

- neuronal signaling cascades.
Neurosci. Res., in press, 2005.
第 28 回日本神経科学学会、
2005.7.26-28, 横浜。
シンポジウム発表。
- 11) Takemoto-Kimura S., Ishihara N., Mano T., Okuno H., Bito H. : A GluR-interacting palmitoyl acyl transferase GODZ palmitoylates and regulates lipid microdomain insertion of a neuron-specific CaM kinase CaMKI γ / CLICK-III. Seikagaku, in press, 2005.
第 78 回日本生化学会、2005.10.19-22、神戸。
ポスター発表。
- 12) Hoshino M., Nakamura .S, Mori K., Kawauchi T., Terao, M., Nishimura YV., Fukuda A., Fuse T., Matsuo N., Sone M., Watanabe M., Bito H., Terashima T., Wright CVE., Kawaguchi Y., Nakao K., Nabeshima Y. : Ptf1a, a bHLH transcriptional gene, defines GABAergic neuronal fates in cerebellum.
Soc. Neurosci. Abstr. 31: 498.9, 2005.
第 35 回北米神経科学学会, Washington, Nov.12-16, 2005.
ポスター発表。
- 13) Takemoto-Kimura S., Ishihara N., Mano T., Okuno H. Bito H. : A GluR-interacting palmitoyl acyl transferase GODZ palmitoylates and regulates lipid microdomain insertion of a neuron-specific CaM kinase CaMKI γ /CLICK-III.
Soc. Neurosci. Abstr. 31: 498.9, 2005.
第 35 回北米神経科学学会,
Washington, Nov.12-16, 2005.
ポスター発表。
- 14) Shoji-Kasai Y., Ikegami S., Inokuchi K., : ACTIVIN, A TGF- β SUPERFAMILY PROTEIN, REGULATES THE MAINTENANCE OF HIPPOCAMPAL LTP BY MODULATING DENDRITIC SPINE MORPHOLOGY. Cold Spring Harbor Meeting on Learning and Memory, Cold Spring Harbor, NY, USA, April, 2005.
- 15) Inoue N., Aiba A., Matsui M., Inokuchi K., : Vesl-1S, an IEG product, plays an important role in various processes of the fear memory formation. The 35th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Washington DC, USA, November, 2005.
- 16) Yao I., Ageta H., Takagi H., Tomoaki K., Fukuda Y., Inokuchi K.; Setou M., ANALYSIS OF A NOVEL F- BOX PROTEIN THAT REGURATES NEURAL ACTIVITY. The 35th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Washington DC, USA, November, 2005.
- 17) Yamamoto K., Sugiura S., Inokuch K., Hayashi T., Kato N., : HOMER- 1A- INDUCED AUGMENTATION OF CA 2+ ENTRY THROUGH L- TYPE CA 2+ CHANNELS SERVES TO ENHANCE BK CHANNEL OPENING IN VISUAL CORTEX LAYER II/III PYRAMIDAL CELLS. The 35th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Washington DC, USA, November, 2005.
- 18) Kataoka M., Yamamori K., Ikegami .S, Kuwahara R., R.Suzuki- Migishima, Nakahara N., Nihonmatsu I., Inokuchi K., Kato Y- Fukuim, Yokoyama M., Azuma S., Takahashi M. : A SINGLE AMINO ACID MUTATION IN SNAP - 25 INDUCES ANXIETY - RELATED BEHAVIOR IN MOUSE. The 35th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Washington DC, USA, November, 2005.
- 19) Inoue Y., Udo H., Kato A., Inokuchi K., Sugiyama H. : ACTIVITY - DEPENDENT REORGANIZATION OF POSTSYNAPTIC HOMER1C CLUSTERS IN CULTURED HIPPOCAMPAL NEURONS. The 35th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Washington DC, USA, November, 2005.
- 20) Ageta H., Murayama A., Takashima N., Shoji-Kasai Y., Ikegami S., Inokuchi K. : An endocrine activin plays multifunctional roles in the brain. Symposium of the 28th Annual Meeting

- of the Japanese Neuroscience Society, Yokohama, July, 2005.
- 21) Okada, D., Ozawa, F., Inokuchi, K. : The NO-PKG pathway is required for synaptic tagging that determines the synapse specificity of late-phase long-term potentiation. Symposium of the 28th Annual Meeting of the Japanese Neuroscience Society, Yokohama, July, 2005.
 - 22) Shoji-Kasai, Y., Ageta, H., Sekiguchi, M., Ozawa, F., Inokuchi K. : Activin, a TGF- β superfamily protein, modulates the dendritic spine morphology and enhances the number of pre- and post-synaptic contact. The 28th Annual Meeting of the Japanese Neuroscience Society, Yokohama, July, 2005.
 - 23) Saitoh y., Ozawa F., Kobayashi S., Ando S., Inokuchi K. : Dynamic change in the synaptic actin cytoskeleton during dentate gyrus LTP in aged rats. The 28th Annual Meeting of the Japanese Neuroscience Society, Yokohama, July, 2005.
 - 24) Murayama, A., Ageta, H., Migishima, R., Inokuchi K. : Activin, a TGF- β superfamily protein, regulates postnatal neurogenesis and anxiety-related behavior. The 28th Annual Meeting of the Japanese Neuroscience Society, Yokohama, July, 2005.
 - 25) 二本松伊都子、井ノ口馨 : 電顕による *Arc* mRNA のニューロン内局在の解析、第 28 回日本神経科学大会、横浜、7 月、2005.
 - 26) 井上直子、饗場篤、右島理可、井ノ口馨 : 恐怖条件付けの長期記憶には *Ves1-1S* 蛋白質が必要である、第 28 回日本神経科学大会、横浜、7 月、2005.
 - 27) 小澤史子、岡田大助、井ノ口馨、N O · P K G 経路は後期長期増強のシナプス特異性決定因子シナプスタグの活性化に必要である、第 28 回日本神経科学大会、横浜、7 月、2005.
 - 28) Ageta H., Inokuchi K. : An endocrine activin regulates anxiety-related behavior and postnatal neurogenesis. Symposium at the 48th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, Fukuoka, September, 2005
 - 29) 新堀洋介、林文彦、平井啓子、井ノ口馨 : ポリアデニル化部位の選択による神経活動依存的な alternative RNA スプライシングの制御機構、第 28 回日本分子生物学会、福岡、12 月、2005
 - 30) Ageta H., Murayama A., Migishima R., Inokuchi K. : Activin regulates postnatal neurogenesis and anxiety-related behavior. The 28th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Fukuoka, December, 2005.
 - 31) 大川宜昭、杉崎俊一郎、藤谷和子、徳永絵里、瀬藤光利、井ノ口馨 : mARD1-mNAT1 アセチルトランスフェラーゼ複合体による tubulin アセチル化を介した樹状突起の発達制御、第 28 回日本分子生物学会、福岡、12 月、2005
 - 32) 鈴木(大久保)玲子、岡田大助、斎藤喜人、井ノ口馨 : アクチン結合シナプス蛋白 Synaptopodin のシナプス局在化機構、第 28 回日本分子生物学会、福岡、12 月、2005
 - 33) 青山志緒里・斎藤由里・福本理恵・近藤武夫・利島 保 : 母子の絆形成における嗅覚刺激と血行動態反応の関連について 日本発達心理学会第 16 回大会 229.
 - 34) 斎藤由里・青山志緒里・福本理恵・近藤武夫・利島 保 : 乳児のストレス脆弱性における気質と脳機能の関連について —0 歳児の月齢に伴う脳血流反応の観点から—日本発達心理学会第 16 回大会 373, 2005.
 - 35) 福原理恵・近藤武夫・藤原 信・木原裕貴・中村朱里・岩永甲午郎・利島 保 : 極低出生体重児における痛み刺激前後の脳血流の変化 (第 1 報) 日本周産期・新生児医学会第 41 回学術集会 277, 2005.
 - 36) 青山志緒里・斎藤由里・福本理恵・近藤武夫・小林正夫・利島 保 : 母子の絆形成における嗅覚刺激と血行動態

