

博士論文

下辺縁皮質ドーパミンシグナルによる
恐怖の復元の制御

今村 菜津子

目次

要旨	5
緒言	7
不安障害の治療と再発	7
恐怖条件づけ	7
恐怖を制御する脳領域	8
恐怖の発現と抑制を担う神経回路	10
実験方法および使用薬物	12
マウス	12
文脈的恐怖条件づけ	12
手術・薬物投与	15
免疫組織化学染色	16
画像取得・解析	17
電気生理学的検討	18
結果	20
弱い電気ショックにより恐怖反応が復元する	20
恐怖の復元時に下辺縁皮質の活動が低下する	20
下辺縁皮質の抑制により恐怖反応が増大する	21

復元に伴い下辺縁皮質においてシナプス伝達が減弱する	22
復元誘導刺激は下辺縁皮質に投射するドーパミン性細胞を活性化する . . .	23
復元は下辺縁皮質のドーパミン D ₁ 受容体依存である	24
下辺縁皮質のシナプス減弱はドーパミン D ₁ 受容体依存である	24
扁桃体の活動変化は下辺縁皮質のドーパミン D ₁ 受容体依存である	25
下辺縁皮質へのドーパミン投与は復元を誘導しない	25
図	27
考察	40
復元時の神経活動の変化	40
条件づけ学習と復元の違い	42
復元に伴う下辺縁皮質の変化	43
復元とドーパミン	44
復元メカニズムの普遍性	47
参考文献	48
謝辞	59

略語一覧

扁桃体

BLA … 基底外側核、basolateral nucleus of the amygdala

LA … 外側核、lateral nucleus of the amygdala

BA … 基底核、basal nucleus of the amygdala

CeM … 内側中心核、medial division of the central nucleus

CeL … 外側中心核、lateral division of the central nucleus

ITC … 間在核、intercalated amygdala cells

内側前頭前皮質、medial prefrontal cortex (mPFC)

IL… 下辺縁皮質、infralimbic region

PL … 前辺縁皮質、prelimbic region

海馬

DG … 齒状回、dentate gyrus

腹側被蓋野、ventral tegmental area (VTA)

要旨

恐怖は生物が環境に適応して生存するために重要な情動である。しかし不安障害においては過剰な恐怖が症状の悪化に寄与している。近年、不安障害に対する治療法として、患者を恐怖の対象に徐々にさらしていくことで恐怖を克服させる曝露療法が注目されている。曝露療法は、脳に元来備わっている“恐怖を抑制する機構”を利用することで不安障害を治療する。しかし、再発率が約40%と非常に高いことが問題となっている。再発のメカニズムは依然として不明である。実験動物においても、恐怖条件づけ後に、嫌悪刺激と関連付けられた中立的な刺激のみを再提示する消去学習を行うことにより、恐怖反応は減弱する。しかし、消去学習の効果は永続的ではなく、しばしば恐怖は「復元」する。本研究は、恐怖の復元メカニズムを解明することにより、不安障害の再発メカニズムの一端を明らかにすることを目的とした。マウスに実験環境で電気ショックを与え、環境と電気ショックの関係を学習させた。翌日、環境に長時間再提示し続けることにより消去学習をさせると、恐怖反応は徐々に低下した。このマウスに、単独では条件づけが成立しない程度の弱い電気ショックを与えると、再び高い恐怖反応を示すようになった（復元）。復元に関与する脳領域を探索するため、最初期遺伝子 **c-Fos** を用いて神経活動をマッピングした。復元時は、消去学習に関与すると考えられている、下辺縁皮質および間在核の活動が低下していた。一方で、恐怖の発現に必須な脳領域である中心核が活性化していた。また電気生理学的解析により、復元に伴い下辺縁皮質のシナプス伝達が減弱することを明らかにした。さらに、復元誘導時に下辺縁皮質に投射するドーパミン細胞が活性化すること、恐怖の復元が下辺縁皮質のドーパミン **D₁** 受容体依存であることを明らかにした。復元に伴う下辺縁皮質のシナプス減弱および

扁桃体の活動変化も、共に、下辺縁皮質のドパミン D₁ 受容体依存であった。

これらの結果から、下辺縁皮質のドパミンシグナルは、消去学習に関わる神経回路を抑圧して扁桃体中心核を脱抑制することにより、復元に寄与すると考えられる。

緒言

不安障害の治療と再発

恐怖は生物が環境に適応して生存するために重要な情動である。過剰な恐怖は不安障害などの精神疾患の原因となる。例えば、心的外傷後ストレス障害 (Post-Traumatic Stress Disorder, PTSD) は自然災害、戦争、暴力行為、事故など衝撃的事象の経験後に生じる精神疾患である。PTSD はパニック発作、うつ、睡眠障害、離人感、失感情などの症状を引き起こし、生活の質を著しく低下させる。PTSD 治療には選択的セロトニン再取込阻害薬、ベンゾジアゼピン等が用いられるが、奏効しない症例が多い (Foa et al., 2002; Ehlers and Clark, 2003)。そのため、恐怖を制御する脳内メカニズムを解明し、適切に制御することは、神経科学における重要な課題である。近年、不安障害に対する治療法として、認知行動療法の一つである曝露療法が注目されている。曝露療法は、患者を恐怖の対象に徐々にさらしていくことにより、脳に元来備わっている“恐怖を抑制する機構”を利用して、恐怖を克服させる治療法である (McNally, 2007)。しかし、不安障害患者において臨床上問題となっている再発率の高さは、認知行動療法においても解決できていない。不安障害患者の約 4 割が、治療後の再発に苦しんでいる (Bruce et al., 2005; Ansell et al., 2011)。そして、このような再発のメカニズムは依然として不明である。

恐怖条件づけ

恐怖を制御する神経基盤は、恐怖条件づけ課題を用いた研究により明らかにされてきた。恐怖条件づけ課題は、電気ショックなどの嫌悪刺激（無条件刺激）

と音や実験環境のような中立的な刺激（条件刺激）の関係を学習させる課題である（Phillips and LeDoux, 1992; LeDoux, 2000）。条件づけが成立すると、実験動物は条件刺激の提示に対して恐怖反応を示すようになる。しかし、条件刺激のみの再提示を続けると恐怖反応は徐々に消失する。これは、恐怖記憶が失われる忘却によるのではなく、実験動物が「条件刺激は危険ではない」という新たな学習（Extinction, 消去学習）をすることにより、恐怖の発現が抑制されるためだと考えられている（Morgan et al., 1993; Myers and Davis, 2002; Quirk et al., 2006; Herry et al., 2010）。消去学習は曝露療法の科学的基盤と考えられている（Davis, 2002; Quirk et al., 2006）。しかし、消去学習の効果は永続的ではない。条件刺激に対する恐怖反応は消去学習によって現れなくなるが、無条件刺激を単独で与えることにより復元（Reinstatement）する（Rescorla and Heth, 1975; Myers and Davis, 2007; Vervliet et al., 2013）。復元は不安障害の再発の一因となると考えられるが、そのメカニズムは不明である。

恐怖を制御する脳領域

破壊実験、薬理学実験、神経活動の測定などにより、恐怖の制御に関わる脳領域が明らかにされてきた。中でも扁桃体、内側前頭前皮質（mPFC）、海馬は、恐怖の制御に重要な役割を持つ（Kim et al., 1993; Morgan and LeDoux, 1995; Maren et al., 1996; Sierra-Mercado et al., 2011）。

扁桃体は情動の中核と考えられており、組織学的に複数の亜核に分けられる（Sah et al., 2003）（Fig. 1）。扁桃体内側中心核（CeM）は扁桃体の出力核であり、視床下部や中脳水道周囲灰白質などに投射を持つ（De Oca et al., 1998; Ehrlich et al., 2009）。CeM の神経活動は、恐怖反応の発現に必要かつ十分であること

が知られている (Ciocchi et al., 2010)。扁桃体基底外側核 (BLA) は、条件づけ学習における条件刺激と無条件刺激の連合の場である (LeDoux, 2000; Hashikawa et al., 2013)。条件づけが成立すると、学習時に活動した神経細胞が条件刺激の提示に対して優先的に活動し、記憶を想起させて恐怖反応を引き起こすと考えられている (Han et al., 2007; Zhou et al., 2009; Nomura et al., 2011; Nonaka et al., 2014)。間在核 (ITC) は中心核と BLA の間に存在する抑制性神経細胞である。ITC は BLA から入力を受け、中心核に対して出力する (Amir et al., 2011; Busti et al., 2011; Mańko et al., 2011)。ITC は消去学習に必須であることが示されており (Likhtik et al., 2008)、CeM の活動を抑制することにより扁桃体からの出力を遮断して、恐怖の発現を抑制すると考えられている (Amano et al., 2010)。

mPFC は下辺縁皮質 (IL)、前辺縁皮質 (PL) 等の亜領域に分けられる (Fig. 1)。IL、PL 共に、扁桃体と相互投射を持つと考えられており、特に IL は ITC に直接投射を持つことが示されている (Cho et al., 2013)。古典的な破壊実験から、mPFC は消去学習に必要であると考えられてきた (Morgan et al., 1993)。さらに近年になり亜領域を区別した検討が進むと、IL と PL は消去学習において異なる機能を持つことが示唆された。IL および PL を消去学習時に薬理的に抑制すると、IL を抑制した場合のみ消去学習が阻害される (Sierra-Mercado et al., 2011)。また、IL の電気刺激は消去学習を促進する一方で、PL の電気刺激は消去学習を抑制する (Vidal-Gonzalez et al., 2006)。このような知見から、IL および PL はそれぞれ、恐怖反応の発現を負および正に制御すると考えられている (Sotres-Bayon and Quirk, 2010; Lüthi and Lüscher, 2014)。

海馬も恐怖条件づけに関わり、特に文脈的恐怖条件づけにおいて必須である

ことから、環境の情報を処理していると考えられている (Selden et al., 1991; Kim and Fanselow, 1992; Phillips and LeDoux, 1992, 1994; McHugh et al., 2007) (Fig. 1)。消去学習も環境特異性のある学習であり、海馬が関与すると考えられている (Ji and Maren, 2007; Tronson et al., 2009)。海馬は扁桃体および mPFC に対して投射を持っており、これらの脳領域が相互作用することによって正常な学習が成立すると考えられている (Sotres-Bayon et al., 2012; Moustafa et al., 2013)。

恐怖の発現と抑制を担う神経回路

神経回路は経験に基づいて可塑的に変化し、記憶痕跡として脳内に固定化される。動物の情動や行動は、それぞれに対応した神経回路が活性化することにより制御されると考えられている。恐怖条件づけをすると恐怖の発現を司る神経回路が活性化し、可塑的に変化して、記憶痕跡として **Fear circuit** が形成されると考えられている (Sotres-Bayon and Quirk, 2010; Marek et al., 2013)。**Fear circuit** には BLA、PL、海馬などが含まれ、その下流で CeM が活性化することにより恐怖反応を誘導すると考えられている。一方、消去トレーニングにより恐怖反応が現れなくなるのは、**Fear circuit** が消失するためではなく、**Fear circuit** を上書きして抑制するような新しい回路 (**Extinction circuit**) が形成されるためであると考えられている (Herry et al., 2008)。**Extinction circuit** には IL、ITC、BLA 等が含まれる。IL は、ITC を介して CeM の活動を抑制することにより消去学習に関わると考えられている (Milad et al., 2004; Amir et al., 2011; Cho et al., 2013) (Fig. 1)。このように消去学習は、恐怖条件づけにより形成された記憶痕跡を消し去る忘却ではなく、元の恐怖を上

書きして抑制すると考えられている。行動学的には、消去学習の効果が永続的ではなく、時間経過や環境の変化、無条件刺激の再提示などにより恐怖が復元することが、元の恐怖が完全に消失してはいないことを示唆している (Herry et al., 2010)。

復元は、恐怖条件づけおよび消去学習による神経回路編成の後に起こる現象であるため、これらの神経回路メカニズムが明らかになって初めて研究対象とすることが可能になる。近年、恐怖条件づけと消去学習のメカニズムが脳領域レベル、神経回路レベル、分子レベルで明らかになってきており、復元のメカニズム解明の足場が整いつつある。そこで本研究は、恐怖復元の神経回路メカニズムを解明することにより、不安障害の再発メカニズムの一端を明らかにすることを目的とした。

実験方法および使用薬物

実験は、東京大学大学院薬学系研究科のガイドラインに従い、実験動物への苦痛を最小限に抑える努力のもとにおこなった。

マウス

日本 SLC より購入した C57BL/6J (♂)を 4 匹ずつ、12 時間の点灯サイクル、自由摂食・摂水下で飼育した。行動試験開始の 2 日前から個別に飼育した。実験開始までに 1 週間のハンドリングをおこなった。行動試験開始時のマウスは 8 – 15 週齢であった。行動試験は 9 – 14 時の間におこなった。

文脈的恐怖条件づけ

マウスに実験環境と床からの電気ショックを関連づけて学習させた。実験環境でマウスが示したすくみ反応の時間（無動時間）を測定し、全時間に占める割合を算出して恐怖の指標とした。実験中のマウスの行動はすべてビデオに録画し、すくみ反応時間は NIH ImageJ を用いて自動的に算出した。算出方法は (Nomura and Matsuki, 2008) を参考にした。

条件づけ、消去学習、復元の誘導は以下のようにおこなった (Fig. 2) (Shen et al., 2013)。マウスを条件づけ環境 A (四角柱透明アクリル壁、白色光、グリッドの床) に入れ、150 秒後に 1 mA の電気ショックを 2 秒間与え、その後 150 秒間隔で計 3 回電気ショックを与えた (条件づけ、FC)。60 秒後にマウスをホームケージに戻した。翌日、ショックを与えない状態で環境 A に 40 分間再曝

