

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860926

研究課題名(和文)病態生理の解明に基づく新規かつ特異的なPTSD治療薬開発のための基礎的研究

研究課題名(英文) Study for the establishment of novel and specific treatment for PTSD, which is based on pathological mechanism

研究代表者

近藤 誠 (KONDO, Makoto)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50633012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：恐怖記憶の機序とセロトニンの関連に着目し、遺伝子改変マウスを用いて解析を行った。恐怖条件付けテストによる解析から、5-HT3受容体欠損マウスは恐怖記憶の獲得や保持は正常であるが、消去が障害されている事を見出し、5-HT3受容体が恐怖記憶の消去に特異的に関わる重要分子で、5-HT3受容体欠損マウスは、PTSDの有用なモデル動物となる事を明らかにした。運動には、恐怖記憶も含めた記憶能力の向上効果や抗うつ効果、海馬神経新生の促進効果がある。5-HT3受容体欠損マウスを用いた組織学的解析と行動解析により、5-HT3受容体は、運動による海馬神経新生の増加や抗うつ効果に必須である事を見出した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the relationship between fear memory processes and serotonin by using genetically engineered mice. Behavioral analysis of fear conditioning test revealed that the 5-HT3 receptor-deficient (*htr3a*^{-/-}) mice showed intact acquisition and retention of fear memory, but impaired fear extinction. We found that 5-HT3 receptor is essential for fear extinction, and *htr3a*^{-/-} mice could be a useful animal model of PTSD. Exercise has a variety of effects on brain structure and function, such as hippocampal neurogenesis, mood and memory. Exercise enhances hippocampal neurogenesis, induces antidepressant effects, and improves learning behavior. Detailed histological and behavioral analyses of *htr3a*^{-/-} mice revealed that 5-HT3 receptor is indispensable for exercise-induced hippocampal neurogenesis and antidepressant effects, but not for learning enhancement.

研究分野：神経科学、解剖学

キーワード：セロトニン 5-HT受容体 恐怖記憶 情動

1. 研究開始当初の背景

恐怖記憶の形成は、危険や脅威を回避するための防御反応であり、全ての動物に備わっている本能のひとつである。恐怖記憶は、ただ一度の恐怖体験によって獲得されると、長期間にわたって保持される。しかし、これ以上恐怖を感じる必要がない事を新たに学習すると、恐怖記憶の消去が起こる。これらの恐怖記憶のプロセスが障害されると、ヒトでは不安障害や PTSD (心的外傷後ストレス障害) などの精神疾患を引き起こす事が知られている。これらの精神疾患に対する薬物療法として、選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) が第一選択薬として用いられており、恐怖記憶の機序やこれらの精神疾患の病態にはセロトニン (5-hydroxytryptamine, 5-HT) の関与が示唆されていたが、詳細な機序は明らかでなかった。一方、運動は、脳の機能や形態に様々な影響を及ぼすことが知られている。運動には、恐怖記憶も含めた記憶能力の向上効果や抗うつ効果、海馬神経新生の促進効果がある。これらの脳の機能的変化や、形態的变化には、5-HT の関与が報告されていたが、詳細な作用は明らかでなかった。5-HT 受容体サブファミリーの 1 つである 5-HT₃ イオンチャネル型受容体は、海馬や扁桃体などの辺縁系領域に発現しているが、記憶や情動などの脳機能に関する詳細な役割については、これまでよく分かっていなかった。

2. 研究の目的

恐怖記憶の機序に着目し、5-HT₃ 受容体が恐怖記憶の獲得や保持、消去などの恐怖記憶のプロセスにどの様に関わっているのか、5-HT₃ 受容体欠損 (KO) マウスを用いて解析を行った。また、運動がもたらす、恐怖記憶などの記憶学習能力の向上効果や抗うつ効果、海馬神経新生の促進効果に着目し、5-HT₃ 受容体が、運動によるこれらの変化にどの様に関わっているのか解析を行った。

