

ドーパミン作動性細胞に発現する Otx2 の恐怖記憶における役割

飯島 友也

新潟大学大学院医歯学総合研究科分子細胞医学専攻神経発達学分野
(主任:杉山清佳准教授)

A role of Otx2-expressing dopamine neurons in fear memory

Tomoya Iijima

Lab of Neuronal Development, Division of Cellular and Molecular Pathology,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences
(Director : Associate Prof. Sayaka Sugiyama)

要旨

外部からの刺激と連合した記憶は、神経細胞間のシナプス結合の強度が可塑的に変化することによって形成される。特に、恐怖情動の記憶には、扁桃体や海馬におけるシナプス結合の可塑性が重要である。神経伝達物質の1つであるドーパミンは、このシナプスの可塑性に影響を与え、恐怖記憶に関わると考えられている。一方、ドーパミンが恐怖記憶にどのように作用するのか、そのメカニズムには未だに疑問が多く残されている。扁桃体に入力する腹側被蓋野領域のドーパミン作動性細胞には、Otx2 ホメオ蛋白質が発現して細胞機能の維持に関わることが示唆されている。そこで本研究では、ドーパミン作動性細胞と Otx2 の恐怖記憶における作用を検討するため、ドーパミン作動性細胞特異的な Otx2 ノックアウトマウスを作成した。このマウスを用いて音に対する恐怖条件付けを行うと、Otx2 ノックアウトマウスにおいて恐怖記憶が低下することが明らかになった。さらに、組織学的な解析を行うと、恐怖記憶を制御する扁桃体基底外側核の前側核において、ドーパミン線維の減少が観察された。同様に、前側核において恐怖記憶の保持に関わるコンドロイチン硫酸や、Parvalbumin の発現が減少していた。これらの結果から、Otx2 欠損による扁桃体基底外側核の前側核の異常が、恐怖記憶の低下を招くと考えられた。近年、扁桃体基底外側核の前側核が恐怖刺激に応答するのと反対に、後側核は報酬刺激に応答することが報告されている。今回、Otx2 欠損によって後側核の異常は検出されなかったことから、Otx2 を発現するドーパミン作動性細胞は、前側核のみに作用して恐怖記憶の想起を促すことが示唆された。本研究の結果は、ドーパミン作動性細胞が入力した局所領域あるいは標的細胞の性質により、ドーパミンがもたらす作用に違いが生じることを示唆している。

キーワード：ドーパミン、扁桃体、Otx2、恐怖条件付け、神経可塑性

Reprint requests to: Tomoya Iijima

Lab of Neuronal Development, Division of Cellular and Molecular Pathology,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences
1-757 Asahimachi-dori Chuo-ku, Niigata 951-8510 JAPAN

別刷請求先：〒950-8510 新潟市中央区旭町通 1-757

新潟大学大学院医歯学総合研究科神経発達学分野
飯島友也

緒言

生後の脳には、遺伝要因だけでなく外部の環境要因からの刺激や経験に依存して、神経回路を集中的に形成する時期（臨界期）がある。特に、視覚などの知覚機能の発達には、経験に応じた回路形成が必須であり、例えば、視力の向上にも視覚経験が必要である。子どもの脳で観察される臨界期は、回路の可塑性が最も高まる時期として知られる。

これまでに、マウスを用いた研究から、ホメオ蛋白質 Otx2 は視覚の臨界期を制御することが示されている^{1,2)}。Otx2 は大脳視覚野の特定の抑制性神経細胞（Parvalbumin 陽性細胞、PV 細胞）に局在し、PV 細胞の発達を促すことで、回路の可塑性を制御することができる。大脳において Otx2 は、PV 細胞を取り囲むコンドロイチン硫酸の量を増加させ、PV 細胞の機能を増強する³⁾。さらに、Otx2 ホメオ蛋白質は転写因子として精神疾患に関連する因子や、ミトコンドリア機能に関連する因子の発現を制御すると推測される⁴⁾。実際に、Otx2 はミトコンドリアを介して網膜細胞の生存を保護することが報告されている⁵⁾。さらに、酸化ストレスの増加によるミトコンドリアのダメージは、視覚回路の可塑性にも影響を与えることが示唆されている⁶⁾。これらの報告は、生後の脳において Otx2 が、視覚経路の細胞の生存と機能を促し、回路の可塑性に作用することを示唆している。

