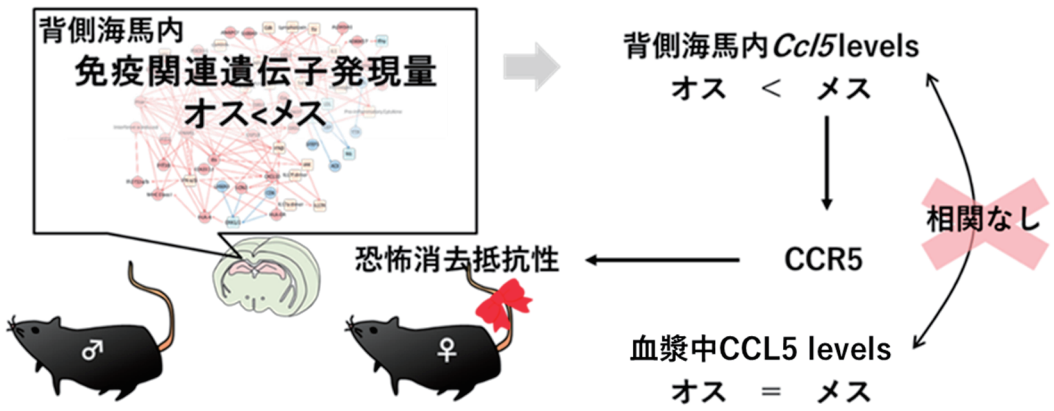
145　CCL5-CCR5を利用したPTSDの新規治療方策の開発	松田　真悟

【目的】恐怖記憶は生存に必須な記憶であるが、忘れられない強固な恐怖記憶は時として心的外傷後ストレス障害（PTSD）などの恐怖関連疾患に結びつく。現在の PTSD 治療薬は極めて限定的で、日本や米国で承認されている薬物はセロトニン選択的再取り込み阻害薬（SSRI）であるセルトラリンとパロキセチンのみである。SSRI は効果発現までに 2 週間以上要することや治療抵抗性の患者が約 30%存在するため、SSRI 以外の分子を標的とした新規治療薬の開発が切望されている。現在、恐怖関連疾患に対する新規治療薬の標的分子の探索は、恐怖関連疾患の治療理論モデルである恐怖消去課題を用いて精力的に行われている。我々は、これまでに恐怖関連疾患の有病率が男性に比べて女性で約 2 倍高いことに注目し、恐怖消去の性差とその分子機構の解明に向けて研究を行ってきた。その成果として、雌マウスは雄マウスに比べて恐怖消去課題抵抗性を示すことを見出した。さらに、『雌マウスは雄マウスに比べて背側海馬内 CCL5-CCR5 経路が活性化しており、それが原因で恐怖消去抵抗性を示す』という仮説を得た。そこで、本研究は我々の仮説を検証するとともに、CCL5-CCR5 を標的とした新規治療方策（新規治療薬と分子マーカー）の可能性を探ることを目的とした。

【方法】1. 恐怖消去の性差に対する背側海馬内 CCL5-CCR5 の関与の検討 : 雌雄の C57BL/6J マウスをフットショックが流れる箱に入れ、フットショック（0.75 mA、2 秒間）を 3 回与え、恐怖条件づけを行った。翌日、雌マウスに対しては CCR5 拮抗薬であるマラビロク (0.5 or 1 μg/site) を、雄マウスに対しては recombinant CCL5 (10 or 20 ng/site) を背側海馬へ投与した。投与の 30 分後に恐怖消去として、フットショックを受けた箱へマウスを 20 分間入れた。この薬物投与と恐怖消去の組み合わせを合計 5 日間実施した。その後、薬物投与部の確認用に 0.5%エオジンを背側海馬に投与し、抜脳した。摘出した脳を 40 μm の切片とし、エオジンによる染色範囲から、薬物投与部を同定した。恐怖条件づけ時及び恐怖消去時に示したすくみ反応（% freezing）を恐怖記憶の指標として解析した。2. 腹腔内 CCR5 拮抗薬投与による雌雄の恐怖消去促進効果の検討 : 薬物投与方法を腹腔内投与に変更したことを除いて、実験 1 と同様の方法で恐怖消去課題を行い、薬物効果を解析した。なお、マラビロクの投与濃度は 20 mg/kg とした。3. 恐怖消去後での雌雄の背側海馬内と血漿中 CCL5 量の相関解析 : 恐怖消去後の生体内 CCL5 濃度の解析として、実験 1 と同じ方法で 5 日間の恐怖消去を行い、最後の恐怖消去の 1 時間後に背側海馬と血漿を採取した。背側海馬内 *Ccl5* mRNA 量は real time RT-PCR 法を、血漿中 CCL5 量は ELISA 法を用いて解析した。

