

## PTSD における不安増強機構の解明

(中間報告)

福井大学医学部医学科 形態機能医科学講座 人体解剖学・神経科学領域	橋 本 隆
福井大学医学部医学科 形態機能医科学講座 人体解剖学・神経科学領域	飯 野 哲
京都府立医科大学 大学院医学研究科 生体構造科学部門	松 田 賢 一
京都府立医科大学 精神科	吉 井 崇 喜
佛教大学 保健医療技術学部	河 田 光 博

### Expression analyses of stress-related factors in the brain of the single prolonged stress rats

Division of Anatomy and Neuroscience,  
Dept. Morphological and Physiological Science, Fukui University, HASHIMOTO, Takashi  
Division of Anatomy and Neuroscience,  
Dept. Morphological and Physiological Science, Fukui University, IINO, Satoshi  
Department of Anatomy and Neurobiology  
Kyoto Prefectural University of Medicine, MATSUDA, Ken-ichi  
Department of Psychiatry, Kyoto Prefectural University of Medicine, YOSHII, Takanobu  
School of Health Sciences, Bukkyo University, KAWATA, Mitsuhiro

### 要 約

心的外傷後ストレス障害(PTSD)は、日常では経験し得ないような心的外傷体験に後発する精神疾患で、フラッシュバック等の不安症状が長期に持続する。PTSD ではネガティブフィードバックが亢進する等、内分泌環境との関連が報告されており、ストレス負荷後に脳機能障害が引き起こる可能性が示唆される。本研究では動物モデルを使用し、ストレス応答の中である視床下部領域や不安情動に関連する扁桃体を含む複数の領域での発現変化を検索した結果、扁桃体中心核(CeA)における CRH の遺伝子発現量は有意に増加を認め、定量 PCR および免疫組織化学法においても同様の結果を得た。免疫陽性の細胞数は対象領域の全てにおいて SPS-コントロール群間で有意差を示さなかった。扁桃体において観察された不安惹起作用のある CRH の発現レベルの上昇が、PTSD における不安症状に深く関与する可能性が考えられた。

【キー・ワード】 外傷後ストレス障害, CRH, 視床下部, 扁桃体

## Abstract

Post-traumatic stress disorder (PTSD) is a stress-related anxiety syndrome that develops after exposure to traumatic experience. Single prolonged stress (SPS) is an established animal model proposed for PTSD and mimics the pathophysiological and behavioral characteristics of PTSD. In this study, by using this paradigm, we investigated the expressions of stress-related factor in the brain of adult male rats, and found aberrant expression of corticotropin releasing hormone (CRH) in the central nucleus of the amygdala in the central nucleus of the amygdala which is known to be involved in the expression of emotion such as anxiety and fear. These results suggest that SPS paradigm alters amygdala CRH system and may provide the physiological and behavioral understanding of PTSD.

**【Key words】 PTSD, CRH, Hypothalamus, Amygdala**

## 背景と目的

「不安」は生物が生存するために必要な警戒状態を促すための「正常な生理現象」である。しかし過剰な反応・異常な行動を伴い生活上の支障をきたす場合、そのような状態は障害と認知される。「精神障害の診断と統計の手引き第 4 版(DSM-IV)」による分類において、このような不安障害と呼ばれる精神疾患の一つとして PTSD があげられる。PTSD では外傷体験（トラウマ）の発生から一か月を超過して長期に持続する。特に日本では、研究代表者も神戸にて自ら被災した阪神淡路大震災を契機にその社会的認知が広まった。症状の深刻な永続性と大規模災害等によって発生する不特定多数の潜在患者数を鑑みれば、PTSD の病態解明と治療法の開発は、喫緊の最重要課題の一つである。また、文科省が平成 24 年に実施した「非常災害時の子供の心のケアに関する調査」に寄れば、被災地域における小学生以下児童の 14.1%に PTSD 症状の疑われると報告されており、幼少期の健全な精神発達という観点からも臨床研究だけでなく病態生理の根本を理解するための基礎的な研究が進められることが不可欠である。

先行の PTSD 研究では MRI を主体に海馬容積等、器質的变化に着目した画像研究が行われてきた。一方で副腎皮質からのグルココルチコイド基礎分泌量が減少しネガティブフィードバックが亢進している等、内分泌環境変化を起こしていることも明らかにされてきている(Yehuda 2002)。これらの事実は、ストレス応答や情動に関連する脳領域において、重度ストレス負荷後にホルモン分泌の変化が起こり、脳機能障害が引き起こされる可能性を示唆する。