胎生期には、Otx2 は脳を形成するホメオ蛋白質として知られている。視覚経路の細胞に強く発現して分化方向を決定するのと同様に、ドーパミン作動性細胞にも強く発現し、細胞運命の決定に寄与する。特に、胎生初期の中脳領域に Otx2 を過剰発現させると、腹側被蓋野のドーパミン作動性細胞の数が増加し、自発運動活性の減少や不安行動の増加が観察される^{7,8)}。生後の脳においても、Otx2 はドーパミン作動性細胞に発現しており、Otx2 の欠損はパーキンソン病神経毒に対する抵抗力を低下させ、細胞死を導く⁹⁾。視覚経路における Otx2 の作用を考えると、Otx2 はドーパミン作動性細胞の機能と可塑性に、深く関与することが推測される。

Otx2 が発現する腹側被蓋野は、好き嫌いにまつわる情動の刺激に発火応答することが報告されている¹⁰⁾。特に、腹側被蓋野のドーパミン作動性細胞は、扁桃体や海馬、大脳内側前頭皮質、線条体に投射することで、情動記憶の制御にも関与することが示唆されている^{11,12)}。一方、薬理学あるいはドーパミン受容体欠損マウスを用いた研究蓄積から、恐怖記憶におけるドーパミンの作用は一様ではないと考えられる。そこで本研究では、Otx2 が発達期の回路の可塑性だけでなく、成体の記憶・学習にも関わる可能性について解析する。特に、Otx2 を発現するドーパミン作動性細胞と恐怖記憶との関連性を明らかにするために、ドーパミン作動性細胞特異的に Otx2 が欠損するノックマウスを作成し、恐怖条件付け行動解析と組織学的解析を行った。

材料と方法

1、動物

本研究では、ドーパミントランスポーター遺伝子 (DAT) のプロモーター制御下で、ドーパミン作動性細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する DAT-Cre マウス¹³⁾と、loxP 配列に挟まれた Otx2 遺伝子座を持つ Otx2-flox マウス¹⁴⁾を掛け合わせ、Otx2 コンディショナルノックアウトマウスを作成した。また、Cre リコンビナーゼ依存的に EGFP を発現する Z/EG マウス¹⁵⁾、Otx2 遺伝子座に lacZ 遺伝子が挿入された Otx2-lacZ マウス¹⁶⁾を使用した。マウスは 12 時間の明暗サイクルで飼育を行い、生後 8 週齢以上の成体雄マウスを実験に使用した。すべての動物実験は、新潟大学動物実験施設が設けるガイドラインに従って行った。

2、免疫組織化学染色

ハロタン麻酔を施したマウスの腹腔内にペントバルビタールナトリウム注射液(5mg/ml)を注射し、麻酔の効きを確認後、4% Paraformaldehyde (PFA) による灌流固定を行った。剖出した脳は 4% PFA 溶液中で 1 時間の後固定(4°C)を行い、30% sucrose を含む 0.1M リン酸緩衝液で一晩置換した。凍結脳サンプルから厚さ 20 μ m の冠状切片を作成し、PBT(PBS, 0.1% Tween-20)で洗浄後、5% goat serum でブロッキングを行い、一次抗体反応液と一晩 4°C で反応させた。一次抗体には抗 Otx2 抗体 (ウサギ, Millipore)、抗チロシンヒドロキシラーゼ(TH)抗体 (マウス, Millipore)、抗 Parvalbumin 抗体 (マウス, Swant)、Glycosaminoglycan (GAG)の検出には、Biotin 標識 Wisteria floribunda agglutinin (WFA, Sigma)を用いた。二次抗体および蛍光染色には、Alexa Flour 488 標識抗ウサギ IgG 抗体(Invitrogen)、Alexa Flour 594 標識抗マウス IgG 抗体(Invitrogen)、Alexa Flour 488 標識 streptavidin(Invitrogen)を用いた。反応後 PBT で洗浄し、退色防止封入剤(Vector)で封入して観察を行った。

