

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590117

研究課題名(和文) 恐怖記憶の階層的情報処理機構に関する研究

研究課題名(英文) Neuronal Basis of Fear Memory and its Possible Basis of Stress-induced Neuropsychological Diseases

研究代表者

富樫 廣子 (TOGASHI, Hiroko)

北海道医療大学・薬学部・講師

研究者番号：20113590

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：離乳前後の脳機能発達期にストレスを負荷したラットを用いて、幼時期のストレスが、発達期特異性(臨界期)を持って、成長後の情動行動変容を引き起こすこと、それには恐怖記憶の形成・想起に関わる皮質辺縁系を中心とした脳内シナプス伝達の障害が関与していることを神経生理学的及び分子生物学的に明らかにした。さらに、恐怖刺激に対する行動応答には性差が認められること、それにはセロトニン神経系が関与していることを見出した。また、脳内サイトカインを介する恐怖記憶に関わる神経調節機構があることを初めて明らかにした。これらの知見は、ストレス性精神神経疾患の生物学的背景及び治療戦力の構築に新たな情報を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：We reported the persistent influence of early life stress on fear memory regulation, focusing on fear-related behavior and synaptic responses in rats. Aversive stimulus, foot shock (FS), at early postnatal period (before and after weaning) produced behavioral, neurological and electrophysiological changes with the developmental period in adult rats. Sex-difference in fear-related responses was noted in the cortico-limbic area, accompanied with serotonergic dysfunction. We also reported a novel immuno-neurological mechanism in stress-induced fear memory changes. These findings may indicate that traumatic events in early life are implicated in an increased risk of psychiatric diseases, such as depression and anxiety disorders, and provide an idea that normalization of cortico-limbic function has therapeutic potentials for stress-induced emotional disturbance.

研究分野：精神医学

キーワード：恐怖行動 皮質辺縁系 扁桃体 発達期ストレス セロトニン シナプス可塑性 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

(1) 精神疾患に関わる遺伝子の探索研究が進められ、シナプス形成や神経細胞の分化や転写制御に関連する精神疾患関連遺伝子が見出されてきた。一方、精神神経疾患の要因として、エピジェネティックな視点から出生後のストレスなど環境要因の重要性が指摘されている。例えば、心的外傷後ストレス障害(PTSD)や不安障害など精神神経疾患の易罹患性には、幼時期ストレスなど後天的要因が関与している可能性があり、幼児虐待やネグレクトといった劣悪な生育環境が成長後の精神機能に与える影響が懸念されている。

(2) 脳には障害を受けた機能に対してそれを補完する可塑性という柔軟な性質がある。しかし脳発達期である幼時期に過度のストレスを受けると、成長後のストレス応答に関わる脳内神経回路における可塑性の変化、いわゆるメタ可塑的な変化が生じる可能性がある。我々は、雄性ラットでは、幼若期(離乳前後)ストレスによって、成長後、恐怖記憶の「想起(再生)不全」(離乳前ストレス群)と「消去障害」(離乳後ストレス群)といった異なるベクトルの行動変容が生じることから、幼時期ストレスによる影響には臨界期が存在する可能性を報告してきた。先行研究から、消去記憶障害の背景には、海馬や皮質前頭前野(mPFC)などの情動行動制御に統合的調節役割を担う脳部位におけるメタ可塑的变化の関与が考えられたことから、ストレスに起因するPTSDや不安障害などの精神疾患の易罹患性あるいは病態の背景には、このようなメタ可塑性を背景とする階層的情報処理機構の障害があるのではないかとこの仮説を持つに至った。

2. 研究の目的

(1) 心的外傷後ストレス障害(PTSD)や不安障害などのストレスを背景とする精神疾患の脳内機構を明らかにするために、恐怖記憶に基づいた情動応答(行動ならびに情動神経回路におけるシナプス応答)を指標に、恐怖記憶の形成ならびに消去過程に関わる神経機構及び新たな分子機構を追究した。また、PTSDの治療戦略を含めた薬理学的視点から、恐怖記憶制御因子としての内因性物質を探索した。

(2) 脳機能発達期である幼時期の過度のストレスが、情動神経回路の形成不全あるいは情報処理機能の障害を引き起こし、成長後に心的外傷後ストレス障害(PTSD)や不安障害などの精神神経疾患の易罹患性の背景になっているとの仮説に基づき、離乳期前後にストレスを負荷した雌雄ラットを用いて、恐怖関連行動を指標として、記憶の形成及び消去過程における応答性の性差を明らかにした。さらに、皮質 辺縁系ならびに情動行動制御における脳内階層的情報処理機構を、シナプス可塑性ならびにその分子機構から追究した。