露した（消去トレーニング、Extinction training）。翌日、環境 A に 5 分間再曝露して、恐怖反応が消失していることを確認した（Test 1）。翌日、環境 B（三角柱白色アクリル壁、赤色光、グリッドの床）に入れた直後に 0.6 mA、2 秒間の Reminder shock を与え、すぐに取り出しホームケージに戻した。さらに翌日、環境 A に 5 分間再提示してすくみ反応時間を測定し、復元が生じているかを評価した（Test 2）。なお、ナイーブのマウスに対して、環境 B で 0.6 mA、2 秒間の電気ショックを与えてすぐに取り出し、翌日環境 A に提示した場合のすくみ反応時間は $6.0 \pm 2.1\%$ と低かったことから、Reminder shock 単独では条件づけが成立しないことを確認した。

実験① 恐怖の想起時、消去時、復元時の神経活動の検出:

マウスは 3 群に分けた。Fear 群は、1 日目に条件づけ、2 日目に 5 分間環境 A に再提示し（Test 0）、90 分後に脳を摘出した。Extinction 群は、1 日目に条件づけ、2 日目に消去トレーニング、3 日目に Test 1 をおこない、Test 1 の 90 分後に脳を摘出した。Reinstatement 群は、1 日目に条件づけ、2 日目に消去トレーニング、3 日目に Test 1、4 日目に Reminder shock 提示、5 日目に Test 2 をおこない、Test 2 の 90 分後に脳を摘出した（Fig. 3）。行動試験をおこなわず、ホームケージにいるマウスの脳を摘出したものをナイーブコントロールとした。

実験② IL の活動低下の復元への十分性の検証:

1 日目に条件づけ、2 日目に消去トレーニング、3 日目に Test 1 をおこなった。4 日目に蛍光標識されたムシモール ($0.25 \mu\text{g}/\text{side}$) もしくは PBS を IL に

局所投与し、30 分後に Test 2 をおこなった (Fig. 5)。Test 2 の後に脳を摘出し、蛍光シグナルを観察することで IL に薬物が投与できていることを確認した。

実験③ IL の電気生理学的性質の変化の検討 I :

mEPSC の記録には、実験①と同様の Fear 群、Extinction 群、Reinstatement 群を用いた。最後のテストの 60 – 90 分後に脳を摘出した (Fig. 6)。

実験④ IL の電気生理学的性質の変化の検討 II :

ペアパルス比の記録には、以下のマウスを用いた。Reinstatement 群は実験③と同様。Extinction 群は、1 日目に条件づけ、2 日目に消去トレーニング、3 日目に Test 1 をおこなった。4 日目に環境 B に数秒間曝露し、ホームケージに戻した。5 日目に Test 2 をおこない、60 – 90 分後に脳を摘出した (Fig. 7)。

実験⑤ IL に投射する VTA 神経細胞の活動の検出 :

Alexa 488-conjugated cholera toxin subunit B (0.5ug/side, Life Technologies) は、行動試験開始の 3 日前に投与した。1 日目に条件づけ、2 日目に消去トレーニング、3 日目に Test 1 をおこなった。4 日目、Reminder shock 群は環境 B で Reminder shock を与え、No shock 群は環境 B に数秒間曝露し、ホームケージに戻した。90 分後に脳を摘出した (Fig. 8)。

実験⑥ D₁ 受容体の復元への必要性、および、D₁ 受容体阻害が IL の電気生理学的性質と扁桃体の活動に与える影響の検討:

1 日目に条件づけ、2 日目に消去トレーニング、3 日目に Test 1 をおこなった。4 日目に SCH23390 (1 µg/side) もしくは PBS を IL もしくは PL に局所投与し、30 分後に Reminder shock を与えた。5 日目に Test 2 をおこなった。電気生理学的性質の検討の実験では、Test 2 の 60 – 90 分後に脳を摘出した。扁桃体の活動に与える影響の検討の実験では、Test 2 の 90 分後に脳を摘出した (Fig. 9 – 12)。

実験⑦ IL のドパミンシグナルの復元への十分性の検討:

1 日目に条件づけ、2 日目に消去トレーニング、3 日目に Test 1 をおこなった。4 日目にドパミン (30 µg/side) を IL に局所投与した。5 日目に Test 2 をおこなった。

手術・薬物投与

キシラジン (10 mg/kg, i.p.)、ペントバルビタール (2.5 mg/kg, i.p.) 麻酔下で、26 ゲージのステンレスガイドカニューレ (Plastics One) を IL (A/P 1.7 mm, L/M ±0.3 mm, D/V -3.0 mm) もしくは前辺縁皮質 (A/P 2.0 mm, L/M ±0.3 mm, D/V -2.2 mm) をターゲットとして埋め込み、歯科用セメントで固定した。薬物投与まで、詰まりを防ぐために 33 ゲージのダミーカニューレを挿入した。手術後、7 日間以上の回復期間の後に行動試験をおこなった。薬物投与には 28 ゲージの投与カニューレを用いた。2 分間かけて薬液を投与し、投与終了後 1 分

間静置した。行動試験後に、カニューレの跡および蛍光色素の投与により、薬物投与位置を確認した。

免疫組織化学染色

マウスにエーテル麻酔を施し、灌流固定後脳を摘出、後固定を 8 時間おこない、20 % スクロース / PBS 溶液に一晩、30 % スクロース / PBS 溶液に二晩浸漬させた。脳をドライアイスで急速凍結させ、-80 °C で保存した。クリオスタットを用いて 40 μ m 厚の切片を作製し、PBS に浮遊させ免疫染色をおこなった。

DAB 染色は以下の要領でおこなった。0.2 % Triton-X-100 を 15 分間処置、PBS で洗浄、0.03 % H_2O_2 を 30 分間処置、PBS で洗浄、2 % goat serum で 60 分間ブロッキングをおこない、一次抗体 (rabbit anti-c-Fos (Ab-5) (CalBiochem, 1 : 5000)) を 4 °C で二晩処置した。PBS で洗浄後、二次抗体 (Biotinylated anti-Rabbit IgG (1 : 500)) を室温で 2 時間処置、PBS で洗浄後、avidin-biotin 複合体 (1 : 100) を室温で 90 分間処置、TBS で洗浄、Diaminobenzidine (0.03 %) 、0.01 % H_2O_2 で 7 分間反応させた。TBS、0.01 M PB で洗浄し、切片をスライドに貼り付け、一晩乾燥させた。エタノールで脱色し、キシレンで透徹した後、マリノールで封入した。

蛍光染色は以下の要領でおこなった。0.2 % Triton-X-100、5 % goat serum で 60 分間ブロッキングをおこない、一次抗体 (rabbit anti-c-Fos (Ab-5) (CalBiochem, 1 : 1000), mouse anti-tyrosine hydroxylase antibody (MAB318, 1:500; Millipore)) を 4 °C で一晩処置した。PBS で洗浄後、二次抗体 (goat

anti-rabbit biotinylated antibody (BA-1000, 1 : 500), Alexa Fluor 405 goat anti-mouse IgG secondary antibody (A31553, 1:400; Life Technologies)) を室温で 2 時間処置、PBS で洗浄後、avidin-biotin 複合体 (1 : 100) を室温で 90 分間処置、PBS で洗浄、TSA-Cyanine 3 (SAT704A001EA, 1:1000; Perkin-Elmer) を室温で 1 時間処置した。切片をスライドに貼り付け、Permafluor (ThermoShandon, Pittsburgh, PA) で封入した。

画像取得・解析

DAB 染色画像は AF7000 蛍光顕微鏡システム (Leica AF6000, 10x objective lens (NA, 0.3))を用いて取得した。蛍光染色画像は共焦点顕微鏡 (CV1000, 40x objective lens (NA, 1.3); 横河電気) を用いて取得した。ImageJ を用いて、各脳領域における c-Fos 陽性細胞の密度を算出した。解析はブラインドでおこなった。解析に用いた画像の座標は以下の通り：内側前頭前皮質 (bregma between 2.2 mm and 1.5 mm)、扁桃体 (bregma between -1.2 mm and -1.8 mm)、海馬 (bregma between -1.5 mm and -2.0 mm)、腹側被蓋野 (bregma between -2.9 to -3.4 mm)。内側前頭前野皮質は下辺縁皮質 (infralimbic region, IL) と前辺縁皮質 (prelimbic region, PL) に分けて解析した。扁桃体は、外側核 (lateral nucleus, LA)、基底核 (basal nucleus, BA)、外側中心核 (lateral division of the central nucleus, CeL)、内側中心核 (medial division of the central nucleus, CeM)、腹側間在核 (ventral intercalated amygdala cells, ITCv)、背側間在核 (dorsal ITC, ITCd) を区別して解析した。海馬は、CA 1 野、CA 2 野、CA 3 野、歯状回 (dentate gyrus, DG) を区別して解析した。

電気生理学的検討

マウスにエーテル麻酔を施し、脳を摘出、95% O₂ / 5% CO₂ を十分に通気し氷冷した ACSF 溶液 (127 NaCl、1.6 KCl、1.24 KH₂PO₄、1.3 MgSO₄、2.4 CaCl₂、26 NaHCO₃、10 Glucose (in mM)) 中に入れた。95% O₂ / 5% CO₂ を十分に通気し氷冷した mACSF 溶液 (222.1 Sucrose、27 NaHCO₃、1.4 NaH₂PO₄、2.5 KCl、0.5 ascorbic acid、1 CaCl₂、7 MgSO₄ (in mM)) 中に脳を移し、ビブラトーム VT 1200S (Leica) を用いて IL を含む厚さ 300 μm の冠状急性スライス標本を作製した。作成した標本は、通気した 37 °C の ACSF 溶液中で 30 分間インキュベートした後、室温にてさらに 30 分間インキュベートしてから使用した。スライス標本を記録用チャンバーに移し、95% O₂ / 5% CO₂ を十分に通気した ACSF 溶液 (30-32°C) を灌流した (1.5-3 ml/min)。赤外線微分干渉法を用い、顕微鏡下で IL 第 5 層の錐体細胞を目視により特定し、ホールセル記録をおこなった。ガラス電極は外径 1.5 mm のホウケイ酸ガラスキャピラリー (World Precision Instruments) より作成し、以下に示す組成の溶液を満たした (in mM): 120 K-gluconate、5 KCl、10 HEPES、1 MgCl₂、10 phosphocreatine-Na₂、2 MgATP、0.1 NaGTP、0.2 EGTA、2 biocytin、pH 7.2-7.3、280-295 mOsm。データの取得には Axopatch 700B amplifier (Axon Instruments)、DIGIDATA 1440A (Axon Instruments) を用い、20 kHz でサンプリングをおこない、2 kHz のフィルターをかけた。

抑制性シナプス電流を阻害するため、ピクロトキシン (100 μM) を添加した ACSF を使用した。IL 第 2/3 層に刺激電極を置き 50 μs、1–40 μA の電流パルスを与えた。50 ms 間隔で paired 刺激を与え、2 回目と 1 回目の興奮性シナプス後電流 (EPSC) の強度比 (ペアパルス比) を算出した。微小興奮性シナ

ブス後電流 (mEPSC) は、テトロドトキシン ($1\ \mu\text{M}$) 存在下、電位固定モード ($-70\ \text{mV}$) にて測定した。定期的に脱分極性パルスを注入することでアクセス抵抗を測定し、これが $40\text{M}\Omega$ 未満のものについてのみ解析した。検出には自作の MATLAB プログラムを用い、 $7\ \text{pA}$ 以上の強度を持つ内向き電流を mEPSC と定義した。decay time と rise time を、それぞれ mEPSC のピークから強度が $1/e$ になるまでの時間、および mEPSC の立ち上がりにおいて強度が 10-90 % になるまでの時間として算出した。rise time が decay time よりも長いようなイベントについては、偽陽性として排除した。記録後、急性スライス標本を 4 % パラホルムアルデヒドに浸し、 4°C にて一晩インキュベートし、細胞を固定した。翌日、スライス標本を 0.1% triton X、streptavidin-Alexa 594 ($4\ \mu\text{g/ml}$) 溶液に浸し、 4°C にて一晩インキュベートすることで、記録した細胞を染色した。染色像は共焦点顕微鏡 CV1000 にて観察し、記録した細胞が IL 第 5 層に存在することを確認した。

結果

弱い電気ショックにより恐怖反応が復元する

文脈的恐怖条件づけ課題を用いて、マウスに実験環境 A と電気ショックの関係を学習させた (Fig. 2)。環境 A 内でマウスに電気ショックを与え (条件づけ, FC)、翌日、環境 A に 40 分間再曝露した (消去トレーニング, Extinction training)。すくみ反応 (freezing) は時間経過に伴い減少し、この消去学習の効果は 3 日目の環境 A 再曝露時 (5 分間、Test 1) まで維持された。ところが、4 日目に弱い電気ショック (Reminder shock) を与えると、5 日目に環境 A に再曝露した際 (5 分間、Test 2) 再びすくみ反応時間が長くなった (復元, reinstatement)。Reminder shock は、条件づけ環境とは異なる環境 B で、環境暴露の直後に与えた。ナীবマウスに対して同様の方法で弱い電気ショックを与え、翌日環境 A でテストをした場合のすくみ反応時間は短かった ($6.0 \pm 2.1\%$, $n = 5$)。このことから、Reminder shock 単独では恐怖反応を誘導しないと考えられる。

恐怖の復元時に下辺縁皮質の活動が低下する

復元に伴う実験環境での神経活動の変化を調べるため、神経活動依存的に発現するタンパク質である c-Fos を神経活動マーカーとして利用した。恐怖の復元時 (Reinstatement 群) の c-Fos 発現パターンを、恐怖の想起時 (Fear 群) および消失時 (Extinction 群) と比較した (Fig. 3A)。テストのにおいて Fear 群が高いすくみ反応時間を示したのに対し、Extinction 群のすくみ反応時間は低く、Reinstatement 群は Fear 群と同程度の高いすくみ反応時間を示した

