

カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)と恐怖記憶に関する研究

三島 脩太・松内 省太・大塚 青海

橋川 直也・橋川 成美

岡山理科大学大学院理学研究科臨床生命科学専攻

(2018年10月5日受付、2018年12月6日受理)

カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)を脳室内投与することで不安症状やうつ様症状を改善させることが知られているが、恐怖記憶学習における影響についてはまだ不明な点が多い。今回、CGRPをマウスに脳室内投与をすることによって恐怖記憶に変化が現れるか、恐怖条件付け文脈学習試験を行い調べた。恐怖記憶を想起させる前に、CGRPを投与した場合は記憶消去に対して有意な変化を示さなかった。一方、記憶を想起させた直後に、CGRPを投与すると恐怖記憶消去が有意に抑制された。この反応はCGRP受容体拮抗薬を同時に投与することで抑制されたためCGRP受容体を介したものであると考えられる。さらに、記憶を想起させた後にCGRPとGABA受容体拮抗薬を投与するとCGRPによる記憶消去阻害が有意に抑制されたためGABA神経系が関与していることが示唆された。加えて、CGRPの恐怖記憶消去阻害作用の経時的変化を調べた結果、記憶を想起させてから1週間は恐怖記憶を保持したままであった。以上の結果より、CGRP脳室内投与による恐怖記憶消去阻害作用は、記憶を一度想起させた直後に効果を示し、GABA神経系が関与していることが示唆された。

1. 緒言

記憶・学習とは、生物が日常生活を営んでいくうえで、なくてはならない脳の重要な機能の1つである。記憶は固定化、保持、想起、消去など時間的経過から分類することが出来るが、記憶のメカニズムは明らかとなっていない部分が多く様々な研究がされている。世の中においても、記憶力アップや効率の良い学習方法など諸説上がっている。記憶障害を伴う代表的な変性疾患として認知症が知られているが、日本においても今後、高齢化が進むことにより認知症の人も増加することから医療関係者を中心に対策が検討されている。

カルシトニン遺伝子関連ペプチド(calcitonin gene related peptide, 以下、CGRP)は37個のアミノ酸からなる神経ペプチドの1種で1982年に初めて発見された。CGRPは、CGRP受容体を介してcAMPを上昇させ、血管拡張、心拍数増加、心筋収縮力増大、片頭痛を誘発等の生理作用がある。これまでに、CGRPを脳室内に投与することにより不安症状¹⁾ やうつ様症状²⁾ を改善させることが報告してきたが、恐怖記憶学習における影響についてはまだ、明らかになっていない。今回、我々はCGRPをマウスに脳室内投与することによって恐怖記憶に変化が現れるか、恐怖文脈学習試験を行い解析した。

2. 実験材料および実験方法

2-1 実験動物

実験動物には、8週齢の雄性C57BL/6Jマウス(清水実験材料, 京都)を用い、ケージ内に5~6匹ずつに分けて飼育を行った。自由給餌法にて飼育し、飲料水は水道水を与えた。

2-2 使用薬剤と投与方法

CGRP(0.5 nmoL, ペプチド社)とCGRP受容体拮抗薬(CGRP8-37; 0.5 mmol, sigma)は脳室内投与、GABA受容体拮抗薬(ピクロトキシン; 3 mg/kg, sigma)は腹腔内投与を行った。また、対照群には生理食塩水を脳室内投与あるいは腹腔内投与した。

2-3 行動試験による評価

Contextual fear learning test; 恐怖文脈学習試験

恐怖記憶の評価に汎用されている試験である。足元に電気刺激が流れる装置(有限会社メルクエスト MODEL: MPB-M010/PBM1015050)の上にガラス製の筒を置き、ガラス製の板でフタをし、マウスを入れるチャンパーとした。1日目、チャンパー内にマウスを入れ、3分間計測し環境に慣れさせた。2日目、1日目と同じチャンパーにマウスを入れ足元に0.3 mAの電気刺激を計4回、2秒間与え恐怖条件付けを行った。各試行間のインターバルは30秒とした。恐怖条件付けを行った

1 週間後、マウスを同じチャンバー内に入れ電気刺激を与えずに5分間恐怖記憶を想起させた。想起を行った1日後に再び同じチャンバーにマウスのすくみ行動時間を測定した。マウスのすくみ行動時間は、マウスが目を閉じ静止している時間をすくみ行動とし、ストップウォッチを用いて5分間計測した。