- 反応の関連について (2) - 新生児以後の乳児を対象として 日本心理学会第 69 回大会 1184, 2005.
- 37) 利島 保: 乳幼児の脳機能発達研究と NIRS 適用の効用と問題点 日本心理学会第 69 回大会シンポジウム企画提案 S15, 2005.
- 38) 近藤武夫: 乳幼児の脳機能イメージング法としての NIRS の利用の実践
- 39) 日本心理学会第 69 回シンポジウム話題提供 S15.
- 40) 斉藤由里・青山志緒里・福本理恵・利島 保: 乳児の表情認知に関する前頭部領域における血行動態反応 顔学会第 10 回大会 167, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1) 特許

井ノ口馨、井上直子、新規非ヒト動物、
特願 2005-181209

Ⅱ. 分担研究報告

分担研究報告書

ストレス脆弱性形成の分子機構の解明に関する研究

分担研究者：森信 繁 広島大学大学院医歯薬学総合研究科（精神神経医科学） 助教授

研究要旨 ストレス性精神障害の発症メカニズムには、幼少期の不遇な環境による海馬遺伝子発現の変動によって形成される、ストレス脆弱性が深く関与していると予想される。本分担研究者はこの仮説に従って初・2年度に引き続き本年度も、以下のような母子分離ストレスによって形成されるストレス脆弱モデルラットを用いて、幼少期の不遇な環境と脆弱性形成の分子メカニズムの解明を行った。その結果、以下のようなことが示された。1) 母子分離による成長後ラットにみられる拘束ストレス脆弱性は、拘束ストレス負荷に伴う海馬Insulin-like growth factor (IGF)-1受容体mRNA, タンパク発現 (CA1 - CA3領域錐体細胞層及び歯状回顆粒細胞層) の低下や、IGFBP2 mRNA発現の低下が密接に関与している。2) 母子分離ラットが成熟後にsingle prolonged stressに曝露されると、嫌悪刺激に伴う不安恐怖感の亢進や痛覚に対する閾値の亢進が引き起こされる。これらの結果は、母子分離によるIGF情報系を介した海馬の神経細胞の分化の抑制によってストレス脆弱性の形成される可能性を示唆しており、その結果苛酷なストレスに曝露された際には過剰な不安恐怖状態などを呈すると思われる。

A. 研究目的

幼少時期のストレス体験、特に不遇な養育環境は成人期においてストレス関連精神障害の発症リスクを高めることが示唆されている。同様に母子分離負荷を受けて成長したラットは、成熟期にストレスの影響を受けやすくストレス脆弱性の形成されていることが行動学的・神経内分泌学的に明らかにされ、ヒト成人期ストレス脆弱性のモデルとみなされている。これまでに本研究者は母子分離によって、1) 成熟期ラットが拘束ストレスに曝露されると自発運動の顕著な減少を伴ったストレス脆弱性を示し、c-Jun N-terminal kinase-2, 94 kDa glucose-regulated protein, insulin-like growth factor (IGF)-1 受容体、IGF binding protein2 の発現が海馬で減少する、2) 不安行動や自発運動とは無関係に、成熟期の海馬を介した記憶・学習機能が低下し、良好な飼育環境(EE)の供与によって機能低下が緩和される、3) 母子分離によって形成された記憶・学習機能の低下の機序には、海馬での Integrin β 3 (CD61)発現の低下の関与している、ことを明らかにしてきた。初・昨年度に引き続き本年度も、以下の研究を継続して行った。A-1) 母子分離による成長

後の拘束ストレス脆弱性形成の分子機序の解明、A-2) 母子分離のおよぼす成長後の PTSD 症状形成への影響の検討。

B. 方法

実験には、全て雄性 Sprague-Dawley ラットを用い、12 時間毎に明暗期を保ち飼育した。

B-1. 母子分離による成長後の拘束ストレス脆弱性形成の分子機序の解明

ストレスパラダイム：妊娠ラットを購入し、出産後の雄性仔ラットを用いた。誕生後 2-9 日目までの 8 日間、毎日午前中 1 時間母子分離を行ったものを母子分離群とした。誕生後通常的环境下で飼育したものを正常飼育群とした。それぞれのラットが成長した後(生後 6 週と生後 90 日)、拘束ストレス 2 時間を施行し、直後に断頭、海馬を摘出した。

Western blot 法:生後 90 日で摘出したラットの海馬を用いた。海馬を homogenization buffer 中でホモジェナイズし、10000G で 10 分間遠心後、上清を回収した。60 μ g のタンパクを 12.5%SDS ゲルを用いて電気泳動し、タンパクをニトロセルロースメンブレンに転写した。IGFBP2 の 1 次抗体および 2 次抗

体でインキュベーション後に、Enhanced ChemiLuminescence 法によりバンドを検出し、デンストメーターを用いてシグナルの定量を行った。正常飼育+母子分離群、母子分離+急性拘束ストレス群で比較検討を行った。

免疫組織染色法：ラット海馬内 IGF1R タンパク発現の部位の変動を検討する目的で、免疫組織染色を行った。海馬スライス(15 μ m)を作成し、IGF1R の 1 次抗体および 2 次抗体でインキュベーション後、陽性細胞を検出し、デジタルビデオイメージ解析装置にて画像を得た。正常飼育+急性拘束ストレス群、母子分離+急性拘束ストレス群で比較検討を行った。

B-2. 母子分離のおよぼす成長後の PTSD 症状形成への影響の検討

動物処置：妊娠ラットを購入し、出産後の雄性仔ラットを用いた。生後 2 日から 9 日目までの 8 日間、毎日午前中 1 時間母子分離を行ったものを母子分離群、誕生後通常的环境下で養育したものを Sham 群とし、両群ともに生後 22 日目で離乳を行った。8 週齢で SPS ストレス負荷を行い、1 週間の undisturbed period を経て 9 週目で、以下の行動実験を行った。a) Open field locomotor test (角型のオープンフィールドにラットを入れ、5 分間の自発運動量を計測した)・ b) 高架式十字迷路 (5 分間、オープンアームへの進入回数、滞在時間などを計測した)・ c) 恐怖条件づけ試験・ d) Flinch jump test {ラットをスキナーケージに入れ、3 分間の馴化期間を置いた後、電気刺激 (0.05~1.0mA:0.05mA ずつ電流を増加) を加え、ラットの刺激に対する反応の閾値 (尻込み、泣き声、ジャンプ) を計測した}・ e) Hot plate test (ラットを 52.5 $^{\circ}$ C に保った hot plate の中に置き、後ろ肢をなめるまでの潜時を計測した)。EE 処置群は離乳後 4 週間 (3 週目から 6 週の終わりまで)、ケージに輪回しやトンネルを配備した環境で飼育し、同様に行動解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は広島大学動物実験倫理委員会に動物実験計画書を提出し、同委員会の許可を受けて実験を行った。