(Fig. 3B)。テストの 90 分後に脳を摘出し、c-Fos を免疫染色により可視化した。c-Fos 陽性細胞密度を測定し、安静時の c-Fos の発現を反映すると考えられるナীবマウスの値を 100 % とした場合の相対値として比較した。内側前頭前皮質、扁桃体および海馬に着目して、亜領域ごとの陽性細胞密度を測定した (Fig. 4)。Fear 群は、PL、BA、CeM、CA1 で c-Fos 陽性細胞がナীবマウスに比較して増加していた。Extinction 群は、IL、BA、ITCv、CeL で c-Fos 陽性細胞がナীবマウスに比較して増加していた。これに対して Reinstatement 群では、BA、CeM で c-Fos 陽性細胞がナীবマウスに比較して増加していた。Extinction 群と Reinstatement 群の間に有意な差が認められた、すなわち、復元に伴い活動が変化した脳領域は IL、ITCv、CeM の 3 領域であった。IL および ITCv の c-Fos 陽性細胞は、Extinction 群に比較して Reinstatement 群で低下していた。一方、CeM の c-Fos 陽性細胞は増加していた。このことから、復元時には IL および ITCv の活動が低下し、CeM の活動が上昇していることが明らかになった。Reminder shock の提示により IL の活動が低下した結果、ITCv を介した CeM への抑制が減弱することにより、消去学習により抑制されていた恐怖が復元すると考察される。

下辺縁皮質の抑制により恐怖反応が増大する

消去学習後の IL の活動低下が、恐怖反応の増大に十分である可能性を検証した。IL の活動を抑制するために、GABA_A 受容体作動薬であるムシモールを IL に局所投与した (Fig. 5C)。条件づけ、消去トレーニング、テスト 1 をおこなったマウスにムシモール (0.25 µg/side) を投与し、テスト 2 でのすくみ反応時間を比較した (Fig. 5A)。ムシモール群はコントロール群に比較して高いすくみ

反応を示したこと (Fig. 5B) から、IL の活動低下は恐怖反応を増大させることが示唆された。これは、消去時には活性化していた IL が復元時には活性化しなくなることが恐怖の復元に寄与するという仮説と一致する結果である。

復元に伴い下辺縁皮質においてシナプス伝達が減弱する

IL の神経細胞の電気生理学的な性質の変化を検討するため、Fear 群、Extinction 群および Reinstatement 群の脳急性スライス標本を作製し (Fig. 6A)、パッチクランプ記録により微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC) を測定した (Fig. 6B)。mEPSC は神経伝達物質の自発的放出により生じるシナプス後電流である。mEPSC 頻度はシナプス入力の強さ (プレシナプスからの神経伝達物質の放出確率およびシナプスの数) を反映し、mEPSC 強度はポストシナプスに存在する受容体の感度を反映すると考えられている。Reinstatement 群は Extinction 群に比較して mEPSC 頻度が減少した (Fig. 6C)。一方で、mEPSC 強度に関しては群間に有意な差は認められなかった (Fig. 6D)。この結果は、復元に伴い IL へのシナプス入力が減弱することを示唆している。さらに、Reinstatement 群の Test 1 と Test 2 のすくみ反応時間の差を復元値 (Δ freezing) として mEPSC 頻度との相関を調べたところ、有意な負の相関が認められた (Fig. 6E)。

より詳細に検討するために、連続した 2 度の電気刺激に対するシナプス電流の大きさの比 (ペアパルス比) を測定した (Fig. 7A, B)。ペアパルス比の増大は、神経伝達物質の放出確率の減少を反映する。Reinstatement 群は Extinction 群に比較してペアパルス比が増大していたことから、プレシナプスからの神経伝達物質の放出確率が減少していることが示唆された (Fig. 7C)。さらに、復元

値とペアパルス比の間には有意な正の相関があった(Fig. 7D)。これらの結果は、復元に伴い IL においてプレシナプス性のシナプス減弱が生じることを示唆している。

復元誘導刺激は下辺縁皮質に投射するドパミン性細胞を活性化する

電気ショックなどの嫌悪刺激の提示により内側前頭前皮質でドパミンが放出されることが知られている (Abercrombie et al., 1989; Hamamura and Fibiger, 1993; Feenstra et al., 2000)。また、内側前頭前皮質のドパミン D₁ 受容体刺激はプレシナプス性にシナプス伝達を減弱させることが知られている (Law-Tho et al., 1994; Gao et al., 2001)。これらのことから、弱いショックの提示により下辺縁皮質の活動が低下する現象にドパミンが関与し、恐怖を復元させるのではないかと考え、これを検証した。

まず、Reminder shock の提示時に IL に投射を持つドパミン性細胞が活性化するかを検証した (Fig. 8A)。IL への主要なドパミン性神経投射元である中脳腹側被蓋野 (ventral tegmental area, VTA) に着目した (Hoover and Vertes, 2007)。IL に神経トレーサーであるコレラトキシン B (CTB) を局所投与し (Fig. 8B)、逆行性シグナルにより、IL に投射を持つ VTA 神経細胞を特定した。VTA には、約 65 % のドパミン性神経細胞の他に、約 30 % の GABA 性神経細胞、約 5 % のグルタミン酸性神経細胞が存在する (Tan et al., 2012) ため、ドパミン性細胞マーカーとしてチロシン水酸化酵素 (TH) を免疫染色した。CTB 陽性かつ TH 陽性の細胞は、IL に投射するドパミン性細胞と同定できる。これらの神経細胞が Reminder shock を与えた時に活性化したかどうかを調べるため、Reminder shock を与えた 90 分後に脳を摘出し、神経活動マーカーの c-Fos

を免疫染色した (Fig. 8C)。CTB 陽性かつ TH 陽性細胞のうち、c-Fos 陽性の細胞の割合を計算した。Reminder Shock 群は、実験環境 B に入れただけで Reminder shock を与えなかったコントロール群 (No shock 群) に比較して、c-Fos 陽性細胞の割合が高かった (Fig. 8D)。一方、CTB 陽性かつ TH 陰性細胞のうち、c-Fos 陽性の細胞の割合は、両群で同程度であった (Fig. 8E)。以上より、IL へ投射するドパミン性細胞が Reminder shock により活性化することが示唆された。

復元は下辺縁皮質のドパミン D₁ 受容体依存である

IL のドパミンシグナルが恐怖の復元に必要である可能性を検証した (Fig. 9A)。Reminder shock を与える前に、ドパミン D₁ 受容体阻害薬である SCH23390 (1 µg/side) を IL に局所投与した (Fig. 9C)。翌日マウスを実験環境に再曝露すると、SCH23390 処置群はコントロール群に比較してすくみ反応時間が短く、復元が阻害された (Fig. 9B)。一方、IL に隣接する脳領域である前辺縁皮質 (PL) に SCH23390 を局所投与した場合には、両群の間に差は認められなかった (Fig. 10)。このことから、恐怖の復元には IL の D₁ 受容体シグナルが必要であることが示された。

下辺縁皮質のシナプス減弱はドパミン D₁ 受容体依存である

IL の D₁ 受容体の活性化がシナプス減弱に必要である可能性を検証した (Fig. 11A)。Reminder shock を与える前に SCH23390 (1 µg/side) を IL に局所投与し、翌日の Test 2 の後に脳を摘出して、IL の神経細胞から mEPSC を

測定した (Fig. 11B)。コントロール群の mEPSC 頻度は、前述の Reinstatement 群 (Fig. 6C) と同程度であった。これに対し SCH23390 処置は mEPSC 頻度が高く (Fig. 11C)、この値は前述の Extinction 群 (Fig. 6C) と同程度であった。すなわち、復元時にみられる IL のシナプス伝達の減弱は D₁ 受容体シグナル依存であると考えられる。一方で、mEPSC 強度には有意な差は認められなかった (Fig. 11D)。

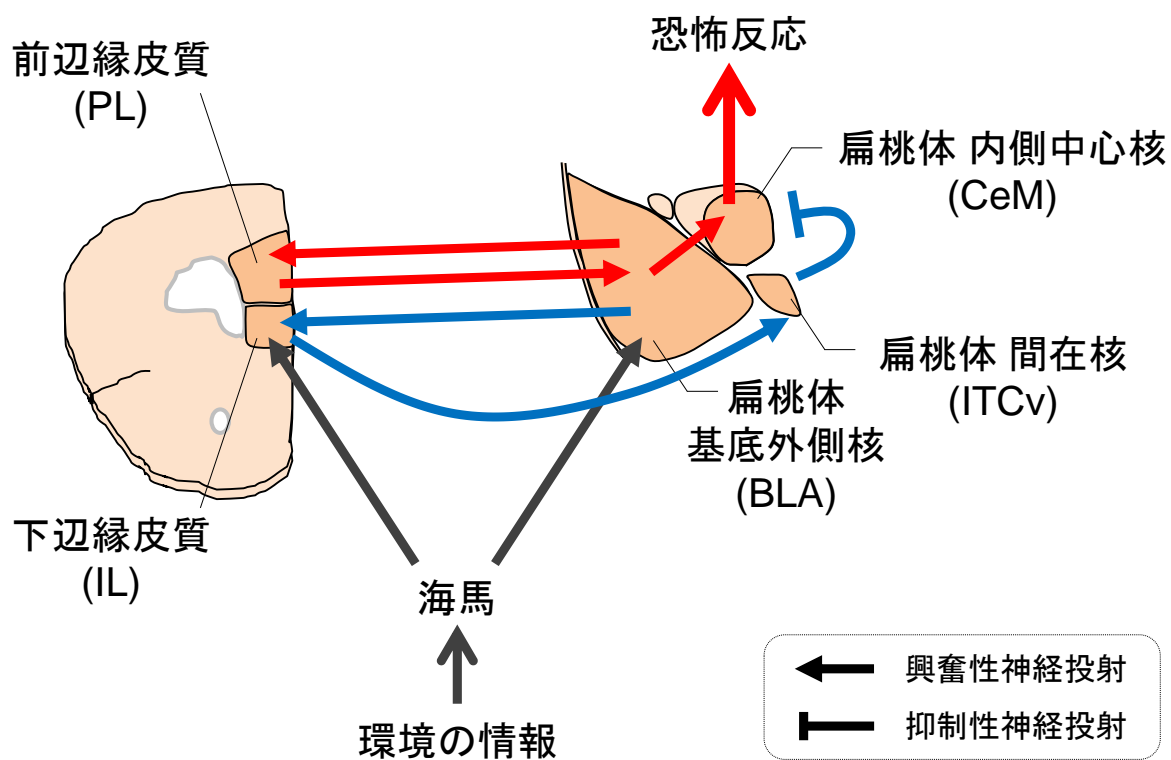
扁桃体の活動変化は下辺縁皮質のドパミン D₁ 受容体依存である

IL の D₁ 受容体阻害が実験環境での扁桃体の活動パターンの変化に与える影響を検討した。Reminder shock を与える前に SCH23390 (1 µg/side) を IL に局所投与し、翌日のテスト 2 の後に脳を摘出して c-Fos の免疫染色をおこなった (Fig. 12A)。コントロール群は前述の Reinstatement 群 (Fig. 4B) 同様、ITCv の活動は低く CeM が活性化していた。これに対し SCH23390 処置群は、前述の Extinction 群 (Fig. 4B) と同様、ITCv が活性化しており CeM の活動は低かった (Fig. 12B)。すなわち、IL の D₁ 受容体阻害は、復元に伴う扁桃体の活動パターンの変化を阻害することが示された。

下辺縁皮質へのドパミン投与は復元を誘導しない

IL のドパミンシグナルの活性化が復元の誘導に十分である可能性を検証した。Reminder shock を与える代わりに IL にドパミンを投与することで恐怖が復元するかを検証した。条件づけ、消去トレーニング、Test 1 をおこない、4 日目にドパミン (30 µg/side) を IL に局所投与した。翌日、条件づけ環境に再

提示しすくみ反応時間を計測した (Test 2)。Test 1 のすくみ反応時間が $44.2 \pm 4.9\%$ だったのに対して、Test 2 のすくみ反応時間は $37.8 \pm 3.3\%$ であり、すくみ反応時間の上昇は認められなかった ($p = 0.26$, paired t -test, $n = 7$)。このことから、IL のドパミンシグナルは復元に必要ではあるものの、それ単独では復元を誘導しないことが示唆された。



mPFC および扁桃体の投射関係の模式図。赤色の矢印は、恐怖の発現に関わると考えられている神経回路（Fear circuit）を表す。青色の矢印は、恐怖の抑制に関わると考えられている神経回路（Extinction circuit）を表す。