2-4 脳室内投与 (intracerebroventricular administration: i.c.v.) 処置方法

ジエチルエーテル麻酔下において、マウス頭蓋に bregma から尾側に1 mm、外側に1 mmの場所に垂直に針を立て刺し、マイクロシリンジを用いて脳室内に薬剤を5 μ L投与した。針は27 G(0.40 \times 25 mm; TERUMO)を用い、ホワイトチップの中に針を入れ先端が2.5-2.7 mm程度出るように調整したものを使用した。実験前には必ず墨汁を使い脳室内投与の練習を行い、脳室内に投与されていることを解剖して確認した。恐怖記憶想起前の1時間前と恐怖記憶想起後の1時間後、CGRPとCGRP8-37の脳室内投与を行った。

2-5 AGPC法 ;RNA抽出方法

頸椎脱臼後、摘出したマウス脳をPBSで洗浄後、RNAlater に浸け直ちに、海馬を取り出しPBSで洗浄後、500 μ LのRLT buffer (Quagen)を加え、ピペッティング、シェイカーによりホモジナイズを行った。その後、2M酢酸ナトリウムを100 μ L加え、Tris-EDTA buffer で酸性に調整したフェノール溶液を加えvortexにより混和した。そこにクロロホルムを150 μ L加えさらに混和後、氷中で15分間反応させた。遠心機で15000 rpm 4 $^{\circ}$ Cで5分間遠心し、上清を別のチューブに回収し、イソプロパノールを500 μ L加え-80 $^{\circ}$ Cにて10分間以上保存した。冷凍後、15000 rpm 4 $^{\circ}$ Cで10分間遠心し上清を捨て、冷えた70%エタノールを加え15000 rpm、1分間遠心し上清を除去した。乾燥機を用いて沈殿物を乾燥させ、Nuclease free water (Quagen)を加え150 μ L加えて溶解後、8 M LiClを50 μ L加え混和し、-30 $^{\circ}$ Cにて60分間保存した。冷凍後、15000 rpmで10分間遠心し上清を捨てNuclease free water 150 μ Lと8 M酢酸アンモニウム50 μ Lを加え混和後、pH7.6 Tris-HClで調整したフェノール・クロロホルムを加え混和後、15000 rpmで2分間遠心した。上清を別のチューブに移し、100%エタノールを500 μ L加えて混和し-80 $^{\circ}$ Cで10分間以上保存した。冷凍後、15000 rpmで10分間遠心し上清を捨て冷えた70%エタノールを加え15000 rpm、1分間遠心し上清を除去した。乾燥機を用いて沈殿物を乾燥し、沈殿物の量に応じ10 μ L~20 μ LのNuclease free waterに溶かした。98 μ Lの蒸留水に2 μ LのRNA溶液を加えよく混ぜてから紫外吸光測定用のセルに移

して260 nmの吸光度を測定し、

「RNA 濃度 (ng/ μ L)=吸光度 \times 40 \times 40」の式によりRNA濃度を算出した。

2-6 Real time PCRにおける脳内遺伝子発現の評価方法

Real time PCR はPower SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies Ltd.)にプロトコルに従い行った。解析はEco Real time PCR system (Illumina, Inc., 東京)を用いた。それぞれの遺伝子をGAPDHにて補正し、 $\Delta\Delta$ Ct法にて解析を行った。

2-7 統計学的解析

得られたデータ値を平均値 \pm 標準誤差 (Mean \pm S. E. M) で表した。また、One-way ANOVA、Two-way ANOVA、t-test を用いて統計的処理を行い、いずれも有意水準5%以下を有意差ありと判定した。

3. 結果

3-1 恐怖記憶想起前にCGRPを投与

1日目に慣れ、2日目に恐怖条件付け、条件付けから1週間後にsaline、CGRP(0.5 nmol)あるいは、CGRP+CGRP8-37 (0.5 nmol:混合)を脳室内投与した。投与から1時間後には恐怖記憶を想起させ、翌日にすくみ時間を測定した (Fig. 1A)。恐怖記憶の想起を行うといずれの投与群においても200秒ほどのすくみ時間を示し、恐怖を記憶していた。しかし、翌日再び同じチャンバー内に入れると、既に安全な場所であると前日学習したため、いずれの投与群においてもすくみ行動は減少し、CGRP投与において100秒以下の値となった (Fig. 1B, C)。

