

128. 恐怖記憶を制御する分子機構の解明

近藤 誠

Key words : 恐怖記憶, 5-HT3 受容体, 運動,
抗うつ効果, 海馬神経新生

大阪大学 大学院医学系研究科
神経細胞生物学講座

緒言

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的行動である。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、その後、これ以上恐怖を感じる必要がないこと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ことが知られている。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発症や病態にはセロトニン (5-hydroxytryptamine, 5-HT) が関わっていること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、5-HT 受容体サブファミリーの 1 つである 5-HT3 イオンチャンネル型受容体は、海馬や扁桃体などの辺縁系領域に発現していることが報告されていたが、記憶や情動などの高次脳機能に関する役割についての詳細は、よく分かっていなかった。本研究では、恐怖記憶に着目し、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 受容体ノックアウトマウスを用いて行動解析を行った。さらに本研究では、運動環境が記憶や情動に影響をもたらすことにも着目した。運動は、脳の組織形態や、記憶や情動などの高次脳機能に様々な変化を引き起こすことが知られており、これらの効果には、セロトニンが関与していることが報告されていたが、その詳細な作用は明らかでなかった。そこで、本研究ではさらに、5-HT3 受容体に着目し、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い、大変興味深い結果を得たので報告する。

方法および結果

5-HT3 受容体が恐怖記憶のプロセスにどの様に関与しているのか調べるために、5-HT3 受容体ノックアウト (KO) マウスを用いて、恐怖条件付け試験によって行動解析を行った^{1,2)}。まず、5-HT3 受容体 KO マウスが、野生型 (WT) マウスと比べて、痛覚反応性や自発活動量、運動機能に差がなく異常がないことを確認した。続いて、恐怖条件付け試験を行った。恐怖条件付けは、マウスをチャンバーに入れた 120 秒後に、30 秒間の音刺激 (85 dB, 3000 Hz) とともに、足底から電気ショック (0.6 mA, 2 秒間) を与え、これを 120 秒間隔で 2 回与えることにより行った。まずは、恐怖記憶の獲得について検討した。初日に恐怖条件付けを行い、24 時間後に文脈条件付け恐怖記憶テストを、48 時間後には音条件付け恐怖記憶テストを行った。恐怖記憶は、マウスの Freezing 反応時間を測定することにより解析した。その結果、5-HT3 受容体 KO マウスは、文脈条件付け恐怖記憶テスト、音条件付け恐怖記憶テストともに、WT マウスと比較して Freezing 反応時間に差は見られなかった (図 1A)。

続いて、恐怖記憶の長期間の保持について検討した。初日に恐怖条件付けを行い、6 日後に文脈条件付け恐怖記憶テスト、及び音条件付け恐怖記憶テストを行った。その結果、5-HT3 受容体 KO マウスは、文脈条件付け恐怖記憶テスト、音条件付け恐怖記憶テストともに、WT マウスと比較して Freezing 反応時間に差は見られなかった (図 1B)。以上の結果は、5-HT3 受容体 KO マウスは恐怖記憶の獲得や保持に関しては正常であることを示しており、5-HT3 受容体は、恐怖記憶の獲得や保持には必要でないことが明らかとなった。