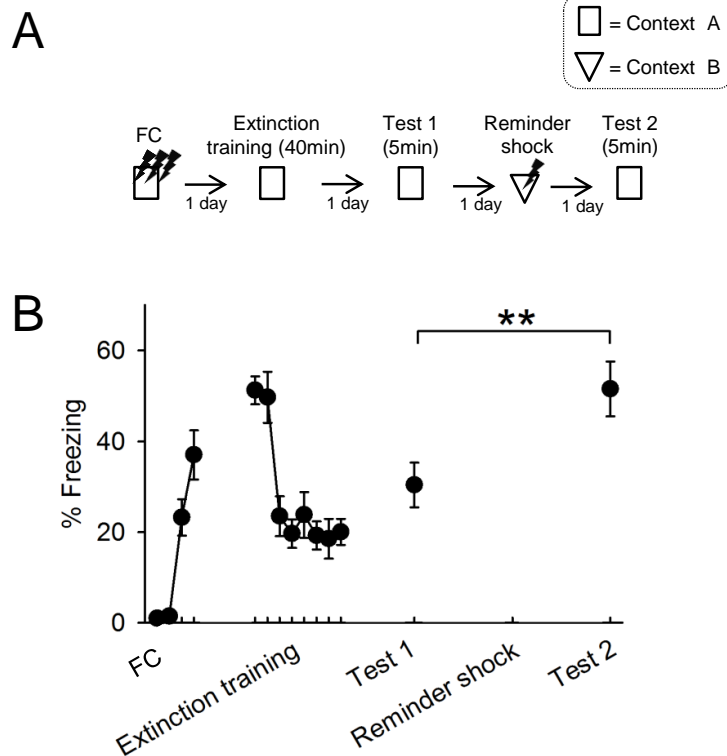


Fig. 2 弱い電気ショックによる恐怖の復元

A) 行動実験パラダイム。実験環境 A で 3 回電気ショックを与えることにより恐怖条件づけ (FC) をおこなった。翌日、環境 A に 40 分間再曝露し続ける消去トレーニング (Extinction training) をおこなった。翌日の Test 1 で、Extinction training の最初の 5 分間に比較してすくみ反応が低下していることを確認した。翌日、環境 B で Reminder shock を与えた。翌日、環境 A で Test 2 をおこなった。

B) すくみ反応時間の変化。FC の各点は、ショックを与える前、1 度目のショックの後、2 度目のショックの後、3 度目のショックの後のすくみ反応時間を表す。Extinction training、Test 1、Test 2 の各点は、5 分間のすくみ反応時間を表す。Reminder shock を与えることにより、Test 2 でのすくみ反応時間が Test 1 に比較して高くなったことから、恐怖が復元していることが分かる。

** $p < 0.01$. paired t -test. Mean \pm SEM of 10 mice.

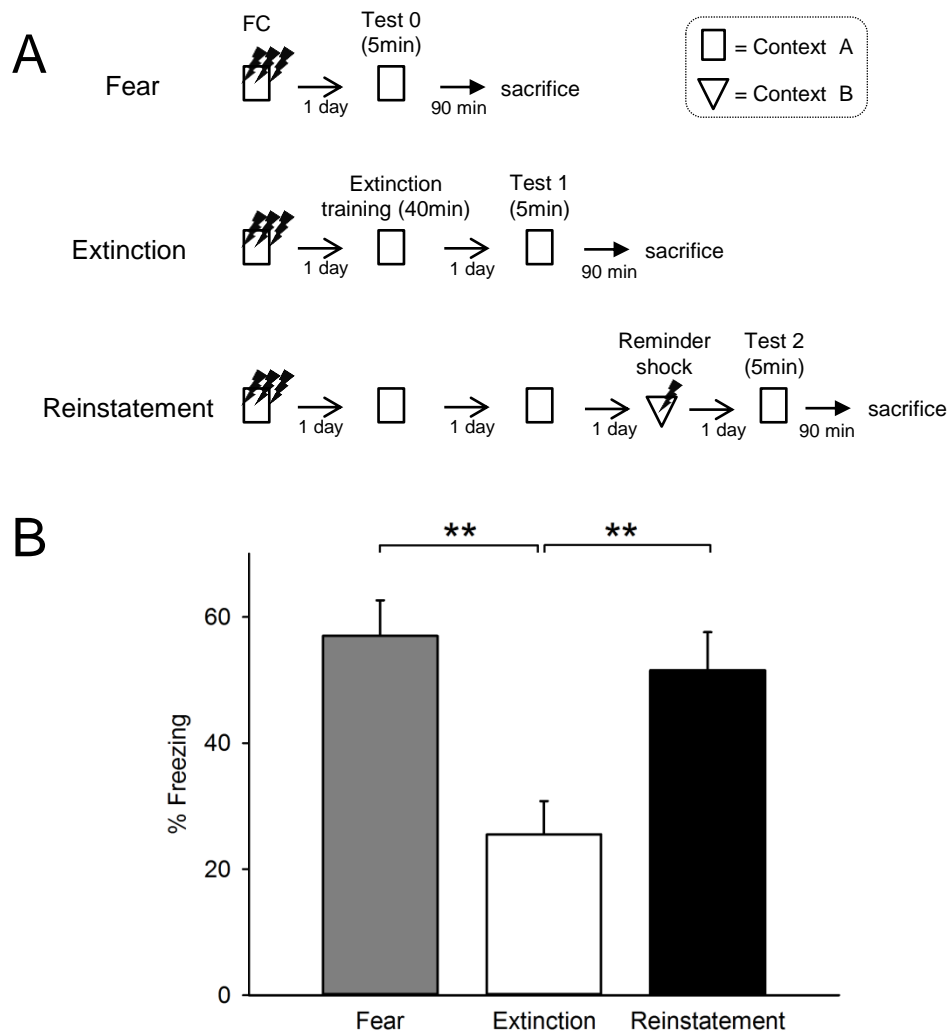


Fig. 3 c-Fos 免疫染色に用いたマウスの行動実験パラダイム

A) 行動実験パラダイム。Fear 群は Test 0、Extinction 群は Test 1、Reinstatement 群は Test 2 の 90 分後に脳を摘出して c-Fos の免疫染色をすることで、それぞれの Test 時の神経活動を調べた。

B) 各群のテスト時のすくみ反応時間。Fear 群は Test 0、Extinction 群は Test 1、Reinstatement 群は Test 2 におけるすくみ反応時間を表す。** $p < 0.01$. Tukey's test after ANOVA. Mean \pm SEM of 8-11 mice.

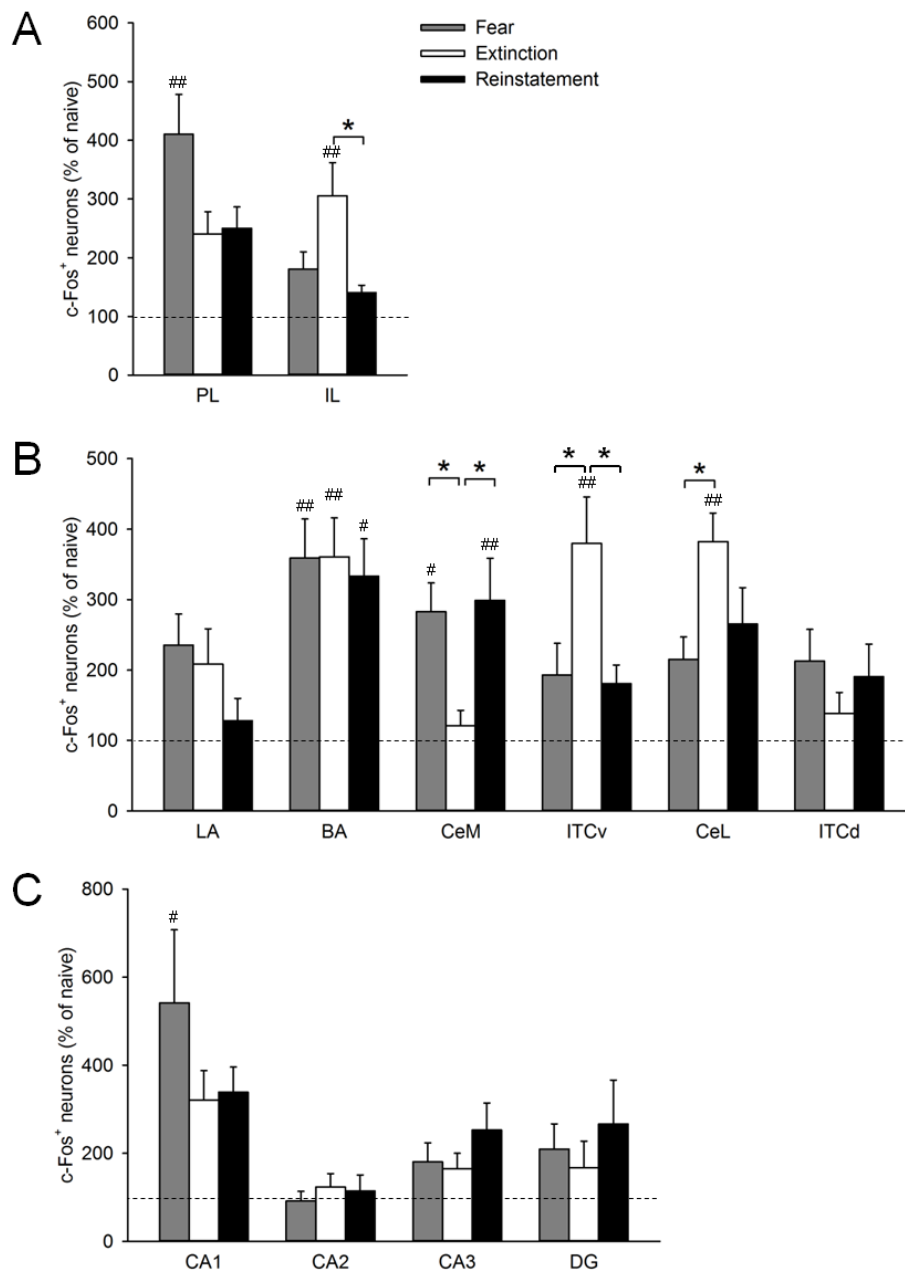


Fig. 4 復元に伴う実験環境での c-Fos 発現パターンの変化

内側前頭前皮質 (A)、扁桃体 (B)、海馬 (C) の亜領域における c-Fos 陽性細胞密度。ナীবマウスの値 (点線) を 100 % とした相対値。^{##} $p < 0.01$, [#] $p < 0.05$ vs naïve mice. ^{*} $p < 0.05$. Tukey's test after ANOVA. Mean \pm SEM of 8-11 mice.

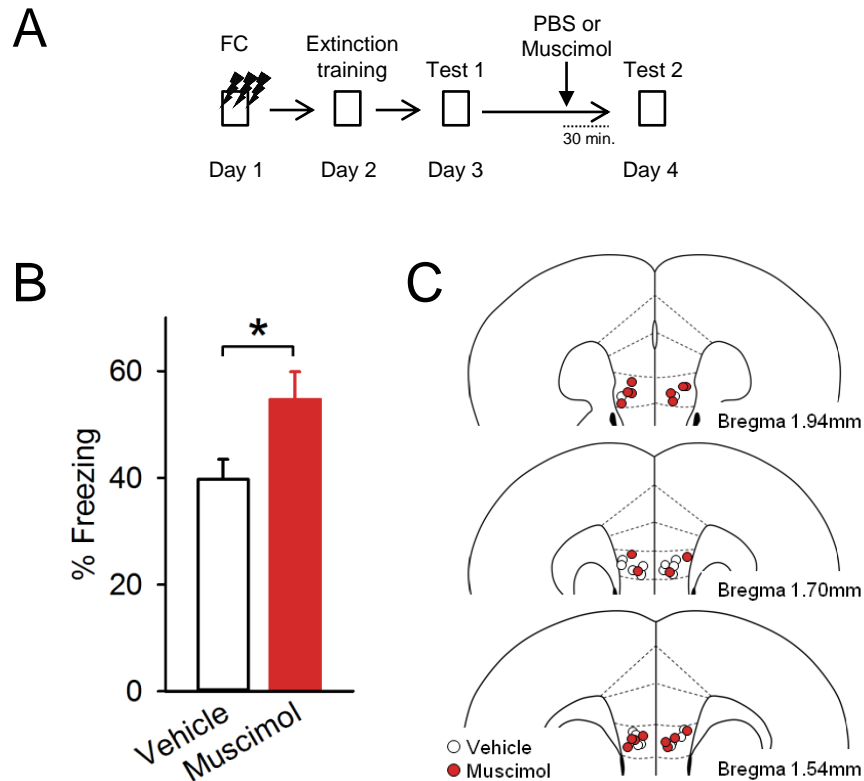


Fig. 5 IL の抑制による恐怖反応の増大

A) 行動実験パラダイム。条件づけ、消去トレーニング、Test 1 をおこなったマウスに、Muscimol または PBS (Vehicle)を IL に局所投与し、30 分後に Test 2 をおこなった。

B) Test 2 でのすくみ反応時間。Muscimol 投与群は、コントロール群に比較してすくみ反応時間が長かった。Muscimol: 0.25 μ g/side, * $p < 0.05$. Student's t -test. Mean \pm SEM of 10 mice.