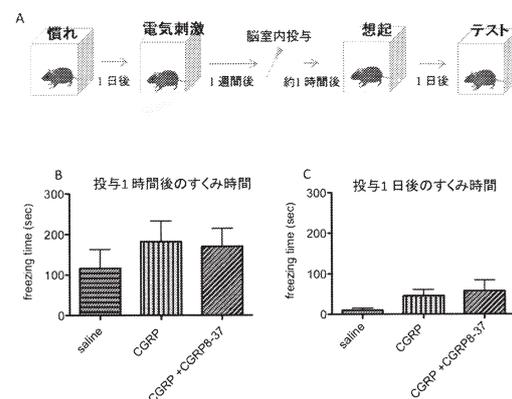


Fig. 1 Effects of CGRP intracerebroventricular administration before fear memory retrieval in mice. (A) Sequence of behavioral procedures for experiment. (B) Freezing time of a 1hr after

administration (n=5). (C) Freezing time of after 1 day administration (n=5). Each bar indicates the mean \pm S.E.M.

3-2 恐怖記憶想起後にCGRPを投与

1日目に慣れ、2日目に恐怖条件付け、条件付けから1週間後に想起を行った。想起から1時間後にsaline、CGRP (0.5 nmol)あるいはCGRP+CGRP8-37 (0.5 nmol:混合)を脳室内投与した。投与1日後にすくみ時間を測定した (Fig. 2A)。電気刺激を与えてから1週間経過しても、想起によりすくみ行動が200秒ほど観察され、恐怖を記憶していた。その後、CGRPを脳室内投与すると恐怖記憶消去がsaline投与群と比べ、すくみ時間は有意に高い値のままであった。また、その反応はCGRP受容体拮抗薬 (CGRP8-37)とCGRPの共投与によって有意に抑制され、salineと同程度まで減少した (Fig. 2B,C)。

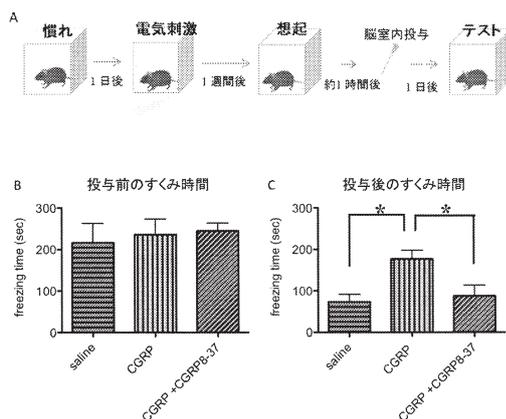


Fig. 2 Effects of CGRP intracerebroventricular administration after fear memory retrieval in mice. (A) Sequence of behavioral procedures for experiment. (B) Freezing time of 1 hr before administration (n=5). (C) Freezing time of 1 day after administration (n=5). Freezing time was observed for 5 min in context test. Each bar indicates the mean \pm S.E.M. One-way ANOVA by Tukey's test. * $P < 0.05$.

3-3 PicROTOXINE (GABA受容体拮抗薬) 投与による恐怖記憶への影響

CGRPによる恐怖記憶の形成にGABA神経系が関与するのではないかと仮説を立て、ピクトロキシン (GABA受容体拮抗薬; 3 mg/kg) を投与し、すくみ時間を測定した。本実験は1日目に慣れ、2日目に恐怖条件付け、1週間後に想起を行い、想起の1時間後にsaline、ピクトロキシン (3 mg/kg) の腹腔内投与を行い、さらに30分後にsalineあるいはCGRP (0.5 nmol) を脳室内投与した (Fig. 3A)。ピクトロキシン投与により、CGRPによる恐怖記憶消去阻害が有意に抑制された (Fig. 3B)。

