

## PTSD における不安増強機構の解明

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。ところがこのモデル動物では急性ストレス負荷後の扁桃体 CRH 発現は対照群と比較して変化が無く、一方で分界状床核において強い免疫陽性反応を示すようになった。不安惹起作用のある扁桃体 CRH の発現レベルの上昇が、同じく情動行動に関与深い分界状床核を介して PTSD における不安症状を引き起こすことが示唆された。

【キー・ワード】外傷後ストレス障害, CRH, 視床下部, 扁桃体, 分界状床核

## 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 (CeA) which is known to be involved in the expression of emotion such as anxiety and fear. After acute stress, SPS rats did not show any difference in CRH immunoreactivity (ir) in CeA, but exhibited higher CRH-ir in bed nucleus of stria terminalis (BNST) compared to the control group. These results suggest that SPS paradigm alters CeA and BNST-CRH system and may provide the physiological and behavioral understanding of PTSD.

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

## 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」によれば、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。

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分界状床核(BNST)や扁桃体中心核(CeA)等に関心領域とし、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・発現について検討し、特に扁桃体CRHとSPSラットの示す不安増強との間に相関が示唆されることを中間報告にて発表した。本論ではさらに、SPSラットの急性ストレス後における脳内CRHの発現変動を観察した結果と併せ、病態成立後のストレス応答変化とその機序についても論じる。

## 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。急性ストレス負荷実験には上記Liberzonによって用いられた手技を参考に、SPS負荷7日目に20分の強制水泳を課し、その2時間後に以下4)に従って組織学的評価を行った。Cont群には、SPS負荷を加えない他条件は同様にして飼育し、強制水泳を行った。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		fold (SPS/Cont)
				Cont	SPS	
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 beta actin	Gapdh Actb	24383 81822	9213.9 13015.6	9449.9 14011.8	1.03 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 beta actin	Gapdh Actb	24383 81822	11347.4 13449.9	11830.6 14485.0	1.04 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。

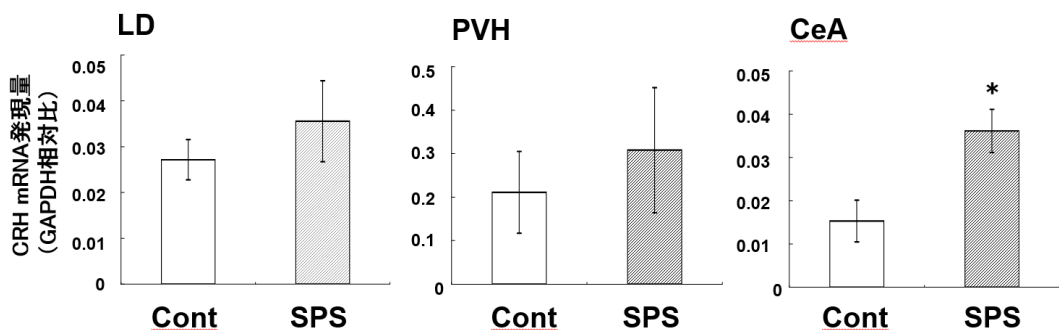


図 1 定量 PCR 法によるストレス関連領域における CRH mRNA の発現比較

## 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。

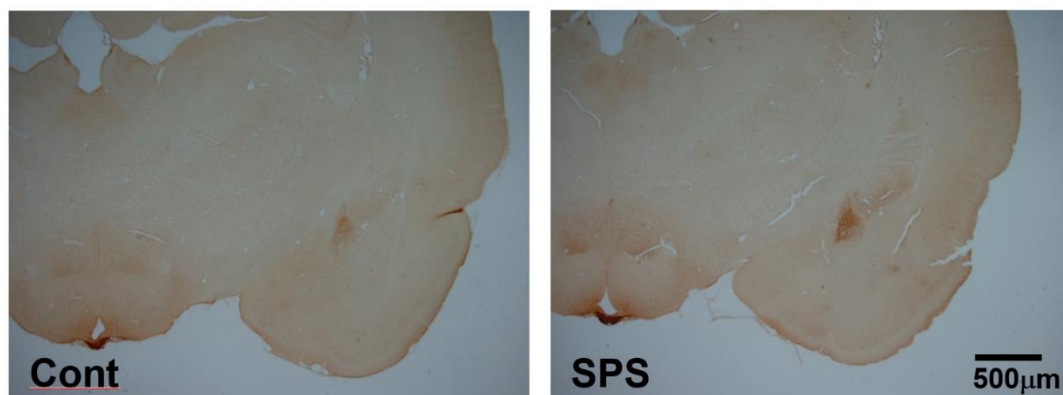


図 2 扁桃体中心核における CRH の免疫組織化学

#### 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。

#### 5) 急性ストレス再負荷後における CRH の免疫組織化学

SPS 負荷による病態成立後にストレス再負荷実験を実施し, 固定・抜脳後に CRH の免疫用正反応をコントロール群と比較した。扁桃体領域においては SPS 負荷群およびコントロール群間で差は観察されなかった。一方で分界状床核では, SPS 群に対してより高い免疫陽性反応がコントロール群において定性的に認められた。