C) 薬物投与位置。各点は投与カニューレの位置を示す。

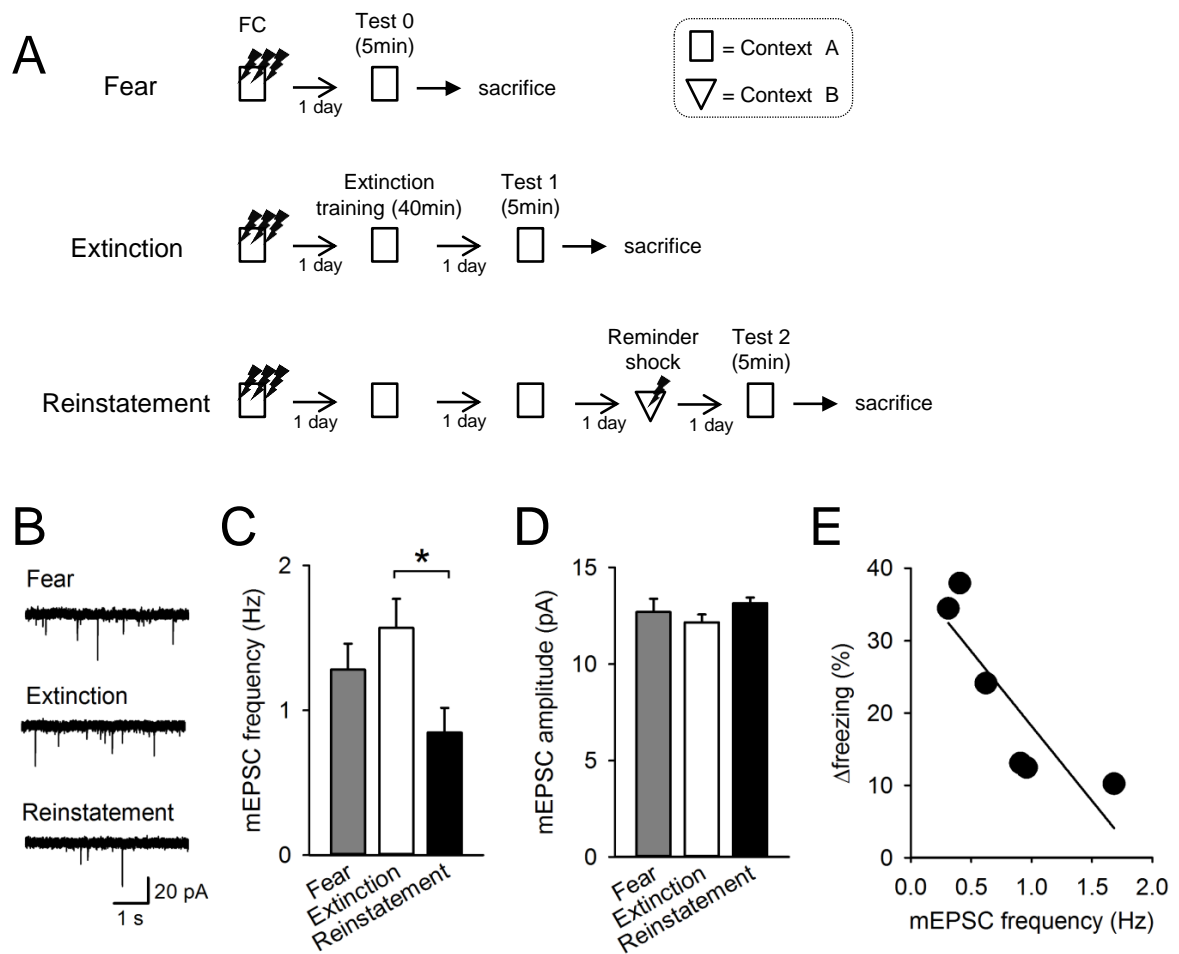


Fig. 6 復元に伴う IL へのシナプス入力 of 減弱

A) 行動実験パラダイム。

B) mEPSC の代表波形。記録は、IL の第 5 層の細胞よりおこなった。

C) Reinstatement 群は、Extinction 群に比較して mEPSC 頻度が低かった。

* $p < 0.05$, Tukey's test after ANOVA. Mean \pm SEM of 8 cells.

D) 各群の mEPSC 強度は同程度だった。Mean \pm SEM of 8 cells.

E) mEPSC 頻度とすくみ反応時間の変化の関係。Reinstatement 群において、Test 1 と Test 2 のすくみ反応時間の差を算出し、復元値 Δ freezing (%) とした。両者の間に有意な負の相関が認められた。 $r = -0.83$, $p = 0.040$. N = 6 mice.

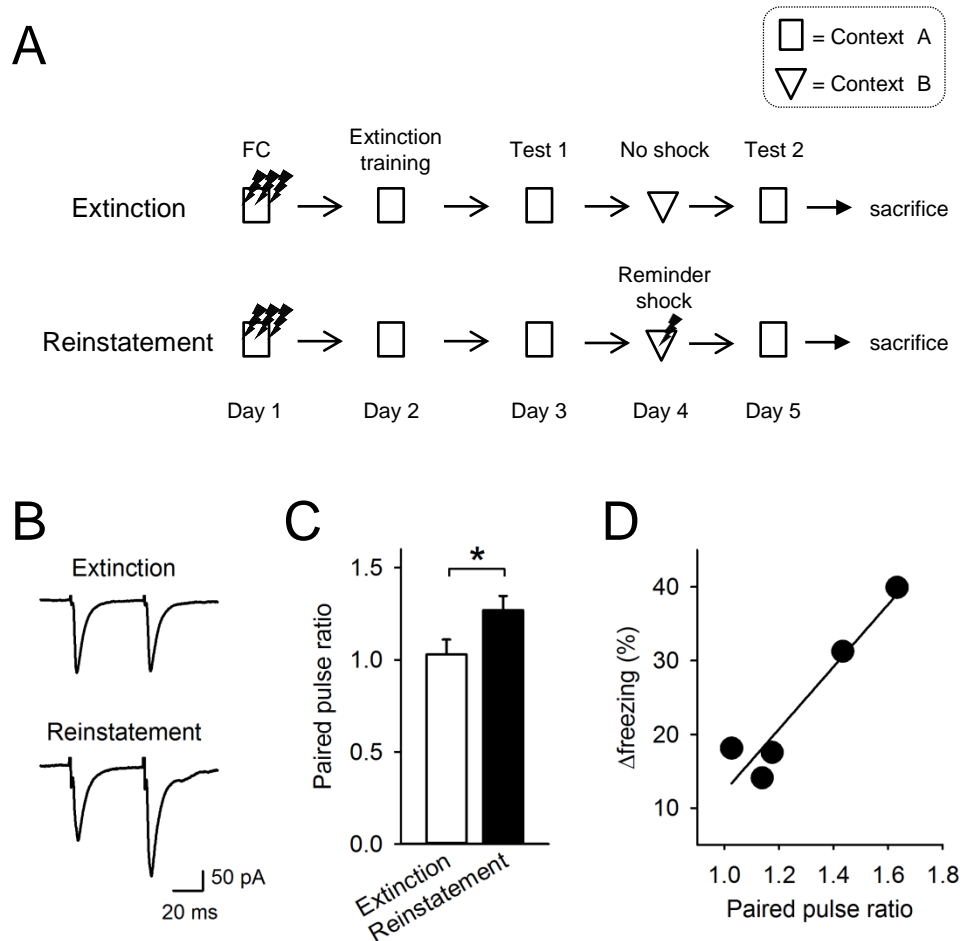


Fig. 7 復元に伴う IL でのプレシナプス性のシナプス伝達減弱

A) 行動実験パラダイム。

B) ペアパルス応答の代表波形。連続した 2 度の電気刺激に対するシナプス電流の大きさの比（ペアパルス比）を測定した。IL の第 2/3 層を刺激し、記録は第 5 層の細胞よりおこなった。

C) Reinstatement 群は、Extinction 群に比較してペアパルス比が大きかった。

* $p < 0.05$, Student's t -test, Mean \pm SEM of 8 cells.

D) ペアパルス比とすくみ反応時間の変化の関係。Reinstatement 群において、Test 1 と Test 2 のすくみ反応時間の差を算出し、復元値 Δ freezing (%) とした。両者の間に有意な正の相関が認められた。 $r = 0.95$, $p = 0.012$. N = 5 mice.

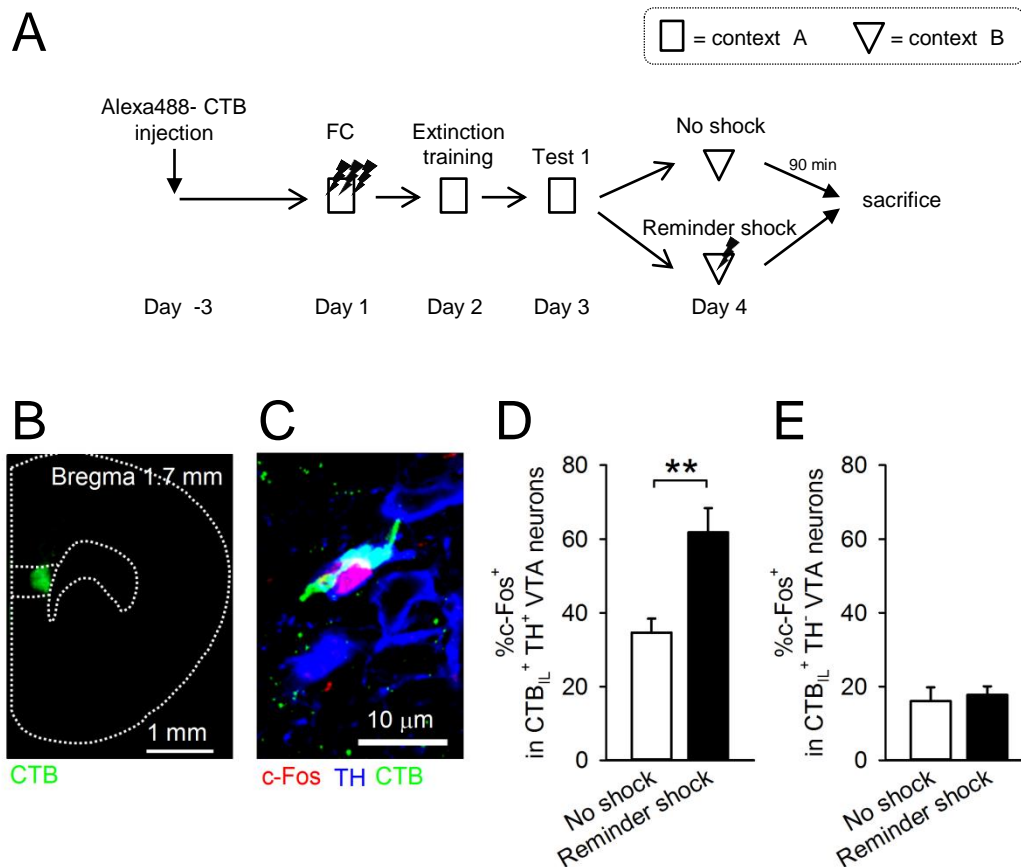


Fig. 8 Reminder shock による IL へ投射を持つ VTA ドパミン性細胞の活性化

A) 行動実験パラダイム。

B) 蛍光標識された CTB の投与位置。

C) VTA における CTB の逆行性シグナルと TH および c-Fos の免疫染色画像。

D) CTB 陽性かつ TH 陽性細胞の中での c-Fos 陽性細胞の割合。 ** $p < 0.01$, Student's t -test, Mean \pm SEM of 6, 7 mice.

E) CTB 陽性かつ TH 陰性細胞の中での c-Fos 陽性細胞の割合。 Mean \pm SEM of 6, 7 mice.

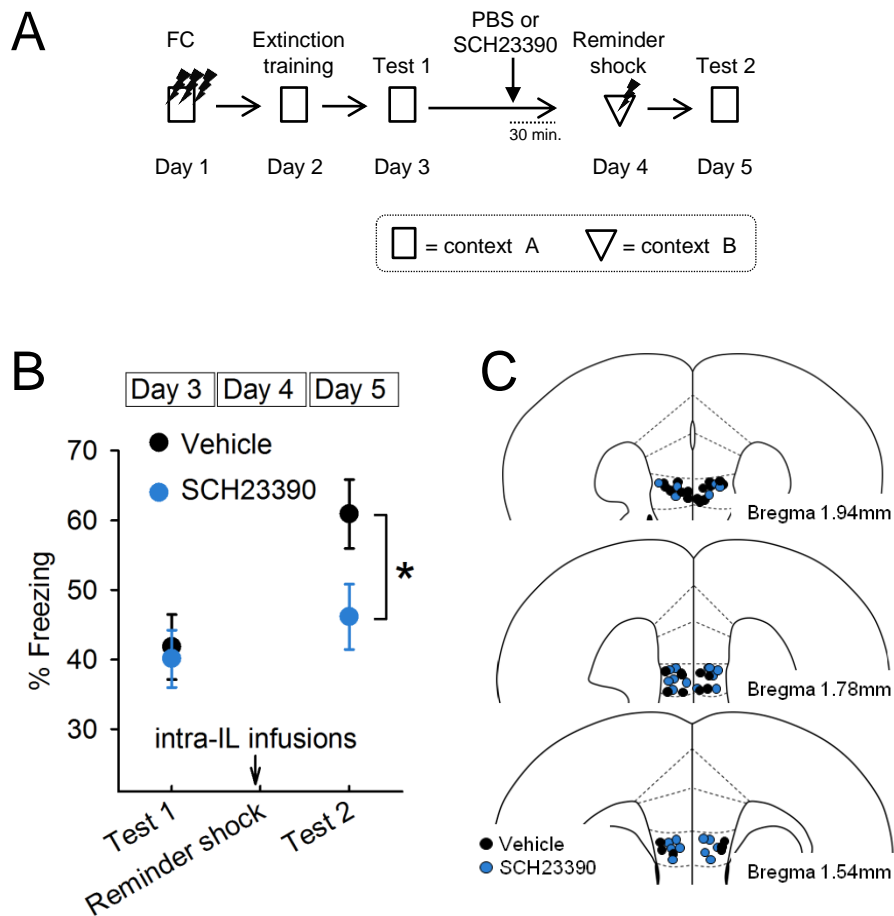


Fig. 9 IL の D₁ 受容体阻害による復元の障害

A) 行動実験パラダイム。条件づけおよび消去学習をおこなった後、SCH23390 または PBS (Vehicle) を IL に局所投与した 30 分後に Reminder shock を与え、翌日 Test 2 をおこなった。

B) Test 1 および Test 2 でのすくみ反応時間。コントロール群は、Test 2 のすくみ反応時間が Test 1 に比較して長かったのに対し、SCH23390 投与群では変化がなかった。SCH23390 群の Test 2 でのすくみ反応時間は、コントロール群に比較して短かった。SCH23390: 1 μ g/side, * p < 0.05. Student's t -test, Mean \pm SEM of 14, 15 mice.

