

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700367

研究課題名（和文） 恐怖消失を司る扁桃体の機能的神経ネットワークの解明

研究課題名（英文） Amygdala functional network underlying fear extinction

研究代表者

野村 洋（NOMURA HIROSHI）

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：10549603

研究成果の概要（和文）：

本研究では、恐怖の消失および復元を司る神経回路を解明するため、恐怖条件づけモデル、最初期遺伝子を用いた大規模な神経活動イメージング、パッチクランプ記録を用いて、主に以下の点を明らかにした。

- (1) 恐怖の復元時に内側前頭前皮質の一部、下辺縁皮質の活性化が低下すること。
- (2) 恐怖の復元には内側前頭前皮質における神経可塑性が関与すること。
- (3) 恐怖の復元に伴って、内側前頭前皮質ニューロンへの興奮性シナプス入力が減弱すること。
- (4) 条件づけ恐怖発現の有無に対応して、扁桃体基底外側核内の異なるニューロン集団が活性化すること。
- (5) (4)の異なるニューロン集団は、その投射先が異なること。

今回明らかにした神経回路を抽出し、選択的な解析を進めることにより、恐怖の消失および復元の細胞メカニズムをより詳細に明らかにできると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we used contextual fear conditioning, large-scale imaging with immediate early genes and whole-cell recordings to demonstrate the neuronal circuits underlying fear extinction and reinstatement and found the results described below.

- (1) The neuronal activity in the infralimbic cortex is decreased during fear reinstatement.
- (2) Neural plasticity in the infralimbic cortex is involved in fear reinstatement.
- (3) Excitatory synaptic currents onto infralimbic cortical neurons are reduced with fear reinstatement.
- (4) A specific subset of basolateral amygdala neurons is active during fear memory expression.
- (5) The basolateral amygdala neurons that are active during fear memory expression have different projection from the other neurons.

Further analysis of our identified neuronal circuits will contribute to understanding the cellular mechanisms underlying fear extinction and reinstatement.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経薬理学

科研費の分科・細目：神経科学

キーワード：記憶、扁桃体、恐怖条件づけ

1. 研究開始当初の背景

記憶は生物個体の将来の行動を制御する重要な機能である。特に恐怖記憶は心的外傷後ストレス障害 (PTSD) を含めた不安障害の発症要因となっており、社会生活の質を著しく低下させる。そのため、恐怖記憶の発現、消失メカニズムの解明が求められている。

2. 研究の目的

恐怖記憶は消失トレーニングによって、発現を抑制することができる。しかし、時間経過および別なストレスの経験によって恐怖発現は復元する。これまでの多くの研究は、恐怖記憶の形成過程に注目してきた。しかし、実際に恐怖の抑制を目指すためには、恐怖の消失過程やその後の復元過程の解明も必須である。そこで本研究では、条件づけ恐怖の消失および復元に関する神経機構の解明を目指して研究を行った。

3. 研究の方法

全ての実験は、東京大学動物実験実施規則に従い、動物への苦痛を最小限に抑え、さらに使用する動物匹数を最小限に抑える努力の下に行った。

最初期遺伝子 c-Fos および Arc の発現を指標に、神経活動履歴を測定した。内側前頭前皮質を含むスライス標本からパッチクランプ記録を行い、ニューロンの内因的興奮性と微小興奮性シナプス後電流を測定した。

4. 研究成果

(1) 恐怖の復元に内側前頭前皮質の可塑性が関与する。

一度消失した恐怖はストレスによって復元する。復元に関わる神経機構を明らかにするため、復元に対する各種薬物の影響を調べた。NMDA 受容体阻害薬 MK-801、タンパク質合成阻害薬アニソマイシンの腹腔内投与によって復元は阻害された。恐怖の復元に NMDA 受容体の活性化、および新規タンパク質合成が関与すると考えられる。