C. 研究成果

C-1. 母子分離による成長後の拘束ストレス

脆弱性形成の分子機序の解明

初年度に行った cDNA アレイによるスクリーニングから、海馬での正常飼育+急性拘束ストレス群における発現が母子分離+急性拘束ストレス群における発現の 2 倍以上である遺伝子に多くの IGF シグナル関連遺伝子 (IGF1、IGF2、IGF1R、IGF2R、IGFBP2) が挙げられた。これらの遺伝子発現の差の検証を real-time quantitative PCR 法を用いて行い、その結果有意な発現の差をみた遺伝子については Western blot 法や免疫組織染色法にてタンパク発現の差を検討してきた。

本年度はこれまで解析を行っていなかった、IGF1、IGF2 mRNA の発現を上記 2 群で解析したが、特に有意な差はみられなかった。昨年度までの研究により IGF1R mRNA、タンパクレベルは母子分離+急性拘束ストレス群において、正常飼育+急性拘束ストレス群と比較して有意に低下していた。今年度はラット海馬内 IGF1R タンパク発現の部位の変動を検討する目的で、免疫組織染色を行った。CA1 および CA3 錐体細胞層、歯状回顆粒細胞層において母子分離+急性拘束ストレス群では正常飼育+急性拘束ストレス群と比較して IGF1R の発現が低下していた。

C-2. 母子分離のおよぼす成長後の PTSD 症状形成への影響の検討

Open field locomotor test では各群で自発運動量に差を認めなかった。高架式十字迷路試験では SPS を行った sham 群で有意に %open arm time, %open arm entries が減少し、母子分離 (NI) 群でも減少傾向を認め、不安、回避行動が増加していた。さらに、NI + SPS 群でより不安、回避傾向が強いことが示された。恐怖条件づけ試験では Sham+SPS 群が sham 群に比べ有意に freezing time が増加しており、母子分離 (NI) 群と SPS を行った stress 群で freezing time に交互作用を認め、母子分離と SPS の相乗作用が示された。嫌悪刺激場面への再暴露に対して NI+SPS 群で文脈的恐怖条件づけが増強し、不安、恐怖がより著しく惹起されることが示された。Flinch jump test や Hot plate test などの痛覚鈍麻 (analgesia) 試験では、SPS を行った stress 群でより痛みを感じる閾値が有意に上昇していた。また、Flinch jump test の jump

の指標では母子分離と SPS の相乗作用が示され、NI + SPS 群で analgesia 傾向がより顕著であることが示された。離乳後豊かな環境に暴露すると高架式十字迷路試験で EE 群では %open arm entries が増加したが、NI + EE + SPS 群では増加しなかった。恐怖条件づけ試験では、EE 群で有意に freezing time が減少し、母子分離や SPS ストレスの影響が改善された。しかし NI + EE + SPS 群は NI+SPS 群に比べ、freezing time は減少したものの、有意な改善ではなく、依然長い傾向であった。Flinch jump test での jump の指標では、EE に暴露した Sham + EE + SPS 群、NI+EE+SPS 群ともに sham + SPS 群、NI + SPS 群に比べ痛みを感じる閾値の有意な低下は認めなかった。

D. 考察

D-1. 母子分離による成長後の拘束ストレス脆弱性形成の分子機序の解明

昨年度までの研究で、ラット海馬において生後早期の母子分離負荷により成熟期のストレス負荷に伴う IGF1R mRNA およびタンパク、IGFBP2 mRNA 発現が障害されることが明らかとなった。本年度の実験結果からは、母子分離負荷により成熟期拘束ストレス負荷後の海馬での IGF1R タンパク発現は CA1 および CA3 錐体細胞層、歯状回顆粒細胞層において影響を受けることが明らかとなった。また、タンパクレベルで母子分離負荷の有無による成熟期拘束ストレス後の IGFBP2 発現の変化を認めなかったが、この理由として、拘束ストレスに対する IGFBP2 タンパクの誘導は緩徐であることが考えられた。

IGF シグナルは中枢神経系を含む、さまざまな組織の発達に関与している。特に、IGF1 は海馬の neurogenesis や synaptogenesis に関与しており、IGF1R は IGF1 の最も重要メディエーターである。母子分離ラットにおける IGF1R の低下は、IGF1 シグナル伝達の減弱を通して海馬機能の障害に関与している可能性がある。また、IGFBP2 は中枢神経系の障害時に誘導され、神経保護作用を有していると考えられる。母子分離負荷ラットでは急性拘束ストレス負荷後に IGFBP2 誘導がなく、ストレスからの保護が減弱している可能性がある。抗う

つ薬投与により海馬での IGF1 レベルが上昇するという報告や、IGF1 投与は抗うつ薬様の効果を示すという報告があり、本研究成果は、IGF 情報系の障害から由来する海馬機能の低下から個体のストレス脆弱性が導かれる可能性を示している。母子分離やその後の成熟期ストレスが、IGF の細胞内シグナル伝達の活性に影響をあたえているかどうかを検証するさらなる研究が必要とされる。

D-2. 母子分離のおよぼす成長後の PTSD 症状形成への影響の検討

昨年度までの結果に加え、本年度我々は SPS 負荷ラット (Sham + SPS 群) での高架式十字迷路における不安行動の亢進、恐怖条件づけ試験における海馬依存性記憶である文脈的恐怖条件づけの亢進、flinch jump test, hot plate test における痛覚鈍麻という PTSD 患者での不安、回避、再体験、麻痺の亢進に類似した所見を得ることができた。これらの所見より、PTSD モデルラットとしての SPS 負荷ラットの妥当性や蓋然性を示すことができた。

幼少期の不遇な体験の与える PTSD 症状への影響を検討する目的で、新生時期に母子分離を体験し成獣後 SPS ストレスに暴露されたラット (NI + SPS 群) の行動を観察した結果、各試験で不安行動、恐怖条件づけ、麻痺が相乗的に亢進した。すなわち、母子分離がその後の PTSD 発症におけるストレス脆弱性および感受性を増強することが示された。母子分離に引き続き離乳後に豊かな環境 (EE) に暴露したところ、SPS ストレスのみを受けたラット (Sham + EE + SPS 群) は高架式十字迷路や恐怖条件づけ試験において、有意なパラメーターの改善を認めた。しかし、母子分離と SPS ストレスを受けたラット (NI + EE + SPS 群) では、恐怖条件づけ試験での freezing time のみの改善を認めた。Pitman et al. (1990) は PTSD 患者における μ -オピオイドを介した stress-induced analgesia の報告を行っており、今回の研究結果である EE が母子分離による PTSD にみられる stress-induced analgesia の亢進を修復しないことは、この機序に関連した痛覚鈍麻の改善には EE の効果が乏しいことを示している。これらの結果は、幼少時期に不遇な体験をし、PTSD を発症する患者には、早期の

適切な介入により、扁桃体依存性よりむしろ海馬依存性の機能不全に効果があることを示していると考えられる。

E. 結論

母子分離により形成される成長後の拘束ストレス脆弱モデルラットの海馬では、成熟期においてストレス負荷時に IGF1R mRNA、タンパク、IGFBP2 mRNA レベルが正常飼育ラットに比べ低下しており、IGF 情報系の機能低下が予想された。IGF 情報系の機能低下は、海馬機能の障害に伴うストレス脆弱性の発現機序に関与している可能性がある。

Sham + SPS 群は Sham 群に比べ、有意に不安、回避、恐怖、嫌悪刺激場面への条件づけ、麻痺の亢進を認め、SPS による PTSD モデル動物としての妥当性を示すことができた。SPS ストレスのみを受けたラット (Sham + SPS 群) に比べ、母子分離と SPS ストレスを受けたラット (NI + SPS 群) は、行動学的により重篤な症状が出現することが示された。母子分離と SPS を受けたラット (NI + EE + SPS 群) は EE を行っても、高架式十字迷路試験や痛覚閾値試験でのパラメーターの改善は認めなかった。これは、幼児期に持続的に不遇な体験をし、その後 PTSD を発症するものは、病態や病理が重篤でより難治性であることを示唆しているのかもしれないと思われる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

- 1) Morinobu S, Tsuji S, Takahashi M, Russell DS, Takahashi J, Tanaka K, Fujimaki K, Yamawaki S, Endoh S, Endoh M. Stress Vulnerability induced by neonatal isolation and the disturbance between the phosphorylation and dephosphorylation of CREB. In: PTSD - Brain mechanisms and clinical implications-. Eds., Kato N, Kawata M, Pitman RK. Springer, Tokyo, 2005. pp. 37-46.

