

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。一方、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”を利用することで症状を緩和する治療法であるが、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。

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。特に「消去学習」は曝露療法の科学的基盤と考えられている。消去学習は、“嫌悪刺激と条件づけられた中立的な刺激”のみを再提示し続けることにより、恐怖を抑制する新たな学習をさせるものである。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」することが知られている。本論文は、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ている。

【結果と考察】

1. 恐怖の復元時に下辺縁皮質の活動が低下する

文脈的恐怖条件づけ課題を用いて、マウスに実験環境と電気ショックの関係を学習させた (図 1 A)。実験環境内でマウスに電気ショックを与え (条件づけ)、翌日、実験環境に 40 分間再曝露した (消去学習)。マウスが示す恐怖反応は時間経過に伴い減弱し、この消去学習の効果は 3 日目の環境再曝露時 (5 分間、テスト 1) まで維持された。ところが 4 日目に、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、5 日目に環境に 5 分間再曝露した際 (テスト 2) 再び高い恐怖反応を示した (復元)。

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。テスト 1 (復元前) もしくはテスト 2 (復元後) の後に脳を摘出し、c-Fos を免疫染色により可視化した。恐怖の制御に重要であると考えられている、内側前頭前皮質および扁桃体に着目して陽性細胞数を測定した (図 1 B)。その結果、内側前頭前皮質の亜領域である下辺縁皮質、および、扁桃体の間在核における c-Fos 陽性細胞数は、復元前は高く

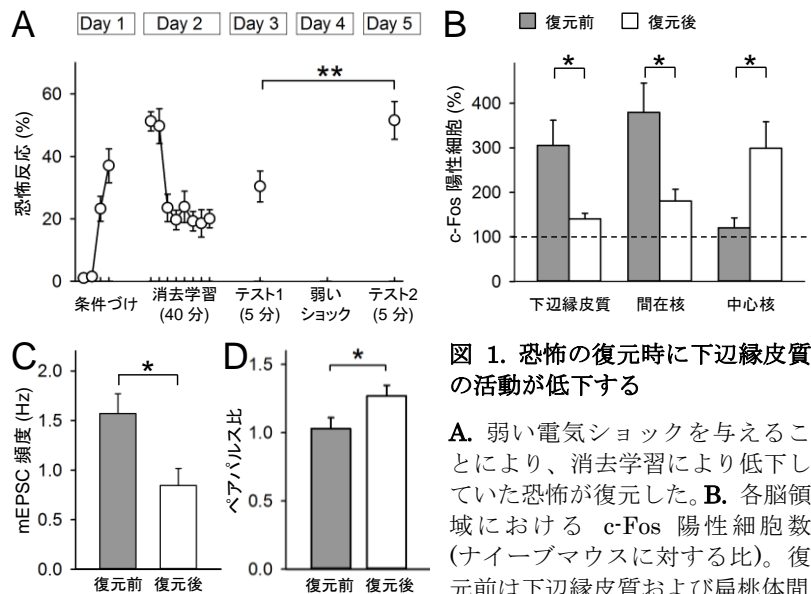


図 1. 恐怖の復元時に下辺縁皮質の活動が低下する

A. 弱い電気ショックを与えることにより、消去学習により低下していた恐怖が復元した。B. 各脳領域における c-Fos 陽性細胞数 (ナイーブマウスに対する比)。復元前は下辺縁皮質および扁桃体間

在核の活動が高く、復元後は扁桃体中心核の活動が高かった。\*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ , Tukey test after ANOVA,  $n = 8-11$  mice, mean  $\pm$  SEM. C. 復元に伴い mEPSC 頻度が低下した。D. 復元に伴いペアパルス比が上昇した。\* $p < 0.05$ , Student's  $t$ -test,  $n = 8$  cells, mean  $\pm$  SEM.