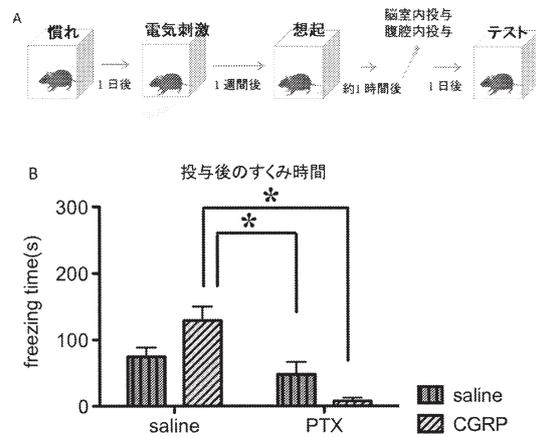


Fig. 3 PicROTOXINE (GABA receptor antagonist) inhibited CGRP-mediated fear extinction. (A) Sequence of behavioral procedures for experiment. (B) PicROTOXINE (3 mg/kg) was administered by intraperitoneal before CGRP i. c. v.. Freezing time was observed for 5 min in context test (n=9 animals per group). Each bar indicates the mean \pm S.E.M. Saline \times CGRP < 0.05 , Two-way ANOVA post-hoc comparison by Tukey. * $P < 0.05$, PTX; PicROTOXINE.

3-4 CGRP の恐怖記憶消去阻害作用の経時的变化

CGRPの恐怖記憶消去阻害作用がいつまで継続するかを検討した。1日目に恐怖条件付けを行った。1週間後に想起を行い、1時間後にsalineあるいはCGRP (0.5 nmol) を脳室内投与した。すくみ時間は脳室内投与を行った8日後、15日後、22日後の3回測定した (Fig. 4A)。CGRP 脳室内投与を行った8日後 (day15)においてCGRPによって恐怖記憶消去の阻害が有意に見られた。よって、CGRPの恐怖記憶消去阻害作用が約1週間継続することが分かった。(Fig. 4B)。

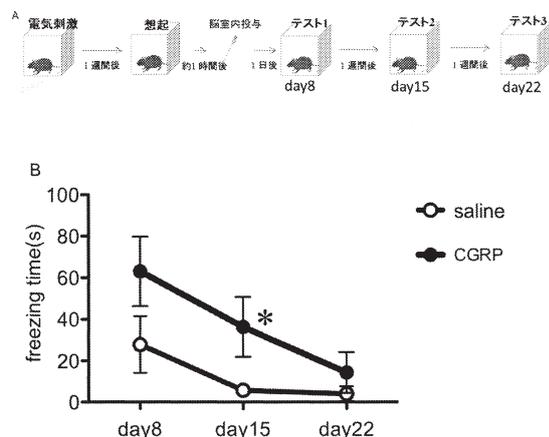


Fig. 4 Time course of CGRP inhibitory effect on fear memory extinction. (A) Sequence of behavioral procedures for experiment. (B) Freezing time of 1 day, 8 day and 15 day after CGRP administration (n=9). Each bar indicates the mean \pm S.E.M. t-test, * p <0.05.

3-5 記憶の想起をさせずに電気刺激の1週間後にCGRPを投与

CGRPの恐怖記憶阻害作用に記憶の想起が必要かどうか検討するために記憶の想起をさせずに、電気刺激の1週間後にCGRPを脳室内投与し、すくみ行動を観察した。1日目に恐怖条件付けを行った。1週間後に想起をさせずにsalineあるいはCGRP (0.5 nmol) を脳室内投与し翌日にすくみ行動を測定した (Fig. 5A)。恐怖記憶を想起させずにCGRPを投与するとすくみ時間がsaline投与群では150秒ほどに対し、CGRP投与群では100秒以下に減少し、恐怖記憶の消去が有意にみられた (Fig. 5B)。

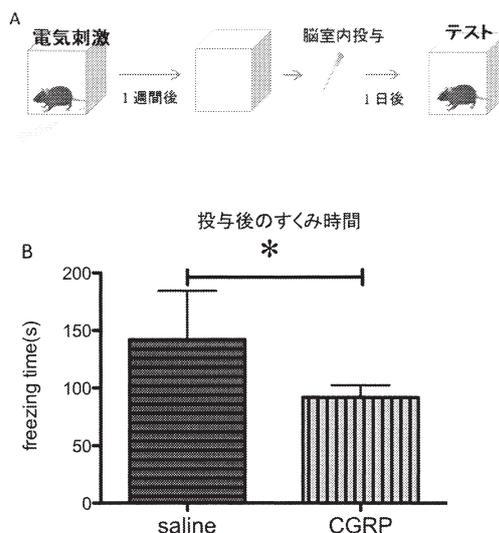


Fig. 5 Effect of CGRP intracerebroventricular administration fear conditioning 1 week later without fear memory retrieval. (A) Sequence of behavioral procedures for experiment. (B) Freezing time of 1 day after administration (n=5). Each bar indicates the mean \pm S.E.M. t-test, * p <0.05.

