33　海馬によるトラウマ記憶制御基盤の解明	喜田　聡

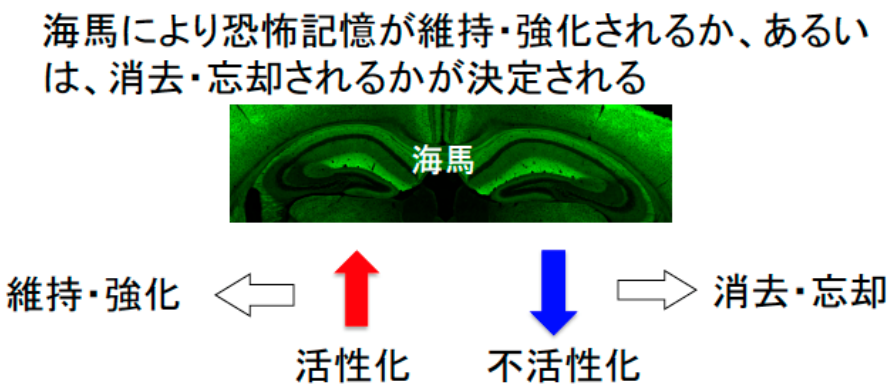
【目的】心的外傷後ストレス障害（Post Traumatic Stress Disorder; PTSD）は生死に関わるトラウマ体験、すなわち、トラウマ記憶を原因とする精神疾患である。現在、PTSD の治療方法開発を目指して、トラウマ記憶のモデルである「恐怖記憶」の制御機構に注目が集まっている。我々は恐怖記憶再固定化の制御機構を解析し、再固定化と消去は行動・細胞・分子レベルで極めて対照的な性状を示すこと、さらに、再固定化と消去は独立したプロセスではなく、相互作用することを明らかにしてきた。この中で、恐怖記憶が再固定化（維持あるいは強化）される場合には海馬が活動し、一方で、消去（恐怖軽減）が誘導される場合には海馬の活動が抑制されることを見出した。以上の結果を通して、エピソード記憶制御の中枢である海馬がトラウマ記憶制御の中心であり、海馬の活動を通して、トラウマ記憶の維持や消去がダイナミックにコントロールされているとの仮説に至った。そこで、本課題では PTSD 治療方法開発を目指す基礎研究として、マウスにおける恐怖条件づけ文脈記憶並びに受動的回避反応記憶をトラウマ記憶モデルとして海馬によるトラウマ記憶制御機構の解明を試みた。

【方法】前脳特異的にチャネルロドプシン2またはアーチロドプシンTを発現するトランスジェニックマウスを用いて、恐怖記憶想起中に海馬を光遺伝学的手法を用いて人為的に活性化あるいは不活性化させた影響を解析した。さらに、恐怖記憶固定化に対する海馬カルパインの役割を薬理学的に解析した。

【結果】光遺伝学的手法を用いて短時間の恐怖記憶想起中に海馬を不活性化させると、その後に恐怖記憶が減弱すること、一方、長時間の恐怖記憶想起中に海馬を活性化させると、消去の阻害が観察されることが示された。以上の結果から、恐怖記憶の想起時に、海馬の活性変動を介して、恐怖記憶が維持（再固定化）される、あるいは、消去されるかが決定されるメカニズムの存在が強く示唆された。

また、海馬カルパインの阻害により短期記憶は正常であったものの、長期記憶形成に障害が観察されたことから、海馬カルパインが恐怖記憶再固定化に必須であることが示唆された。一方、海馬カルパインの阻害により、想起後の記憶が破壊され、海馬カルパインが恐怖記憶固定化にも必須であることが示唆された。以上の結果から海馬におけるカルパインによる恐怖記憶制御機構が初めて明らかにされた。