【結果】マラビロク（1 μg/site）を投与することで雌マウスの恐怖消去時の% freezing が低下し、恐怖消去が促進した。一方、今回の濃度の recombinant CCL5 を投与しても雄マウスの恐怖消去時の% freezing は影響を受けなかった。背側海馬内投与と異なり、マラビロク（20 mg/kg）の腹腔内投与では、雌マウスの恐怖消去時の% freezing が増加し、恐怖消去が抑制された。背側海馬内 *Ccl5* mRNA 量と血漿中 CCL5 量の間に相関はなかった。

研究成果に基づく恐怖消去の性差を担う分子機構の仮説



145. CCL5-CCR5 を利用した PTSD の新規治療方策の開発

松田　真悟

昭和薬科大学 薬物治療学研究室

Key words：恐怖消去，性差，CCL5-CCR5，PTSD

緒　言

恐怖記憶は生存に必須な記憶であるが、忘れられない強固な恐怖記憶は時として心的外傷後ストレス障害（PTSD）などの恐怖関連疾患に結びつく。2014 年の時点で PTSD の生涯有病率は西欧諸国では 3～6%、日本では 1.3%である。近年の異常気象に伴う災害の増加や紛争に伴い、今後、有病率が増加することが懸念されている。現在の PTSD 治療薬は極めて限定的で、日本や米国で承認されている薬物はセロトニン選択的再取り込み阻害薬（SSRI）であるセルトラリンとパロキセチンのみである。SSRI は効果発現までに 2 週間以上要することや治療抵抗性の患者が約 30%存在するため、SSRI 以外の分子を標的とした新規治療薬の開発が切望されている。

現在、治療標的分子の探索は、恐怖関連疾患の治療理論モデルである恐怖消去課題を用いて精力的に行われている。我々は、これまでに恐怖関連疾患の有病率が男性に比べて女性で約 2 倍高いことに注目し、恐怖消去の性差とその分子機構の解明に向けて研究を行ってきた。その成果として、雌マウスは雄マウスに比べて恐怖消去抵抗性を示すことを見出した。そして、DNA マイクロアレイ法を用いて恐怖消去課題後の背側海馬において、発現量に性差のある遺伝子を網羅的に調べた。次に、その遺伝子情報を基にバイオインフォマティクス解析を行い、雌は免疫関連遺伝子の発現量が高いことを明らかにした。そこで、免疫抑制剤のデキサメタゾン（DEX）と免疫誘発物質のリポポリサッカライド（LPS）をそれぞれ雌雄マウスの腹腔内に投与した。その結果、DEX は雌の恐怖消去の安定性を高め、LPS は雄の恐怖消去を阻害した。加えて、DEX を雌の背側海馬内へ投与することでも恐怖消去が促進し、LPS を雄の背側海馬内へ投与することで恐怖消去が阻害された。続いて、恐怖消去の性差に中心的な役割を担う免疫関連遺伝子を絞り込むために、雌で発現量が高かった遺伝子の中から、DEX と LPS に関連のある遺伝子に絞り込み、恐怖消去課題後の発現量差を real time RT-PCR 法で再確認した。その結果、*Ccl5*、*Ifit3*、*Usp18* は雌で発現量が高いだけでなく、各遺伝子発現量は恐怖反応と正の相関があることも分かった。

上述した 3 分子の中でも、特に CCL5 は臨床からも研究が進められている。例えば、CCL5 やその受容体である CCR5 の血中濃度は PTSD 患者で高く、さらに女性患者の方が男性患者よりも高い［1］。加えて、メタ解析から CCL5 の誘導因子であるインターフェロンγの血中濃度も PTSD 患者で高いことが報告されている［2］。これらの結果から、我々は『雌マウスは雄マウスに比べて背側海馬内 CCL5-CCR5 経路が活性化しており、それが原因で恐怖消去抵抗性を示す』という仮説を立てた。本研究は、我々の仮説を検証するとともに、CCL5-CCR5 を標的とした新規治療方策（新規治療薬と分子マーカー）の可能性を探ることを目的として実施した。