3-6 Real time PCRによる脳内遺伝子の検出

CGRP 脳室内投与による脳海馬における遺伝子発現量への影響を解析するため、Real time PCRを行った。CGRPを脳室内投与したマウス海馬において抑制性シナプス伝達を担うGABA合成に関与しているグルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) の発現量の確認を行った。2種類のアイソフォームであるGAD1 (GAD67), GAD2 (GAD65) においてCGRPによってGAD2のmRNA発現量の上昇が有意に見られた (Fig. 6B)。

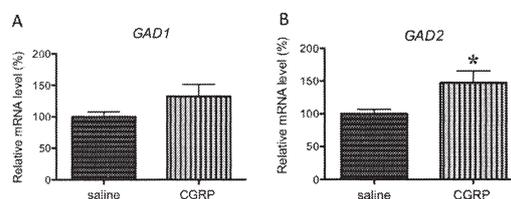


Fig. 6 Effects of CGRP administration on mRNA levels of *GAD1* and *GAD2*. (A) The levels of *GAD1* mRNA in the mice hippocampus by CGRP i.c.v. (n=6). (B) *GAD2* mRNA levels (n=7). Each bar indicates the mean \pm S.E.M. t-test, * p <0.05.

4. 考察

本実験では8週齢の雄性C57BL/6Jマウスを用いてCGRP脳室内投与における恐怖記憶への影響について恐怖文脈学習試験を用い検討した。まず、「記憶想起」とは一度覚えた記憶を「思い出す」過程のことを指す。特定のものを認識しているにも関わらず、その名前がなかなか思い出せないなどは記憶しているが想起ができない状態を示している。想起された記憶は固定化や再固定化の過程を誘導することもあるが、元の記憶と相反する記憶を誘導する消去学習 (extinction) の過程を誘導することもある。次に、消去学習とは恐怖条件付けにより恐怖反応を誘発するようになった動物に対し、条件刺激 (CS; チャンバー) を掲示すると電気刺激により表出する恐怖反応 (すくみ行動) が減弱する現象を示し、消去学習には前頭前野 (prefrontal cortex) と扁桃核 (amygdala) が深く関与することが知られている⁽³⁾。今回、我々の研究ではCGRPを記憶の想起後に投与した場合において恐怖記憶が消去されず保持されたままであった。本来、想起によってマウスは恐怖を経験した場所を安全な場所と学習するが、CGRP投与により学習は阻害された。想起によって不安定化した恐怖記憶がCGRPの作用で再び固定化することで恐怖記憶消去阻害に繋がったと考えられる。また、この反応はCGRP受容体拮抗薬 (CGRP8-37) によって有意に抑制されたことからCGRP受容体を介した反応であると示唆される (Fig. 1C, 2C)。

GABAは脳を通して見出され、ニューロンによって生成される抑制性神経伝達物質であり、GABA受容体と結びつき隣接ニューロンの働きを抑制する。今回、我々はCGRPによる恐怖記憶消去阻害がGABA神経系の誘発によるものと仮説を立てた。本実験では、CGRPによって恐怖記憶消去が阻害された。これはCGRPがGABA神経系に作用しニューロンの興奮が抑制されたためと考えられる。また、GABA受容体拮抗薬 (ピクロトキシン) 投与によって有意に抑制されたことからCGRPの恐怖記憶消去阻害作用にはGABA神経系が関与していることが示唆される (Fig. 3)。また、GABA作動性ニューロンにはグルタミン酸からGABAを合成するグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) が存在しGABA作動性ニューロン特異的に発現していることが知られている⁽⁴⁾。このGADには2種類のアイソフォームが存在し、GAD1 (GAD67) は細胞質全体に、GAD2 (GAD65) は神経終末部に豊富に存在している⁽⁵⁾。本実験では、CGRPによってGAD2のmRNA発現量が増加した。これは、CGRPがGAD2が豊富に存在する神経終末に作用しGABA作動性ニューロンが活発化したためと考えられる (Fig6)。