復元後は低かった。また、扁桃体内側中心核の c-Fos 陽性細胞数は、復元前は低く復元後は高かった。先行研究から、中心核の活動は恐怖の発現に必要十分であることが示されている。一方、下辺縁皮質および間在核の活動は消去学習に重要であることが示唆されている。下辺縁皮質は、抑制性神経核である間在核を介して中心核を抑制することにより、消去学習に寄与すると考えられている。このことから、復元時には、弱い電気ショックの提示により下辺縁皮質および間在核の活動が低下し、中心核が脱抑制されるために、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。

下辺縁皮質の神経細胞の電気生理学的な性質の変化を検討するため、脳急性スライス標本を製作し、パッチクランプ記録をおこなった。微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC) を測定することでシナプス伝達を評価した。復元後は復元前に比べて mEPSC 頻度が減少したことから (図 1 C)、シナプス伝達が減弱することが示唆された。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。その結果、復元後は復元前に比べてペアパルス比が増大していた (図 1 D)。このことは、復元に伴い下辺縁皮質の神経細胞へのシナプス伝達物質の放出確率が低下することを示唆している。

## 2. 復元を誘導する刺激は下辺縁皮質に投射するドーパミン作動性細胞を活性化させる

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ーパミンが放出されることが知られている。また、内側前頭前皮質のドーパミン D1 受容体刺激はシナプス伝達を減弱させることが知られている。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ーパミンが関与し、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、弱い電気ショックの提示時に下辺縁皮質に投射を持つドーパミン作動性細胞が活性化する可能性を検証した。下辺縁皮質への主要なドーパミン作動性神経投射元である中脳腹側被蓋野に着目した。下辺縁皮質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 (図 2 A)、腹側被蓋野で逆行性シグナルを観察した。チロシン水酸化酵素 (TH) をドーパミン作動性細胞マーカーとして用い、神経活動マーカーの c-Fos と共染色した (図 2 B)。その結果、復元を誘導する弱いショックを与えると、CTB 陽性かつ TH 陽性の細胞において、c-Fos 陽性細胞の割合が上昇した (図 2 C)。これは、下辺縁皮質へ投射するドーパミン作動性細胞が弱いショックにより活性化することを示している。

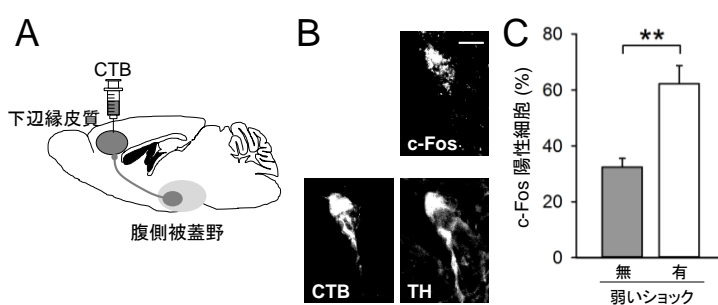


図 2. 復元を誘導する刺激により下辺縁皮質に投射するドーパミン作動性細胞が活性化される

**A.** 下辺縁皮質に CTB を投与することにより、下辺縁皮質への投射を持つ細胞を可視化した。**B.** 腹側被蓋野の細胞の代表写真。TH シグナルによりドーパミン作動性細胞を同定した。Bar = 5  $\mu$ m. **C.** CTB 陽性かつ TH 陽性細胞の中で、c-Fos を発現する細胞の割合。弱いショックの提示により、下辺縁皮質へ投射を持つドーパミン作動性細胞が活性化した。 \*\* $p < 0.01$ , Student's  $t$ -test,  $n = 6-7$  mice, mean  $\pm$  SEM.