3. 研究の方法

(1) 実験動物:幼時期ストレス負荷モデルとして、自家繁殖した離乳前(生後2週齢)および後(3週齢)のラットに、2秒間の電撃ストレス(FS)を30秒毎に5回、5日間にわたり負荷した。成長後(11-14週齢時)に環境(context)に依存した文脈的恐怖条件試験により恐怖記憶の「消去」を中心とした行動解析を行った。覚醒下で電気生理ならびに神経化学的検討を行い、行動解析後は免疫組織化学的解析に供した。対照群としてFS装置に入れる処置のみを負荷した同腹のFS非負荷群を用いた。

(2) 行動解析:情動記憶に関わる脳内システムの解明に汎用されている恐怖条件付け(Conditioned fear conditioning:CFC)試験を不安水準の評価系として用いた。幼時期に電撃ショックを負荷した装置とは別の装置で、FSを1日1回、2日間負荷した(Day1、Day2)。2回目のFS負荷3時間後に電撃箱に10分間再曝露した。この時はFSを負荷せず、不安関連行動であるすくみ行動(freezing)を測定した(獲得試行:Acquisition)(Day2)。24時間後に、電撃箱に10分間再曝露し(extinction trial)すくみ行動(freezing)を測定した。この試行を3時間毎に3回繰り返し、消去試行とした(Day3)。3回目の試行の24時間後に、電撃装置内に10分間再曝露し、消去記憶の想起を試みた(Day4)。FSを負荷せず、上記と同様のプロトコールで電撃装置内に再曝露したものを対照群とした。またFSを負荷した後、消去試行を行わず(電撃箱に入れず、ホームケージに戻すのみ)4日目に再曝露した群を非消去群とした。

(3) 電気生理学的解析:恐怖条件付け(CFC)における消去試行および想起における皮質 辺縁系神経回路のシナプス伝達効率の変化を行動解析と同時に検討するために、ペンタバルビタール麻酔下に、目的とする脳内部位に記録電極及び刺激電極を埋め込み、シナプス伝達を測定した。さらに、FS刺激24時間後に、電気刺激(高頻度刺激あるいは低頻度刺激)によってシナプス機能を擾乱し、消去過程における行動応答の変化を評価した。

(4) 神経化学的解析:情動記憶に関わる脳部位の細胞外液中あるいは組織内アミノ酸(グルタミン酸およびGABA)ならびにモノアミン(NE、DA、5-HT)濃度を、化学検出器付き高速液体クロマトグラフィーにて測定し、消去過程に関わる内因性神経伝達物質を探索した。

(5) 免疫組織化学的解析:消去試行3回目あるいは消去想起における行動解析を行った1時間後に、ウレタン麻酔下に速やかに脳を摘出し、情動記憶に関わる脳部位のc-Fosタンパク質発現をポリクロナール抗体を用いて免疫組織化学的に解析し、画像解析により定量した。さらに、シナプス可塑性に重要な役割を担っているERK(extracellular signal regulated kinase)活性を、Total ERKならびにリン酸化ERKとしてWestern blottingで定量し、さらにERKの活性化の細胞内分子

機構について検討した。

4. 研究成果

(1) 文脈的恐怖条件付け試験における行動応答と情動回路(皮質辺縁系)におけるシナプス伝達を同時に記録することによって、恐怖記憶調節機構を、獲得、再生ならびに消去過程(消去試行ならびに消去記憶の想起)の三つの側面から検討した。その結果、恐怖記憶の消去過程においては、単なる恐怖記憶の消去ではなく、消去記憶という新たな記憶が形成されることを、神経生理学的に初めて明らかにした。すなわち、恐怖記憶の消去過程には、海馬におけるシナプスのシナプス伝達が、消去試行24時間後の「想起」時には、海馬ではなく海馬-皮質前頭前野(mPFC)神経回路のシナプス伝達が増強することから、消去試行によって海馬で獲得・形成された記憶(消去記憶)は、海馬から mPFC へ移行し保持される可能性が考えられた。さらに、消去試行を繰り返すことにより、不安行動の減弱と共に、海馬 CA1 のシナプス伝達効率は徐々に増強し、長期増強様のシナプス可塑的变化を示すことを見出した。すなわち、恐怖記憶の消去過程および想起時には、それぞれ海馬及び皮質前頭前野におけるシナプスの可塑的变化が重要な役割を担っていることが明らかとなった。