3、画像解析

作成した標本から、蛍光顕微鏡(Nikon、KEYENCE)とコンフォーカル顕微鏡(Nikon)を用いて、一定の露光条件のもと画像を撮影した。画像解析には NIS-Elements AR Analysis software (Nikon)を使用した。腹側被蓋野領域、扁桃体基底外側核領域の前側核・後側核を取り囲み、囲い線内の蛍光強度の平均値を算出した。Parvalbumin 陽性細胞も細胞体を線で囲い、細胞体の平均蛍光強度を算出した。背景から陽性細胞を明確に区別するため、平均蛍光強度が閾値以上の細胞のみを使用した。コントロールマウスとノックアウトマウスのグループ間比較は、Welch's *t*-test あるいは Student's *t*-test により行った。

4、恐怖条件付け行動解析

恐怖条件付け実験の 2 日前からマウスの馴化を行った。馴化 1 日目には対象のマウスを手のひらに乗せた後、静かにホームケージに戻した。2 日目にはマウスを手のひらに乗せて 1 分間ほど手の上で自由に行動させて馴化した。

恐怖条件付け (実験 1 日目) のため、飼育施設から実験室にホームケージごと馴化マウスを移送し、暗所で 10 分以上静置して落ち着かせた。マウスは興奮させないように優しく取り出し、空ケージを経由して、あらかじめ次亜塩素酸とエタノールで洗浄しておいた金網チャンバーに移した。チャンバー内の照度が 200 lux、バックグラウンドノイズが 50 db になるよう設定した実験箱に、マウスが入った金網チャンバーをセットし実験を開始した。開始後 180 秒で 65 db の音 (Conditioned Stimulus, CS) を 30 秒間鳴らし、音の最後 2 秒間に 0.4mA の電気ショックを与えた。その後 90 秒の間隔を空け、再度音とショックを与え、合計 3 回の

恐怖条件付けを行った。終了後は空ケージを経由して、暗所内のホームケージにマウスを速やかに戻した。

恐怖条件付け実験の翌日（実験 2 日目）、翌々日（実験 3 日目）、9 日後（実験 10 日目）には、恐怖条件付け時と同様の手順でマウスを半透明チャンバーに移し、実験箱内に設置した。チャンバー内の照度を 50 lux に設定し、マウスを入れてから 180 秒後に音（CS）のみを 30 秒間鳴らし、CS に対する応答を測定した。その後 60 秒の間隔を空けて再度音を聴かせ、一日当たり合計 14 回の消去学習を行った。

マウスのチャンバー内での移動距離と恐怖行動の 1 つであるすくみ行動（Freezing）は、TimeFZ1 software（小原医科産業株式会社）を用いて測定された。CS 前（180 秒間）と CS 中（30 秒間）のすくみ行動の割合をマウスグループ間で比較し、Welch's *t*-test あるいは Student's *t*-test により統計処理した。なお、一連の行動解析実験には littermate マウスを用い、マウスの遺伝子型は実験終了後に明らかにされた（ブラインドテスト）。

結果

ドーパミン作動性細胞における Otx2 ホメオ蛋白質の発現

本研究では、ドーパミン作動性細胞における Otx2 ホメオ蛋白質の役割を解析する。これまでに、特に腹側被蓋野（A10）のドーパミン作動性細胞において Otx2 が発現することが示されている¹⁷⁾。一方、他のドーパミン作動性細胞における Otx2 の発現については未だ報告がない。そこで、Otx2 遺伝子座に lacZ レポーター遺伝子が組み込まれた Otx2-lacZ マウス¹⁶⁾を使用し、LacZ の発現を検出することにより Otx2 を発現する細胞を観察した。抗 TH 抗体での染色を行い、ドーパミン作動性細胞を含む神経核を同定した結果、多くのドーパミン神経核において Otx2 が発現することが分った（表 1）。特に、Otx2 は大脳辺縁部や線条体などに投射する中脳神経核（A8-11）に発現が観察され、情動との関係性が推測された。そこで、ドーパミントランスポーター（DAT）のプロモーター制御下で、ドーパミン作動性細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する DAT-Cre マウスと、Otx2-flox マウスを掛け合わせ、Otx2 コンディショナルノックアウトマウスを作成した。DAT-Cre マウスにおける Cre 発現細胞の観察には、Cre 依存的に EGFP を発現する Z/EG マウス¹⁵⁾を用いた。ZEG/DAT-cre マウスの標本に対して抗 TH 抗体との二重染色を行うことにより、腹側被蓋野（A10）、黒質緻密部（A9）、赤核後方部（A8）のみで Cre リコンビナーゼが発現することを確認した（表 1、図 1 A,B）。中でも、腹側被蓋野領域はネガティブ（嫌い）な刺激、あるいはポジティブ（好き）な刺激の双方に反応し、情動に関与する神経核であることが示唆されている¹⁰⁾。Otx2-flox/DAT-cre マウスにおいて抗 Otx2 抗体の染色像を観察すると、Cre の発現と一致して、腹側被蓋野領域で Otx2 の発現が抑制されることが分った（図 1 C,D）。