- 2) Yokoyama H, Morinobu S, Ueda Y. EPR imaging to estimate the in vivo intracerebral reducing ability in adolescent rats subjected to neonatal isolation. J Magn Reson Imaging (in press).
- 3) 森信 繁, PTSD 動物モデル - Single prolonged stress を中心に-. 精神科 (印刷中) .

G-2. 学会発表

- 1) 土岐茂, 森信繁, 今中章弘, 山脇成人: Early Adversity Enhanced the Single Prolonged Stress (SPS)-induced Contextual Freezing and Analgesia in the Rats, 第 27 回日本生物学的精神医学会, 2005/7 (大阪)
- 2) 土岐茂, 森信繁, 今中章弘, 山脇成人: Neonatal Isolation and Environmental Enrichment in an Animal model of PTSD: Effects on Conditioned and Unconditioned Fear after Stress 第 48 回, 神経化学大会 2005/9 (福岡)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

ストレス性精神障害の病態形成と治療に関する脳機能画像解析研究

分担研究者 岡本泰昌 広島大学大学院医歯薬学総合研究科(精神神経医科学) 講師

研究要旨 われわれはストレスへの脳内認知機構の解明として、身体イメージに関する不快な情報（ストレス）を処理する神経基盤が男女で異なる可能性を想定し、その神経基盤の性差について検討した。さらにストレスへの適応強化のための心理機制として、将来の報酬予測に着目し、セロトニンの影響について検討を行った。その結果、若年の健常成人において、身体イメージに関する不快な情報を処理する神経基盤が男女で明らかに異なる可能性が考えられた。脳内の「報酬への予測」機能が、線条体を中心とした分化した情報システムによってなされていること、この機能はうつ病との関連が示唆されるセロトニンによって調節を受けることなどが明らかになった。今回得られた所見は、ストレス事象に対する適応を理解し、ストレス適応を強化するための方策を検討していく上で、基礎となるものと考えられた。

A. 研究目的

多くの精神障害の発症、症状形成や持続にストレスが関与している。特にストレス関連障害においては脳内のストレス適応機構の破綻した状態と考えられ、適応の脳内機構に関する検討は、精神障害の発症機序・治癒過程の解明につながると思われる。このような観点から、われわれはストレスの適応破綻の脳内メカニズムを明らかにするために、機能的磁気共鳴画像法 (functional Magnetic Resonance Imaging:fMRI) と脳磁場計測法 (Magnetoencephalography:MEG) といった脳機能画像解析手法を用いて検討を行ってきた。昨年度はストレスへの適応強化のための心理機制として、予期と心像生成 (Imagery) に着目し、その脳機能局在について検討を行った。その結果、健常者では快刺激の予期と左前頭前野の活動、不快刺激の予期と右前頭前野の活動が関連していることが示唆されたが、これに対してうつ病患者では左前頭前野の活動低下、右前頭前野・帯状回前部腹側領域を含む活動亢進が示唆された。また、アレキシサイミアでは未来の楽しい心像を生成する際に後帯状回の活動低下しており、感情を伴うエピソード記憶の利用が乏しい可能性を指摘した。

引き続いて今年度は、身体イメージに関

する不快な情報（ストレス）を処理する神経基盤が男女で異なる可能性を想定し、その神経基盤の性差について検討した。さらにストレスへの適応強化のための心理機制として、将来の報酬予測に着目し、その脳機能局在について検討を行った。

B. 方法

検討-1. 健常者を対象とした自己身体イメージ認知の機能局在の性差に関するfMRIを用いた検討

方法は広島大学医学部倫理委員会の承認を受けたプロトコールに従い、被験者に研究の目的と内容を書面により説明し、文書による同意を得た上で行われた。対象は右利きの健常女性 11 例 (平均年齢±SD=24.5±3.4 歳)、右利きの健常男性 11 例 (平均年齢±SD=24.8±3.1 歳) である。身長や体重を測定し、また摂食障害調査表 (Eating Disorder Inventory-2: EDI-2) による食行動・身体イメージ障害や心理学的特徴の評価を行なった。男女の 2 群間で、Body Mass Index、EDI-2 総得点に有意差はなかった。課題 (body image task) は被験者自身の服装・姿勢 (立位) を統一し撮像した全身デジタル画像を取り込み、デジタル操作で-25~+25%まで 5%毎に拡大縮小して、やせイメージ、肥満イメージを作成し、真の身

体イメージの組み合わせで構成した、やせ課題、肥満課題、対照課題を用いた。これらの課題を30秒ごとに交互に3回ずつ繰り返すブロックデザインで行い、この間の脳活動をfMRIで測定した。肥満課題とやせ課題では、変形身体イメージと真の身体イメージを比較して、どちらがより不快かを選択し、ボタンを押して行き、対照課題では、赤い印がついているイメージを選択し、ボタンを押して行うよう教示した。測定された画像は解析ソフトSPM99を用いて統計解析を行い、各被験者群で変形身体課題遂行中に対照課題遂行中と比較して有意に活動が上昇した領域を同定した。

検討-2. 健常者を対象とした将来の報酬予測の機能局在に対するセロトニンの影響に関する検討

対象は健常ボランティア15例で、ATR及び広島大学医学部倫理委員会の承認を受けたプロトコルに従い、被験者には書面によって研究の目的と内容を説明して、文書による同意を得た。課題は、白色・黄色の、黒いモザイクに覆われた四角形を提示し、ボタンを押すにより選択し色の四角形を覆うモザイクの量を減らしていき、すべてのモザイクが消えたときに報酬が獲得できる（白色では少額の、黄色では高額の報酬）。各試行の初めに提示されるモザイクの量により、少額・高額それぞれの報酬が得られるまでの遅延時間が異なる。制限時間内に獲得できる合計金額が最多になるような選択を学習させる。さらに、われわれは、セロトニン神経系の時間的スケールを加味した報酬予測機能に与える影響を明らかにするために、セロトニンの前駆物質であるトリプトファンの過剰負荷、正常、欠乏した3条件のアミノ酸飲料を服用した後、1.5Tの島津Marconi社製のMRI装置を用い、脳機能測定を行った。脳の各部位がどのような時間スケールにおける報酬予測に関わるかを調べるために、被験者の脳活動データを強化学習の理論モデルに基づいて解析した。具体的には、各被験者が実際に経験した行動と報酬の時系列を、強化学習のプログラムに疑似体験させ、報酬予測の学習を行わせた。この際、予測の時間スケールを決める値を6通りに変えて学習を行わせた。

このようにして学習プログラムが推定した各被験者にとっての報酬の「予測値」信号と、各被験者の脳活動データとの相関を調べた。

(倫理面への配慮)