方　法

1. 恐怖消去の性差に対する背側海馬内 CCL5-CCR5 の関与の検討

まず、雌雄の C57BL/6J マウスをフットショックが流れる箱に入れ（合計 546 秒間）、フットショック（0.75 mA、2 秒間）を 3 回与え（箱に入れてから 180 秒後、242 秒後、364 秒後）、恐怖条づけを行った。翌日、雌マウスに対しては CCR5 拮抗薬であるマラビロク（MVC、0.5 or 1 μg/site）を、雄マウスに対しては recombinant CCL5（CCL5、10 or 20 ng/site）を背側海馬へ投与した。投与の 30 分後に恐怖消去として、フットショックを受けた箱へマウスを

20 分間入れた。この薬物投与と恐怖消去の組み合わせを合計 5 日間実施した。その後、薬物投与部の確認用に 0.5%エオジンを背側海馬に投与し、抜脳した。摘出した脳を 40 μm の切片とし、エオジンによる染色範囲から、薬物投与部を同定した。恐怖条件づけ時及び恐怖消去時に示した%すくみ反応（% freezing）を恐怖記憶の指標とした。また、恐怖条件づけ時は、フットショックを与える前の最初の 2 分間を PRE とし、フットショック後の最後の 2 分間を POST とした。さらに、恐怖消去 1 日目の最初の 6 分間を恐怖記憶テストに用いた。各恐怖消去では 2 分毎の% freezing を 1 bin として解析した。なお、CCL5 と MVC の溶媒はそれぞれ PBS と 5% DMSO を含んだ PBS を使用した。

2. 腹腔内 CCR5 拮抗薬投与による雌の恐怖消去促進効果の検討

薬物投与方法を腹腔内投与に変更したことを除いて、実験 1 と同様の方法で恐怖消去課題を行い、薬物効果を解析した。なお、MVC の投与濃度は 20 mg/kg とし、溶媒は PBS を使用した。

3. 恐怖消去後での雌雄の生体内 CCL5 量の解析

恐怖消去後の生体内 CCL5 濃度の解析として、実験 1 と同じ方法で 5 日間の恐怖消去を行い、最後の恐怖消去の 1 時間後に背側海馬と血漿を採取した。背側海馬内 *Ccl5* mRNA 量は real time RT-PCR 法を、血漿中 CCL5 量は ELISA 法を用いて解析した。

結果および考察

1. 恐怖消去の性差に対する背側海馬内 CCL5-CCR5 の関与の検討

我々の仮説『雌マウスは雄マウスに比べて背側海馬内 CCL5-CCR5 経路が活性化しており、それが原因で恐怖消去抵抗性を示す』を検証するために、まず、雌マウスの背側海馬へ CCR5 拮抗薬である MVC を投与し、恐怖消去が促進するかを調べた。MVC（1.0 μg/site）群も溶媒群も共に POST 時の% freezing が PRE 時の% freezing より高くなり、恐怖記憶の獲得に成功した（図 1a）。さらに、両群で TEST 時の% freezing には差が無かったことから（図 1b）、MVC は恐怖記憶の想起に影響を及ぼさないことがわかった。一方、恐怖消去時の% freezing は MVC 投与によって減少した（図 1c）。これらの結果から、雌の背側海馬内への MVC 投与が恐怖消去を促進することがわかった。なお、MVC（0.5 μg/site）は恐怖消去に影響を及ぼさなかった（data not shown）。