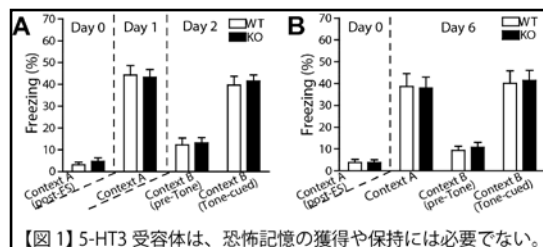
3. 研究の方法

恐怖条件付けテストにより恐怖記憶の行動解析を行った。恐怖条件付けは、初日 (Day 0) にマウスを床に電線を敷いたチャンバー (Context A) の中に入れ、120 秒後に 30 秒間の音刺激 (85dB, 3000Hz) と電気ショック (0.6mA, 2 秒間) を与え、この組み合わせを、120 秒間隔で合計 2 回与える事で行った。脳の組織学的解析は、Kluver-Barrera 染色法により行い、また海馬歯状回における神経新生は、BrdU による分裂細胞標識法と神経の分子マーカーを用いて免疫組織学的に解析した。マウスのうつ行動の解析は、強制水泳テストと尾懸垂テストによって行った。

4. 研究成果

(1) まず、恐怖記憶の獲得について検討した。恐怖条件付けの 24 時間後 (Day 1) に、

条件付けを行ったチャンバー (Context A) に 5 分間入れ、音刺激や電気ショックを与えない状態でマウスのフリージング時間を測定した (文脈条件付け恐怖記憶テスト)。48 時間後 (Day 2) には、新しいチャンバー (Context B) にマウスを入れて 3 分間音刺激のみを与え、フリージング時間を測定した (音条件付け恐怖記憶テスト)。その結果、文脈条件付け及び音条件付けテストともに、野生型マウスと 5-HT₃ 受容体 KO マウスのフリージング時間に差は見られなかった (図 1A)。次に、恐怖記憶の保持について検討した。恐怖条件付けの 6 日後 (Day 6)、同様に文脈条件付け及び音条件付け恐怖記憶テストを行った。その結果、文脈条件付け、音条件付けテストともに、野生型マウスと KO マウスのフリージング時間に差は見られなかった (図 1B)。以上の結果から、5-HT₃ 受容体 KO マウスは恐怖記憶の獲得や保持には必要でない事が明らかとなった。