次に、復元に関与する脳部位を特定するため、復元時に活性化する脳領域を調べた。その結果、内側前頭前皮質の下辺縁皮質の活性化が低下していた。過去の研究から、下辺縁皮質の活性化は扁桃体介在ニューロン、内側中心核を介して恐怖を抑制することが分かっている。そのため、下辺縁皮質の活性低下は扁桃体介在ニューロンの活性低下、扁桃体内側中心核の活性上昇を介して恐怖を増強すると考えられる。実際に、扁桃体介在ニューロンの活性は低下、扁桃体内側中心核の活性は上昇していた。

内側前頭前皮質の可塑性が復元に関与するかを調べるため、内側前頭前皮質へアニソマ

イシンおよび NMDA 受容体阻害薬 APV を投与した。その結果、いずれの投与によっても恐怖の復元は抑制された。内側前頭前皮質の NMDA 受容体、タンパク質合成が復元に関与すると考えられる。

では、内側前頭前皮質のどのような細胞内機構の変化が復元に関係するのだろうか。ニューロンの活動は主にシナプス入力と、そのニューロンの内因的興奮性によって規定される。パッチクランプ記録を行い、復元に伴って内側前頭前皮質ニューロンの興奮性シナプス入力および内因的興奮性がどのように変化するかを調べた。その結果、恐怖の消失時は内因的興奮性が上昇することで活動性が上昇するが、復元時は興奮性シナプス入力が増加することで活動性が減少することを明らかにした。

以上の結果から、恐怖の復元には内側前頭前皮質において、NMDA 受容体活性、タンパク質合成依存的に興奮性シナプス入力が増加し、その結果、下辺縁皮質の活性低下が扁桃体を介して恐怖の増強を引き起こすと考えられる。

(2) 扁桃体基底外側核内の異なるニューロン集団は、異なる投射先を介して恐怖発現の有無を制御する。

扁桃体基底外側核は恐怖の発現にも消失にも関与する。本研究ではさらに、恐怖条件づけ時、恐怖を発現する時、および発現しない時の神経活動を同一マウスの扁桃体外側核からイメージングした。その結果、恐怖を発現する時としない時では 70% 以上異なるニューロン集団が活性化していた。恐怖を発現する時に活性化したニューロンの多くは、恐怖条件づけ時に活性化したニューロンであった。この結果は、扁桃体が異なるニューロン集団を介して正負の情動を制御していること、恐怖発現を司るニューロン集団が恐怖条件づけによって形成されることを示唆している。

異なるニューロン集団は、どのようなメカニズムで正負の情動を制御するのだろうか。私たちは、異なるニューロン集団の投射先が異なるために、恐怖発現の有無が異なると考え、検証した。扁桃体中心核に逆行性トレーサー CTB を投与し、中心核に投射する扁桃体基底外側核のニューロンを標識した。その結果、恐怖を発現する際、中心核に投射するニューロンがより多く活性化することを見出した。扁桃体基底外側核は、投射先の異なるニューロン集団を介して恐怖発現を制御すると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件) 全て査読有

(1) Ayako Nonaka, Fumitaka Masuda, Hiroshi Nomura*, Norio Matsuki, Impairment of fear memory consolidation and expression by antihistamines, *Brain Research*, 2013: 1493, 19-26.

DOI: 10.1016/j.brainres.2012.11.030

(2) Yuki Miura, Masamitsu Naka, Norio Matsuki, Hiroshi Nomura*, Differential calcium dependence in basal and forskolin-potentiated spontaneous transmitter release in basolateral amygdala neurons, *Neuroscience Letters*, 2012: 529(1), 1-6.

DOI: 10.1016/j.neulet.2012.09.015

(3) Yoshiko Yamasaki, Koichi Hashikawa, Norio Matsuki, Hiroshi Nomura*, Off-line Arc transcription in active ensembles during fear memory retrieval, *European Journal of Neuroscience*, 2012: 36(10):3451-7.

DOI: 10.1111/j.1460-9568.2012.08269.x

(4) Ryo Akiyama, Norio Matsuki, Hiroshi Nomura, Hisao Yoshida, Tomoko Yoshida, Shu Kobayashi*, Nontoxic, Nonvolatile, and Highly Efficient Osmium Catalysts for Asymmetric Dihydroxylation of Alkenes and Application to One Mol-scale Synthesis of an Anticancer Drug, *Camptothecin Intermediate*, *RSC Advances*, 2012: 2, 7456-7461.