被験者に対しては研究内容について十分な説明を行い文章にて同意を得た。本研究は広島大学倫理委員会にて承認を受けている研究計画に基づいて実施した。

C. 研究成果

1. 行動指標として、女性は肥満イメージをより不快と選択する傾向が認められた。脳活動に関して、女性は対照課題遂行中と比較して肥満課題遂行中に、両側前頭前野と扁桃体を含む左大脳辺縁系で有意に活動が上昇し、対照課題遂行中と比較してやせ課題遂行中に、左前頭前野と帯状回を含む左大脳辺縁系や島を含む左傍辺縁系で有意に活動が上昇した。また男性は対照課題遂行中と比較して肥満課題遂行中に、一次、二次視覚野を含む右後頭葉と右側頭葉、右頭頂葉で有意に活動が上昇し、対照課題遂行中と比較してやせ課題遂行中に、一次、二次視覚野を含む左後頭葉と両側紡錘状回を含む側頭葉、右頭頂葉で有意に活動が上昇した。すなわち、心理行動学的データより女性は今回の刺激をストレスと評価しており、ストレスの認知と前頭前野の関連が示唆された。

2. 強化学習の理論モデルに基づいて解析した結果、被殻で腹側から背側にかけて報酬予測の時間的スケールマップ（短期は腹側部、長期は背側部）を認めたこと、トリプトファン欠乏条件では被殻腹側部で短期時間スケールとの相関およびトリプトファン過負荷条件で被殻背側部と長期時間スケールとの相関が認められた。すなわち、セロトニン機能が低下した状況では短期の報酬予測が中心となり、セロトニン機能が亢進した状況では長期の報酬予測が中心となる可能性を示唆している。

D. 考察

検討-1の結果から、女性は変形身体イメージの認知には前頭前野、大脳辺縁系、傍辺縁系の活動が認められたことより、若年

女性はこの刺激により、恐怖や自己についての注意を喚起され、情動制御するなど複雑な情緒的な認知処理を行っている可能性が示唆された。一方男性は変形身体イメージの認知には一次、二次視覚野、および側頭葉、頭頂葉の視覚経路の活動が認められたことより、若年男性はこの刺激の処理に際し、腹側経路を介した、色、形、顔つきなどの物体視や背側経路を介した、動き、回転などの空間視を行っている可能性が示唆された。

検討-2の結果から、脳内の「報酬への見通し」機能が、線条体を中心とした分化した情報システムによってなされていること、この機能はうつ病との関連が示唆されるセロトニンによって調節を受ける可能性が想定された。

E. 結論

摂食障害は、体型や体重への強いこだわりがみられ、拒食や過食・自己誘発性嘔吐などの症状をみとめるストレス関連の精神疾患であるが、その発症率は男性よりも女性のほうが約10倍高いといわれる。今回の検討から、発症率にこれほど大きな性差がみられる要因のひとつとして、身体イメージに関する不快な情報を処理する神経基盤が男女で異なる可能性が考えられた。

さらに、将来の報酬の予測は希望につながり、重要なストレス適応強化の方策として考えられるが、今回の検討から、脳内の「報酬への見通し」機能が、線条体を中心とした分化した情報システムによってなされていること、この機能はうつ病との関連が示唆されるセロトニンによって調節を受ける可能性が推定された。

以上のように、今回、得られた所見は、ストレス事象に対する適応を理解し、ストレス適応を強化するための方策を検討していく上で、基礎となるものと考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1) 岡本泰昌、岡田 剛、上田一貴、旭 修司、志々田一宏、木下亜紀子、萬谷智

之、山下英尚、山脇成人、田中沙織、銅谷賢治、情動・行動の脳内機構に関するfMRI研究-うつ病の病態解明に向けて-、心身医学45:439-447,2005

- 2) 岡本泰昌、上田一貴、ストレス事象の予測に関する脳機能画像解析、医学のあゆみ212:1115-1119,2005
- 3) 岡本泰昌、山脇成人、うつ病と前頭前野、Clin Neurosciences 23 679-681,2005.
- 4) 岡本泰昌、ストレスを感じる前頭前野-ストレス適応破綻の脳内機構-、日本薬理学雑誌126:194-198,2005
- 5) 岡本泰昌、山脇成人、うつ病研究の現状紹介 うつ病の病態解明に向けた脳機能画像研究、Depression Frontier 3, 92-98, 2005
- 6) Shirao N, Okamoto Y, Mantani T, Okamoto Y, Yamawaki S. Gender differences in brain activity toward unpleasant word stimuli concerning body image: an fMRI study. British Journal of Psychiatry 186:48-53,2005.
- 7) Yamashita H, Okamoto Y, Morinobu S, Yamawaki S, Kahkonen S: Visual emotional stimuli modulate auditory sensory gating studied by magnetic P50 suppression. European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience 255:99-103,2005.
- 8) Mantani T, Okamoto Y, Okada G, Shirao N, Yamawaki S. Reduced activation of posterior cingulate cortex during imagery in subjects with high degrees of alexithymia: a functional magnetic resonance imaging study.. Biological Psychiatry 57: 982-90, 2005.
- 9) Yamashita H, Mori K, Nagao M, Okamoto Y, Morinobu S, Yamawaki S. Influence of aging on the improvement of subjective sleep quality by atypical antipsychotic drugs in patients with schizophrenia: comparison of middle-aged and older adults. Am J Geriatr Psychiatry. 13: 377-84. 2005
- 10) Shirao N, Okamoto Y, Okada G, Ueda K, Yamawaki S. Gender differences in brain activity toward unpleasant linguistic stimuli concerning interpersonal

relationships: an fMRI study European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience (in press).

- 11) Kurosaki M, Shirao N, Yamashita H, Okamoto Y, Yamawaki S. Distorted Images of One's Own Body Activates the Prefrontal Cortex and Limbic/Paralimbic System in Young Women: A Functional Magnetic Resonance Imaging Study. Biol Psychiatry. (in press).

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

情動の発達からみた前頭前野グルタミン酸-カテコールアミン系ネットワークの
構築に関する研究

分担研究者 神庭重信 九州大学大学院医学研究院精神病態医学分野 教授

研究要旨 情動の発達とともに形成される中枢のストレス反応系である前頭前野カテコールアミン系について、AMPA/kainate受容体による調節機構を脳内微小透析法を用いて検討した。刺激を受けたAMPA受容体の脱感作を非定型抗精神病薬が抑制して前頭前野のドーパミン系とノルエピネフリン系の活動が亢進したことから、AMPA受容体を標的とした抗ストレス薬開発の可能性が示唆された。

A. 研究目的

本研究は、情動発達の神経生物学的基盤を解明するとともに、その障害をもたらすストレス脆弱性のメカニズムについて明らかにし、予防法開発に結びつけることを目的としている。今年度の研究では、中枢の主要なストレス反応系である前頭前野カテコールアミン系とグルタミン酸系の機能的連関について予備的な検討を行った。このニューロン回路は、側坐核や扁桃など、皮質下の辺縁系諸部位において情動ストレスに関連した過剰なニューロン活動を制御しており、抗うつ薬、気分安定化薬や非定型抗精神病薬によって選択的に賦活されることで知られている。今回の研究では、従来、ほとんど検討されていないAMPA/kainate型グルタミン酸受容体による前頭前野カテコールアミン系活動の調節機構について非定型抗精神病薬のドーパミンおよびノルエピネフリン遊離作用を指標に調べた。