海馬の活性制御を介して恐怖記憶が正負に制御される



33. 海馬によるトラウマ記憶制御基盤の解明

喜田　聡

東京農業大学 応用生物科学部 バイオサイエンス学科

Key words：恐怖記憶，海馬，PTSD，記憶想起，記憶消去

緒　言

心的外傷後ストレス障害（Post Traumatic Stress Disorder; PTSD）は生死に関わるトラウマ体験、すなわち、トラウマ記憶を原因とする精神疾患である。交通事故の身近な災害をも原因とするため、我が国の生涯有病率は約 10%である。PTSD の最も有効な治療方法は認知行動療法「持続エクポージャー（暴露）療法」であるものの、この暴露療法では患者は医師との面接において繰り返しトラウマ体験を陳述する中で恐怖感を和らげるため、医師と患者の負担が大きいことが問題となっている。

現在、世界的にも、トラウマ記憶のモデルである「恐怖記憶」制御機構の解明に注目が集まっている。これまでに、ヒト脳画像解析からヒトと高等動物の恐怖記憶制御基盤の共通性が強く示唆され［1］、また、げっ歯類の研究成果が即座にヒトで検証されるなど［2］、ヒトと動物の間で、共通の恐怖記憶制御基盤が存在すると認識されている。この背景から、PTSD の発症原因はトラウマ記憶制御の破綻であると理解されている。一方、古くから、げっ歯類の恐怖条件づけ課題を用いて、形成直後の不安定な恐怖記憶を保存する「固定化」の機構が解析されてきた。また、恐怖記憶を想起し続けると恐怖反応を負に制御する「消去」が誘導されることも知られており［3］、重要な点として、現在、この記憶消去は暴露療法の生物学的基盤であると世界的にも認識されている。興味深いことに、近年の解析から、恐怖記憶を想起すると「不安定化」され、「再固定化（維持・強化）」されることも示された［4］。以上の背景から、恐怖記憶制御基盤に基づいて、持続エクスポージャー療法を短縮することが試みられている。

我々は恐怖記憶再固定化の分子機構を解析し［5］、再固定化と消去は行動・細胞・分子レベルで極めて対照的な性状を示すこと、さらに、再固定化と消去は独立したプロセスではなく、相互作用することを明らかにしてきた［6〜9］。さらに、恐怖記憶回路の同定を進め、この回路は多領野にまたがること、しかも、想起後にダイナミックに変化することを示してきた。この中で、恐怖記憶が再固定化（維持あるいは強化）される場合には海馬が活動し、一方で、消去（恐怖軽減）が誘導される場合には海馬の活動が抑制されることを見出した。この解析結果から、エピソード記憶制御の中枢である海馬がトラウマ記憶制御の中心であり、海馬の活動を通して、トラウマ記憶の維持や消去がダイナミックにコントロールされているとの仮説に至った。そこで、本課題では PTSD 治療方法開発を目指す基礎研究として、マウスにおける恐怖条件付け文脈記憶並びに受動的回避反応記憶をトラウマ記憶モデルとして、光遺伝学的手法・リアルタイムイメージング・薬理学的手法を用いて、海馬によるトラウマ記憶制御機構の解明を行動・領野・細胞・分子レベルで試みる。

方　法

1. 海馬活性制御による恐怖記憶制御機構の解析

テトラサイクリン依存性転写因子（tTA）を前脳特異的に発現するトランスジェニックマウスと、tTA 依存性プロモーター制御下で ChR2-EYFP あるいは ArchT-GFP を発現するトランスジェニックマウスを交配させて、前脳特異的に ChR2 または ArchT を発現するダブルトランスジェニックマウス（tTA/ChR2 または tTA/ArchT）をそれぞれ作製した。これらマウスの頭蓋の結合点（Bregma）から背側 1.5 mm、右 1.0 mm の位置にドリルで穴を開け、LED カニューラを移植した。マウスをチャンバーに入れ、148 秒後に電気ショック（0.4 mA、2 秒間）を与え、30 秒後にチャ

ンバーから取り出した。この 24 時間後に再び同じチャンバーに戻し、すくみ反応を測定した（再エクスポージャー）。再エクスポージャーでは、tTA/ ChR2 マウスの場合、30 分間戻し、5 分後から、青色光を毎分 1 回計 25 回照射した。tTA/ArchT マウスの場合、10 分間戻し、3 分後から緑色光を照射した。これらの 24 時間後に再びチャンバーに 5 分間戻し、すくみ反応を測定した。