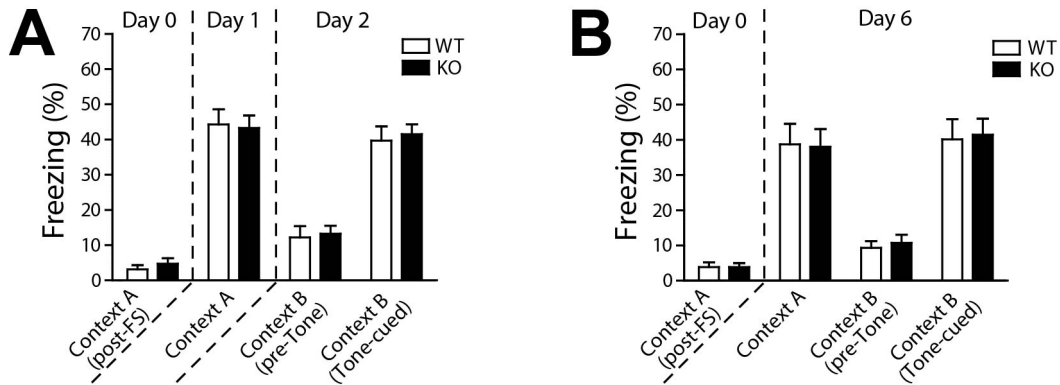


図1. 5-HT3 受容体は恐怖記憶の獲得や保持には必要ではない。

A) Day 0 に恐怖条件付けを行い, Day 1 に文脈条件付け恐怖記憶テスト, Day 2 に音条件付け恐怖記憶テストを行い, 恐怖記憶の獲得を検討した. B) Day 6 に文脈条件付け, 及び音条件付け恐怖記憶テストを行い恐怖記憶の保持を検討した. 5-HT3 受容体 KO マウスでは, WT マウスと比較して, 同程度の Freezing 反応時間 (%) を呈し, 恐怖記憶の獲得 (A) や保持 (B) に関しては正常であることが示された. 有意差なし (t-test).

次に, 恐怖記憶の消去と 5-HT3 受容体の関連について検討した¹²⁾. まずは, 文脈条件付け恐怖記憶の消去について検討を行った. 初日に恐怖条件付けを行い, その翌日から6日間毎日 (Day 1~6), 恐怖条件付けを行ったチャンバーに5分間入れる. しかし, この時電気ショックは与えない. 恐怖条件付けの翌日には, WT マウスと 5-HT3 受容体 KO マウスは, 同程度の Freezing 反応時間を示した. これは, 図1の結果に矛盾しない. 2日目以降は, WT マウスであれば, 恐怖を感じる必要がないことを学習し, 日に日に Freezing 反応時間が減少していき, 恐怖記憶の消去が起こった. しかし, 5-HT3 受容体 KO マウスでは, WT マウスと比較して Freezing 反応時間の減少程度が小さく, 文脈条件付け恐怖記憶の消去が障害されていた (図2A). 続いて, 音条件付け恐怖記憶の消去について検討した. 初日に恐怖条件付けを行い, 翌日にはマウスを新しいチャンバーに入れ, 音を3分間鳴らした. その翌日から6日間毎日 (Day 1~6), そのチャンバーにマウスを入れ, 3分間音を鳴らした. 恐怖条件付けの翌日には, WT マウスと 5-HT3 受容体 KO マウスは, 音刺激に対して同程度の Freezing 反応時間を示した. これは, 図1の結果に矛盾しない. 2日目以降は, WT マウスでは, 日に日に Freezing 反応時間が減少していき, 恐怖記憶の消去が起こった. しかし, 5-HT3 受容体 KO マウスでは, WT マウスと比較して Freezing 反応時間の減少程度が小さく, 音条件付け恐怖記憶の消去が障害されていた (図2B). 以上の結果は, 5-HT3 受容体 KO マウスは恐怖記憶の消去が障害されていることを示しており, 5-HT3 受容体は, 恐怖記憶の消去に必須の重要分子であることが明らかとなった.

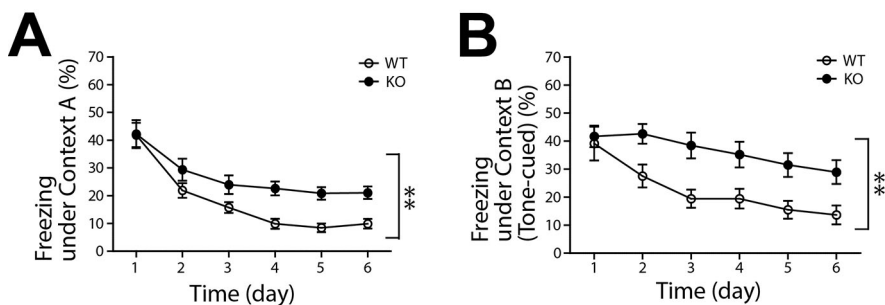


図2. 5-HT3 受容体は恐怖記憶の消去に必要である.