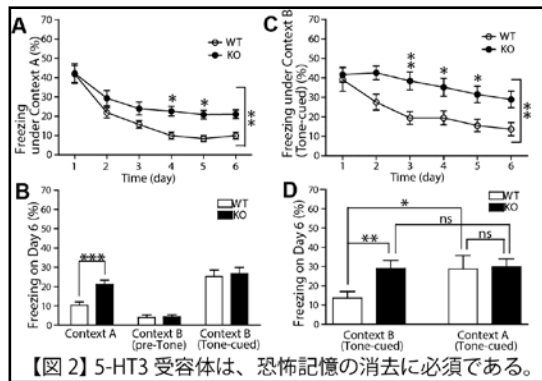


【図 1】5-HT₃ 受容体は、恐怖記憶の獲得や保持には必要でない。

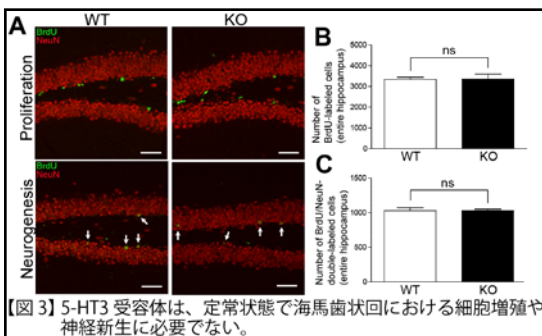
(2) 続いて、恐怖記憶の消去について検討した。恐怖条件付けの翌日から 6 日間毎日 (Day 1~6)、マウスをチャンバー (Context A) に電気ショックの無い状態で 5 分間入れ、フリージング時間を測定し、文脈条件付け恐怖記憶の消去を評価した。野生型マウスでは、日を経るごとにフリージング時間がすばやく減少していき、消去学習が認められたが、5-HT₃ 受容体 KO マウスでは、野生型マウスと比べて、文脈条件付け恐怖記憶の消去が障害されていた (図 2A)。一方、6 日目 (Day 6) に恐怖記憶の消去を評価した後に、条件付けを行ったチャンバーと異なる新しいチャンバー (Context B) にマウスを入れて 3 分間の音刺激を与え、フリージング時間を測定したところ、野生型マウスと KO マウスとの間に差は見られなかった (図 2B)。この結果は、文脈条件付け恐怖記憶の消去における、野生型マウスと 5-HT₃ 受容体 KO マウスの差は、消去学習が行われたコンテキストに特異的に起こっている事を示している。次に、恐怖条件付けの翌日から 6 日間毎日 (Day 1~6)、条件付けを行ったチャンバーとは異なる新しいチャンバー (Context B) にマウスを入れて 3 分間の音刺激を与え、フリージング時間を測定し、音条件付け恐怖記憶の消去を評価した。その結果、野生型マウスと比べて、5-HT₃ 受容体 KO マウスでは、音条件付け恐怖記憶の消去が著しく障害されていた (図 2C)。これらの結果から、文脈条件付け及び

音条件付け恐怖記憶の消去プロセスに 5-HT3 受容体が必要である事が明らかとなった。

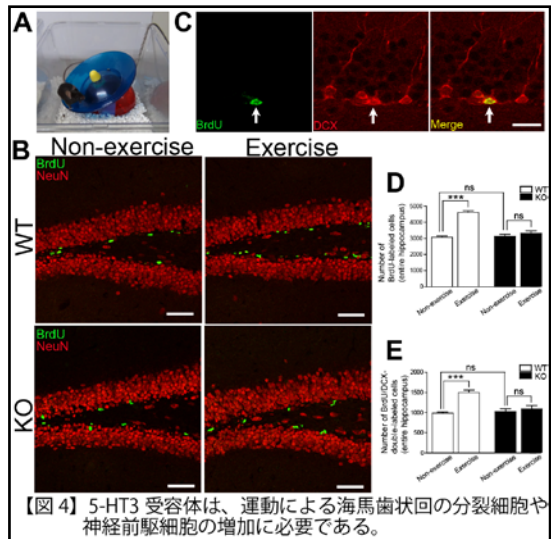
音条件付け恐怖記憶の消去を誘導した後に、消去学習が行われたコンテキストとは異なるコンテキストにマウスを入れて音刺激を与えた場合、再び強いフリージングを示す。これは renewal 効果と呼ばれ、コンテキスト特異的に起こる恐怖記憶の消去の特性の 1 つである。野生型マウスでは、音条件付け恐怖記憶の消去が誘導された後に、消去学習を行ったチャンバー (Context B) と異なるチャンバー (Context A) に入れて 3 分間の音刺激を与えると、フリージング時間の延長が見られ renewal 効果を認めた。一方、5-HT3 受容体 KO マウスでは、フリージング時間の延長は見られなかった (図 2D)。この結果は恐怖記憶の消去プロセスにおけるコンテキスト特異性に 5-HT3 受容体が重要である事を示している。



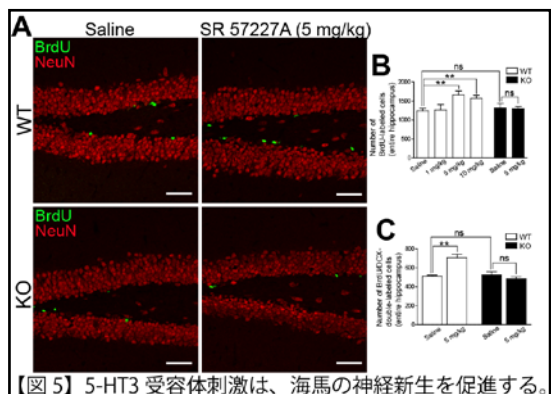
(3) 次に、5-HT3 受容体 KO マウスの脳の組織形態学的解析を行った。Kluver-Barrera 染色を用いた脳組織の解析では、恐怖記憶の消去に関わる海馬や扁桃体、前頭前野には明らかな形態異常は見られなかった。続いて、海馬の歯状回における神経新生について、組織学的に検討した。BrdU による分裂細胞標識法を用いた免疫組織学的解析を行ったところ、5-HT3 受容体 KO マウスは、歯状回における細胞増殖 (BrdU 陽性細胞) や神経新生 (BrdU/NeuN 陽性細胞) が、野生型マウスと同じ程度で、差は見られなかった。これらの結果から、5-HT3 受容体は、定常状態で海馬歯状回における細胞増殖や神経新生に必要でない事が明らかとなった (図 3A,B,C)。