最近の研究から BDNF や CREB 等神経細胞の成長や活動に必須の分子が記憶の消去や再固定化に深く関与するとする興味深い報告がなされ (Takei et al.,2011; Mamiya et al.,2009), 記憶・情動中枢である海馬・扁桃体と PTSD との関連について分子生物学的解析が進められている。しかしながら、分子レベルの変化が神経細胞・組織レベルでどのような形態・伝達異常を引き起こすのかについての詳細は依然不明である。また、ストレス応答の要とも言うべきホルモンについて、PTSD モデル

動物として知られる SPS (single-prolonged stress)ラット (Liberzon, 1997)を使用した実験から、ストレス関連因子として神経ペプチド Y やバソプレシンの組織レベルの発現異常に関する報告がなされているが、分子・行動レベルの検証には未だ至っておらず (Cui et al., 2008;Yoshii et al.,2008), モデル動物が示す不安行動の増加についても原因についてはほとんど明らかにされていない。

そこで本研究では、上記 SPS ラットを用いた動物実験より、ストレス応答の中枢である視床下部室傍核(PVH)や不安情動に関与のある領域から境界状床核(BNNST)や扁桃体中心核(CeA)等を関心領域とし、ストレス負荷に伴う遺伝子発現変動を DNA マイクロアレイによる網羅的に解析を行い、定量 PCR による mRNA レベルでの定量確認および免疫抗体法による組織上での分布・発現について検討を加えることとした。

## 方 法

### 1) モデル動物の作出

SPS ラットは、薬理・行動学的な検証 (SSRI 投与による症状緩和や、十字高架迷路試験における不安行動の増加等)に加えて、唯一 PTSD のネガティブフィードバック亢進病態を内分泌学的に模した学際的にも認められたモデル動物である(Liberzon, 1997)。8 週齢オスの SD ラットを用い、2 時間拘束ストレス・20 分強制水泳・15 分休息・ジエチルエーテル深麻酔の連続暴露 (SPS 負荷) 後、7 日の無接触期をおいてこれを作製し、以下各種アッセイを行った。コントロール (Cont) 群には SPS 負荷操作を省いたものを用いた。動物実験については「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」他法令を遵守し、福井大学動物実験管理規定に沿って実施した。

### 2) DNA マイクロアレイ

抜脳の後、氷冷下で 200~400 $\mu$ m の冠状断切片を作製し、対象領域の大きさに合わせたステンレスパイプを用いて顕微鏡下で試料採取を行い、Agilent SurePrint G3 Mouse GE microarray 8x60k をフォーマットとして 2 色蛍光標識マイクロアレイ法により解析を実施した。

### 3) 定量 PCR 法

上記と同様にして試料採取を行った後、RNeasy Micro kit(Qiagen)を使用してトータル RNA の抽出を行い、続いて ReverTra Ace qPCR kit(Qiagen)を用いて cDNA を合成した。TaqMan プローブを使用し LightCycler480 (Roche)上で mRNA の発現量を測定した。

### 4) 免疫組織化学

4%パラホルムアルデヒド溶液にて還流固定後に抜脳を行い、同液にて一晩後固定を行った。次いで 30%スクロース液に置換後一週間浸漬し、凍結切片を作製した。抗 CRH ウサギポリクローナル抗体 (PBL rC70) を用い通常の ABC 法に従って可視化を行った。正立顕微鏡(BX51, Olympus)を用いて観察・画像取得を行い、解析には ImageJ (NIH)を用いた。

## 5) 統計解析

Unpaired t-test を用い、 $p < 0.05$  を統計学的有意とした。

## 結果

### 1) ストレス関連因子の遺伝子プロファイリング

SPS およびコントロール群より採取した BNST および CeA の組織を用いて行った DNA マイクロアレイの解析結果を表 1 に示す。ストレス応答に関連する遺伝子群から、転写産物の検出が有効であり顕著な発現変動が観察された CRH 遺伝子と合わせ、関連する受容体についてデータを抜粋した。BNST における CRH 遺伝子の発現は変動が見られなかったが、特に CeA における変動は 2 倍以上を認めた。合わせて、同領域ではその 1 型受容体の発現も大きく増加を示し、ストレス負荷後に CRH を介した神経伝達様式が不可逆に変化を起こしたことが示唆された。一方で、ハウスキーピング遺伝子として GAPDH および  $\beta$  アクチンの発現量がストレス負荷後に変動のないことも確認している。また、CRH2 型受容体および CRH 結合タンパクそれぞれの遺伝子については、どちらの領域でも変動を示さなかった。