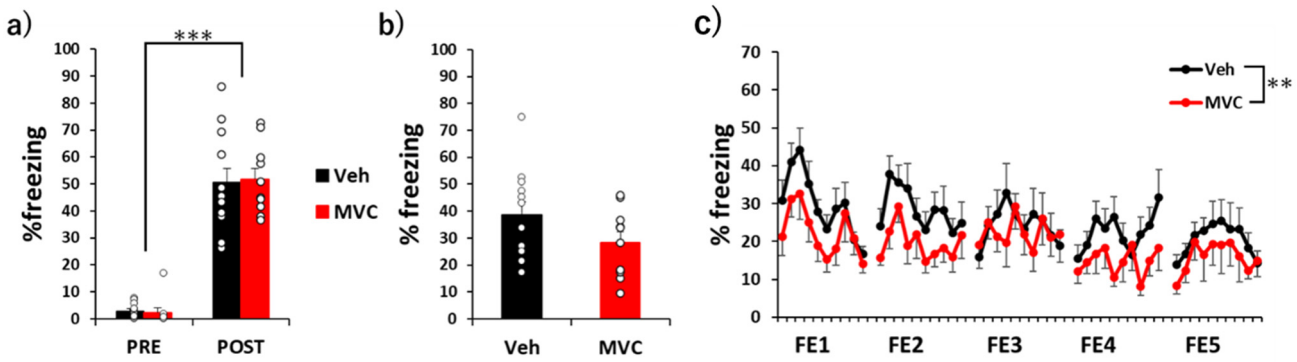


図 1. 雌の恐怖消去に対する背側海馬内マラビロク（1.0 μg/site）投与の効果

a) 恐怖条件づけ時の恐怖反応。Veh 群も MVC 群も PRE に比べて POST の% freezing が高くなった（$p<0.001$）が、両群間で差はなかった。

b) 恐怖記憶テスト時の恐怖反応。両群間で差はなかった。

c) 恐怖条件消去時の恐怖反応。Veh 群に比べて MVC 群で% freezing が低くなった（$p<0.01$）。

統計学的処理は、繰り返しのある 2-way ANOVA、post hoc としてボンフェローニを使用して行った（n=10～12/group）。

続いて、雌マウスの背側海馬内 CCL5 量を *in vivo* siRNA でノックダウンする計画だったが、試薬や装置の価格が高騰したために断念した。代わりに、雄マウスの背側海馬へ CCL5 を投与し、恐怖消去が阻害されるかを調べた。CCL5（10 or 20 ng/site）群も溶媒群も共に POST 時の% freezing が PRE 時の% freezing より高くなり、恐怖記憶の獲得に成功した。しかし、我々の予想に反し、CCL5 投与は TEST 時だけでなく FE 時の% freezing にも影響を及ぼさなかった（data not shown）。つまり、雌の結果は我々の仮説を支持したが、雄の結果は支持しなかった。今後、本研究よりも高い濃度の CCL5 を使用することや、雌マウスの海馬内 CCL5 量を低下させる方法を用いて、我々の仮説に対して更なる検証を行う必要がある。

2. 腹腔内 CCR5 拮抗薬投与による雌の恐怖消去促進効果の検討

背側海馬内 MVC 投与によって雌の恐怖消去は促進したが、臨床応用を考慮した際、海馬内投与は侵襲性を伴うという大きな課題がある。MVC は経口投与可能な抗 HIV 治療薬としてすでに本国で承認されている。これまでマラビロクを用いた HIV 治療では重篤な副作用は報告されておらず、さらに、重大な副作用の発現頻度も 0.5%未満と非常に低いため、マラビロクは安全性の高い薬物と考えられている。そのため、マラビロクの腹腔内投与によって恐怖消去を促進する結果が得られれば、他の新規薬物候補に比べ、素早く臨床へ適用することが可能である。ラットの結果から、静脈内投与した MVC 脳内へ移行することが報告されている［3］。そこで、雌マウスに MVC を腹腔内投与し、恐怖消去促進効果が得られるかを調べた。

MVC（20 mg/kg）群も溶媒群も共に POST 時の% freezing が PRE 時の% freezing より高くなり、恐怖記憶の獲得に成功した（図 2a）。さらに、両群で TEST 時の% freezing には差が無かったことから（図 2b）、腹腔内投与した MVC も恐怖記憶の想起に影響を及ぼさないことがわかった。一方、恐怖消去時の% freezing は MVC 投与によって増加した（図 2c）。つまり、背側海馬の結果と異なり、MVC の腹腔内投与では雌マウスの恐怖消去が阻害された。これらの結果は、雌マウスの恐怖消去抵抗性は、背側海馬内 CCR5 が中心的な役割を担っていることを示唆する。従って、CCR5 を標的とした治療薬は背側海馬への薬物送達、すなわち、ドラッグデリバリーシステム（DDS）が重要になる。近年、超音波刺激とマイクロバブルを利用することで、抹消投与した薬物を低侵襲的に脳内へ送達する方法が注目されている［4］。今後、CCR5 を標的とした新規治療法を模索するならば、この様な DDS との併用を考慮する必要がある。また、なぜ MVC の腹腔内投与は背側海馬内投与と異なり恐怖消去を阻害したのか、その分子機構を探ることも重要である。