(4) 運動には、恐怖記憶も含めた記憶学習能力の向上効果や抗うつ効果、海馬神経新生の促進効果がある事が知られている。これらの効果に 5-HT が関与している事に着目し、5-HT3 受容体 KO マウスを用いて更なる解析を展開した。マウスを回転車輪のある運動環境 (図 4A) で 1 週間飼育したところ、野生型マウスでは、運動していないマウスと比較して、海馬歯状回における分裂細胞 (BrdU 陽性細胞) および神経前駆細胞 (BrdU/DCX 陽性細胞) の増加が認められた。しかし、5-HT3 受容体 KO マウスでは、運動後に分裂細胞や神経前駆細胞の増加は見られなかった (図 4B,C,D,E)。また、野生型マウスと 5-HT3 受容体 KO マウスで、1 週間の運動量に差は見られなかった。これらの結果から、5-HT3 受容体が、運動による海馬歯状回の分裂細胞や神経前駆細胞の増加に必須である事が明らかとなった。

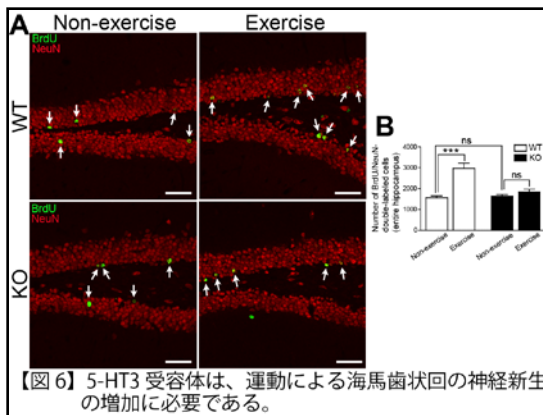


(5) 5-HT3 受容体作動薬 (アゴニスト: SR 57227A) 投与による 5-HT3 受容体刺激が、海馬の神経新生にどのような影響を及ぼすか検討を行った。マウスに、5-HT3 受容体アゴニストを腹腔内投与した後に BrdU を投与し、その 24 時間後に海馬歯状回における神経新生を組織学的に解析したところ、分裂細胞 (BrdU 陽性細胞) および神経前駆細胞 (BrdU/DCX 陽性細胞) の増加が見られた。一方で、5-HT3 受容体 KO マウスでは、分裂



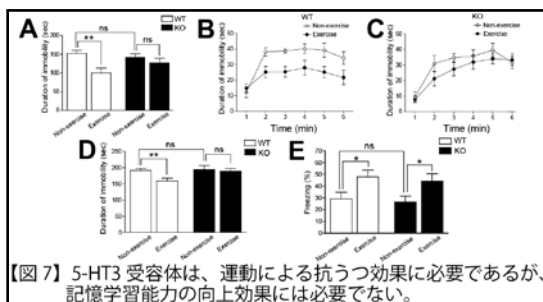
細胞や神経前駆細胞の増加は見られなかった (図 5A,B,C)。これらの結果は、5-HT3 受容体刺激が、海馬の神経新生を促進する事を示しており、5-HT3 受容体が海馬の神経新生を制御している事が明らかとなった。