DOI: 10.1039/C2RA21123H

(5) Hiroshi Nomura*, Ayako Nonaka, and Norio Matsuki, Population activity in the dorsal hippocampal CA1 encoding the surrounding environment is absent during contextual fear memory expression, *Neuroscience*, 2012: 220, 19-25.

DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.06.043

(6) Tetsuya Sakaguchi, Daisuke Ishikawa, Hiroshi Nomura, Norio Matsuki, and Yuji Ikegaya*, Normal learning ability of mice with a surgically exposed hippocampus, *Neuroreport*, 2012: 23(7), 457-461.

DOI: 10.1097/WNR.0b013e32835375b6

(7) Hiroshi Nomura*, Ayako Nonaka, Natsuko Imamura, Koichi Hashikawa and Norio

Matsuki, Memory coding in plastic neuronal subpopulations within the amygdala, *NeuroImage*, 2012: 60(1), 153-161.

DOI: 10.1016/j.neuroimage.2011.12.022

(8) Yusuke Sekine, Shuichi Takagahara, Ryo Hatanaka, Takeshi Watanabe, Haruka Oguchi, Takuya Noguchi, Isao Naguro, Kazuto Kobayashi, Makoto Tsunoda, Takashi Funatsu, Hiroshi Nomura, Takeshi Toyoda, Norio Matsuki, Erina Kuranaga, Masayuki Miura, Kohsuke Takeda*, and Hidenori Ichijo, p38 MAP kinase regulates the expression of genes in the dopamine synthesis pathway through phosphorylation of NR4A nuclear receptors, *Journal of Cell Science*, 2011: 124(Pt 17), 3006-3016.

DOI: 10.1242/jcs.085902

(9) Huilian Shen, Yuta Fuchino, Daisuke Miyamoto, Hiroshi Nomura*, and Norio Matsuki, Vagus nerve stimulation enhances perforant path-CA3 synaptic transmission via the activation of beta-adrenergic receptors and the locus coeruleus, *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 2012: 15(4), 523-30

DOI: 10.1017/S1461145711000708

[学会発表] (計 57 件)

(1) 仲理允、島上洋、松木則夫、野村洋、コルチコステロンの慢性投与は扁桃体基底外側核神経細胞において持続的に機能的シナプスの増加および内因的興奮性の上昇を引き起こす、日本薬学会 第 133 年会、2013 年 3 月 28 日、横浜

(2) 五十嵐ひかる、沈慧蓮、松木則夫、野村洋、恐怖の復元に NMDA 受容体および蛋白質合成が関与する、日本薬学会 第 133 年会、2013 年 3 月 28 日、横浜

(3) 野中綾子、松木則夫、野村洋、恐怖条件づけにおける神経活動の変化、日本薬学会 第 133 年会、2013 年 3 月 28 日、横浜

(4) 三浦友樹、松木則夫、野村洋、下辺縁皮質神経細胞の内因的興奮性およびシナプス伝達と恐怖反応、日本薬学会 第 133 年会、2013 年 3 月 28 日、横浜

(5) 中山大輔、山崎良子、岩田浩一、松木則夫、野村洋、恐怖記憶想起後の Arc 発現の役割、日本薬学会 第 133 年会、2013 年 3 月 28 日、横浜

(6) 三浦友樹、松木則夫、野村洋、下辺縁皮質神経細胞の電気生理学的性質と恐怖反応の獲得および消失、先端分子薬理研究会、2013年3月28日、東京

(7) 長村浩子、松木則夫、野村洋、恐怖条件づけに関与する、扁桃体におけるニューロン集団の解明、先端分子薬理研究会、2012年12月1日、東京

(8) 仲理允、島上洋、松木則夫、野村洋、慢性的なコルチコステロンの投与は扁桃体基底外側核神経細胞におけるシナプス入力が増加および内的興奮性の上昇を引き起こす、第127回日本薬理学会関東部会、2012年10月20日、東京

