

PTSD 治療にむけた記憶消去の分子メカニズム解明

山中章弘

名古屋大学 環境医学研究所

【研究の背景】

睡眠中に記憶がどのように制御されているのかについて良く分かっていない。本研究では、研究実施者等が独自に同定した視床下部のメラニン凝集ホルモン産生神経(MCH 神経)がレム睡眠調節に関わっていること(Tsunematsu et al., J Neurosci 2014)と、MCH神経が海馬に密に投射しており、レム睡眠中に活動することで、記憶の消去に関わっている (Izawa et al. Science 2019) 知見から、この記憶消去に関わる分子メカニズムについて明らかにし、心的外傷後ストレス障害(PTSD)などの記憶に問題がある疾患の治療法開発に資する結果を得ることを目指す。

【目 的】

本研究では、視床下部のメラニン凝集ホルモン産生神経(MCH 神経)がレム睡眠中に記憶を消去することを明らかにしたことから、この記憶消去に関わる分子メカニズムについて詳細に解明し、心的外傷後ストレス障害などの記憶に問題がある疾患の治療法開発に資する知見を得ることを目的としている。

【方 法】

研究実施者のこれまでの MCH 神経に関する研究から、MCH 神経は海馬に密に投射しており、レム睡眠中に活動する MCH 神経が、海馬において記憶消去に関わっていることを明らかにしている(Izawa et al., Science 2019)。MCH 神経は、MCH だけでなく、グルタミン酸、コカイン・アンフェタミン調節転写産物(CART)などの複数の伝達物質を同時に産生し、活動に伴い同時に遊離している。現時点では、MCH 神経から遊離されているどの神経伝達物質が記憶消去に関与しているのかは明らかではない。そこでどの伝達物質が関わっているのかについて、分子レベルで詳細に解明することを目的として以下の研究を行った。

まず、MCH 神経において、それらの伝達物質を欠損するコンディショナルノックアウトマウスを作成し、その記憶を評価することで、どの神経伝達物質が記憶消去に関わっているのかについて明らかにすることを試みた。MCH 神経特異的な特定遺伝子を欠損させるために、MCH 神経特異的に Cre リコンビナーゼを発現する MCH-Cre マウスと Cre 依存的に特定遺伝子を欠損する flox マウスを交配させる方法と、CLISPR/Cas9 を用いてインビボゲノム編集によって特定神経細胞において特定遺伝子を欠損させる手法の異なる独立した方法を用いて結果を比較した。

まず、最も関与する可能性が高いと考えられた神経伝達物質であるグルタミン酸について、グルタミン酸をシナプス小胞に取り込む vGLUT2 遺伝子を欠損させるために、vGLUT2-flox マウスと MCH-Cre マウスを交配させて、MCH-Cre; vGLUT2^{flox/flox} マウスを作成し、MCH 神経だけでグルタミン酸が遊離できなくなるマウスを作成し、新奇物体認識試験を用いて記憶を評価した。

【結 果】

新奇物体認識試験において、MCH-Cre; vGLUT2^{flox/flox} ホモマウスは野生型マウスや MCH-Cre; vGLUT2^{flox/+}ヘテロマウス

スと比較して有意に高い記憶能力があることを示した。このことは、MCH 神経から遊離されるグルタミン酸が海馬において記憶消去に主に関わっている可能性を示唆している。

この結果をさらに異なる方法によって確認するために、MCH 神経特異的に SpCas9 を発現するマウスである MCH-Cre; loxP-Stop-loxP-SpCas9 マウスを作成し、vGLUT2 に対する sgRNA を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを視床下部に投与して感染させ、インビボゲノム編集によって MCH 神経特異的に vGLUT2 遺伝子を欠損させることを試みた。

事前に行ったインビボゲノム編集の検討では、MCH 神経において、MCH 遺伝子に対する sgRNA と Cas9 を発現させると MCH 遺伝子を欠損させることができることを確認している。

そこで vGLUT2 に対する sgRNA を発現するウイルスベクターを作成・精製し、視床下部に局所注入を行い、新奇物体認識試験を用いて記憶能力を評価した。ほ乳類には存在しない遺伝子である LacZ に対する sgRNA を発現するウイルスベクターを注入したマウスを対照群として比較を行った。vGlut2 に対する sgRNA を発現するウイルスベクターを注入した群では、LacZ に対する sgRNA を発現するウイルスベクターを注入した群と比較して記憶の向上が認められた。

【考 察】

今後これらを用い、vGLUT2 抗体による免疫組織化学的解析によって、どの程度の vGLUT2 が MCH 神経で脱落しているのかについて解析を行う予定である。これらの検討によって、MCH 神経から遊離されるグルタミン酸が海馬において記憶消去に関わっていることが明らかになると考えられる。結果をまとめて論文として報告する予定である。これまでに、レム睡眠時に活動する MCH 神経が海馬において記憶消去に関わっていることを見いだしていることから、MCH 神経から遊離されるグルタミン酸が主に記憶消去に関わっている可能性が強く示唆されたことになる。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

今後は、さらに他の伝達物質の関与や、関与するなら関与の程度について同様の検討を行い明らかにしていく予定である。これらによって、記憶消去のための分子標的が明らかになり、それに対して創薬を行うことで記憶治療が可能になると考えられる。

【参考・引用文献】

- 1) Tsunematsu T, Ueno T, Tabuchi S, Inutsuka A, Tanaka KF, Hasuwa H, Kilduff TS, Terao A, *Yamanaka A: Optogenetic manipulation of activity and temporally-controlled cell-specific ablation reveal a role for MCH neurons in sleep/wake regulation. *J Neurosci*, 34(20): 6896-909 (2014).
- 2) Izawa S, Chowdhury S, Miyazaki T, Mukai Y, Ono D, Inoue R, Ohmura Y, Mizoguchi H, Kimura K, Yoshioka M, Terao A, Kilduff TS, *Yamanaka A: REM sleep-active MCH neurons are involved in forgetting hippocampus-dependent memories. *Science*, 365: 1308-1313 (2019).