2. 想起後の海馬ニューロン活性変動のリアルタイムイメージング

海馬ニューロンにカルシウムイオン indicator である GCaMP を発現させて、脳搭載型蛍光顕微鏡を用いて、恐怖記憶想起時の海馬ニューロンの活性変動をリアルタイムで解析した。

3. 想起後の海馬における恐怖記憶制御の分子基盤の解析

転写調節因子 cAMP-responsive element-binding protein（CREB）による遺伝子発現活性化が記憶再固定化と消去に必須であることが明らかにされている。一方、MAP キナーゼである extracellular signal-regulated kinase（ERK）は CREB を活性化する上流キナーゼとして知られている。そこで、受動的回避反応課題を用いて、蛍光二重免疫染色法を用いて CREB 及び ERK の活性化マーカーとなるリン酸化を検出することで、海馬、扁桃体、前頭前野皮質の脳領域において再固定化及び消去を制御し、生化学的に差異を示すニューロン集団の同定を進めた。さらに、次世代シークエンサーを用いて、恐怖記憶想起時、消去誘導時の海馬におけるトランスクリプトームを解析した。

また、恐怖記憶制御に対する海馬におけるカルパインの役割を解析するため、カルパイン阻害剤 N-Acetyl-Leu-Leu-norleucinal（ALLN）を用いて、恐怖条件付け文脈記憶の制御プロセス群に対する ALLN の効果を海馬に対する局所注入法を用いて解析した。

結果および考察

1. 海馬活性制御による恐怖記憶制御機構の解析

前脳特異的にチャネルロドプシン 2（ChR2）またはアーチロドプシン T（ArchT）を発現するトランスジェニックマウスを用いて、恐怖条件付け 24 時間後に 10 または 30 分間電気ショックを受けたチャンバーにマウスを戻して恐怖記憶を想起させて（再エクスポージャー）、想起中に海馬を人為的に活性化あるいは不活性化させた影響を解析した。その結果、短時間（10 分間）の再エクスポージャー時に海馬を不活性化させると、その後に恐怖反応の減少が観察され、海馬不活性化が恐怖条件づけ文脈記憶を減弱させることが示された。一方、長時間（30 分間）の再エクスポージャー時に海馬を活性化させると、消去の阻害が観察され、想起時の海馬不活性化を介して消去が誘導されることが示唆された。以上の結果から、恐怖記憶の想起時に、海馬の活性変動を介して、恐怖記憶が維持（再固定化）される、あるいは、消去されるかが決定されるメカニズムの存在が強く示唆された。このように想起時の海馬不活性化により恐怖記憶が軽減されることは、恐怖記憶を原因とする心的外傷後ストレス障害の新たな治療方法開発に貢献することが期待される（図 1）。

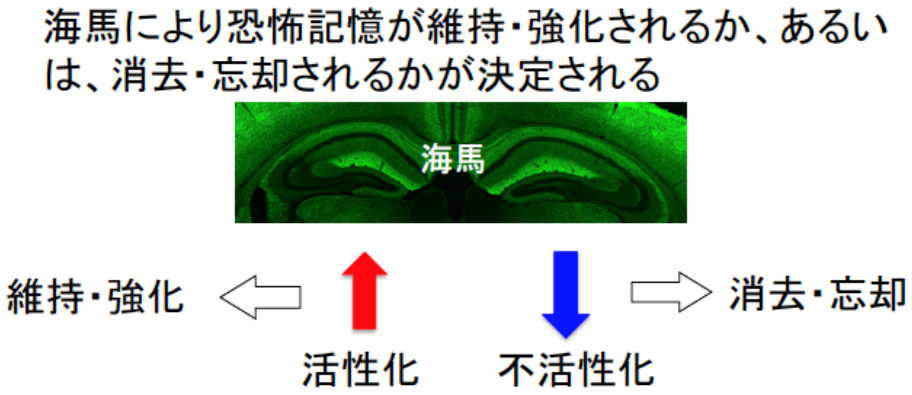


図 1. 海馬による恐怖記憶制御の概念図

海馬の活性変動によって想起後の恐怖記憶の運命が決定される。恐怖想起時に海馬の活動を通して恐怖記憶は維持または強化され、一方、海馬の活動の抑制を通して恐怖記憶は消去あるいは忘却される。