(9) Hiroshi Nomura, Natsuko Imamura, Huilian Shen, Norio Matsuki, The medial prefrontal cortex controls relapse of conditioned fear, Society for Neuroscience 2012, 2012年10月14日、New Orleans (アメリカ)

(10) Hiroshi Nomura, Natsuko Imamura, Huilian Shen, Norio Matsuki, The medial prefrontal cortex controls relapse of conditioned fear, Molecular and cellular cognition society 2012, 2012年10月11日、New Orleans (アメリカ)

(11) 富川恵美、野村洋、松木則夫、末梢性ストレスによる記憶学習の減弱、第35回日本神経科学大会、2012年9月21日、神戸

(12) 仲理允、島上洋、松木則夫、野村洋、慢性的なコルチコステロンの投与が扁桃体基底外側核神経細胞における樹状突起の伸長および内的興奮性の上昇をもたらす、第35回日本神経科学大会、2012年9月21日、神戸

(13) 坂口哲也、石川大介、野村洋、松木則夫、池谷裕二、海馬の露出処置はマウスの学習能力に影響を与えない、第35回日本神経科学大会、2012年9月20日、神戸

(14) 今村菜津子、沈慧蓮、松木則夫、野村洋、前頭前皮質における新規タンパク合成は条件づけ恐怖の復元に重要である、第35回日本神経科学大会、2012年9月19日、神戸

(15) 中山大輔、山崎良子、松木則夫、野村洋、想起後の遅発的なタンパク質発現が想起後の記憶の維持に必要、第35回日本神経科学大会、2012年9月19日、神戸

(16) 中山大輔、山崎良子、岩田浩一、松木則夫、野村洋、記憶の維持における遅発性 Arc 発現の必要性、次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2012、2012年9月1日、神戸

(17) 中山大輔、山崎良子、松木則夫、野村洋、恐怖記憶想起後の遅発的な Arc 発現が恐怖記憶の維持に必要である、第126回日本薬理学会関東部会、2012年7月14日、東京

(18) 中山大輔、山崎良子、松木則夫、野村洋、想起後の遅発的な Arc タンパク質発現がその後の記憶の維持に必要、第12回東京大学生命科学シンポジウム、2012年6月30日、東京

(19) 仲理允、島上洋、松木則夫、野村洋、慢性的なコルチコステロンの投与は扁桃体基底外側核神経細胞における樹状突起の伸長および内的興奮性の上昇を引き起こす、第12回東京大学生命科学シンポジウム、2012年6月30日、東京

(20) 野村洋、沈慧蓮、松木則夫、消失した条件づけ恐怖の復元、日本薬学会 第132年会、2012年3月28日、札幌

(21) 三浦友樹、松木則夫、野村洋、扁桃体基底外側核における増強後の活動電位非依存的な伝達物質放出はカルシウム源が異なる、第85回日本薬理学会年会、2012年3月15日、京都

(22) 野中綾子、松木則夫、野村洋、恐怖条件づけによる扁桃体外側核における神経活動変化はすくみ反応と相関する、第85回日本薬理学会年会、2012年3月14日、京都

(23) 沈慧蓮、松木則夫、野村洋、恐怖反応の復元には NMDA 受容体およびタンパク合成が必要である、第85回日本薬理学会年会、2012年3月14日、京都

(24) 橋川浩一、松木則夫、野村洋、異なる感覚刺激を用いた連合記憶の干渉、第85回日本薬理学会年会、2012年3月14日、京都

(25) Yuki Miura, Norio Matsuki, Hiroshi Nomura, Differential source of calcium in potentiated spontaneous transmitter release in basolateral amygdala neurons, 平成23年度生理学研究所国際研究集会 シナプス研究会、2011年12月8日、岡崎

(26) Koichi Hashikawa, Norio Matsuki, Hiroshi Nomura, The roles of

off-line brain activity after learning: Possible roles on memory consolidation and memory interference、Society for Neuroscience 2011、2011年11月15日、Washington DC (アメリカ)