### 3. 復元は下辺縁皮質のドーパミン D1 受容体依存である

下辺縁皮質のドーパミン受容体が恐怖の復元に必要である可能性を検証した。弱い電気ショックを与える前に、ドーパミン D1 受容体阻害薬である SCH23390 を下辺縁皮質に局所投与した。その後マウスを実験環境に再曝露すると、SCH23390 処置群は溶媒を投与したコントロール群に比べて恐怖反応が低く、復元が阻害された (図 3 A)。このことから、恐怖の復元には下辺縁皮質の D1 受容体シグナルが必要であることが示された。また、下辺縁皮質の D1 受容体阻害が実験環境での扁桃体の活動変化に与える影響を調べるため、テスト 2 の後に脳を摘出し c-Fos の免疫染色をおこなった (図 3 B)。コントロール群では、間在核の活動は低く、中心核の活動が上昇していたのに対し、SCH23390 処置群では、間在核の活動が高く、中心核の活動は低かった。すなわち、復元時に伴う扁桃体の活動パターンの変化は、下辺縁皮質の D1 受容体シグナル依存であると考えられる。さらに、復元に伴う下辺縁皮質のシナプス伝達減弱に D1 受容体が関与する可能性を検証するため、下辺縁皮質の神経細胞から mEPSC を測定した。SCH23390 処置群はコントロール群に比べて mEPSC 頻度が高かった (図 3 C)。すなわち、復元時にみられる下辺縁皮質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。

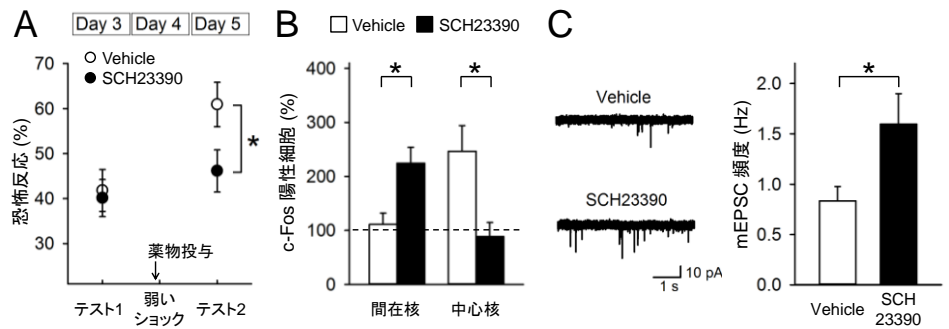


図 3. 復元は下辺縁皮質のドーパミン D1 受容体阻害により障害される

**A.** 弱いショック提示前にドーパミン D1 受容体阻害薬を下辺縁皮質に局所投与することにより、恐怖の復元が阻害された。Student's *t*-test,  $n = 14-15$  mice. SCH23390 : 1  $\mu\text{g}/\text{side}$ . **B.** 扁桃体の c-Fos 陽性細胞数 (ナイーブマウスに対する比)。下辺縁皮質への D1 受容体阻害薬局所投与により、実験環境での間在核および中心核の活動変化が阻害された。Tukey test after ANOVA,  $n = 7-8$  mice. **C.** 下辺縁皮質への D1 受容体阻害薬局所投与により、mEPSC 頻度の低下が阻害された。Student's *t*-test,  $n = 9-10$  cells. \* $p < 0.05$ , mean  $\pm$  SEM.

#### 【総括】

本研究から、恐怖の復元のメカニズムとして以下のような過程が考察される。すなわち、刺激によるドーパミン作動性神経細胞の活性化 → 下辺縁皮質での D1 受容体シグナル活性化 → 下辺縁皮質のシナプス伝達減弱 → 扁桃体間在核の活動低下と中心核の活動上昇 → 恐怖の復元、である。このように恐怖の復元は、下辺縁皮質のドーパミンシグナルが、下辺縁皮質および扁桃体間在核といった消去学習に関わる神経回路を抑圧して中心核を脱抑制することにより生じると考えられる。実際、恐怖の復元は、多様な嫌悪刺激やストレスによっても生じることが報告されており、これらはドーパミン作動性神経細胞を活性化する刺激である。不安障害の再発においても同様の機構が存在する可能性があり、本研究を端緒として再発メカニズムの解明が進むと期待される。

よって本論文は博士 (薬科学) の学位請求論文として合格と認められる。