表 1 DNA マイクロアレイによる遺伝子発現比較解析

Region	gene title	gene symbol	Entrez gene ID	raw value		
				Cont	SPS	fold (SPS/Cont)
BNST	<b>Transmitter and receptor gene (CRH system):</b>					
	corticotropin releasing hormone	Crh	81648	59.9	62.2	1.04
	corticotropin releasing hormone receptor 1	Crhr1	58959	5.1	12.6	2.48
	corticotropin releasing hormone receptor 2	Crhr2	64680	54.6	37.7	0.69
	corticotropin releasing hormone binding protein	Crhbp	29625	104.8	774.4	1.02
	<b>House keeping gene:</b>					
	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapdh	24383	9213.9	9449.9	1.03
beta actin	Actb	81822	13015.6	14011.8	1.08	
CeA	<b>Transmitter and receptor gene (CRH system):</b>					
	corticotropin releasing hormone	Crh	81648	77.3	177.0	2.48
	corticotropin releasing hormone receptor 1	Crhr1	58959	13.8	32.1	2.33
	corticotropin releasing hormone receptor 2	Crhr2	64680	18.7	12.5	0.67
	corticotropin releasing hormone binding protein	Crhbp	29625	77.0	107.0	1.05
	<b>House keeping gene:</b>					
	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapdh	24383	11347.4	11830.6	1.04
beta actin	Actb	81822	13449.9	14485.0	1.08	

### 2) CRH mRNA の発現変動

マイクロアレイの結果を参照に、特に CRH に注目して定量 PCR 法による定量比較を検討し、同時に測定された GAPDH の発現量に対する相対比として表 2 に記した。BNST では CRH の mRNA 発現量は変動を認めなかったが、CeA においては、SPS 群はコントロール群と比較して有意な増大することが再現された。ストレス反応を担う視床下部-下垂体-副腎系(HPA 系)のうち、視床下部では特に PVH が応答中枢として CRH をはじめとするペプチドホルモンの合成・分泌制御を担っており、

本モデル動物においても血漿中の副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)濃度の低下を観察する報告があることから (Liberzon, 1997), 同領域における CRH の発現動態も調査したが, 変化を認めることはなかった。

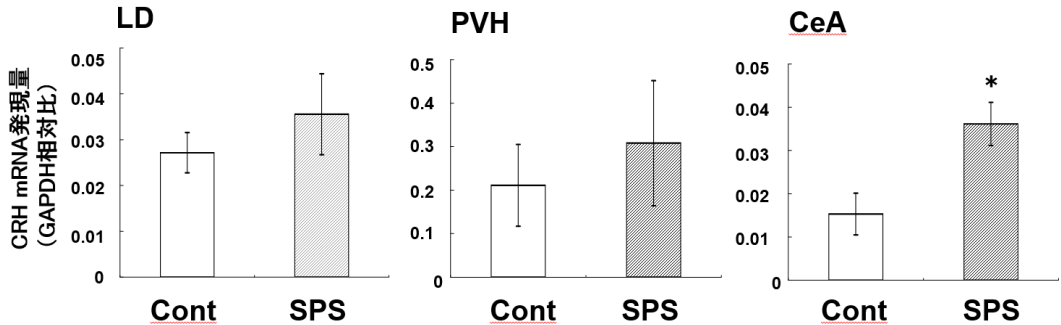


図1 定量PCR法によるストレス関連領域におけるCRH mRNAの発現比較

### 3) CRHの免疫組織化学

SPS 負荷群およびコントロール群から得た固定脳を用い, 免疫組織化学法により陽性反応について定性比較を行った。定量PCRの結果と同様に, BNSTおよびPVHにおけるCRHの分布・発現に顕著な変化は見られなかったが, 特に尾側方向にかけてSPS群ではCeAでのCRH陽性反応の増大が観察された(図2)。取得した画像から, Image Jを利用した半定量的解析の結果も同様であった。

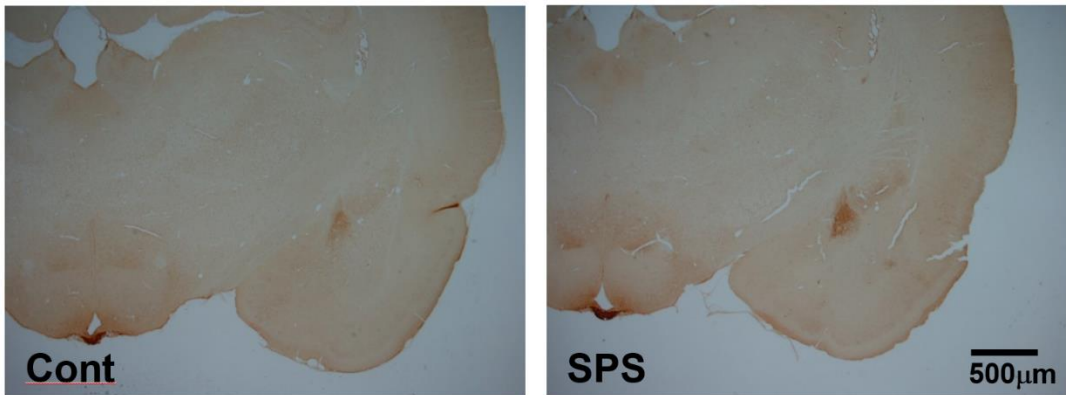


図2 扁桃体中心核におけるCRHの免疫組織化学

### 4) CRH陽性細胞数の定量

免疫組織化学の結果より, CeAで観察された免疫反応の増大について強拡大観察によりCRH免疫陽性細胞数についても計測を行った。この結果, 領域内における細胞数自体には変化がないことが分かった。