(6) 海馬歯状回の顆粒細胞下帯で誕生した新生細胞は、数週間かけて成熟神経細胞となり、海馬の神経ネットワークに機能的に組み込まれる。そこで、マウスを3週間、運動環境で飼育した後に、海馬歯状回の神経新生を検討した。3週間の運動後に、野生型マウスでは、運動していないマウスと比較して、BrdU 陽性の成熟顆粒細胞 (BrdU/NeuN 陽性細胞) の増加が見られた。一方で、5-HT3 受容体 KO マウスでは、運動後に BrdU 陽性の成熟顆粒細胞の増加は見られなかった (図 6A,B)。また、野生型マウスと 5-HT3 受容体 KO マウスで、3週間の運動量に差は見られなかった。これらの結果から、運動による海馬神経新生の増加に 5-HT3 受容体が必須である事が明らかとなった。



【図 6】 5-HT3 受容体は、運動による海馬歯状回の神経新生の増加に必要である。

(7) 運動には、抗うつ効果や記憶学習能力の向上効果がある事が知られている。そこで、5-HT3 受容体 KO マウスを用いて、うつ行動と記憶学習行動の解析を行った。マウスのうつ行動は、強制水泳テストと尾懸垂テストによって解析し、記憶学習行動は、恐怖条件付けテストによる恐怖記憶の解析により検討した。野生型マウスでは、3週間の運動後に、強制水泳テストと尾懸垂テストにおいて、無動時間の減少が見られ、運動による抗うつ効果を認めた。一方で、5-HT3 受容体 KO マウスでは、強制水泳テストと尾懸垂テストともに、3週間の運動後に無動時間の減少は見られなかった (図 7A,B,C,D)。一方で、3週間



【図 7】 5-HT3 受容体は、運動による抗うつ効果に必要であるが、記憶学習能力の向上効果には必要でない。

の自発運動後に行った文脈条件付け恐怖記憶テストでは、野生型マウスと 5-HT3 受容体 KO マウスともに、運動していない各々のマウスと比較して、フリージング時間が延長しており、記憶学習能力の向上が見られた (図 7E)。これらの結果から、5-HT3 受容体は、運動による抗うつ効果には必須であるが、記憶学習能力の向上には必要でない事が明らかとなった。

(8) PTSD は、恐怖体験によって形成された恐怖記憶が、これ以上恐怖を感じる必要がないにもかかわらず消去されない疾患で、恐怖記憶の制御の異常がその発症や病態に関係していると考えられている。本研究により、5-HT3 受容体が恐怖記憶の消去に必須の働きをしている事が明らかとなり、5-HT3 受容体が PTSD 治療の標的分子となる可能性が示唆された。また、5-HT3 受容体 KO マウスが、PTSD の発症や病態を理解する上で有用なモデル動物となる事が考えられる。本研究の成果は、今後、PTSD の治療に向けたさらなる研究の発展に寄与すると考えられる。

(9) 本研究によって、運動によって引き起こされる海馬神経新生の増加や抗うつ効果に、5-HT3 受容体が必須の働きをしている事が明らかとなり、運動がもたらす脳の形態的变化や機能的変化におけるセロトニンの作用機序が初めて明らかとなった。これまで明らかでなかった、運動が脳に与える影響の分子メカニズムの解明に役立つものと考えられる。さらに、本研究成果から、5-HT3 受容体が、うつ病の新しい治療標的分子となる可能性が考えられる。しかし、5-HT3 受容体がどのような機序で、海馬の神経新生を制御し、その刺激が抗うつ効果をもたらすのか、まだ分かっていない。今後のさらなる研究によって、新しい抗うつ薬の開発へと展開していく事が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

① Takezawa K, Kondo M*(Co-first), Kiuchi H, Ueda N, Soda T, Fukuhara S, Takao T, Miyagawa Y, Tsujimura A, Matsumoto K, Ishida Y, Negoro H, Ogawa O, Nonomura N, Shimada S.

Authentic role of ATP signaling in micturition reflex.

Scientific Reports, Vol 6, article number 19585, 2016. 査読有

DOI: 10.1038/srep19585

② Kondo M*, Nakamura Y, Ishida Y, Shimada S.

The 5-HT3 receptor is essential for exercise-induced hippocampal neurogenesis and antidepressant effects.

