

学位論文題名

The involvement of corticotropin releasing factor (CRF)
in cognitive and emotional functions
— Is CRF release a cause or result of anxiety/fear?

(コルチコトロピン遊離因子(CRF)と認知・情動機能との関係

— CRF 遊離は恐怖・不安の原因なのか結果なのか?)

学位論文内容の要旨

【Background and Objectives】 Appropriate responses to emotional stress are indispensable for threat avoidance and survival. For example, in the peripheral nervous system, adrenaline increases heart rate and thereby helps us run away from predators and/or conspecific enemy. Although such mechanisms must be organized in the central nervous system, little is known about the details. Whereas appropriate responses to emotional stress are important, too much anxiety and/or severe stress (or mild but chronic stress) often induces psychiatric disorders such as posttraumatic stress disorder, generalized anxiety disorder, panic disorder, and depression. The neural mechanisms of responses to emotional stress should be resolved for more efficient clinical treatments of these psychiatric disorders. To find a clue to resolving the neural mechanisms of responses to emotional stress, I have focused on corticotropin releasing factor (CRF), a neuropeptide that has been closely related to stress responses.

Many studies have demonstrated that CRF induces anxiety/fear-related behaviors. However, we have to interpret these results cautiously because high doses of CRF may stimulate CRF₂ receptor as well as CRF₁ receptor and behavioral tests reflect several aspects of cognition and emotion. Moreover, previous studies have shown that the stimulation of CRF₁ receptor may facilitate learning and memory retrieval. Given that the CRF₁ receptor is involved in learning and memory retrieval, we have to carefully evaluate the effects of CRF₁ receptor antagonists on anxiety/fear-related behaviors in memory-dependent tasks. It is possible that one confuses the effects of CRF₁ receptor antagonists on learning and memory retrieval with anxiolytic effects. If CRF and/or related peptides are involved in other cognitive functions such as attentional function as well as learning and memory retrieval, one may confuse the effects of CRF, related peptides and CRF receptors antagonists on cognitive functions with anxiogenic or anxiolytic effects even in memory-independent tasks. I addressed this issue in chapter 2.

Nevertheless, there are many studies indicating the involvement of CRF in anxiety/fear. Numerous studies have shown that serotonin in forebrain is involved in fear/anxiety and several studies have indicated that CRF is closely related to serotonergic activity. There are two origins of serotonergic projections to the forebrain in mammalian brain. Although one of the two, the dorsal raphe nucleus (DRN), has been extensively studied to date because DRN is relatively large nucleus and located in the shallow part of the brain, another origin, the median raphe nucleus (MRN), has been scarcely studied because the MRN is small nucleus and located in the deep part of the brain. It may be possible to make clear the relationship between CRF and anxiety/fear by elucidating the relationship between CRF and serotonergic system. I addressed this issue in chapter 3 and 4.

【Materials and Methods】 *Chapter 2:* I examined the effect of CRF on attentional function using a 5-choice serial reaction time task (5-CSRTT) in rats. Accuracy in the 5-CSRTT was used as the index of attentional function. Human/rat CRF was intracerebroventricularly injected (0, 0.01, 0.1, or

1 μg / 5 μl saline) 20 minutes before the beginning of the test trial in male Lister hooded rats that generally show high performance in the 5-CSRTT. Moreover, Wistar/ST rats, which generally show poor performance in the 5-CSRTT, were injected with 5 μl of 5% dimethylsulfoxide in saline (vehicle), 0.1 μg CRF in vehicle, 0.1 μg CRF + 5 μg antalarmin (CRF₁ receptor antagonist) in vehicle or 5 μg antalarmin in vehicle into the lateral ventricle.

Chapter 3: I examined the role of CRF in the MRN on fear-related behaviors in rats. I employed the contextual fear conditioning test and the elevated plus-maze test as memory-dependent and -independent tasks, respectively. Human/rat CRF (10 ng) in 0.5 μl saline was injected into the MRN 15 minutes before the beginning of the test.