B. 方法

Wistar系成熟雄性ラットを用いて、麻酔下に前頭前野に脳内微小透析用プローブを装着した翌日、脳内微小透析実験を行った。各薬物は人工脳脊髄液に溶解しプローブを介して前頭前野に局所還流した。採取した試料中のドーパミンとノルエピネフリンをオンライン接続したHPLC-ECDにより測定した。以上により、前頭前野細胞外カテコールアミンレベルをリアルタイムにモニタリング

することを可能とした。

以上の研究方法は、九州大学医学部動物実験倫理委員会により承認された。

C. 研究成果

1) AMPAを含む人工脳脊髄液を前頭前野に還流すると細胞外ドーパミンレベルは有意に上昇したが、ノルエピネフリンレベルには変化がなかった。

2) AMPAと非定型抗精神病薬（クロザピン、オランザピン）の同時還流は後者によるドーパミン、およびノルエピネフリン遊離作用の双方を増強した。一方、AMPAとハロペリドールの同時還流は細胞外ドーパミン、およびノルエピネフリンレベルをむしろ低下させた。

3) 非競合的AMPA受容体アンタゴニストSYM2206を還流したところ、非定型抗精神病薬によるカテコールアミン遊離作用に対するAMPAの増強効果が消失したが、同様のSYM2206の拮抗作用はハロペリドールについては認められなかった。

D. 考察

今回の所見は、AMPA受容体の脱分極がNMDA受容体の活性化を促して前頭前野カテコールアミン系を賦活することを示唆するが、刺激を受けたAMPA受容体は速やかに脱感作(desensitization)通常、刺激を受けたAMPA受容体は速やかに脱感作(desensitization)されることから、非定型

抗精神病薬が脱感作を抑制して、AMPA 受容体の脱分極を延長する可能性が推測される。この仮説は、AMPA 受容体の脱感作の速度を抑制するサイクロチアザイドの阻害薬であるSYM2206がAMPAによる非定型抗精神病薬誘発性カテコールアミン遊離作の増強効果を消失させたことから、支持される。今回の結果は、前頭前野グルタミン酸—カテコールアミン系機能連関におけるAMPA受容体の役割について新たな知見を与えるとともに、AMPA受容体の脱感作阻害を標的とした新しい抗ストレス薬開発の可能性が示唆した。同様の薬理作用が気分安定化薬（バルプロ酸やカルバマゼピン）にもみられるかを現在検討中であるが、とともに、同受容体の脱感作阻害薬が新しい抗ストレス薬として有効である可能性を示唆している。今後は、グルタミン酸—カテコールアミン系を介する前頭前野—辺縁系の機能的連関において、ストレス反応系がどのように発達してゆくかを解明してゆきたい。

E. 結論

情動の発達に関連深いストレス反応系のうち、前頭前野のカテコールアミン系活動のAMPA/kainate受容体による調節機構を、脳内微小透析法を用いて検討した結果、刺激を受けたAMPA受容体の脱感作を非定型抗精神病薬が抑制する可能性が示唆された。本研究は、AMPA受容体を標的とした新しい抗ストレス薬開発の可能性を示した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

- 1) Kudo K, Wati H, Qiao C, et al.: Age-related disturbance of memory and CREB phosphorylation in CA1 area of hippocampus of rats. *Brain Research* 1054: 30 – 37, 2005
- 2) Furukawa TA, Streiner DL, Azuma H, et al.: Cross-cultural equivalence in depression assessment: Japan-Europe-North American study. *Acta*

Psychiatr Scand 112: 279-285, 2005..

- 3) Maekawa T, Goto Y, Kinukawa N, et al.: Functional characterization of mismatch negativity to a visual stimulus. *Clin Neurophysiol* 116: 2393-2402, 2005
- 4) Hashioka S, Monji A, Ueda T, et al.: Amyloid-beta fibril formation is not necessarily required for microglial activation by the peptides. *Neurochem Int* 47:369-376, 2005.
- 5) Nakao T, Nakagawa A, Yoshiura T, et al.: Brain activation of patients with obsessive-compulsive disorder during neuropsychological and symptom provocation tasks before and after symptom improvement: A functional magnetic resonance imaging study. *Biol Psychiatry* 57: 901-910, 2005.
- 6) Uemura T, Kudoh J, Noda S, et al.: Characterization of human and mouse TRPM2 genes: identification of a novel N-terminal truncated protein specifically expressed in human striatum. *Biochem Biophys Res Comm* 328:1232-43, 2005.
- 7) Qiao C-X, Den R., Kudo K, et al.: Ginseng enhances contextual fear conditioning and neurogenesis in rats. *Neurosci Res* 51: 31-38, 2005.
- 8) Tamaoki T, Tezuka H, Okada Y, et al.: Avoiding the effect of linked genes is crucial to elucidate the role of Apcs in autoimmunity. *Nature Med* 11: 11-12, 2005.
- 9) Sakamoto R, Minoura K, Usui A, et al.: Effectiveness of aroma on work efficiency: lavender aroma during recesses prevents deterioration of work performance. *Chem. Senses* 30:1–9, 2005

G-2. 学会発表

- 1) Hashioka S, Youn-Hee H, Kato T, et al.: Phosphatidylserine-liposomes inhibits microglial production of neurotoxic molecules. 第48回日本神経化学会, 福岡, 9月28~30日, 2005年
- 2) Kajihata T, Nakahara T, Nagao N, et al.: Effects of AMPA on clozapine-induced

dopamine and norepinephrine release in rat medial prefrontal cortex: implications for neurocognitive effects of atypical antipsychotic drugs. 第48回日本神経化学会, 福岡, 9月28~30日, 2005年

- 3) Kaneko N, Kudo K, Mabuchi T, et al.: Human interferon-alpha suppressed cell proliferation through interleukin-1 production in adult rat dentate gyrus. 第48回日本神経化学会, 福岡, 9月28~30日, 2005年
- 4) Kudo K, Kanba S: Ginseng enhances contextual fear conditioning and neurogenesis in rats. 第48回日本神経化学会, 福岡, 9月28~30日, 2005年
- 5) Monji A, Yoshida I, Tashiro K, et al.: Depletion of intracellular Ca²⁺ store itself may be a major factor in thapsigargin-induced ER stress and apoptosis in PC12 cells. 第48回日本神経化学会, 福岡, 9月28~30日, 2005年
- 6) Nagao N, Nakahara T, Kuroki T, et al.: Potent blockade of dopamine D2 receptors inhibits clozapine-induced dopamine release in rat medial prefrontal cortex. 第48回日本神経化学会, 福岡, 9月28~30日, 2005年

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

ストレス暴露による神経形態変化の分子機構に関する研究

分担研究者 尾藤晴彦 東京大学大学院医学系研究科 助教授

研究要旨 PSD-95に着目し、興奮性神経細胞の樹状突起スパイン形態制御とsynGAPとの結合離散のリンケージを初めて明らかにした。また、BDNFがストレス様グルタミン酸刺激に拮抗してアクチン動態制御に寄与する可能性を見出した。樹状突起形態制御候補分子として同定したカルシウム・カルモジュリン依存性キナーゼCLICK-III/CaMKII α はラフト膜からアクチン細胞骨格へのシグナル伝達に寄与することを同定した。

A. 研究目的

ストレス暴露時の過剰神経活動後には、スパイン形態や樹状突起形態に著明な異変が起こることがすでに示されている。そこで、本研究では、ストレス暴露様シナプス活動後のスパイン形態変化の解明と、その変化に関与しうるシグナル経路の同定に焦点を絞り、以下の点について研究を進める。