Molecular Psychiatry, Vol 20, pp 1428-1437,

2015. 査読有
DOI: 10.1038/mp.2014.153
③ **Kondo M***, Shimada S.
Exercise-induced neuronal effects and the 5-HT₃ receptor.
Neurotransmitter, Vol 2, e764, 2015. 査読有
DOI: 10.14800/nt.764
④ **Kondo M***, Shimada S.
Serotonin and exercise-induced brain plasticity.
Neurotransmitter, Vol 2, e793, 2015. 査読有
DOI: 10.14800/nt.793
⑤ **近藤誠**
環境や経験依存的な脳可塑性の分子メカニズムに関する研究
神経化学, 54 巻, pp 60-62, 2015 年
⑥ Maehara T, Matsumoto K, Horiguchi K, **Kondo M**, Iino S, Horie S, Murata T, Tsuboe H, Shimada S, Ozaki H, Hori M.
Therapeutic action of 5-HT₃ receptor antagonists targeting peritoneal macrophages in postoperative ileus.
British Journal of Pharmacology, Vol 172, pp 1136-1147, 2015. 査読有
DOI: 10.1111/bph.13006
⑦ **Kondo M***, Nakamura Y, Ishida Y, Yamada T, Shimada S.
The 5-HT_{3A} receptor is essential for fear extinction.
Learning & Memory, Vol 21, pp 1-4, 2014. 査読有
DOI: 10.1101/lm.032193.113
⑧ **Kondo M***, Shimada S.
5-hydroxytryptamine type-3A receptor in the process of fear extinction.
Receptors & Clinical Investigation, Vol 1, pp 33-37, 2014. 査読有
DOI: 10.14800/rci.71
⑨ Takimoto Y, Ishida Y, Nakamura Y, Kamakura T, Yamada T, **Kondo M**, Kitahara T, Uno A, Imai T, Horii A, Okazaki S, Nishiike S, Inohara H, Shimada S.
5-HT₃ receptor expression in the mouse vestibular ganglion.
Brain Research, Vol 1557, pp 74-82, 2014. 査読有
DOI: 10.1016/j.brainres.2014.02.016
⑩ Takezawa K, **Kondo M***, Kiuchi H, Soda T, Takao T, Miyagawa Y, Tsujimura A, Nonomura N, Shimada S.
Combination of bladder ultrasonography and novel cystometry method in mice reveals rapid decrease of bladder capacity and compliance in LPS-induced cystitis.
American Journal of Physiology-Renal Physiology, Vol 307, pp F234-F241, 2014. 査読有

DOI: 10.1152/ajprenal.00043.2014

[学会発表] (計 27 件)

① **近藤誠**
環境や経験依存的な脳の形態的・機能的可塑性の分子機序に関する研究
第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会
2016 年 3 月 29 日、ビッグパレットふくしま (福島県郡山市)
② **Kondo M**, Nakamura Y, Ishida Y, Shimada S.
Roles of serotonergic system in hippocampal neurogenesis.
第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会
2016 年 3 月 28 日、ビッグパレットふくしま (福島県郡山市)
③ 竹澤健太郎, **近藤誠**, 島田昌一
5-HT₃ 受容体を介した新しい膀胱知覚亢進メカニズム
第 91 回日本解剖学会近畿支部学術集会
2015 年 11 月 28 日
京都工芸繊維大学総合研究棟 (京都府京都市)
④ **近藤誠**
The 5-HT₃ receptor is essential for exercise-induced hippocampal neurogenesis and antidepressant effects.
第 11 回成体脳のニューロン新生懇話会
2015 年 11 月 14 日
名古屋市立大学大学院医学系研究科研究棟 (愛知県名古屋市)
⑤ **Kondo M**, Nakamura Y, Ishida Y, Shimada S.
The 5-HT₃ receptor is essential for exercise-induced hippocampal neurogenesis and antidepressant effects.
Society for Neuroscience 45th Annual Meeting
2015 年 10 月 17 日~21 日
Chicago (USA)
⑥ **近藤誠**
The 5-HT₃ receptor is essential for exercise-induced hippocampal neurogenesis and antidepressant effects.
第 5 回若手研究フォーラム
2015 年 9 月 15 日
大阪大学銀杏会館 (大阪府吹田市)
⑦ **Kondo M**, Nakamura Y, Ishida Y, Shimada S.
The 5-HT₃ receptor is essential for exercise-induced hippocampal neurogenesis and antidepressant effects.
第 58 回日本神経化学学会大会
2015 年 9 月 11 日
大宮ソニックシティ (埼玉県さいたま市)
⑧ **近藤誠**
運動が抗うつ効果をもたらす機序の解析
第 17 回 ORIGIN 神経科学研究会
2015 年 8 月 28 日
下関市豊北生涯学習センター (山口県下関)