(2) 離乳前後に嫌悪刺激に曝露した幼若期ストレス負荷ラットでは、離乳前のストレス負荷が成長後の恐怖記憶形成に、離乳後のストレス負荷が成長後の恐怖記憶の消去過程(消去試行ならびに消去記憶の想起)に影響が認められたことから、発達時期特異的な神経回路の障害が生じている可能性が示唆された。さらに、離乳後ストレス負荷ラットでは、「想起」時に海馬-皮質前頭前野(mPFC)神経回路のシナプス伝達の増強は見られなかったことから、離乳後ストレスによる消去障害の背景には、海馬あるいは mPFC のシナプス可塑性の変化(メタ可塑的变化)による mPFC の統合的調節機能不全が関与している可能性が示された。

(3) 恐怖記憶の制御に関わる脳部位をシナプス可塑性に重要な役割を担っている ERK (extracellular signal regulated kinase)活性の動的変化より明らかにした。対照群では、恐怖記憶の再生によって扁桃体と海馬 CA1 の ERK 活性が上昇した。離乳前ストレス負荷群では恐怖記憶の再生に伴う ERK 活性の上昇が認められなかった。恐怖記憶の消去試行 (extinction training) によって海馬 CA1 の ERK 活性が上昇したが、想起 (retrieval) においては、海馬 CA1 ではなく、mPFC の ERK 活性が上昇した。離乳前ストレス負荷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。したがって、恐怖記憶の再生、消去(消去試行と想起)には、それぞれ異なる脳部位での ERK の活性化が関与していることを示すものであり、恐怖記憶調節に関わる神経回路におけるシナプス可塑的变化及び幼時期ストレスによって障害されるメタ可塑的变化を受ける脳部位に一致するものであった。

(4) 文脈的恐怖条件付け(CFC)試験における行動応答を指標として、恐怖記憶の形成及び消去過程における性差について検討した結果、雌性では雄性に比較して、恐怖記憶に基づく行動応答が低下していること、セロトニン神経の起始核の一つである正中縫線核(MRN)ならびに海馬のセロトニン陽性細胞数ならびにセロトニン組織量に差異がみられること、CFC 中の海馬における細胞外セロトニン遊離量の増加が認められないこと、CFC による海馬 CA1 領域の長期増強(LTP)形成抑制がみられないこと、さらに雄性では、MRN の破壊によって恐怖記憶に基づく行動応答が障害されること、MRN 刺激および 5-HT_{1A} 受容体刺激によって LTP 形成が抑制されることから、情動ストレス応答にみられた性差には、MRN-海馬における 5-HT_{1A} 受容体を含む 5-HT 神経系がその神経基盤として関わっていることが明らかとなった。

(5) 恐怖記憶の階層的情報処理機構という視点から、恐怖刺激の入力部位である扁桃体(AMG)の役割を追究した。実験的あるいは遺伝的に恐怖記憶形成障害を呈する離乳前ストレス負荷ラット及び注意欠如多動性障害モデルラットを用いて、情動神経回路のシナプス可塑性と情動行動表出との関連性を追究した結果、恐怖記憶の形成に関わる皮質辺縁系シナプス応答を扁桃体が抑制的に調節していることが明らかとなった。

(6) 恐怖記憶の階層的情報処理機構という視点から、恐怖刺激に対する行動応答の最終出力部位として情動行動制御に重要な役割を担っている中脳水道中心灰白質(PAG)の機能的役割に関する基礎的検討を行った。PAG は解剖学的に細分化されることから、c-Fos 陽性細胞数を背内側 PAG (DMPAG)、背外側 PAG (DLPAG)、外側 PAG (LPAG)、及び腹外側 PAG (VLPAG)の各部位で計測し、侵害刺激に対する応答性を評価した。その結果、VLPAG では、熱性侵害刺激によって c-Fos 陽性細胞が有意に増加したが、DMPAG、DLPAG 及び LPAG では変化は認められなかったことから、これら PAG 領域の機能的役割の違いが明らかになった。

(7) 恐怖記憶の形成ならびに消去過程に関わる神経機構及び新たな分子機構として、免疫分子サイトカインの役割を追究した。炎症性サイトカイン誘発モデルマウスを用いて皮質 辺縁系シナプス応答との関連性を追究し、恐怖記憶の形成には、脳内サイトカインを介する新たな調節機構があることを初めて報告した。すなわち、中枢神経系に発現している Toll-like receptor (TLR)メンバーの1つで、I型インターフェロン(IFN)の産生の誘導を介して抗ウイルス作用を現わすことが知られている TLR7 に着目し、その情動調節における役割について、TLR7 特異的リガンドである imiquimod と TLR7 ノックアウトマウスを用い、情動行動、シナプス