C) 薬物投与位置。各点は投与カニューレの位置を示す。

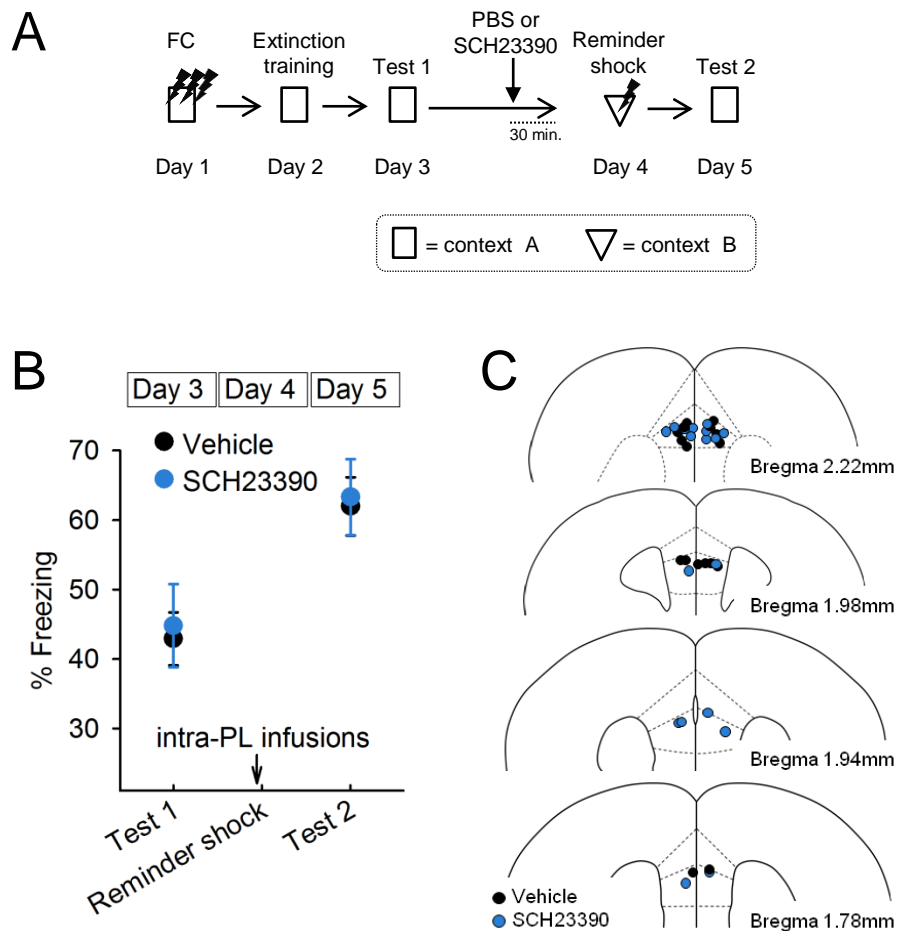


Fig. 10 PL の D₁ 受容体阻害は復元を障害しない

A) 行動実験パラダイム。条件づけおよび消去学習をおこなった後、SCH23390 または PBS (Vehicle) を PL に局所投与した 30 分後に Reminder shock を与え、翌日 Test 2 をおこなった。

B) Test 1 および Test 2 でのすくみ反応時間。Test 2 のすくみ反応時間が Test 1 に比較して長く、コントロール群、SCH23390 投与群の間に差はなかった。SCH23390: 1 µg/side, Mean ± SEM of 9 mice.

C) 薬物投与位置。各点は投与カニューレの位置を示す。

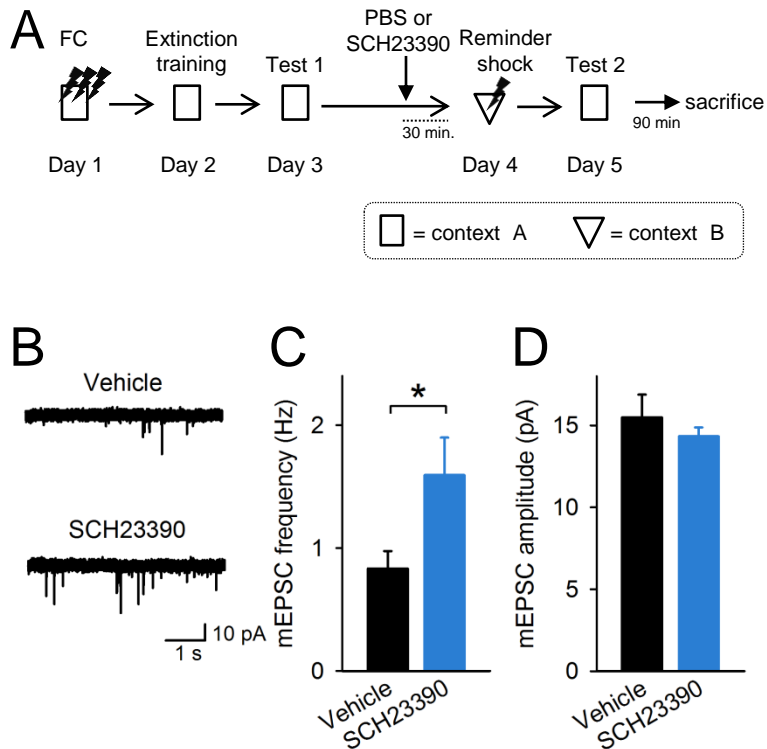


Fig. 11 IL の D₁ 受容体阻害によるシナプス減弱の障害

A) 行動実験パラダイム。条件づけおよび消去学習をおこなった後、SCH23390 または PBS (Vehicle) を IL に局所投与した 30 分後に Reminder shock を与え、翌日 Test 2 をおこなった。テスト後に脳を摘出し、急性脳切片を作製してパッチクランプ記録をおこなった。SCH23390: 1 μ g/side.

B) mEPSC の代表波形。記録は、IL の第 5 層の細胞よりおこなった。

C) SCH23390 投与群は、コントロール群に比較して mEPSC 頻度が高かった。

* $p < 0.05$, Student's t -test, Mean \pm SEM of 9, 10 cells.

D) mEPSC 強度は同程度だった。Mean \pm SEM of 9, 10 cells.

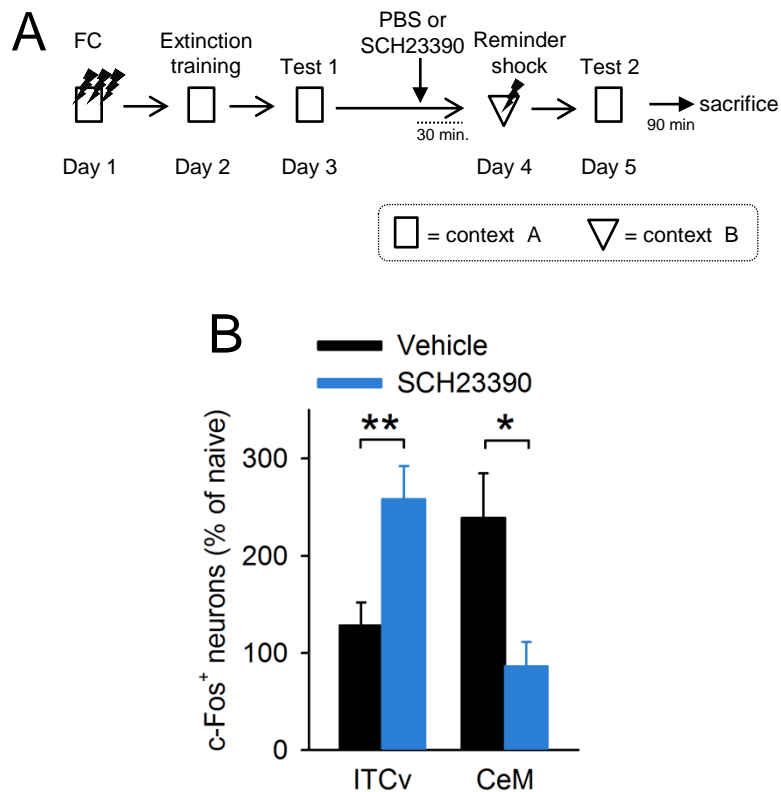


Fig. 12 IL の D₁ 受容体阻害による扁桃体の活動パターン変化の障害

A) 行動実験パラダイム。条件づけおよび消去学習をおこなった後、SCH23390 または PBS (Vehicle) を IL に局所投与した 30 分後に Reminder shock を与え、翌日 Test 2 をおこなった。テストの 90 分後に脳を摘出し、c-Fos の免疫染色をおこなった。

B) SCH23390 投与群は、コントロール群に比較して、ITCv の c-Fos 陽性細胞密度が高く、CeM の c-Fos 陽性細胞密度が低かった。SCH23390: 1 µg/side, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, Student's t -test, Mean \pm SEM of 7, 8 mice.

復元時

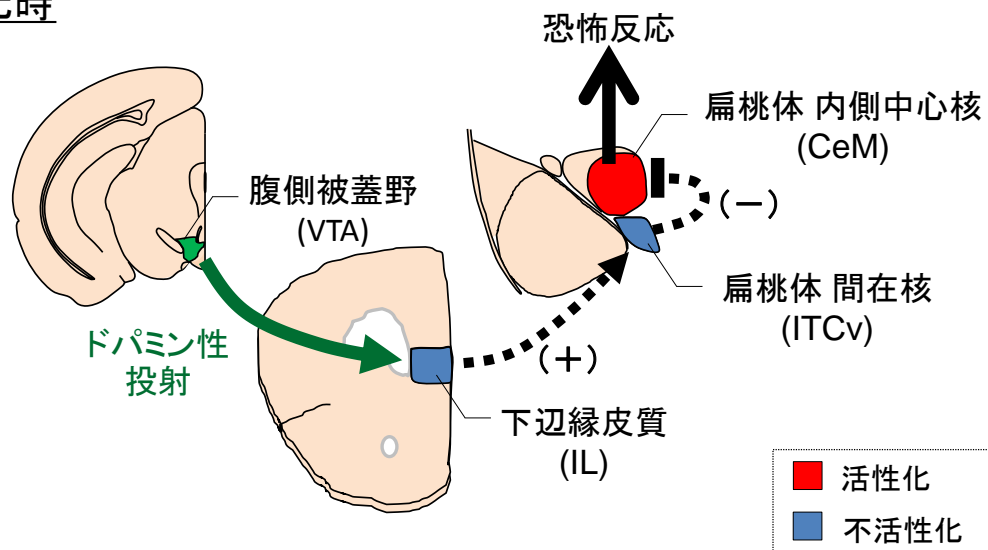


Fig. 13 復元の神経回路メカニズムの模式図

本研究から、以下のようなメカニズムが考察される。復元誘導時に、IL へ投射する VTA ドパミン性細胞が活性化し (緑矢印)、IL の D_1 受容体依存的に IL でシナプス減弱が引き起こされる。すると、環境に再提示した際 IL が活性化しにくくなるため、ITCv を介した CeM への抑制が減弱し (黒点線矢印)、CeM が脱抑制されて活性化することにより恐怖が復元する (黒実線矢印)。

考察

私は本研究において、恐怖の復元に関して以下のことを明らかにした。

- (1) 復元時に、IL および ITCv が不活性化し、CeM が活性化する。
- (2) 復元に伴い、IL においてプレシナプス性のシナプス減弱が生じる。
- (3) 恐怖の復元、IL のシナプス減弱、ITCv および CeM の活動変化は IL ドパミン D₁ 受容体依存である。

以上より、復元を誘発する刺激は、IL に投射するドパミン性細胞を活性化して、IL においてプレシナプス性のシナプス減弱を引き起こすため、実験環境に再提示した際 IL が活性化しにくくなり、ITCv を介した CeM への抑制が減弱して、恐怖を復元させると考えられる (Fig. 13)。

復元時の神経活動の変化

本研究では、復元に伴い IL および ITCv の活動が低下し、CeM の活動が上昇することを明らかにした (Fig. 4)。IL および ITCv は、恐怖の想起時 (Fear 群) には活性化せず、消去時 (Extinction 群) に活性化していたことから、恐怖の発現を抑制する神経回路 (Extinction circuit) の一部であると考えられる。これに対して CeM は、恐怖の想起時に活性化し、消去時に不活性化していたことから、恐怖の発現に関わる神経回路 (Fear circuit) の一部であると考えられる。これらの結果を復元時 (Reinstatement 群) の結果と合わせて考えると、復元時は Extinction circuit の活動性が低下し、Fear circuit が脱抑制され再び活性化するようになると考えられる。

Extinction circuit の不活性化により CeM が活性化するのは、Fear circuit のうち CeM の上流に存在する神経回路の活動が維持されていたためであろう。具体的には、BLA が候補として挙げられる。条件づけの際、環境などの無条件刺激の情報と電気ショックの情報は BLA の一部の細胞において統合され、それらの細胞集団に恐怖記憶が貯蔵されると考えられている (Han et al., 2007; Nomura et al., 2011; Nonaka et al., 2014)。記憶の想起には、このような神経細胞集団の活動が必要である (Han et al., 2009; Zhou et al., 2009)。BLA の活動は CeM を活性化することによって、恐怖反応を誘発すると考えられている (Pitkänen et al., 1997)。BA は恐怖の消去時、復元時の両方において活性化していた (Fig. 4)。このことから、BA から CeM への投射は恐怖の消去時にも復元時にも活性化しているが、IL を含む Extinction circuit による抑制が減弱している復元時にのみ CeM を活性化することが可能になり、恐怖反応が現れる可能性がある。ただし、BLA は消去学習にとっても必須な脳領域であり、Fear circuit だけでなく Extinction circuit にも含まれると考えられている。BA には、恐怖の発現時に条件刺激に対する発火が上昇する Fear neuron と、消去時に条件刺激に対する発火が上昇する Extinction neuron が存在する (Herry et al., 2008)。復元時に活動した BA の神経細胞が Fear neuron と Extinction neuron のどちらに属するのかは、本研究からは判断できない。単一細胞レベルでの神経活動の比較は、今後の検討課題である。これを検討するためには、数日間にわたる複数のタイムポイントでの神経活動履歴を、単一細胞レベルの分解能で検出する手法が必要である。c-fos tTA マウスを利用すれば、任意の時点で活動した神経細胞に GFP 等の蛍光色素を発現させることが可能である (Matsuo et al., 2008; Tayler et al., 2013)。この手法と今回用いた c-Fos タンパク質の免疫染色を組み合わせることにより、恐怖の想起時と復元時、および、