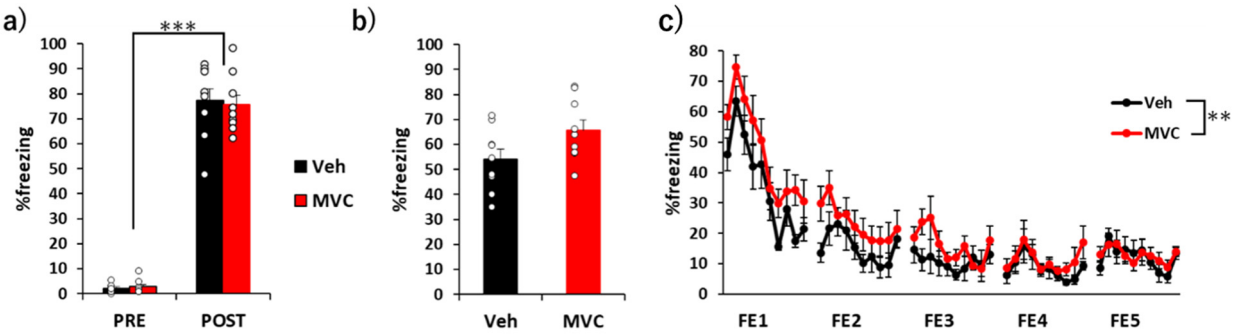


図 2. 雌の恐怖消去に対する腹腔内マラビロク（20 mg/kg）投与の効果

a) 恐怖条件づけ時の恐怖反応。Veh 群も MVC 群も PRE に比べて POST の% freezing が高くなった（$p<0.001$）が、両群間で差はなかった。

b) 恐怖記憶テスト時の恐怖反応。両群間で差はなかった。

c) 恐怖条件消去時の恐怖反応。Veh 群に比べて MVC 群で% freezing が高くなった（$p<0.01$）。

統計学的処理は、繰り返しのある 2-way ANOVA、post hoc としてボンフェローニを使用して行った（n＝9/group）。

3. 恐怖消去後の雌雄の生体内 CCL5 量の解析

前述した通り、我々は、恐怖消去時の% freezing と背側海馬内 *Ccl5* mRNA 量に正の相関を見出している。さらに、雌の方が恐怖消去後の背側海馬内 *Ccl5* mRNA 量が高い傾向にあることも見出している。一方、Oglodek らは、PTSD の患者は健常者と比べて血漿中 CCL5 量と CCR5 量が高く、加えて、共に女性の PTSD 患者は男性患者に比べて高いことを報告している [1]。ただし、本研究によって、雌の恐怖消去抵抗性は全身の CCR5 活性よりも背側海馬内 CCR5 活性が重要なことがわかった。このことから、本来であれば臨床においても海馬内 CCL5 量や CCR5 活性を測定することが望ましいが、現時点では困難である。また、マウスであっても CCR5 活性を測定することは容易ではない。そこで、測定対象を CCL5 に絞り込み、血漿中 CCL5 と背側海馬内 *Ccl5* mRNA の相関を調べ、仮に、これらに正相関が認められれば、血漿中 CCL5 を PTSD の有用な分子マーカーへと発展させることが可能になると考えた。以上の理由から、雌雄マウスを対象とし、恐怖消去後における背側海馬内 *Ccl5* mRNA 量と血漿中 CCL5 量を測定した。

恐怖消去後の血漿中 CCL5 量に性差は認められなかった（図 3a）。恐怖消去後の背側海馬内 *Ccl5* mRNA 量は雌の方が高かったが、有意な差は認められなかった（図 3b）。有意差が認められなかった要因として、解析サンプル数が少なかったことが考えられる。また、背側海馬内 *Ccl5* mRNA 量と血漿中 CCL5 量との間に正相関が認められたが（図 3c）、これは雄の 1 匹のデータが高いために、見かけ上の正相関と推測される。事実、該当データを抜いた場合、相関は消失した（図 3d）。この結果と実験 2 の結果から、恐怖消去反応性に対する CCL5-CCR5 の役割は背側海馬と末梢で異なると考えられる。恐らく、雌の恐怖消去抵抗性には末梢の CCL5 ではなく背側海馬内 CCL5 が重要である。Oglodek らの研究はサンプル数が少ないこともあり、血漿中の CCL5-CCR5 を PTSD の分子マーカーとして用いるには更なる知見の集積が必要と考える。