## 考 察

本研究において、複数の実験結果から CRH の発現異常が認められた領域である CeA は、不安との関連強い部位である。ラットにおける CeA への CRH 局所投与は不安様行動を惹起する (Lee & Davis, 1997)。また、CRH を過剰発現させたマウスでは不安様行動が増加するが、逆に一型受容体をノックアウトしたマウスでは不安様行動が低減する (Bale et al., 2004)。同領域内において、CRH の mRNA 発現量及び免疫反応の増大を見る一方で、CRH 陽性細胞の数そのものに変化がなかったことと合わせて、細胞体におけるペプチド CRH の発現量の増大が考え得る。また、同領域内に投射している CRH 陽性のバリコンシティを含む軸索構造においても、発現や形態を変化させている可能性も予想される。さらにマイクロアレイの結果を受けて、一型受容体の発現量が増加を示したことを鑑み、不安情動を司る当該領域において CRH を介した神経伝達が促進され行動異常の成因となることが示唆され、また実際 SPS 負荷を行ったラットでは高架式十字迷路を用いた行動試験から不安様行動が増加していることが報告されている (Peng et al., 2010; Wang et al., 2010)。

CeA をオリジンとし、CRH ニューロンは BNST に投射することがトレーサー法に基づいた実験から解剖学的に知られており (Gray, 1993)、両領域を含んで扁桃体延長領域とも称されるこの経路は不安を含む負の情動形成に重要だと考えられている。今回の結果から、SPS 負荷後に作出されたモデルラットでは、基礎値としての CRH の発現についてコントロール群との差は見られなかったものの、BNST へ投射を行う軸索について微細レベルの形態変化を起こし、急性ストレス反応に対して正常個体異なる反応を示す可能性を考慮し、今後免疫組織化学や薬理行動学的な検証を行い、扁桃体中心核の CRH 発現異常を軸にした PTSD 病態における不安増強のメカニズムとの関連を、より明らかにしていきたいと考えている。

## 引用文献

- Bale, T. L., Vale, W.W. (2004), CRF and CRF receptors: Role in stress responsivity and other behaviors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 44:525-57
- Cui, H., Sakamoto, H., Higashi, S., Kawata, M. (2008), Effects of single-prolonged stress on neurons and their afferent inputs in the amygdala. *Neurosci*, 152(3):703-12
- Gray, T.S. (1993). Amygdaloid CRF pathways. Role in autonomic, neuroendocrine, and behavioral responses to stress. *Ann N Y Acad Sci*, 697:53-60
- Lee, Y., Davis, M. (1997), Role of the hippocampus, the bed nucleus of the stria terminalis, and the amygdala in the excitatory effect of corticotropin-releasing hormone on the acoustic startle reflex. *J Neurosci*, 17(16):6434-46
- Liberzon, I., Krstic, M., Young, E.A. (1997), Stress-restress: effects on ACTH and fast feedback. *Psychoneuroendocrinology*, 22(6):443-53
- Mamiya, N., Fukushima, H., Suzuki, A., Matsuyama, Z., Homma, S., Paul, W.F., Kida S. (2009),

- Brain region-specific gene expression activation required for reconsolidation and extinction of contextual fear memory. *J Neurosci*, 29(2):402-13
- Peng, Y., Feng, S.F., Wang, Q., Hou, W.G., xiong, L., Luo, Z.J., Tan, Q.R. (2010), Hyperbaric oxygen preconditioning ameliorates anxiety-like behavior and cognitive impariments via upregulation of thioredoxin reductases in stressd rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 34: 1018-25
- Takei, S., Morinobu, S., Yamamoto, S., Fuchikami, M., Matsumoto, T., Yamawaki, S. (2011), Enhanced hippocampal BDNF/TrkB signaling in responses to fear conditioning in an animal model of posttraumatic stress disorder. *J Psychiatr Res*, 45:460-8
- Wang, H.T., Han, F., Gao, J.L., Shi, Y.X. (2010). Increased phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in the medial prefrontal cortex of the single-prolonged stress rats. *Cell Mol Neurobiol*, 30:437-44
- Yoshii, T., Sakamoto, H., Kawasaki, M., Ozawa, H., Ueta, Y., Onaka, T., Fukui, K., Kawata, M. (2008), The single-prolonged stress paradigm alters both the morphology and stress response of magnocellular vasopressin neurons. *Neurosci*, 156(3):466-74