A) Day 0 に恐怖条件付けを行い, その翌日から6日間毎日 (Day 1~6), 条件付けを行ったチャンバーに入れ, 文脈条件付け恐怖記憶の消去を評価した. B) 条件付けの時とは異なる新しいチャンバーに入れ, 音条件付け恐怖記憶の消去を評価した. 5-HT3 受容体 KO マウスでは, WT マウスと比較して Freezing 反応時間の減少程度が小さく, 文脈条件付け恐怖記憶の消去 (A), 及び音条件付け恐怖記憶の消去 (B) が障害されていることが示された. ** $p < 0.01$ (two-way repeated measures ANOVA).

運動は、記憶や情動行動にポジティブな影響をもたらす。また、海馬では神経新生の増加やシナプス増加といった組織形態的变化を引き起こし、脳にとって大変有益な効果があることが知られている。セロトニンは、運動によって脳内で増加し、運動によるこれらの脳の可塑的变化に関わる重要因子の1つであることが報告されていた。しかし、その詳細な作用については分かっていなかった。そこで、5-HT3受容体がこれらの変化にどの様に関わっているのか調べるために、5-HT3受容体 KO マウスを用いて検討を行った^{3,5)}。まず、5-HT3受容体 KO マウスの海馬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により、海馬歯状回における分裂細胞 (BrdU陽性細胞) と神経新生 (BrdU陽性の成熟顆粒細胞: BrdU/NeuN陽性細胞) を定量的に解析したところ、5-HT3受容体 KO マウスの海馬歯状回では、WTマウスと同じ程度の細胞増殖、神経新生を示した (図3)。これにより、通常状態での海馬歯状回における細胞増殖や神経新生には、5-HT3受容体は必要でないことが明らかとなった。