2. 想起後の海馬ニューロン活性変動のリアルタイムイメージング

受動的回避反応記憶課題を用いて、想起時のニューロンにおけるカルシウムイメージングを行った。アデノ随伴ウイルスを用いて海馬興奮性ニューロンにカルシウムイオン indicator である GCaMP を発現させた。受動的回避反応課題を用いて、恐怖記憶を形成させるため、マウスを明箱に入れて暗箱に移動した直後に電気ショックを与えた（トレーニング)。この 24 時間後に再び明箱にマウスを入れ、消去を誘導させるため、明箱から暗箱に入った後に 10 分間滞在させた (再エクスポージャー)。この 48 時間後に同様に明箱に入れ、暗箱に移動後、暗箱に 10 分間滞在させた (テスト)。再エクスポージャーとテストにおいてカルシウムイメージングを実施した結果、テストでは再エクスポージャーに比較して、細胞内カルシウムイオン濃度上昇の頻度が高くなり、さらに、明箱及び暗箱においてカルシウムイオン濃度上昇が特異的に増加するニューロン集団がそれぞれ同定され、恐怖ニューロンと消去ニューロンの存在が強く示唆された。

3. 想起後の海馬における恐怖記憶制御の分子基盤の解析

再固定化誘導時（想起 30 分後）には海馬、扁桃体、前頭前野において CREB のリン酸化のみが誘導されたニューロン集団（pCREB+/pERK-）が出現することが明らかとなった。一方、興味深いことに、消去フェーズ（消去誘導 30 分後）では、前頭前野皮質において、CREB あるいは ERK の一方のみのリン酸化が検出されるニューロン（pCREB+/pERK-あるいは pCREB-/pERK+）と、両者のリン酸化が共に検出されるニューロン（pCREB+/pERK+）の計 3 種類のニューロン集団が出現した。また、扁桃体では、pCREB+/pERK-ニューロンと pCREB+/pERK+ニューロンの計 2 種類のニューロン集団が出現し、海馬では、pCREB-/pERK+ニューロン集団のみの出現が観察された。

続いて、ERK リン酸化の経時的変化を解析した。その結果、再固定化フェーズでは ERK の活性化は記憶想起直後に海馬、扁桃体、前頭前野皮質において一過的に観察されることが明らかとなった。一方、消去フェーズでは、再固定化フェーズと同様に、恐怖記憶想起直後に海馬、扁桃体、前頭前野皮質において ERK は活性化され、この活性は一旦低下するものの、その後再び ERK の活性化が観察されることが明らかとなった。以上のように、この解析においても、再固定化と消去では、ERK の活性化に共通性と特異性が観察され、再固定化と消去時の脳内の分子制御機構には特徴的な差異が観察されることが明らかとなった。特に、消去時には ERK 活性化に二つのピークが観察され、このような ERK の活性化制御が再固定化と消去フェーズの区別、すなわち、記憶フェーズ移行の鍵となることが強く示唆された。さらに、ERK 阻害剤を用いた解析から、ERK 活性化が再固定化及び消去の進行にそれぞれ不可欠であることが行動レベルでも明らかにされた。以上のように、ERK の活性制御が再固定化と消去を区別する、すなわち、フェーズ移行の鍵を握ることが示された。

