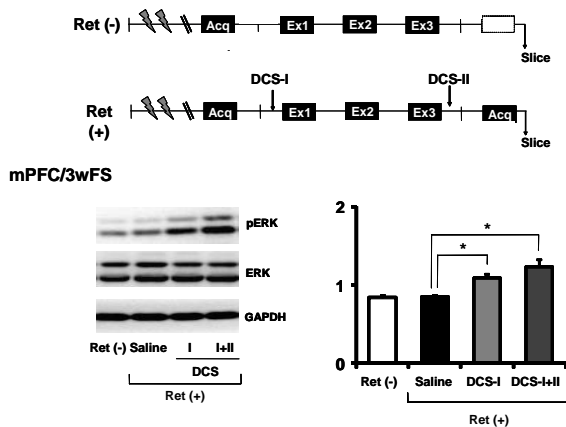


図 9: 幼若期ストレス負荷ラットの「想起」における mPFC の ERK 活性と DCS の影響

[結論ならびに結語]

以上の結果から、恐怖記憶の「消去試行」を繰り返すことによって海馬のシナプス伝達効率が増強すること、また「消去試行」後の「想起」においては、mPFC のシナプス伝達効率が増強することが明らかとなった。

これらのシナプス応答は ERK の活性化を伴っていたことから、恐怖記憶の消去過程においては、脳部位特異的かつ時間依存な神経可塑性の変化が生じることが明らかになった。換言すれば、海馬および mPFC にみられたシナプス可塑的变化は、恐怖記憶消去メカニズムの電気生理学的基盤を反映していると考えられる。

ラット脳発達期である3週齢時のストレス負荷は、海馬ならびに mPFC における ERK 活性化機構の障害を介してシナプス機能に障害的に働き、結果的に成長後の恐怖記憶制御機構の変容を引き起こすことが推測される。この仮説は、3wFS 群の恐怖記憶消去過程における ERK 活性化ならびにシナプス伝達の障害が、DCS の投与によって回復し、消去障害が改善されるという事実によって支持される。一方、恐怖記憶の消去試行を繰り返すことによって、海馬 CA1 における ERK 活性がさらに増強したことは、恐怖記憶の消去過程では、恐怖を克服するためのタンパク合成を伴った新たな記憶が形成されることを示しているのかもしれない。

これらの知見は、不安障害とストレスとの関係を分子レベルで解明する糸口となるものであり、PTSD などの不安障害の治療に用いられている曝露療法を想定した「消去試行」と NMDA 受容体を標的とする薬理的処置との併用という、新たな治療法の開発につながる可能性を示唆するものである。

以上の研究成果は、国内外の学会・研究会で発表し、以下の論文としてまとめた。

## 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 12 件)

- 1) Ishikawa S, Saito Y, Yanagawa Y, Otani S, Hirai S, Shimamura K, Matsumoto M, Togashi H. Early postnatal stress alters extracellular signal-regulated kinase signaling in the corticolimbic system modulating emotional circuitry in adult rats. *Eur J Neuroscience* 35:135-145. 2011. 査読有
- 2) Kimura S, Togashi H, Matsumoto M, Shiozawa T, Ishida J, Kano S, Ohashi A, Ishikawa S, Yamaguchi T, Yoshioka M, Shimamura K. Serotonin  $1A$  receptor-mediated synaptic response in the rat medial prefrontal cortex is altered by