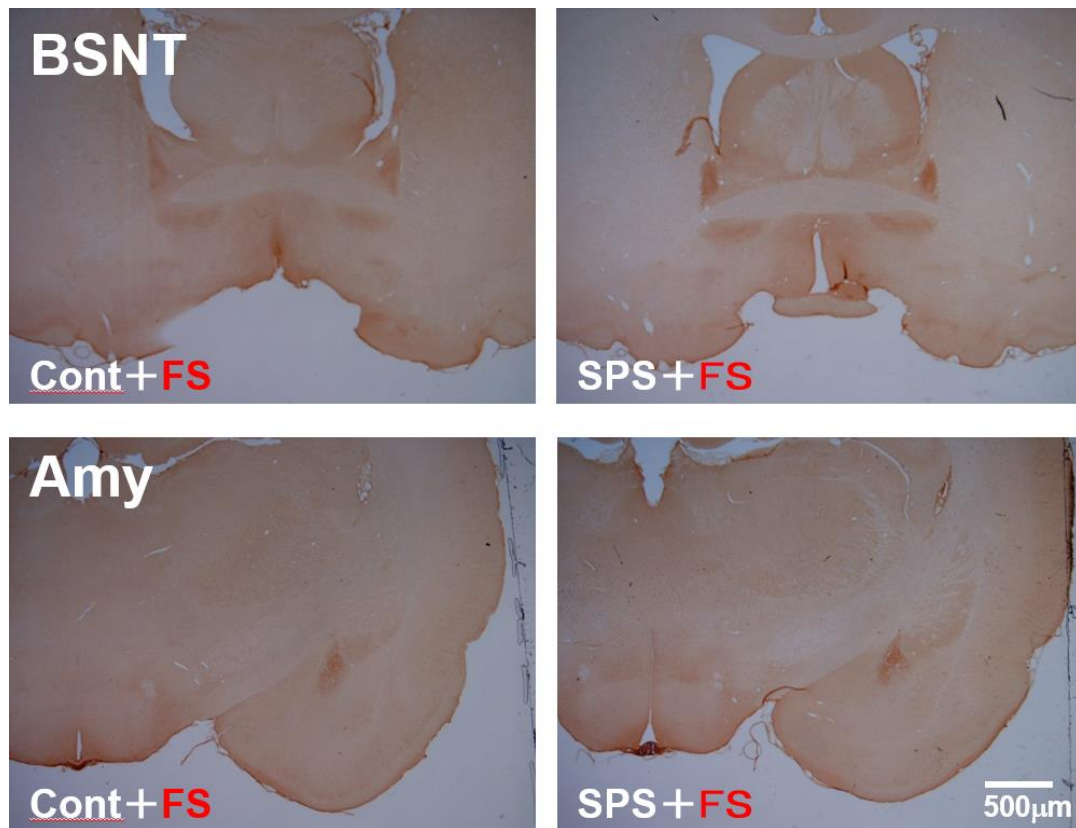


図3 SPS ラットにおける急性ストレス負荷後の CRH 発現変動

### 総合考察

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、不安との関連が強い脳領域である。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 発現量およ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、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。SPS 負荷後に作出されたモデルラットの BNST 領域では、基礎値としての CRH 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、強制水泳再負荷後に発現動態が変化していることが今回新たに判明した。この結果は、CRH を伝達物質として CeA と BNST の両領域を介した急性ストレス応答への差として観測された可能性がある。即ち SPS 負荷による PTSD 様の病態成立後、定常状態として CRH の発現を増強させた CeA のニューロンが、ストレス負荷時の刺激に応じて BNST において過剰な CRH の放散を促すことで伝達異常に陥っていることが考えられ、マイクロアレイの結果から SPS ラットの BNST における CRH 受容体が高発現の状態にあることもこれを一部支持する。あるいは CRH を貯留する小胞が軸索末端部に大量に蓄積したまま放出されずに留まり、正常な神経伝達を妨げることでひいてはストレスに対する異常行動として形質に現れることも予想される。

今後の課題として当該領域における実際のホルモン CRH 濃度を生化学的手法により定量測定する他、電顕法などにより CRH ニューロンの軸索末端の微細構造の形態変化を調査し薬理行動学の側面からも検討を加え、扁桃体中心核の CRH 発現異常を軸に分界状床核を介した PTSD 病態における不安増強のメカニズムについてより明らかにしていく必要がある。

## 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., Krstoc, 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 impairments via upregulation of thioredoxin reductases in stressed rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 34: 1018-



- 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