市)

⑨竹澤健太郎、近藤誠、島田昌一
遺伝子改変マウスを用いた膀胱機能研究
第17回 ORIGIN 神経科学研究会
2015年8月28日

下関市豊北生涯学習センター（山口県下関市）

⑩ Kondo M., Nakamura Y, Ishida Y, Shimada S.

The 5-HT₃ receptor is essential for exercise-induced hippocampal neurogenesis and antidepressant effects.

第38回日本神経科学大会

2015年7月28日

神戸国際会議場・神戸国際展示場（兵庫県神戸市）

⑪ 近藤誠

運動による抗うつ効果のメカニズム

第4回大阪大学神経難病フォーラム

2015年7月25日

大阪大学医学系研究科附属最先端医療イノベーションセンター（大阪府吹田市）

⑫ Kondo M., Nakamura Y, Ishida Y, Shimada S.

The 5-HT₃ receptor is essential for exercise-induced hippocampal neurogenesis and antidepressant effects.

第120回日本解剖学会総会・全国学術集会・

第92回日本生理学会大会 合同大会

2015年3月23日

神戸国際会議場・神戸国際展示場（兵庫県神戸市）

⑬ 近藤誠

海馬神経新生におけるセロトニン神経系の役割の解明

第4回若手研究フォーラム

2015年2月17日

大阪大学銀杏会館（大阪府吹田市）

⑭ 近藤誠、島田昌一

運動による海馬神経新生の増大や抗うつ効果には5-HT₃受容体が必須である

第90回日本解剖学会近畿支部学術集会

2014年11月29日

大阪大学医学部保健学科（大阪府吹田市）

⑮ 近藤誠、中村雪子、石田雄介、島田昌一

セロトニン 3A 受容体は恐怖記憶の消去に必須である

第36回日本生物学的精神医学会・第57回日本神経化学学会大会 合同年会

2014年10月1日

奈良県文化会館・奈良県新公会堂（奈良県奈良市）

⑯ Kondo M., Nakamura Y, Ishida Y, Shimada S.

The 5-HT_{3A} receptor is essential for fear extinction.

第37回日本神経科学大会

2014年9月11日

パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

⑰ 近藤誠

海馬における5-HT₃受容体の役割

第16回 ORIGIN 神経科学研究会

2014年8月31日

松本（長野県松本市）

〔図書〕（計1件）

① 近藤誠

ブレインサイエンス・レビュー2016、「記憶や情動が経験に依存して変化する分子メカニズムの解析」、pp 237-262、(株)クバプロ、2016年

〔その他〕

新聞報道

①日刊工業新聞

「セロトニン3番受容体、海馬の神経細胞を作る働きに関与」

2014年11月19日

アウトリーチ活動

①Handai-Asahi 中之島塾 講演

「運動が「うつ」「認知症」の予防に役立つのはなぜ？」

2015年6月20日

大阪大学中之島センター

②平成27年度大阪府在宅保健師の会 第1回研修会（大阪府国民健康保険団体連合会主催）講演

「運動が『うつ』の予防・改善に役立つ仕組みを解く」

2015年9月10日

大阪府国民健康保険団体連合会

③最先端医療イノベーションセンター定例セミナー 第3回 講演

「運動による抗うつ効果の分子メカニズム」

2015年10月6日

大阪大学医学系研究科附属最先端医療イノベーションセンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 誠 (KONDO, Makoto)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50633012