恐怖記憶固定化に対する海馬カルパインの役割を解析するため、トレーニング直後に溶媒あるいは ALLN を海馬に注入し、24 時間後のテストにおいて長期記憶を評価した結果、すくみ反応を示した時間の長さが ALLN の投与濃度依存的に減少した（図 2A)。一方、2 時間後のテストにおいて短期記憶を評価した結果、ALLN 群と対照群の間ですくみ反応.に差異は観察されなかった。以上のように、ALLN による海馬カルパインの阻害により短期記憶は正常であったものの、長期記憶形成に障害が観察されたことから、海馬カルパインが恐怖記憶固定化に必須であることが示唆された。一方、再固定化に対するカルパインの役割を明らかにするため、5 分間のエクスポージャー直後に溶媒あるいは ALLN を海馬に投与した。その結果、再エクスポージャーでは ALLN 群と対照群に差異は観察されなかったものの、テストでは ALLN 群は対照群に比較して有意に低いすくみ反応を示した（図 2B)。以上のように、海馬カルパインの阻害により、想起後の記憶が破壊されたことから、海馬カルパインが恐怖記憶再固定化にも必須であることが示唆された。最後に、消去に対する海馬カルパインの役割を解析するため、30 分間の再エクスポージャーの 10 分前あるいは直後に溶媒あるいは ALLN を海馬に投与し、その 24 時間後にテストを行った（図 2C)。再エクスポージャー前後の薬剤投与のタイミング、ALLN 投与の有無に関わらず、再エクスポージャー30 分間の過程において全群において同様にすくみ反応の有意な低下が観察され、消去の獲得が観察された。この 24 時間後のテストにおいても、全群で同程度のすくみ反応が観察され、消去記憶の維持が観察された。従って、海馬カルパインの阻害は恐怖記憶消去の獲得と維持に影響を与えないことが示され、海馬カルパインは消去に必要とされないことが示唆された。以上の結果から海馬におけるカルパインが恐怖記憶固定化と再固定化に必要とされ、一方、消去に必要とされないことが初めて明らかにされた［10]。