応答（海馬シナプス可塑性）及び脳内各種遺伝子の発現との関連性から検討した。その結果、miquimod がうつ様行動を誘発し、文脈的恐怖記憶の固定を強化すること、うつ様行動との関連性が示唆されている海馬シナプス可塑性の変化を引き起こすこと、TLR7 を介した情動調節の制御には、脳内に存在する TLR7 陽性細胞による I 型 IFN の発現誘導が関与していることを明らかにした。

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 13 件)

- 1) Inoue S, Shikanai H, Matsumoto M, Hiraide S, Saito Y, Yanagawa Y, Yoshioka M, Shimamura K, Togashi H. Metaplastic regulation of the median raphe nucleus via serotonin 5-HT1A receptor on hippocampal synaptic plasticity is associated with gender-specific emotional expression in rats. *J Pharmacol Sci*. 査読あり, 124(3):394-407. (2014)
DOI: 10.1254/jphs.13237FP
- 2) Shikanai H, Kimura S, Togashi H. Early life stress affects the serotonergic system underlying emotional regulation. *Biol Pharm Bull*. 査読あり, 36(9):1392-1395. (2013)
DOI: 10.1248/bpb.b13-00337
- 3) Hiraide S, Saito Y, Matsumoto M, Yanagawa Y, Ishikawa S, Kubo Y, Inoue S, Yoshioka M, Togashi H. Possible modulation of the amygdala on metaplasticity deficits in the hippocampal CA1 field in early postnatally stressed rats. *J Pharmacol Sci*. 査読あり, 119(1):64-72. (2012)
DOI: 10.1254/jphs.12023FP

〔学会発表〕(計 32 件)

- 1) 鹿内浩樹、井上純孝、山崎あや、根深真央、平田智子、平出幸子、富樫廣子、島村佳一、発達臨界期の性ホルモン擾乱が引き起こす成熟後皮質辺縁系モノアミン神経の異常、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 25 日～28 日、神戸サンボホール(神戸)
- 2) 鹿内浩樹、松崎広和、井上純孝、平出幸子、柳川芳毅、吉岡充弘、島村佳一、富樫廣子、情動応答における性差に及ぼす発達臨界期の情動ストレスと性ホルモンの影響、第 44 回日本神経精神薬理学会、2014 年 11 月 20 日～22 日、名古屋国際会議場(名古屋)
- 3) 井上純孝、松本真知子、鹿内浩樹、柳川芳毅、平出幸子、齋藤靖弘、島村佳一、富樫廣子、情動ストレス応答における性差の神経科学的基盤、日本薬学会第 134

年会、2014 年 3 月 27 日～30 日、熊本市民総合体育館(熊本)

- 4) 井上純孝、松本真知子、鹿内浩樹、平出幸子、齋藤靖弘、柳川芳毅、島村佳一、富樫廣子、情動調節における性差と海馬シナプス可塑性、第 43 回日本神経精神薬理学会、2013 年 10 月 24 日～26 日、沖縄コンベンションセンター(沖縄)
- 5) 井上純孝、松本真知子、鹿内浩樹、平出幸子、齋藤靖弘、柳川芳毅、島村佳一、富樫廣子、情動ストレス応答における性差と正中縫線核-海馬セロトニン神経系、第 64 回日本薬理学会北部会、2013 年 9 月 13 日、大雪クリスタルホール(旭川)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況(なし)
- 取得状況(なし)

〔その他〕

特記なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

富樫 廣子 (TOGASHI, Hiroko)
北海道医療大学・薬学部・講師
研究者番号：20113590

(2)研究分担者

柳川 芳毅 (YANAGAWA, Yoshiki)
北海道医療大学・薬学部・准教授
研究者番号：20322852

松本 真知子 (MATSUMOTO, Machiko)
北海道医療大学・薬学部・助教授
研究者番号：70229574
(平成 24 年度に研究分担者から削除)

平出 幸子 (HIRAIDE, Sachiko)
北海道医療大学・薬学部・助教
研究者番号：50709277
(平成 25 年度より研究分担者に追加)

鹿内 浩樹 (SHIKANAI, Hiroki)
北海道医療大学・薬学部・助教
研究者番号：00632556
(平成 25 年度より研究分担者に追加)

(3)連携研究者

なし