Chapter 4: I determined the subtype of CRF receptors in the MRN responsible for the effect of CRF on fear expression. To assess the levels of anxiety/fear, I employed the contextual fear conditioning test (CFC) and the elevated plus maze test (EPM) as memory-dependent and -independent tasks, respectively. I injected CRF receptor antagonists or vehicle into the MRN 10 minutes before behavioral tests. Antalarmin, a CRF₁ receptor antagonist, was dissolved in a solution of 5% Camphor, 5% ethanol, and 90% saline. Astressin (nonselective CRF receptor antagonist) and astressin 2B (CRF₂ receptor antagonist) were dissolved in saline containing 0.1% bovine serum albumin. The doses of each antagonist were as follows: antalarmin 250 ng, astressin 250 ng, and astressin 2B 1000 ng.

[Results] *Chapter 2:* As a result, 0.1 μg of CRF, but not other doses of CRF, increased accuracy in the 5-CSRTT. However, 0.1 μg of CRF did not affect impulsivity, motivation/appetite, perseverative tendency, or motor function. Even when Wistar/ST rats were used, 0.1 μg of CRF increased accuracy in the 5-CSRTT. However, the effect of CRF was not significantly attenuated by intracerebroventricular injection of the CRF₁ receptor antagonist antalarmin (5 μg).

Chapter 3: Administration of CRF (10 ng) significantly increased memory dependent, but not independent, fear expression.

Chapter 4: Intra-MRN injection of 1000 ng of astressin 2B and 250 ng of astressin, but not 250 ng of antalarmin, significantly suppressed the expression rate of freezing behavior in the CFC. However, in the EPM, there was no difference between astressin 2B-injected rats and saline-injected rats on the time spent in the open arms. Neither the amount of exploratory behavior nor the moving distance in the EPM of astressin 2B-injected rats differed from those of vehicle-injected rats.

[Discussion] *Chapter 2:* These results showed that CRF selectively enhances attentional function regardless of baseline attentional performance and rat strain, but this effect may be due to the pathways other than CRF₁ receptors. The present results suggest that CRF is involved in stress-related changes of attention and indicate that moderate stress, but not severe stress, may enhance attentional performance. Furthermore, these findings also indicate that the CRF-related substance could be a target for the development of an agent to improve attentional function.

Chapter 3: These results suggest that CRF release in the MRN is involved in the retrieval of fear memory. Since serotonergic neurons in the MRN projects to dorsal hippocampus, medial septum, hypothalamus and frontal cortex, endogenous CRF and/or related peptides may activate serotonergic neurons in the MRN and thereby modulate the neural activity of the these sites and facilitate fear memory retrieval.

Chapter 4: These results indicated that endogenous CRF and/or related ligands release in the MRN induces memory-dependent fear expression via the stimulation of CRF₂ receptor. CRF₂ receptor in the MRN would play a pivotal role in fear memory retrieval and might be able to be a target for more efficient clinical treatments of mental disorders such as posttraumatic stress disorder.

[Conclusion] Since CRF enhances attentional function as shown in chapter 2, it is possible that most previous studies have confused the effects of CRF, related peptides and CRF receptors antagonists on cognitive functions such as attentional function with anxiogenic or anxiolytic effects. Moreover, the effect of CRF was observed in memory-dependent task, and the effect was due to the stimulation of CRF₂ receptor, but not CRF₁ receptor. Taken together, the present findings and previous findings indicate that CRF is responsible for stress responses to cope with dangerous situations, but not for fear/anxiety itself.

学位論文審査の要旨

主査 教授 本間 研一
副査 教授 吉岡 充弘
副査 教授 福島 菊郎
副査 教授 神谷 温之
副査 教授 三輪 聡一

学位論文題名

The involvement of corticotropin releasing factor (CRF) in cognitive and emotional functions — Is CRF release a cause or result of anxiety/fear?

(コルチコトロピン遊離因子(CRF)と認知・情動機能との関係

— CRF 遊離は恐怖・不安の原因なのか結果なのか?)