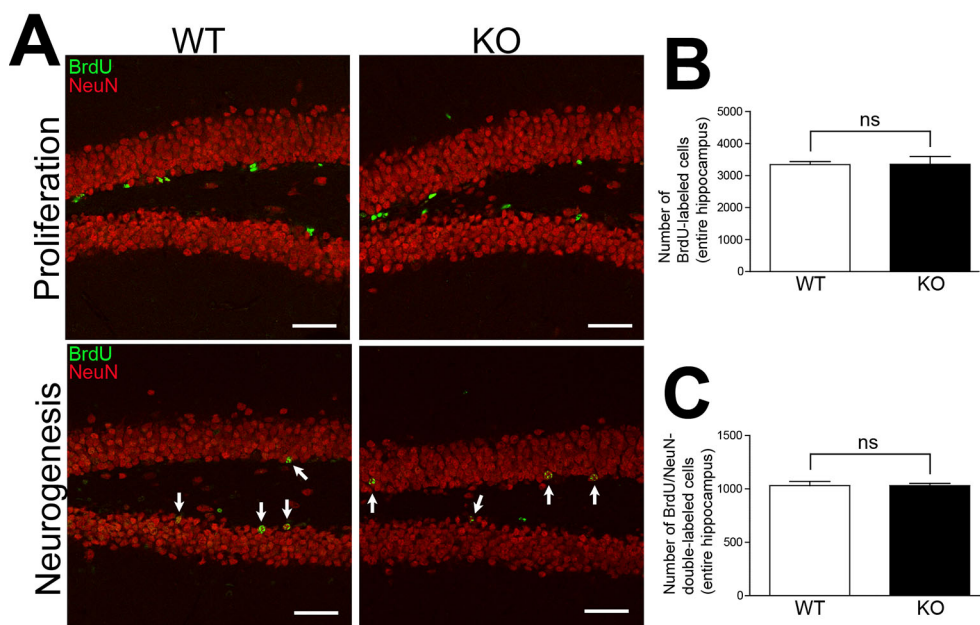


図3. 通常状態での海馬歯状回における細胞増殖や神経新生には5-HT3受容体は必要でない。

海馬歯状回における細胞増殖と神経新生を組織学的に解析した。A) BrdUとNeuNの免疫組織二重染色による海馬歯状回の組織像。Scale bars: 50 μ m。B, C) 分裂細胞 (cell proliferation: BrdU陽性細胞) (B) と BrdU陽性の成熟顆粒細胞 (neurogenesis: BrdU/NeuN陽性細胞) (C) の定量的解析。通常状態では、5-HT3受容体 KOマウスは、WTマウスと同程度の細胞増殖 (B)、神経新生 (C) を示した。有意差なし (t-test)。

続いて、運動による海馬神経新生の増加と5-HT3受容体の関連について検討した。マウスを運動用の回転車輪のある運動環境で飼育したところ、WTマウスでは、1週間の自発運動によって、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) の増加が認められた。さらに、doublecortinとの二重染色法によって、神経前駆細胞 (BrdU/DCX陽性細胞) も増加していることが明らかとなった。しかし、5-HT3受容体 KOマウスでは、運動後に海馬歯状回における分裂細胞や神経前駆細胞の増加は見られなかった (図4)。また、WTマウスとKOマウスで運動量に差は見られなかった。以上の結果は、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ことを示している。

海馬歯状回の顆粒細胞下帯で誕生した新生細胞は、数週間かけてに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ことが知られている。そこで、3週間の自発運動後に、海馬の神経新生を検討したところ、WT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) の増加が見られたが、5-HT3受容体 KOマウスでは、運動後に増加は見られなかった (図5)。一方、WTマウスとKOマウスで3週間の運動量に差は見られなかった。以上の結果は、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ことを示している。