恐怖条件付け学習、消去学習の想起時において扁桃核基底外側核 (BLA) から単一細胞記録により、条件付

け刺激 (CS) に対して示す神経発火パターン解析から、すくみ反応が高い時に発火頻度が上昇する細胞 (恐怖細胞; Fear neuron) と消去学習を経験してすくみ反応が低下した際に発火頻度が増加する細胞 (消去細胞; Extinction neuron) が検出されており、恐怖反応と消去反応はそれぞれ異なる細胞が担うことが報告されている⁽⁵⁾。本実験において、電気刺激後にCGRPを想起させずに投与すると記憶の消去が促進された結果、想起後ではCGRPが恐怖細胞に作用し、想起なしではCGRPが消去細胞に作用したためにCGRPの働きが異なった可能性も考えられる。以上の結果により、CGRP恐怖記憶消去阻害作用は、記憶を一度想起させた後に効果を示し、GABA神経系が関与していることが示唆された。

参考文献

- 1) Sink K. S., Walker D. L., Yang Y. & Davis M., Calcitonin gene-related peptide in the bed nucleus of the stria terminalis produces an anxiety-like pattern of behavior and increases neural activation in anxiety-related structures. *J. Neurosci.* 31, 1802-1810, 2011.
- 2) Narumi Hashikawa-Hobara., Takumi Ogawa., Yusuke Sakamoto., Yumi Matsuo., Yoshito Zamami., and Naoya Hashikawa., Calcitonin gene-related peptide pre-administration acts as a novel antidepressant in stressed mice., *Sci Rep*, Aug 7;5, 12559, 2015.
- 3) Ekaterina Likhtik., Rony Paz., Amygdala-prefrontal interactions in adaptive learning., *Trends Neurosci.* 38 (3): 158-166, 2015.
- 4) J J Soghomonian., D L Martin., Two isoforms of glutamate decarboxylase: why?., *Trends Pharmacol. Sci.* 19 (12) 500-505, 1998.
- 5) M Esclapez., N J Tillakaratne., D L Kaufman., A J Tobin., C R Houser., Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms., *J. Neurosci.* 14 (3 pt 2), 1834-1855, 1994.
- 6) Cyril Herry., Stephane Ciocchi., Verena Senn., Lynda Demmou., Christian Muller., Andreas Lutjji., Switching on and off fear by distinct neuronal circuits., *Nature* 454 (7204): 600-606, 2008.

Effects of intracerebroventricular (i.c.v.) administration of CGRP on fear memory in mice

Shuta MISHIMA, Shota MATSUUCHI, Ami OTSUKA, Naoya HASHIKAWA
and Narumi HASHIKAWA

*Graduate School of Science, Okayama University of Science
1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan*

(Received October 5, 2018; accepted December 6, 2018)

Calcitonin-gene related peptide (CGRP) is a 37-amino acid neuropeptide, which plays a critical role in the central nervous system. It is known that CGRP administration improves anxiety-like symptoms and depression-like symptoms, but the influence of CGRP on fear memory learning is still unclear. In the present study, we investigated how the effect of CGRP was intracerebroventricular (i.c.v.) administered on fear memory learning used by “Contextual fear learning test”. CGRP injections (0.5 nmol) was non-significantly freezing time before fear memory was retrieval. However, the fear memory extinction was significantly inhibited by CGRP injections after fear memory was retrieval. In addition, this response was through CGRP receptor because it was inhibited by CGRP receptor antagonist (CGRP8-37) injection. Next, participation of GABA nervous system was revealed because CGRP and GABA receptor antagonist (Picrotoxine; 3mg/kg) injection were significantly inhibited by the fear memory extinction. Furthermore, result of examination time course of CGRP inhibitory effect on fear memory extinction, the fear memory was keeping after fear memory retrieval 1 week has passed. These results suggested fear memory extinction inhibitory by CGRP intracerebroventricular was effect after retrieval memory once and contribute GABA nervous system.

Keywords: calcitonin gene-related peptide; fear memory; retrieval; extinction; GABA.