(27) Ayako Nonaka, Norio Matsuki, Hiroshi Nomura、Fear conditioning enables fear-related neurons to be responsive to CS、Society for Neuroscience 2011、2011年11月15日、Washington DC (アメリカ)

(28) Yoshiko Yamasaki, Norio Matsuki, Hiroshi Nomura、Preferential transcription of Arc RNA after the retrieval of contextual fear memory in the basolateral amygdala、Society for Neuroscience 2011、2011年11月15日、Washington DC (アメリカ)

(29) Hiroshi Nomura, Takeshi Toyoda, Yuki Miura, Natsuko Imamura, Hiroshi Shimagami, Koichi Hashikawa, Megumi Eguchi, Shun Yamaguchi, Yuji Ikegaya, Norio Matsuki、Synaptic potentiation relevant to fear conditioning is localized in specific subsets of basolateral amygdala neurons、Society for Neuroscience 2011、2011年11月15日、Washington DC (アメリカ)

(30) Koichi Hashikawa, Norio Matsuki, Hiroshi Nomura、The roles of off-line brain activity after learning: Possible roles on memory consolidation and memory interference、Molecular and cellular cognition society 2011、2011年11月10日、Washington DC (アメリカ)

(31) Ayako Nonaka, Norio Matsuki, Hiroshi Nomura、Fear conditioning enables fear-related neurons to be responsive to CS、Molecular and cellular cognition society 2011、2011年11月10日、Washington DC (アメリカ)

(32) Yoshiko Yamasaki, Norio Matsuki, Hiroshi Nomura、Preferential transcription of Arc RNA after the retrieval of contextual fear memory in the basolateral amygdala、Molecular and cellular cognition society 2011、2011年11月10日、Washington DC (アメリカ)

(33) Hiroshi Nomura, Takeshi Toyoda, Yuki Miura, Natsuko Imamura, Hiroshi Shimagami, Koichi Hashikawa, Megumi Eguchi, Shun Yamaguchi, Yuji Ikegaya, Norio Matsuki、

Synaptic potentiation relevant to fear conditioning is localized in specific subsets of basolateral amygdala neurons、Molecular and cellular cognition society 2011、2011年11月10日、Washington DC (アメリカ)

(34) 今村菜津子、松木則夫、野村洋、恐怖反応の増強、消失、回復の行動学的解析、第21回日本臨床精神神経薬理学会・第41回日本神経精神薬理学会 合同年会、2011年10月28日、東京

(35) 島上洋、松木則夫、野村洋、慢性的なグルコルチコイドへの暴露による扁桃体神経細胞の形態変化と不安様・うつ様行動、第21回日本臨床精神神経薬理学会・第41回日本神経精神薬理学会 合同年会、2011年10月27日、東京

(36) 野村洋、宮本大祐、飯島稔、松木則夫、海馬歯状回の脱落による不安関連行動の障害、第21回日本臨床精神神経薬理学会・第41回日本神経精神薬理学会 合同年会、2011年10月27日、東京

(37) Ayako Nonaka, Norio Matsuki, Hiroshi Nomura、Fear memory formation changes activity of fear related neurons in the lateral amygdala、The 32nd NAITO Conference、2011年10月19日、大泉高原

(38) Hiroshi Nomura, Takeshi Toyoda, Yuki Miura, Natsuko Imamura, Hiroshi Shimagami, Koichi Hashikawa, Megumi Eguchi, Shun Yamaguchi, Yuji Ikegaya, Norio Matsuki、Fear conditioning induces synaptic changes localized to specific subsets of basolateral amygdala neurons、The 32nd NAITO Conference、2011年10月19日、大泉高原

(39) 沈 慧蓮、松木則夫、野村洋、恐怖反応の復元に関わる神経回路および分子メカニズムの解明、第125回日本薬理学会関東部会、2011年10月15日、船橋

(40) 今村菜津子、松木則夫、野村洋、恐時間経過による恐怖反応の増強および回復の行動学的解析、第55回日本薬学会関東支部大会、2011年10月8日、船橋

(41) 島上洋、松木則夫、野村洋、グルコルチコイドの慢性的な投与によるうつ様・不安様行動と扁桃体神経細胞の形態変化、第55回日本薬学会関東支部大会、2011年10月8日、船橋