消去時と復元時に活動する細胞集団を比較すれば、復元時に活動した BA の神経細胞の特性を明らかにできるだろう。

条件づけ学習と復元の違い

恐怖条件づけと復元はいずれも電気ショックにより誘導されるが、その誘導メカニズムはそれぞれ異なると考えられる。恐怖条件づけでは、Fear circuit を形成することによって、後のテスト時に恐怖反応が現れる。具体的には、BLA や海馬において NMDA 受容体依存的、新規タンパク質合成依存的な可塑的变化が生じる (Kim et al., 1993; Kim and Davis, 1993; Marek et al., 2013)。これに対して復元では、Extinction circuit を不活性化することにより、既に存在している Fear circuit を脱抑制して恐怖反応を再発させると考えられる。具体的には、IL においてプレシナプス性のシナプス減弱が生じることを明らかにした (Fig. 6, 7)。

Reminder shock を与えることにより再条件づけが起こっていたとしても、行動上は恐怖が復元したように見えるだろう。しかし、本研究においては、条件づけ環境やテストをおこなった環境 A とは異なる環境 B で Reminder shock を与えていること、Reminder shock をナীবマウスに与えても恐怖反応を誘発しないことから、Reminder shock を与えた時に再条件づけが起こっている可能性は低いと考えられる。

復元に伴う下辺縁皮質の変化

IL は Extinction circuit の一部であると考えられており、消去トレーニング後に IL で生じる可塑的变化は消去学習に必須である (Santini et al., 2004; Laurent and Westbrook, 2009)。消去トレーニングは IL の神経細胞の内的興奮性を上昇させ (Santini et al., 2008)、恐怖の消去時には、条件刺激の提示に対して IL の神経細胞が活性化する (Milad and Quirk, 2002)。これに対して、本研究では、復元時に IL のシナプス伝達がプレシナプス性に減弱していることを明らかにした (Fig. 6, 7)。これにより、IL の上流の神経細胞が活動した際に神経伝達物質が放出されにくくなり、IL の神経細胞が活性化しにくくなると考えられる。

本研究では、IL の第 5 層に存在する任意の錐体細胞からパッチクランプ記録をおこなっているため、復元時に観察されたシナプス減弱に細胞特異性があるかは検証できていない。シナプス減弱が IL の全ての（もしくは不特定な）細胞で引き起こされるのか、それとも、消去学習に関わった細胞で選択的に引き起こされるのかは、今後の検討課題である。前述の c-fos tTA マウスを利用して消去学習時に活動した神経細胞を標識して同様の検討をおこなうことで、検証することが可能だろう。

また、復元時にシナプス減弱が起こる際の、IL の上流の神経細胞は本研究では特定しておらず、今後の検討課題である。IL の Extinction circuit を活性化する入力であったとすれば、候補となる脳部位として BA が挙げられる。BA の神経細胞のうち IL に投射を持つものは Extinction neuron になり易いことが報告されている (Senn et al., 2014)。また、海馬も候補として挙げられる。実験環境の情報は海馬に蓄えられると考えられている。消去学習には環

境特異性があるため (Ji and Maren, 2007)、海馬から IL への環境情報の伝達が Extinction circuit の活性化を誘導している可能性がある。このような、IL の Extinction circuit の上流に位置すると考えられる脳部位から入力するシナプスにおいてシナプス減弱が生じ、IL の神経細胞が活性化しにくくなることによって、復元が誘導される可能性がある。

復元とドパミン

ドパミンは恐怖や不安を制御する重要な因子の一つである (Pezze and Feldon, 2004; de la Mora et al., 2010)。電気ショックを含む様々なストレス刺激によりドパミン性神経細胞は活性化し、その投射領域においてドパミン濃度を上昇させる (Abercrombie et al., 1989; Brischoux et al., 2009)。ただし、ドパミンの役割は脳領域ごとに異なる。文脈的恐怖条件づけの獲得において、扁桃体および海馬の D₁ 受容体は必須であるのに対して (Inoue et al., 2000; Sariñana et al., 2014)、PFC の D₁ 受容体は必須ではない (Runyan and Dash, 2004)。これは、文脈的恐怖条件づけ学習に扁桃体や海馬は必須であるのに対して、PFC は必須ではないということからも推察可能である (Morgan et al., 1993)。これに対して、本研究では、復元が PFC の亜領域である IL のドパミンシグナル依存であることを明らかにした。IL は消去学習に必要な脳領域であることから、ドパミンは Extinction circuit に対して影響を与えることにより恐怖を復元させると考えられる。IL のドパミンシグナルは、復元を誘発する刺激 (本研究では Reminder shock) により活性化して、IL においてプレシナプス性のシナプス減弱を引き起こすため、後に実験環境に再提示した際、IL を

含む **Extinction circuit** の活性化が障害されて、**Fear circuit** の活性化および恐怖の発現が引き起こされると考えられる。

D₁ 受容体刺激がプレシナプス性のシナプス減弱を誘導する分子メカニズムは、本研究では明らかにできていないが、アデノシンを介した経路の関与が考えられる。D₁ 受容体は Gs 共役型受容体であり、cyclic AMP – protein kinase A (PKA) 経路を活性化する。PKA の活性化はアデノシンの放出を誘導し、プレシナプスに存在する A₁ 受容体 (Gi 共役型受容体) に作用して、シナプス伝達物質の放出確率を低下させると考えられる (Ding et al., 2003)。

PFC のドパミンは、神経調節因子としてシナプスの可塑的变化を修飾すると考えられている。*in vitro* の実験系において、電気刺激とドパミンの処置を同時にすることによってはじめて、長期的なシナプス減弱が誘導されることが報告されている (Law-Tho et al., 1994; Law-Tho et al., 1995; Otani et al., 1998)。本研究においても、ドパミンシグナルの活性化は復元に必要ではあるものの、IL へのドパミンの局所投与は復元を誘導しなかったことから、IL のドパミンシグナルの活性化は復元誘導に十分ではないと考えられる。では、ドパミンはどのように復元に関与するのだろうか。Reminder shock を与えた際には、VTA からのドパミン性入力のみでなく、同時に様々な脳領域からの興奮性入力があり、IL の神経細胞を活性化していると考えられる。Reminder shock を与えた際、IL において c-Fos 陽性細胞密度が上昇することが、当研究室の先行研究から示されている (Shen 氏博士論文)。このように、ドパミン濃度が上昇している時に同時に IL の神経細胞が活性化することが、シナプス減弱を引き起こすのに必要である可能性がある。

復元するか否かが、どの脳領域によってどのように決定されるのかは興味深い点である。ドパミン神経の活性化は復元に必要ではあるが十分ではないと考えられることから、VTA が復元するか否かを決めている可能性は低いだろう。復元においては、“IL で” ドパミンシグナルが活性化することが重要であり、IL が復元をするか否かを制御している可能性が考えられる。IL は、情動の中核である扁桃体からの入力に加えて、海馬からの外的環境に関する情報の入力、ドパミンをはじめとしたモノアミン神経系からの内的環境に関する情報の入力、他の前頭前皮質からの認知・判断に関わる入力などを受けている (Sotres-Bayon and Quirk, 2010)。これらの多様な情報が IL の神経細胞において統合され、閾値を越えた際に恐怖が復元するのではないかと考えられる。

本研究ではドパミンの投射元として VTA を挙げたが、他の経路の関与は否定できていない。VTA からに比べると疎ではあるものの、黒質からも IL へのドパミン性投射が存在する (Hoover and Vertes, 2007)。これらの神経回路の機能を区別して検討するためには、光遺伝学的手法が有用である。これは、光で活性化するイオンチャネルを遺伝学的に神経細胞に発現させ、光を照射することによって神経細胞の活動を操作する手法である (Tye and Deisseroth, 2012)。青色光で励起される陽イオンチャネルであるチャンネルロドプシンは、細胞内にナトリウムイオンを流入させることで脱分極を引き起こし、神経細胞を活性化させる。一方、黄色光で励起されるイオンポンプであるハロロドプシンは、細胞内に塩化物イオンを流入させることにより過分極を引き起こし、神経細胞を不活性化させる。これらの光感受性イオンチャネルを、VTA もしくは黒質のドパミン細胞に発現させ、IL に投射している神経終末を光により活性化もしくは不活性化することにより、VTA-IL 経路および黒質 - IL 経路の復元への関与を区別して検証することが可能になるだろう。

復元メカニズムの普遍性

本研究では、弱い無条件刺激による恐怖の復元（Reinstatement）に着目し、そのメカニズムを研究した。実験動物を用いた場合には、このほかに、時間経過による復元（Spontaneous recovery）や、環境の変化による復元（Renewal）が知られている（Myers and Davis, 2007; Herry et al., 2010）。Spontaneous recovery および Renewal による復元においても、IL の活動が低下することが示唆されている（Herry and Mons, 2004; Knapska and Maren, 2009）。これらの復元の場合にも、IL のドパミンシグナルが共通したメカニズムとして関与しているかどうかは、興味深い点である。臨床的には、複合的要因により再発が引き起こされると考えられるため、様々な要因による復元に共通したメカニズムを探索することは重要である。

これまでに、恐怖条件づけおよび消去学習を用いた研究から曝露療法の神経基盤が明らかにされてきた。現在も、消去学習のパラダイムに改変を加えたり、消去学習と薬物療法と組み合わせたりすることによって、より効果的で再発率の低い方法が模索されている（Clem and Huganir, 2010; Karpova et al., 2011）。このような研究において、復元は消去学習の評価系の一つとして扱われてきたため、復元自体のメカニズムを研究した例は非常に少数である。本研究は、恐怖の復元に IL の活動低下が関与することを見出し、IL のドパミンシグナルを阻害することにより復元を抑制できることを示した。今後は、このような復元に関する研究を、恐怖を抑制する消去学習に関する研究と並行して進めることが重要になるだろう（Vervliet et al., 2013）。

参考文献

- Abercrombie ED, Keefe KA, DiFrischia DS, Zigmond MJ (1989) Differential effect of stress on in vivo dopamine release in striatum, nucleus accumbens, and medial frontal cortex. *J Neurochem* 52:1655-1658.
- Amano T, Unal CT, Paré D (2010) Synaptic correlates of fear extinction in the amygdala. *Nat Neurosci* 13:489-494.
- Amir A, Amano T, Pare D (2011) Physiological identification and infralimbic responsiveness of rat intercalated amygdala neurons. *J Neurophysiol* 105:3054-3066.
- Ansell EB, Pinto A, Edelen MO, Markowitz JC, Sanislow CA, Yen S, Zannarini M, Skodol AE, Shea MT, Morey LC, Gunderson JG, McGlashan TH, Grilo CM (2011) The association of personality disorders with the prospective 7-year course of anxiety disorders. *PsycholMed* 41:1019-1028.
- Brischoux F, Chakraborty S, Brierley DI, Ungless MA (2009) Phasic excitation of dopamine neurons in ventral VTA by noxious stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:4894-4899.
- Bruce SE, Yonkers KA, Otto MW, Eisen JL, Weisberg RB, Pagano M, Shea MT, Keller MB (2005) Influence of psychiatric comorbidity on recovery and recurrence in generalized anxiety disorder, social phobia, and panic disorder: a 12-year prospective study. *AmJPsychiatry* 162:1179-1187.
- Busti D, Geracitano R, Whittle N, Dalezios Y, Mańko M, Kaufmann W, Sätzler K,

- Singewald N, Capogna M, Ferraguti F (2011) Different fear states engage distinct networks within the intercalated cell clusters of the amygdala. *J Neurosci* 31:5131-5144.
- Cho JH, Deisseroth K, Bolshakov VY (2013) Synaptic encoding of fear extinction in mPFC-amygdala circuits. *Neuron* 80:1491-1507.
- Ciocchi S, Herry C, Grenier F, Wolff SB, Letzkus JJ, Vlachos I, Ehrlich I, Sprengel R, Deisseroth K, Stadler MB, Muller C, Luthi A (2010) Encoding of conditioned fear in central amygdala inhibitory circuits. *Nature* 468:277-282.
- Clem RL, Huganir RL (2010) Calcium-permeable AMPA receptor dynamics mediate fear memory erasure. *Science* 330:1108-1112.
- Davis M (2002) Role of NMDA receptors and MAP kinase in the amygdala in extinction of fear: clinical implications for exposure therapy. *Eur J Neurosci* 16:395-398.
- de la Mora MP, Gallegos-Cari A, Arizmendi-García Y, Marcellino D, Fuxe K (2010) Role of dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety: Structural and functional analysis. *Prog Neurobiol* 90:198-216.
- De Oca BM, DeCola JP, Maren S, Fanselow MS (1998) Distinct regions of the periaqueductal gray are involved in the acquisition and expression of defensive responses. *J Neurosci* 18:3426-3432.
- Ding L, Perkel DJ, Farries MA (2003) Presynaptic depression of glutamatergic synaptic transmission by D1-like dopamine receptor activation in the avian basal ganglia. *J Neurosci* 23:6086-6095.