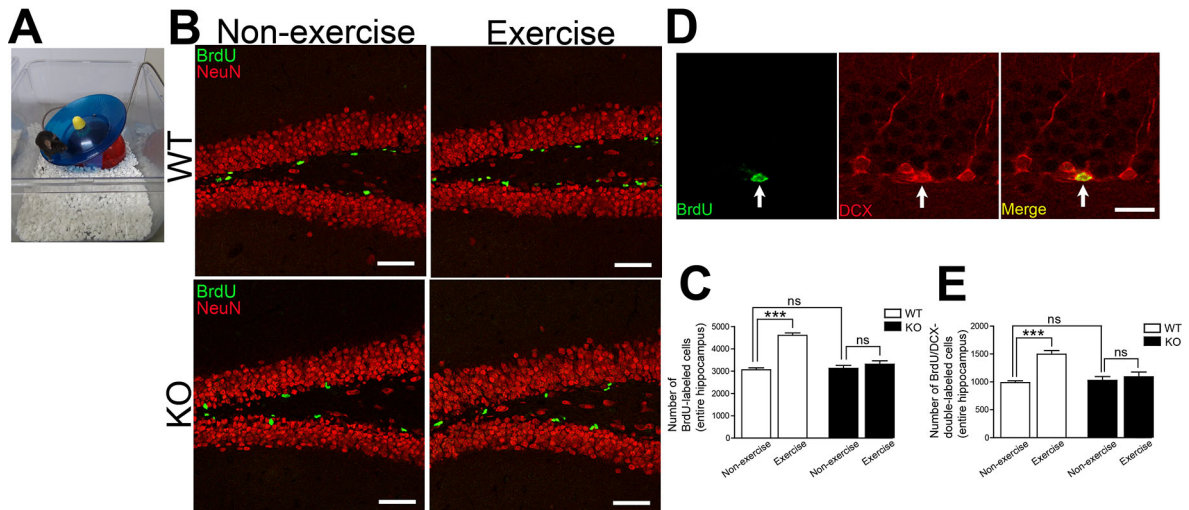


図 4. 5-HT3 受容体は運動による海馬歯状回の分裂細胞の増加に必要である。

A) マウスの運動環境. B) BrdU と NeuN の免疫組織二重染色による海馬歯状回の組織像. Scale bars: 50 μ m. C) 分裂細胞 (BrdU 陽性細胞) の定量的解析. 1 週間の自発運動によって WT 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の増加が見られたが、5-HT3 受容体 KO マウスでは増加が見られなかった. *** $p < 0.001$ (t-test). D) BrdU と DCX の免疫組織二重染色による海馬歯状回の組織像. Scale bars: 20 μ m. E) 神経前駆細胞 (BrdU/DCX 陽性細胞) の定量的解析. 1 週間の自発運動によって WT マウスでは神経前駆細胞の増加が見られたが、5-HT3 受容体 KO マウスでは増加が見られなかった. *** $p < 0.001$ (t-test).

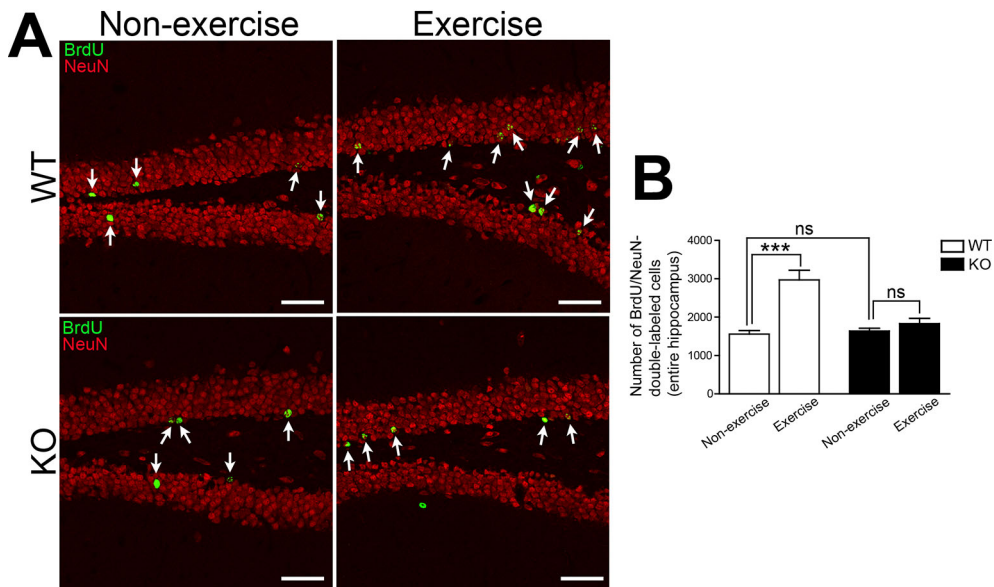


図 5. 5-HT3 受容体は運動による海馬歯状回の神経新生に必要である。

A) BrdU と NeuN の免疫組織二重染色による海馬歯状回の組織像. Scale bars: 50 μ m. B) BrdU 陽性の成熟顆粒細胞 (BrdU/NeuN 陽性細胞) の定量的解析. 3 週間の自発運動後に、WT 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の増加 (海馬神経新生の増加) が見られたが、5-HT3 受容体 KO マウスでは見られなかった. *** $p < 0.001$ (t-test).

運動には、抗うつ効果や記憶学習能力の向上効果があることが知られている。そこで、5-HT3 受容体がこれらの行動変化にどの様に関わっているのか調べるために、5-HT3 受容体 KO マウスを用いて行動解析を行った³⁵⁾。マウスのうつ様行動は、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試験による恐怖記憶の解析により検討した。強制水泳テストは、水を入れた円筒型の容器にマウスを6分間入れ、最後の4分間の無動時間を測定する。また、尾懸垂テストでは、マウスを尻尾から逆さに吊りし、6分間の無動時間を測定した。WT マウスでは、3週間の自発運動後に、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。しかし、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、運動後に無動時間の減少は見られなかった (図 6 A, B)。一方で、3週間の自発運動の後に、文脈条件付け恐怖記憶テストにおいて、WT マウスと 5-HT3 受容体 KO マウスともに記憶学習能力の向上が見られた (図 6 C)。以上の結果は、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ことを示している。