(42) Hiroshi Shimagami, Norio Matsuki, Hiroshi Nomura, Chronic Corticosterone Induces Affective Behaviors and Dendritic Hypertrophy of Basolateral Amygdala Neurons, 2nd Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology, 2011年9月23-24日、Seoul (韓国)

(43) Hiroshi Nomura, Daisuke Miyamoto, Minoru Iijima, Norio Matsuki, Anxiolytic-like behavior in rats with dentate gyrus lesions, 2nd Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology, 2011年9月23-24日、Seoul (韓国)

(44) 野中綾子、松木則夫、野村洋、恐怖条件づけにより恐怖関連ニューロンは条件刺激に対して応答するようになる、第34回日本神経科学大会、2011年9月17日、横浜

(45) 野村洋、豊田雄、三浦友樹、今村菜津子、島上洋、橋川浩一、江口恵、山口瞬、池谷裕二、松木則夫、恐怖条件づけによるシナプス伝達の増強は、扁桃体基底外側核の一部のニューロン集団に限局して生じる、第34回日本神経科学大会、2011年9月17日、横浜

(46) 山崎良子、松木則夫、野村洋、文脈的恐怖記憶想起後の扁桃体におけるArc転写の再活性化、第34回日本神経科学大会、2011年9月16日、横浜

(47) 今村菜津子、松木則夫、野村洋、恐怖記憶の増強に関する行動学的解析、第34回日本神経科学大会、2011年9月15日、横浜

(48) 島上洋、松木則夫、野村洋、慢性的なストレスホルモンの投与による行動異常と扁桃体神経細胞の形態変化、第34回日本神経科学大会、2011年9月15日、横浜

(49) 橋川浩一、松木則夫、野村洋、学習後の脳活動の役割：記憶の固定化と記憶の干渉への関与の可能性、第34回日本神経科学大会、2011年9月15日、横浜

(50) 宮本大祐、野村洋、松木則夫、低頻度刺激によるNMDA受容体依存的な貫通繊維-歯状回経路のシナプス増強、第34回日本神経科学大会、2011年9月15日、横浜

(51) 野村洋、野中綾子、豊田雄、江口恵、山口瞬、松木則夫、扁桃体のニューロン集団による恐怖記憶の符号化様式、生体機能と創

薬シンポジウム 2011、2011年9月2日、東京

(52) 山崎良子、松木則夫、野村洋、記憶の維持に関連した想起後のArc転写の再活性化、次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2011、2011年8月31日、東京

(53) 野村洋、野中綾子、豊田雄、江口恵、山口瞬、池谷裕二、松木則夫、恐怖記憶を担う扁桃体のニューロン集団とそのシナプス伝達の変化、2011年度包括型脳科学研究推進支援ネットワーク夏のワークショップ、2011年8月23日、神戸

(54) 山崎良子、松木則夫、野村洋、恐怖記憶想起後の扁桃体外側核におけるArc転写の再活性化、第124回日本薬理学会関東部会、2011年6月4日、東京

(55) 野中綾子、松木則夫、野村洋、恐怖条件づけにより恐怖関連ニューロンの応答性が変化する、第124回日本薬理学会関東部会、2011年6月4日、東京

(56) 宮本大祐、野村洋、松木則夫、NMDA受容体依存的シナプス可塑性の刺激頻度依存的パターンの三相性、第11回東京大学生命科学シンポジウム、2011年6月4日、東京

(57) 今村菜津子、松木則夫、野村洋、恐怖記憶の増強に関する行動学的解析、第11回東京大学生命科学シンポジウム、2011年6月4日、東京

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

学会発表1、3、24は年会優秀発表賞、学会発表18、57はポスター賞、学会発表39、55はYoung Investigator's Award、学会発表41は学生優秀研究発表賞、学会発表42はJSNP Excellent Presentation Award for AsCNP 2011、学会発表43は2nd AsCNP Fellowship Awardを受賞した。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 洋 (Nomura Hiroshi)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：10549603