- Ehlers A, Clark D (2003) Early psychological interventions for adult survivors of trauma: a review. *BiolPsychiatry* 53:817-826.
- Ehrlich I, Humeau Y, Grenier F, Cioocchi S, Herry C, Luthi A (2009) Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. *Neuron* 62:757-771.
- Feenstra MG, Botterblom MH, Mastenbroek S (2000) Dopamine and noradrenaline efflux in the prefrontal cortex in the light and dark period: effects of novelty and handling and comparison to the nucleus accumbens. *Neuroscience* 100:741-748.
- Foa EB, Franklin ME, Moser J (2002) Context in the clinic: how well do cognitive-behavioral therapies and medications work in combination? *BiolPsychiatry* 52:987-997.
- Gao WJ, Krimer LS, Goldman-Rakic PS (2001) Presynaptic regulation of recurrent excitation by D1 receptors in prefrontal circuits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:295-300.
- Hamamura T, Fibiger HC (1993) Enhanced stress-induced dopamine release in the prefrontal cortex of amphetamine-sensitized rats. *Eur J Pharmacol* 237:65-71.
- Han JH, Kushner SA, Yiu AP, Cole CJ, Matynia A, Brown RA, Neve RL, Guzowski JF, Silva AJ, Josselyn SA (2007) Neuronal competition and selection during memory formation. *Science* 316:457-460.
- Han JH, Kushner SA, Yiu AP, Hsiang HL, Buch T, Waisman A, Bontempi B, Neve RL, Frankland PW, Josselyn SA (2009) Selective erasure of a fear memory.

Science 323:1492-1496.

Hashikawa K, Naka M, Nakayama D, Matsumoto N, Neve R, Matsuki N (2013)

Blockade of stimulus convergence in amygdala neurons disrupts taste associative learning. *J Neurosci* 33:4958-4963.

Herry C, Mons N (2004) Resistance to extinction is associated with impaired immediate early gene induction in medial prefrontal cortex and amygdala. *Eur J Neurosci* 20:781-790.

Herry C, Ciocchi S, Senn V, Demmou L, Müller C, Lüthi A (2008) Switching on and off fear by distinct neuronal circuits. *Nature* 454:600-606.

Herry C, Ferraguti F, Singewald N, Letzkus JJ, Ehrlich I, Lüthi A (2010) Neuronal circuits of fear extinction. *Eur J Neurosci* 31:599-612.

Hoover WB, Vertes RP (2007) Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Struct Funct* 212:149-179.

Inoue T, Izumi T, Maki Y, Muraki I, Koyama T (2000) Effect of the dopamine D(1/5) antagonist SCH 23390 on the acquisition of conditioned fear. *Pharmacol Biochem Behav* 66:573-578.

Ji J, Maren S (2007) Hippocampal involvement in contextual modulation of fear extinction. *Hippocampus* 17:749-758.

Karpova NN, Pickenhagen A, Lindholm J, Tiraboschi E, Kuleshkaya N, Agústs dóttir A, Antila H, Popova D, Akamine Y, Bahi A, Sullivan R, Hen R, Drew LJ, Castrén E (2011) Fear erasure in mice requires synergy between

- antidepressant drugs and extinction training. *Science* 334:1731-1734.
- Kim JJ, Fanselow MS (1992) Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* 256:675-677.
- Kim JJ, Rison RA, Fanselow MS (1993) Effects of amygdala, hippocampus, and periaqueductal gray lesions on short- and long-term contextual fear. *Behav Neurosci* 107:1093-1098.
- Kim M, Davis M (1993) Electrolytic lesions of the amygdala block acquisition and expression of fear-potentiated startle even with extensive training but do not prevent reacquisition. *Behav Neurosci* 107:580-595.
- Knapska E, Maren S (2009) Reciprocal patterns of c-Fos expression in the medial prefrontal cortex and amygdala after extinction and renewal of conditioned fear. *Learn Mem* 16:486-493.
- Laurent V, Westbrook RF (2009) Inactivation of the infralimbic but not the prelimbic cortex impairs consolidation and retrieval of fear extinction. *Learn Mem* 16:520-529.
- Law-Tho D, Hirsch JC, Crepel F (1994) Dopamine modulation of synaptic transmission in rat prefrontal cortex: an in vitro electrophysiological study. *Neurosci Res* 21:151-160.
- Law-Tho D, Desce JM, Crepel F (1995) Dopamine favours the emergence of long-term depression versus long-term potentiation in slices of rat prefrontal cortex. *Neurosci Lett* 188:125-128.

- LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. *AnnuRevNeurosci* 23:155-184.
- Likhtik E, Popa D, Apergis-Schoute J, Fidacaro GA, Paré D (2008) Amygdala intercalated neurons are required for expression of fear extinction. *Nature* 454:642-645.
- Lüthi A, Lüscher C (2014) Pathological circuit function underlying addiction and anxiety disorders. *Nat Neurosci* 17:1635-1643.
- Marek R, Strobel C, Bredy TW, Sah P (2013) The amygdala and medial prefrontal cortex: partners in the fear circuit. *J Physiol* 591:2381-2391.
- Maren S, Aharonov G, Stote DL, Fanselow MS (1996) N-methyl-D-aspartate receptors in the basolateral amygdala are required for both acquisition and expression of conditional fear in rats. *BehavNeurosci* 110:1365-1374.
- Matsuo N, Reijmers L, Mayford M (2008) Spine-type-specific recruitment of newly synthesized AMPA receptors with learning. *Science* 319:1104-1107.
- Mańko M, Geracitano R, Capogna M (2011) Functional connectivity of the main intercalated nucleus of the mouse amygdala. *J Physiol* 589:1911-1925.
- McHugh TJ, Jones MW, Quinn JJ, Balthasar N, Coppari R, Elmquist JK, Lowell BB, Fanselow MS, Wilson MA, Tonegawa S (2007) Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network. *Science* 317:94-99.
- McNally RJ (2007) Mechanisms of exposure therapy: how neuroscience can improve psychological treatments for anxiety disorders. *ClinPsycholRev* 27:750-759.

Milad MR, Quirk GJ (2002) Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature* 420:70-74.

Milad MR, Vidal-Gonzalez I, Quirk GJ (2004) Electrical stimulation of medial prefrontal cortex reduces conditioned fear in a temporally specific manner. *Behav Neurosci* 118:389-394.

Morgan MA, LeDoux JE (1995) Differential contribution of dorsal and ventral medial prefrontal cortex to the acquisition and extinction of conditioned fear in rats. *Behav Neurosci* 109:681-688.

Morgan MA, Romanski LM, LeDoux JE (1993) Extinction of emotional learning: contribution of medial prefrontal cortex. *NeurosciLett* 163:109-113.

Moustafa AA, Gilbertson MW, Orr SP, Herzallah MM, Servatius RJ, Myers CE (2013) A model of amygdala-hippocampal-prefrontal interaction in fear conditioning and extinction in animals. *Brain Cogn* 81:29-43.

Myers KM, Davis M (2002) Behavioral and neural analysis of extinction. *Neuron* 36:567-584.

Myers KM, Davis M (2007) Mechanisms of fear extinction. *MolPsychiatry* 12:120-150.

Nomura H, Matsuki N (2008) Ethanol enhances reactivated fear memories. *Neuropsychopharmacology* 33:2912-2921.

Nomura H, Nonaka A, Imamura N, Hashikawa K, Matsuki N (2011) Memory coding in plastic neuronal subpopulations within the amygdala. *Neuroimage*

60:153-161.

Nonaka A, Toyoda T, Miura Y, Hitora-Imamura N, Naka M, Eguchi M, Yamaguchi S, Ikegaya Y, Matsuki N, Nomura H (2014) Synaptic plasticity associated with a memory engram in the basolateral amygdala. *J Neurosci* 34:9305-9309.

Otani S, Blond O, Desce JM, Cr  pel F (1998) Dopamine facilitates long-term depression of glutamatergic transmission in rat prefrontal cortex. *Neuroscience* 85:669-676.

Pezze MA, Feldon J (2004) Mesolimbic dopaminergic pathways in fear conditioning. *Prog Neurobiol* 74:301-320.

Phillips RG, LeDoux JE (1992) Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *BehavNeurosci* 106:274-285.

Phillips RG, LeDoux JE (1994) Lesions of the dorsal hippocampal formation interfere with background but not foreground contextual fear conditioning. *Learn Mem* 1:34-44.

Pitkänen A, Savander V, LeDoux JE (1997) Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci* 20:517-523.

Quirk GJ, Garcia R, Gonzalez-Lima F (2006) Prefrontal mechanisms in extinction of conditioned fear. *BiolPsychiatry* 60:337-343.

Rescorla RA, Heth CD (1975) Reinstatement of fear to an extinguished conditioned

- stimulus. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 1:88-96.
- Runyan JD, Dash PK (2004) Intra-medial prefrontal administration of SCH-23390 attenuates ERK phosphorylation and long-term memory for trace fear conditioning in rats. *Neurobiol Learn Mem* 82:65-70.
- Sah P, Faber ES, Lopez De Armentia M, Power J (2003) The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev* 83:803-834.
- Santini E, Quirk GJ, Porter JT (2008) Fear conditioning and extinction differentially modify the intrinsic excitability of infralimbic neurons. *J Neurosci* 28:4028-4036.
- Santini E, Ge H, Ren K, Pena dO, Quirk GJ (2004) Consolidation of fear extinction requires protein synthesis in the medial prefrontal cortex. *JNeurosci* 24:5704-5710.
- Sariñana J, Kitamura T, Künzler P, Sultzman L, Tonegawa S (2014) Differential roles of the dopamine 1-class receptors, D1R and D5R, in hippocampal dependent memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:8245-8250.
- Selden NR, Everitt BJ, Jarrard LE, Robbins TW (1991) Complementary roles for the amygdala and hippocampus in aversive conditioning to explicit and contextual cues. *Neuroscience* 42:335-350.
- Senn V, Wolff SB, Herry C, Grenier F, Ehrlich I, Gründemann J, Fadok JP, Müller C, Letzkus JJ, Lüthi A (2014) Long-range connectivity defines behavioral specificity of amygdala neurons. *Neuron* 81:428-437.

Shen H, Igarashi H, Imamura N, Matsuki N, Nomura H (2013)

N-methyl-D-aspartate receptors and protein synthesis are necessary for reinstatement of conditioned fear. *Neuroreport* 24:763-767.

Sierra-Mercado D, Padilla-Coreano N, Quirk GJ (2011) Dissociable roles of

prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear.

Neuropsychopharmacology 36:529-538.

Sotres-Bayon F, Quirk GJ (2010) Prefrontal control of fear: more than just

extinction. *Curr Opin Neurobiol* 20:231-235.

Sotres-Bayon F, Sierra-Mercado D, Pardilla-Delgado E, Quirk GJ (2012) Gating of

fear in prelimbic cortex by hippocampal and amygdala inputs. *Neuron* 76:804-812.

Tan KR, Yvon C, Turiault M, Mirzabekov JJ, Doehner J, Labouèbe G, Deisseroth K,

Tye KM, Lüscher C (2012) GABA neurons of the VTA drive conditioned place aversion. *Neuron* 73:1173-1183.

Tayler KK, Tanaka KZ, Reijmers LG, Wiltgen BJ (2013) Reactivation of neural

ensembles during the retrieval of recent and remote memory. *Curr Biol* 23:99-106.

Tronson NC, Schrick C, Guzman YF, Huh KH, Srivastava DP, Penzes P, Guedea AL,

Gao C, Radulovic J (2009) Segregated populations of hippocampal principal CA1 neurons mediating conditioning and extinction of contextual fear. *J Neurosci* 29:3387-3394.

- Tye KM, Deisseroth K (2012) Optogenetic investigation of neural circuits underlying brain disease in animal models. *Nat Rev Neurosci* 13:251-266.
- Vervliet B, Craske MG, Hermans D (2013) Fear extinction and relapse: state of the art. *Annu Rev Clin Psychol* 9:215-248.
- Vidal-Gonzalez I, Vidal-Gonzalez B, Rauch SL, Quirk GJ (2006) Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. *Learn Mem* 13:728-733.
- Zhou Y, Won J, Karlsson MG, Zhou M, Rogerson T, Balaji J, Neve R, Poirazi P, Silva AJ (2009) CREB regulates excitability and the allocation of memory to subsets of neurons in the amygdala. *Nat Neurosci* 12:1438-1443.

謝辞

研究に対する適切なお指摘・ご助言をいただき、研究の面白さを学ばせていただきました、東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室教授の池谷裕二先生に、心よりお礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、一から丁寧に直接ご指導いただき、研究のいろはを学ばせていただきました、東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室助教の野村洋先生には、感謝の念が絶えません。

研究課題や研究室生活に関して親身に相談にのっていただき、研究に対する姿勢や熱い想いを学ばせていただきました、東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室准教授の小山隆太先生、助教の佐々木拓哉先生に心より感謝いたします。

研究室での生活を温かく見守り、またご支援してくださいました、東京大学名誉教授の松木則夫先生に心より感謝いたします。

薬品作用学教室での 5 年間の大学院生活を共に過ごし、苦楽を分かち合い、常に心の支えとなってくださいました、宇治田早紀子さんに心より感謝いたします。

本研究をより良いものにするために様々な面からサポートしてくださいました、中山大輔さん、三浦友樹さん、五十嵐ひかるさん、尾上広祐さん、手代木知恵さん、原宏士朗さんに、心より感謝いたします。特に三浦さんは、電気生理学的な実験及び考察に関して絶大なサポートをしてくださいました。

日々の研究室生活を送るなかで多くのご支援をいただき、研究生活をより一層楽しく充実したものにしてくださいました、薬品作用学教室の先輩、後輩の皆さまに心より感謝いたします。

本研究において、実験に使用した動物達に謹んで感謝の意を表すとともに、ご冥福をお祈りいたします。

研究者を志す同志として切磋琢磨し、一番の理解者として心との拠り所となってくださった人羅勇氣さんに心より感謝いたします。

最後になりましたが、いつでも温かな目で見守り、信じ、励ましてくださった家族に心から感謝の意を表し、本論文の結びとさせていただきます。