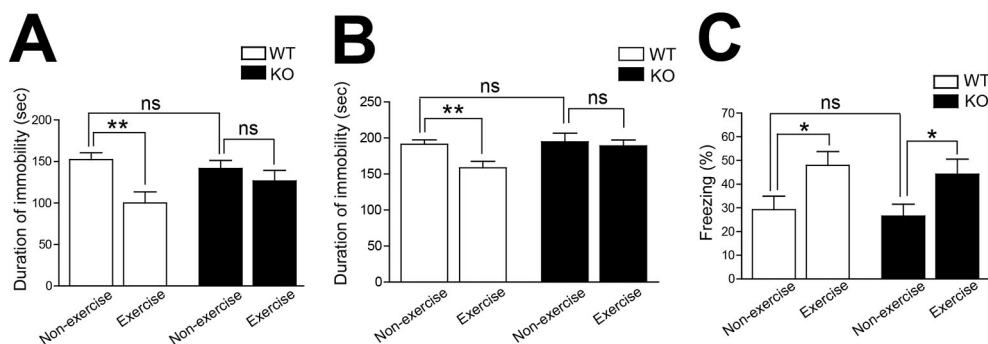


図 6. 5-HT3 受容体は運動による抗うつ効果には必要であるが、記憶学習能力の向上効果には必要でない。

A) 強制水泳テストにおける無動時間. B) 尾懸垂テストにおける無動時間. C) 文脈条件付け恐怖記憶テストにおけるフリージング反応時間 (%). 3週間の自発運動によって、WT マウスでは強制水泳テスト (A) や尾懸垂テスト (B) で、無動時間の減少が見られ、抗うつ効果を認めたが、5-HT3 受容体 KO マウスでは見られなかった。一方で、文脈条件付け恐怖記憶テストでは、WT マウスと 5-HT3 受容体 KO マウスともに記憶学習能力の向上が見られた。 ** $p < 0.01$ (t-test).

考 察

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ことが明らかとなり、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る。また、5-HT3 受容体 KO マウスが、PTSD の発症や分子病態を理解する上で有用なモデル動物となることが考えられ、PTSD の治療に向けた研究の発展が課題である。

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ことが明らかとなり、運動がもたらす脳の形態的变化や動物の行動変化に必須の役割を担う 5-HT 受容体のサブタイプが初めて明らかとなった。今後は、5-HT3 受容体がどのような機序で運動による海馬神経新生の増加に関与し、また抗うつ効果を引き起こすのか解析することが課題であり、今後の研究により新しい抗うつ薬の開発への展開が期待される。

文 献

- 1) Kondo, M., Nakamura, Y., Ishida, Y., Yamada, T. & Shimada, S. : The 5-HT3A receptor is essential for fear extinction. *Learn. Mem.*, **21** : 1-4, 2014.
- 2) Kondo, M. & Shimada, S. : 5-Hydroxytryptamine type-3A receptor in the process of fear extinction. *Receptor Clin. Invest.*, **1** : 33-37, 2014.
- 3) Kondo, M., Nakamura, Y., Ishida, Y. & Shimada, S. : The 5-HT3 receptor is essential for exercise-induced hippocampal neurogenesis and antidepressant effects. *Mol. Psychiatry*, **20** : 1428-1437, 2015.

- 4) Kondo, M. & Shimada, S. : Exercise-induced neuronal effects and the 5-HT3 receptor. *Neurotransmitter*, **2** : e764, 2015.
- 5) Kondo, M. & Shimada, S. : Serotonin and exercise-induced brain plasticity. *Neurotransmitter*, **2** : e793, 2015.