本研究は、コルチコトロピン遊離因子(CRF)が認知・情動機能に与える影響について行動薬理学的手法を用いて追究したものである。CRF をラットの側脳室内に投与すると注意機能が上昇するが、この効果はラットの系統を変えても同じように見られた。しかし、CRF₁受容体拮抗薬によってCRFの効果を減弱させることはできなかったことから、CRFが注意機能に与える影響はその他の経路を介していることが推察された。また、CRF および CRF₁/CRF₂受容体拮抗薬をセロトニン神経起始核の1つである正中縫線核(MRN)に微量注入し、恐怖・不安関連行動との関係について検討した結果、MRNにおけるCRFは記憶に依存する恐怖・不安関連行動にのみ関与し、記憶に依存しない生得的な恐怖反応には関与しないことが示され、さらにその影響がCRF₂受容体を介していることが示された。以上の新たな知見と先行研究の結果を総合し、申請者は、脳内CRFは恐怖・不安の原因ではなく結果である可能性が高いと結論した。

学位審査の口頭試問において、副査の福島教授から、注意機能の測定系が厳密に注意機能を評価できるものであるかどうかについての質問があった。これに対し、申請者は注意機能以外の認知機能が当評価系に一部紛れ込む可能性を認めた。また、各種パラメータのベースラインが実験ごとに大きく異なる理由についての説明が求められた。申請者はこれに対し、動物の系統差、評価方法、手術法などの観点から適切な説明を行った。さらに、一部の実験結果が一致しないことについての説明も求められたが、申請者は先行研究の知見を引用しつ

つ、薬物投与経路の観点から適切な説明を行い、二つの研究の結果は必ずしも矛盾していないことを示した。

続いて副査の三輪教授から、CRF₁受容体拮抗薬の用量の妥当性について質問がなされた。これに対し、申請者は先行研究を引用し、使用用量が適切であったことを説明した。また、CRF₂受容体が関与する可能性についての質問がなされた。申請者はこれに対し、先行研究および自身の予備的実験結果を引用して適切に回答した。さらに内因性のCRFの役割を追求する上では外因性にCRFを与えるよりもストレス負荷を行った上で拮抗薬を用いるのが適切ではないかという質問がなされた。これに対し、申請者は質問者の提案する方法の方がより目的に沿っているが、ストレスの強度と認知機能の関係は複雑であるため実験実施上困難であるとの見解を示した。

続いて副査の神谷教授からMRNに投射するCRF神経の由来について質問が為された。申請者はこれに対し先行研究を引用した上で自身の仮説を提示した。また、CRFの分泌様式について質問された。申請者は先行研究を引用しCRFがシナプス小胞に充填されることから開口放出による形式を取っているとの見解を示した。さらに、CRFの効果を仲介した経路について仮説を提示するよう求められた。これに対し申請者は先行研究を引用し、bioactive fragmentがCRF受容体以外の経路に作用している可能性を提示した。加えてCRFの用量反応性が逆U字型であることの説明も求められたが、申請者はストレスの強弱と認知機能の関係についての過去の知見から適切な説明を行った。

続いて主査の本間教授から概日リズムが実験結果に与える影響についての質問が為された。申請者はこれに対し、実験実施時間は統制しているが、試験遂行中にライトを使用するため、ラットの概日リズムに影響を与える可能性があり、実験結果における誤差が大きくなっている可能性を認めた。また、動物を訓練する上での律速段階についての質問が為された。これに対し申請者はラットの学習のポイントおよび最も訓練を要する段階について実験実施者としての主観と客観的データを交えて説明した。さらにCRHではなくCRFという用語を使用することの妥当性についての質問が為された。これに対し申請者は国際薬理学連合でCRFが用いられるに至った経緯を説明した。

続いて副査の吉岡教授から、今回用いた評価系が今後使用可能なものなのかどうかについて質問が為された。これに対し申請者は新薬のスクリーニングのための評価系としては妥当であり、特定の認知機能のみを厳密に測定する上では多少の問題点があるとの見解を示した。

この論文は、CRFと認知・情動機能との関係をより明確にし、さらに従来の一般的見解とは異なる斬新な仮説を提起したものである。審査員一同は、これらの成果を評価し、大学院博士課程における研鑽や取得単位なども併せて、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。