- 1) 海馬興奮性神経細胞における活動依存的アクチン再編成の分子機構を解明する。
- 2) 興奮性神経細胞における新規アクチン制御機構の探索を行う。

B. 方法

B-1. 活動依存的アクチン再編成の分子機構の解明

本年度は、アクチン動態と他の情報伝達蛋白のダイナミクスを共可視化する手法を開発し、ストレス性シグナルとしてのNMDA過剰投与に拮抗するBDNF活性の役割について明らかにする。

B-2. 興奮性神経細胞におけるアクチン制御分子の探索

興奮性神経細胞のアクチン細胞骨格制御機構を明らかにするため、引き続き、1) スパインに局在化するアクチン制御機構の探索し、2) さらに、アクチン細胞骨格動態を活性化するカルシウム依存性経路の制御機構について明らかにする。

(倫理面への配慮)

DNA組換え実験ならびに動物実験に関しては、東京大学医学部の該当の委員会に

申請を行い、認められたプロトコールに基づいて実験を行った。

C. 研究成果

本年度の実験により、以下のような成果が得られた。

1. スパインに局在化するシナプス後肥厚部(PSD)分子であるPSD-95のスパイン形態制御能がsynGAP分子を介していることを解明した。また、このスパイン形態制御能は、PSD-95のスパイン内集積の誘導活性と強い相関を有していた。すなわち、スパイン形態の制御は、スパイン内分子複合体の集積・分散機構と密接な連関があることが証明された(Nonaka et al., J. Neurosci. et al., in press)。
2. 海馬初代培養系を用い、NMDA受容体過剰刺激の際に、tyrosineリン酸化活性依存的にアクチン制御分子cortactinがスパインから排除されてしまうことを見出し、さらにこの排除がBDNF/trkB経路により拮抗されることを明らかにした(Iki et al., 2005)。
3. 膜結合型新規CaMキナーゼCLICK-IIIが、一部のシナプスにも認められるラフト膜画分に局在することを見出し、さらに、この局在が樹状突起形態形成に不可欠であることが示唆された。(Takemoto-Kimura et al., in preparation)

D. 考察

本研究は、ストレス脆弱の分子機構の一端を担う、シナプス近傍のアクチン細胞骨格再編成の分子基盤を明らかにすることを

目標とした。

近年の研究により、ストレス脆弱性の最も高い脳部位である海馬において、ストレス暴露時において樹状突起スパインの著しい形態変化が生じることが報告されてきた。先行研究において我々自身は、培養初代神経細胞を用い、この過程の一部を再現し、刺激中のアクチン動態を可視化できる *in vitro* 実験系を確立した。

本研究において、一昨年来の実験系に種々の改良を加えた結果、シナプス近傍の PSD-95 を中心とする分子集合体の組成が、直接的にスパイン形態制御と密接な関連を有していることを明らかにすることができた。また、このスパイン内分子集合体の一つであり、重要なアクチン制御分子である cortactin が、ストレス様の過剰な NMDA 受容体活動によりスパインから消失すること、また、逆に BDNF に cortactin をスパインに集積させる活性があることを発見した。これまで、BDNF の抗ストレス作用については、神経栄養因子としての作用以外に、抗アポトーシス活性などが注目されていたが、アクチン動態制御活性についても今後さらなる探索が待たれるところである。

また今年度は、シナプス近傍アクチンを動員する候補分子として、前年に引き続き、我々が初年度に単離したカルシウム依存性キナーゼ CLICK-III/CaMKI γ による特異的な神経樹状突起形態変化誘導機構を探索した。その結果、本キナーゼは、老化やアルツハイマー病でシグナル伝達異常をきたすと考えられているラフト膜画分に強く集積することを発見し、ラフト膜からアクチン細胞骨格へシグナルを伝達する経路を制御していることを明らかにした。今後、本キナーゼのストレス時のみならず、老化等における役割を明らかにも着目していく必要があると考えられた。

E. 結論

活動依存的アクチン集積のストレス暴露時における役割を明らかにするため、神経細胞内アクチン動態の可視化を行い、シナプス後肥厚部内における PSD-95/ synGAP 結合のスパイン形態制御における役割を同定した。また、NMDA 受容体活性と BDNF とが、シナプス内アクチンの制御を行う分子

cortactin 局在を拮抗的に決定していることを見出した。さらに、カルシウム・カルモジュリン依存性キナーゼ CLICK-III/CaMKI γ による樹状突起形態制御がラフト膜内シグナル伝達を介していることを解明した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

- 1) Nonaka M, Doi T, Fujiyoshi Y, Takemoto-Kimura S, Bito H. Essential contribution of the ligand-binding β B- β C loop of PDZ1 and PDZ2 in the regulation of postsynaptic clustering, scaffolding and localization of PSD-95. *J. Neurosci.*, in press, 2006.
- 2) Iki J., Inoue A., Bito H., Okabe S. Bidirectional regulation of postsynaptic cortactin distribution by BDNF and NMDA receptor activity. *Eur. J. Neurosci.*, 22: 2985-2994, 2005.
- 3) Matsuoka Y, Furuyashiki T, Yamada K, Nagai T, Bito H, Tanaka Y, Kitaoka S, Ushikubi F, Nabeshima T., Narumiya S. Prostaglandin E receptor EP1 controls impulsive behavior under stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 16066-16071, 2005.
- 4) Hoshino M, Nakamura S, Mori K, Kawauchi T, Terao M, Nishimura YV, Fukuda A, Fuse T, Matsuo N, Sone M, Watanabe M, Bito H, Terashima T, Wright CVE, Kawaguchi Y, Nakao K, and Nabeshima Y. *Ptfla*, a bHLH transcriptional gene, defines GABAergic neuronal fates in cerebellum. *Neuron*, 47: 201-213, 2005.

G-2. 学会発表

- 1) Fuse T and Bito H. Actin dynamics in cultured cerebellar Purkinje cells visualized using EGFP-actin.

Neurosci. Res., in press, 2005.

第 28 回日本神経科学学会、
2005.7.26-28, 横浜。
ポスター発表。

- 2) Bito H, Fujii H, Ishihara N, Fuse T, Nonaka M, Takemoto-Kimura S, and Okuno H.

Synaptic activity-driven changes in neuronal signaling cascades.

Neurosci. Res., in press, 2005.

第 28 回日本神経科学学会、
2005.7.26-28, 横浜。
シンポジウム発表。

- 3) Takemoto-Kimura S., Ishihara N, Mano T, Okuno H and Bito H. A GluR-interacting palmitoyl acyl transferase GODZ palmitoylates and regulates lipid microdomain insertion of a neuron-specific CaM kinase CaMKI γ / CLICK-III.

Seikagaku, in press, 2005.

第 78 回日本生化学会、2005.10.19-22、
神戸。
ポスター発表。

- 4) Hoshino M, Nakamura S, Mori K, Kawauchi T, Terao, M, Nishimura YV, Fukuda, A, Fuse T, Matsuo, N, Sone, M, Watanabe, M, Bito H, Terashima T, Wright CVE, Kawaguchi Y, Nakao K, Nabeshima Y. Ptf1a, a bHLH transcriptional gene, defines GABAergic neuronal fates in cerebellum.

Soc. Neurosci. Abstr. 31: 498.9, 2005.

第 35 回北米神経科学学会, Washington,
Nov.12-16, 2005。
ポスター発表。

- 5) Takemoto-Kimura S., Ishihara N, Mano T, Okuno H and Bito H.