- early life stress *-in vivo* and *in vitro* electrophysiological studies. *Jpn. J. Neuropsychopharmacol.* 31:9-15. 2011. 査読有
- 3) Kamiyama H, Matsumoto M, Otani S, Kimura S, Shimamura K, Ishikawa S, Yanagawa Y, Togashi H. Mechanisms underlying ketamine-induced synaptic depression in rat hippocampus-medial prefrontal cortex pathway. *Neuroscience* 177: 159-169. 2011. 査読有
  - 4) Yanagawa Y, Matsumoto M, Togashi H. Enhanced dendritic cell antigen uptake via alpha2 adrenoceptor-mediated PI3K activation following brief exposure to noradrenaline. *J. Immunol.*, 185:5762-5768. 2010. 査読有
  - 5) Shikanai H, Izumi T, Matsumoto M, Togashi H, Yamaguchi T, Yoshida T, Yoshioka M. Diazepam-induced increases of synaptic efficacy in the hippocampal-medial prefrontal cortex pathway are associated with its anxiolytic-like effect in rats. *J. Pharmacol. Sci.*, 114: 341-346. 2010. 査読有
  - 6) Matsuzaki H, Izumi T, Horinouchi T, Boku S, Inoue T, Yamaguchi T, Yoshida T, Matsumoto M, Togashi H, Miwa S, Koyama T, Yoshioka M. Juvenile stress attenuates the dorsal hippocampal postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptor function in adult rats. *Psychopharmacology* 214:329-337. 2010. 査読有
  - 7) Judo C, Matsumoto M, Yamazaki D, Hiraide S, Yanagawa Y, Kimura S, Shimamura K, Togashi H. Early stress exposure impairs synaptic potentiation in the rat medial prefrontal cortex underlying contextual fear extinction. *Neuroscience* 169: 1705-1714. 2010. 査読有
  - 8) Matsumoto M, Yoshioka M, Togashi H. Early postnatal stress and neural circuit underlying emotional regulation. International review of neurobiology. 85: 95-107, 2009.
  - 9) Ohmura Y, Yamaguchi T, Futami Y, Togashi H, Izumi T, Matsumoto M, Yoshida T, Yoshioka M. Corticotropin releasing factor enhances attentional function as assessed by the five-choice serial reaction time task in rats. *Behav Brain Res* 198:429-433. 2009. 査読有
  - 10) Matsuzaki H, Izumi T, Matsumoto M, Togashi H, Yamaguchi T, Yoshida T, Watanabe M, Yoshioka M. Early postnatal stress affects 5-HT<sub>1A</sub> receptor function in the medial prefrontal cortex in adult rats. *Eur J Pharmacol* 615: 76-82. 2009. 査読有
  - 11) Hirata R, Matsumoto M, Judo C, Yamaguchi T, Izumi T, Yoshioka M, Togashi H. Possible relationship between the stress-induced synaptic response and metaplasticity in the hippocampal CA1 field of freely moving rats. *Synapse* 63:549-56, 2009. 査読有
  - 12) Koseki H, Matsumoto M, Togashi H, Miura Y, Fukushima K, Yoshioka M. Alteration of

synaptic transmission in the hippocampal-mPFC pathway during extinction trials of context-dependent fear memory in juvenile rat stress models. *Synapse*. 63:805-13, 2009. 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- 1) 平出幸子, 松本真知子, 富樫廣子他 ストレス下の海馬シナプス応答に対する扁桃体の調節と幼若期ストレスの影響 第41回日本神経精神薬理学会(於・東京 2011年10月29日)
- 2) 松本真知子, 富樫廣子 幼若期ストレスによる神経可塑的变化と精神疾患との関連性. 第34回日本神経科学大会シンポジウム (於・横浜 2011年9月29日)
- 3) 松本真知子, 富樫廣子 Neural plasticity and developmental stress. 日・伊合同国際交流学術セミナー(於・仙台 2011年6月2日)
- 4) Ishikawa S, Matsumoto M, Togashi H. et al. Early postnatal stress alters extracellular signal-regulated kinase signaling in the corticolimbic system underlying emotional regulation in adult rats. *Society for Neuroscience 40<sup>th</sup> annual meeting*. (於・SanDiego 2010年11月16日)
- 5) Hiraide Y, Matsumoto M Togashi H. et al. Context-dependent fear memory deficit accompanied with synaptic impairment in the rat medial prefrontal cortex. *Society for Neuroscience 40<sup>th</sup> annual meeting*. (於・SanDiego 2010年11月15日)
- 6) Saito Y, Matsumoto M, Togashi H. et al. Impaired fear extinction by exposure to early postnatal stress: evidence of altered neuronal processing in the rat hippocampus and medial prefrontal cortex network. *Society for Neuroscience 40<sup>th</sup> annual meeting*. (於・SanDiego 2010年11月15日)
- 7) Matsumoto M, Togashi H. Early life stress and neural circuits underlying fear extinction in rats:translational approaches for psychotherapy of posttraumatic stress disorder. *XXVII CINP World Congress* (於・香港 2010年6月10日)
- 8) Togashi H, Matsumoto M, et al. Ketamine-induced cortical dysfunction involved in dopaminergic and GABAergic mechanisms in rats. *XXVII CINP World Congress* (於・香港 2010年6月7日)

[図書] (計 1 件)

Matsumoto M, Togashi H. Early postnatal stress and emotional vulnerability: Focus on neural circuits underlying fear memory in rats. In L. Sher and A. Vilens, eds: *Neurobiology of post-traumatic stress disorder*. Nova Science Publishers. pp. 1-16. 2010.

〔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：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松本 真知子 (MATSUMOTO MACHIKO)

北海道医療大学・薬学部・准教授

研究者番号：70229574

### (2) 研究分担者

富樫 廣子 (TOGASHI HIROKO)

北海道医療大学・薬学部・教授

研究者番号：20113590

### (3) 連携研究者

木村 真一 (KIMURA SHIN-ICHI)

北海道医療大学・薬学部・講師

研究者番号：90281287