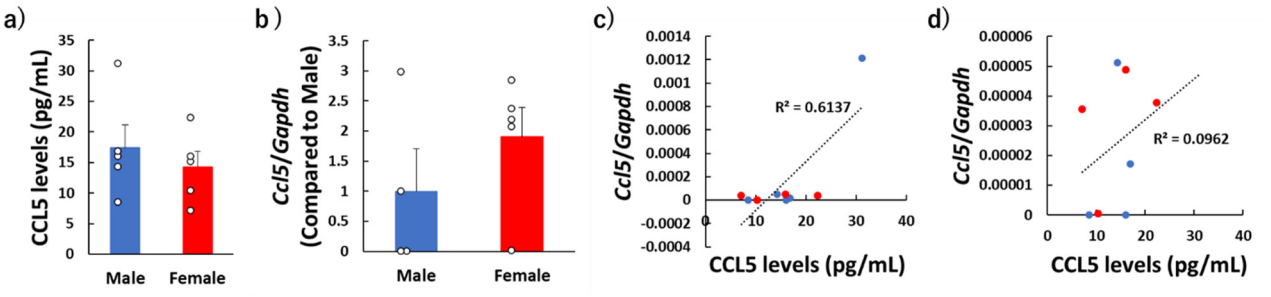


図 3. 恐怖消去後の雌雄の血漿中 CCL5 量と背側海馬内 *Ccl5* 量

a）恐怖消去後の血漿中 CCL5 量。両群間で差はなかった。

b）恐怖消去後の背側海馬内 *Ccl5* 量。両群間で差はなかった。

c）恐怖消去後の雌雄の血漿中 CCL5 量と背側海馬内 *Ccl5* 量の相関図。

d）値の高い雄データを抜いた際の恐怖消去後の雌雄の血漿中 CCL5 量と背側海馬内 *Ccl5* 量の相関図。

統計学的処理は、繰り返しのある 2-way ANOVA、post hoc としてボンフェローニを使用して行った（a：n＝5/group、b：n＝4～5/group）。

共同研究者・謝辞

本研究は、昭和薬科大学薬物治療学研究室の大学院生である水野郁美さん、学部生である高橋里帆さん、葛西令さん、矢島綾乃さんの協力を得て実施した。

文　献

1) Ogłodek EA, Szota AM, Moś DM, Araszkiewicz A, Szromek AR. Serum concentrations of chemokines (CCL-5 and CXCL-12), chemokine receptors (CCR-5 and CXCR-4), and IL-6 in patients with posttraumatic stress disorder and avoidant personality disorder. Pharmacol Rep. 2015 Dec;67(6):1251-8. doi: 10.1016/j.pharep.2015.05.023. Epub 2015 Jun 6. PMID: 26481549

2) Passos IC, Vasconcelos-Moreno MP, Costa LG, Kunz M, Brietzke E, Quevedo J, Salum G, Magalhães PV, Kapczinski F, Kauer-Sant'Anna M. Inflammatory markers in post-traumatic stress disorder: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression. Lancet Psychiatry. 2015 Nov;2(11):1002-12. doi: 10.1016/S2215-0366(15)00309-0. PMID: 26544749

3) Walker DK, Bowers SJ, Mitchell RJ, Potchoiba MJ, Schroeder CM, Small HF. Preclinical assessment of the distribution of maraviroc to potential human immunodeficiency virus (HIV) sanctuary sites in the central nervous system (CNS) and gut-associated lymphoid tissue (GALT). Xenobiotica. 2008 Oct;38(10):1330-9. doi: 10.1080/00498250802447409. PMID: 18853388

4) Chen KT, Wei KC, Liu HL. Focused Ultrasound Combined with Microbubbles in Central Nervous System Applications. Pharmaceutics. 2021 Jul 15;13(7):1084. doi: 10.3390/pharmaceutics13071084. PMID: 34371774