A GluR-interacting palmitoyl acyl transferase GODZ palmitoylates and regulates lipid microdomain insertion of a neuron-specific CaM kinase CaMKI γ /CLICK-III.

Soc. Neurosci. Abstr. 31: 498.9, 2005.

第 35 回北米神経科学学会,
Washington, Nov.12-16, 2005。
ポスター発表。

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

分担研究報告書

生後脳の神経新生から見た精神疾患発症機序に関する研究

分担研究者 井ノ口 馨 三菱化学生命科学研究所 主任研究員

研究要旨 記憶形成後に前脳特異的にアクチビン機能を抑制することで、いったん強固に形成された恐怖条件付け記憶を消去することができることを示した。

A. 研究目的

いったん強固に形成された恐怖記憶を人為的に消去する方策をさぐり、PTSD 治療への展開を探る。

B. 方法

脳海馬の長期増強（LTP）の持続に必須であるアクチビンの機能を、tet OFF システムで前脳特異的に ON/OFF できるトランスジェニックマウスを作製した。任意の時期にエサに DOX を混ぜることにより、アクチビンの特異的阻害タンパク質フォリスタチンの発現を前脳特異的に抑制、あるいは DOX を抜くことにより高発現させることができるマウスの系統を得た。このマウス（BIF）の恐怖条件付け学習を解析した。

C. 研究成果

フォリスタチン cDNA を tet プロモーターの制御下においたトランスジーンを作製した。トランスジーンが染色体に組み込まれたトランスジェニックマウスを 30 系統以上確立した（Tg 系統）。一方、前脳特異的な alpha CaMKII プロモーター制御下で転写因子 tTA が発現するトランスジェニックマウス（tTA）を Jackson lab より購入した。Tg 系統のマウス群を tTA マウスに交配し得られた産仔の中で、DOX 投与で前脳のフォリスタチン発現が OFF になり DOX 非投与でフォリスタチン発現が ON になる系統をスクリーニングした。その結果、3 日間の DOX 投与あるいは 3 日間の DOX 非投与により前脳におけるトランスジーン由来のフォリスタチン量がそれぞれ OFF あるいは ON になるマウス系統を 1 系統（BIF）得た。

文脈と電気ショックの組み合わせによる

恐怖条件付け課題をこれらのマウスに与え、記憶の保持を解析した。実験中 DOX を連続投与してフォリスタチン発現を OFF にした BIF は、コントロール動物と同様に 1 週間の長期記憶が成立した。これに対して、恐怖条件付けを行う前の 3 日間だけ DOX 投与して条件付けの時だけフォリスタチンが発現している BIF は、24 時間の記憶は正常だったが、1 週間の記憶は有意に低下した。

D. 考察

前脳のアクチビン機能が、恐怖条件付け記憶の長期間にわたる保持に必要であることが明らかになった。

E. 結論

記憶形成後に前脳特異的にアクチビン機能を抑制することで、いったん強固に形成された恐怖条件付け記憶を消去することができることを示した。この成果は PTSD の治療法開発に展開できる可能性がある

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

- 1) Inoue, K., Fukazawa, Y., Ogura, A. and Inokuchi, K. Two-dimensional neural activity mapping of the entire population of hippocampal CA1 pyramidal cells responding to fear conditioning. *Neurosci. Res.*, 51, 417-425 (2005).
- 2) Sakagami, Y., Yamamoto, K., Sugiura, S., Inokuchi, K., Hayashi, T., and Kato, N. Roles of Homer-1a in homeostatic

regulation of pyramidal cell excitability: a possible link to clinical benefits of electroconvulsive shock. *Eur. J. Neurosci.*, 21, 3229-3239 (2005)

- 3) Yamamoto, K., Sakagami, Y., Sugiura, S., Inokuchi, K., Shimohama, S. and Kato, N. Homer-1a enhances spike-induced calcium influx via l-type calcium channels in neocortex pyramidal cells. *Eur. J. Neurosci.*, 22, 1338-1348 (2005)
- 4) Maekawa, M., Takashima, N., Arai, Y., Nomura, T., Inokuchi, K., Yuasa, S. and Osumi, N. Pax6 is required for maintenance and differentiation of progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis. *Genes to Cell*, 10, 1001-1014 (2005)
- 5) 井ノ口馨, シナプス可塑性におけるスパインアクチン動態の重要性、遺伝子制御による「選択的シナプス強化・除去」機構の解明、狩野方伸編、p13-22、(株)クバプロ、東京 (2005)
- 6) 笠井陽子、井ノ口馨、アクチビンによるシナプス形態およびシナプス可塑性の制御、遺伝子制御による「選択的シナプス強化・除去」機構の解明、狩野方伸編、p23-38、(株)クバプロ、東京 (2005)

G-2. 学会発表

(シンポジウム)

- 1) Yoko Shoji-Kasai, Shiro Ikegami, and Kaoru Inokuchi, ACTIVIN, A TGF- β SUPERFAMILY PROTEIN, REGULATES THE MAINTENANCE OF HIPPOCAMPAL LTP BY MODULATING DENDRITIC SPINE MORPHOLOGY. Cold Spring Harbor Meeting on Learning and Memory, Cold Spring Harbor, NY, USA, April, 2005.
- 2) Naoko Inoue, Atsu Aiba, Minoru Matsui, Kaoru Inokuchi, Vesl-1S, an IEG product, plays an important role in various processes of the fear memory formation. The 35th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Washington DC, USA, November, 2005.
- 3) I. Yao; H.Ageta; H.Takagi; K.Tomoaki;

Y.Fukuda; K.Inokuchi; M.setou, ANALYSIS OF A NOVEL F- BOX PROTEIN THAT REGULATES NEURAL ACTIVITY. The 35th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Washington DC, USA, November, 2005.

- 4) K.Yamamoto; S.Sugiura; K.Inokuchi; T.Hayashi; N.Kato, HOMER - 1A - INDUCED AUGMENTATION OF CA 2+ ENTRY THROUGH L- TYPE CA 2+ CHANNELS SERVES TO ENHANCE BK CHANNEL OPENING IN VISUAL CORTEX LAYER II/III PYRAMIDAL CELLS. The 35th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Washington DC, USA, November, 2005.
- 5) M.Kataoka; S.Yamamori; S.Ikegami; R.Kuwahara; R.Suzuki - Migishima; Y.Nakahara; I.Nihonmatsu; K.Inokuchi; Y.Kato - Fukui; M.Yokoyama; S.Azuma; M.Takahashi. A SINGLE AMINO ACID MUTATION IN SNAP - 25 INDUCES ANXIETY - RELATED BEHAVIOR IN MOUSE. The 35th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Washington DC, USA, November, 2005.
- 6) Y.Inoue; H.Udo; A.Kato; K.Inokuchi; H.Sugiyama, ACTIVITY - DEPENDENT REORGANIZATION OF POSTSYNAPTIC HOMERIC CLUSTERS IN CULTURED HIPPOCAMPAL NEURONS. The 35th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Washington DC, USA, November, 2005.
- 7) H. Ageta, A. Murayama, N. Takashima, Y. Shoji-Kasai, S. Ikegami, K. Inokuchi, An endocrine activin plays multifunctional roles in the brain. Symposium of the 28th Annual Meeting of the Japanese Neuroscience Society, Yokohama, July, 2005.
- 8) D. Okada, F. Ozawa, K. Inokuchi, The NO-PKG pathway is required for synaptic tagging that determines the synapse specificity of late-phase long-term potentiation. Symposium of