以上より、海馬における想起後の恐怖記憶制御の分子機構の一端が明らかにされた。

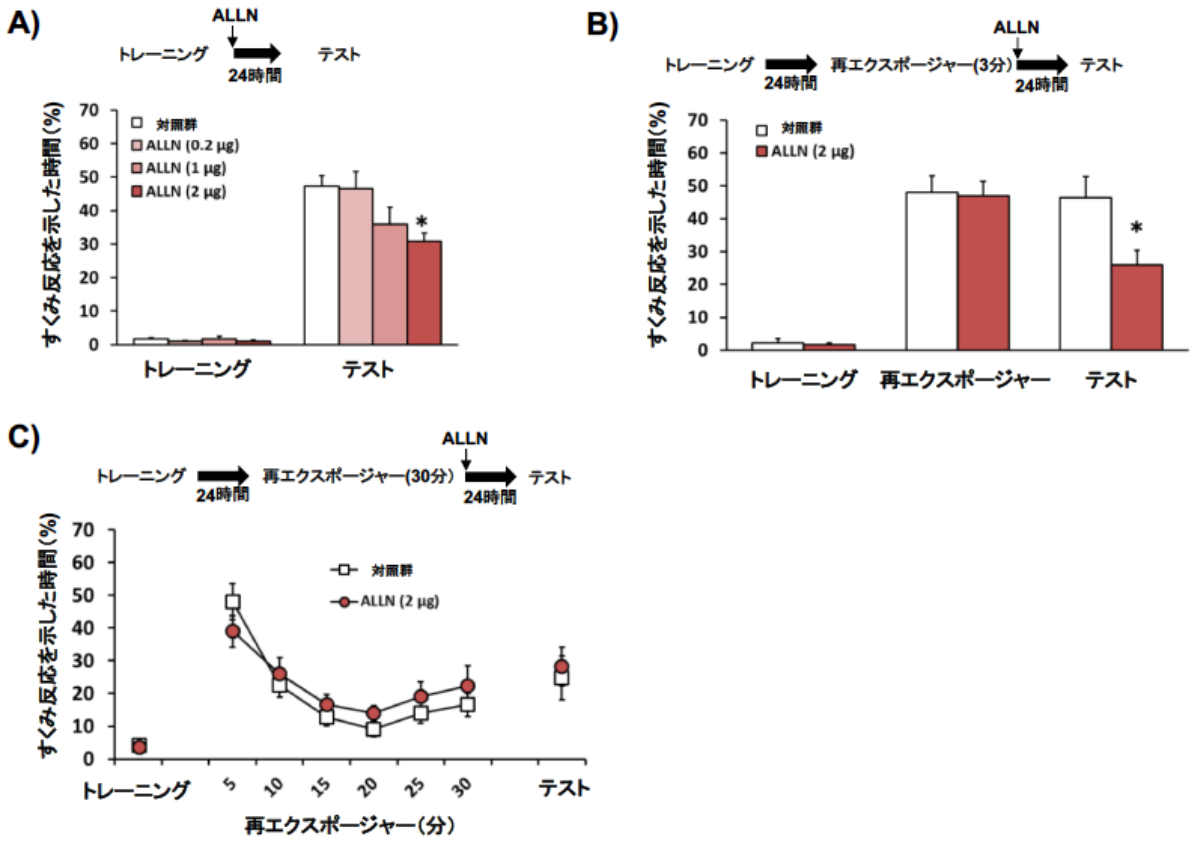


図 2. 海馬カルパインは恐怖記憶固定化と再固定化に必要である

恐怖条件づけ文脈課題を用いて恐怖記憶制御に対する海馬の役割を解析した。（A）恐怖条件づけ（トレーニング）直後にカルパイン阻害剤ALLNを海馬に注入した場合には、24時間後のテストにおけるすくみ反応が有意に低下したことから、恐怖記憶の固定化が阻害された。（B）トレーニングの24時間後に、トレーニング時に電気ショックを受けたチャンバーにマウスを3分間戻し（再エクスポージャー）、恐怖記憶を想起させて、その直後にALLNを海馬に注入した場合にも、この24時間後のテストにおけるすくみ反応が有意に低下した。従って、恐怖記憶の再固定化が阻害された。（C）（B）における再エクスポージャーの時間（チャンバーに戻す時間）を30分間に延長して消去を誘導させた場合には、海馬へのALLN注入の影響は観察されなかった。以上より、海馬カルパインは恐怖条件づけ文脈記憶の固定化と再固定化に必要とされ、一方、消去には必要とされないことが明らかとなった。$*p<0.05$ (ANOVA解析後のNewman-KeulsあるいはBonferroni解析、対照群との比較)

文　献

1) Phelps EA, LeDoux JE. Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. Neuron 2005 48:175-87. PMID:16242399

2) Schiller D, Monfils MH, Raio CM, Johnson DC, Ledoux JE, Phelps EA. Preventing the return of fear in humans using reconsolidation update mechanisms. Nature 2010 463; 49-53. PMID:20010606

3) Myers KM, Davis M. Behavioral and neural analysis of extinction. Neuron 2002 36:567-84. PMID:12441048

4) Nader K, Schafe G E, Le Doux J E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. Nature 2000 406: 722-726. PMID:10963596

5) Kida S, Josselyn SA, Peña de Ortiz S, Kogan JH, Chevere I, Masushige S, Silva. AJ CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. Nat Neurosci. 2002 5:348–55. PMID:11889468

6) Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, Masushige S, Silva AJ, Kida S　Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. J Neurosc. 2004 24:4787– 4795. PMID:15152039
7) Suzuki A, Mukawa T, Tsukagoshi A, Frankland PW, Kida S Activation of LVGCCs and CB1 receptors required for destabilization of reactivated contextual fear memories. Learn Mem 2008 15:426–433. PMID:18511694
8) Mamiya N, Fukushima H, Suzuki A, Matsuyama Z, Homma S, Frankland PW, Kida S. Brain region-specific gene expression activation required for reconsolidation and extinction of contextual fear memory. J Neurosci. 2009.29:402–413. PMID:19144840
9) Fukushima, H., Zhang, Y., Archbol, G., Ishikawa, R., Nader, K. Kida, S. Enhancement of fear memory by retrieval through reconsolidation. eLife, 2014 **3**:e02736. PMID:24963141
10) Nagayoshi T, Isoda K, Mamiya N, Kida, S. Hippocampal calpain is required for the consolidation and reconsolidation but not extinction of contextual fear memory. 2017 Mol Brain. 10:61. PMID:29258546