Otx2 コンディショナルノックアウトマウスにおける恐怖条件付け行動解析

腹側被蓋野のドーパミン作動性細胞は、恐怖・不安の記憶制御に関与する扁桃体や海馬、大脳内側前頭皮質に投射し、恐怖記憶の獲得や維持に関与することが示唆されている。さらに、胎生期の腹側被蓋野に Otx2 を過剰発現させたマウスでは、大脳内側前頭皮質に投射するドーパミン線維が増え、自発運動の低下と不安行動の増加が報告されている⁸⁾。そこで、Otx2 の恐怖記憶に対する作用を検討するため、Otx2 ノックアウトマウス（Otx2-flox/DAT-Cre）に対する恐怖条件付け行動解析を行った。

実験 1 日目には、コントロールマウス（Otx2-flox）11 匹およびノックアウトマウス（Otx2-flox/DAT-Cre）8 匹に対し、音（CS）と電気ショックによる恐怖条件付けを行った（図 2 A）。電気ショックを与える前(180

秒間)の行動量にグループ間の差はなく、顕著な自発運動の違いは検出されなかった(図 2 B)。音が鳴っている間 (30 秒間) のすくみ行動 (Freezing) の持続時間を計測して恐怖条件付けの成立を評価すると、どちらのグループも等しく、音に対する恐怖条件付けが成立した (図 2 C)。なお、翌日以降は音 (CS) のみを聞かせ、CS 中のすくみ行動時間を計測して、各グループにおける恐怖記憶の想起を評価した (図 2 D-F)。その結果、恐怖条件付け 1 日後 (実験 2 日目)、最初の音 (CS1) に対するノックアウトマウスのすくみ行動時間は、コントロールマウスに比べて有意に減少した (図 2 D')。すなわち、Otx2 の減少により 1 日後における恐怖記憶の想起が減弱することが示唆された。その後、音のみによる恐怖条件付けの消去学習を実験 3 日目にわたって繰り返すことにより、どちらの個体も同程度まですくみ行動を抑制することができた(図 2 E')。しかしながら、消去学習から 1 週間後 (実験 10 日目) に恐怖記憶の自発的回復を評価したところ、コントロールマウスではこれまでの報告と一致して¹⁸⁾、音に対する恐怖記憶が回復したのに対し、ノックアウトマウスではすくみ行動が見られず、恐怖記憶が完全に消去されていた(図 2 F')。これらの結果から、ドーパミン作動性細胞における Otx2 の欠損は、恐怖記憶の想起および自発的回復を低下させることが示唆された。

扁桃体基底外側核におけるドーパミン作動性細胞と機能分子の局在

これまでに、音によって条件付けられた恐怖記憶は、扁桃体基底外側核 (basolateral amygdala) で統合され、保持されると考えられている¹⁹⁾。行動解析の結果、Otx2 欠損により恐怖記憶の低下が見られたことから、Otx2 がドーパミン作動性細胞の扁桃体への投射に影響を与える可能性が推測された。そこで、コントロールマウス (Otx2-flox) および Otx2 ノックアウトマウス (Otx2-flox/DAT-Cre) から冠状切片を作成し、抗 TH 抗体を用いてドーパミン作動性細胞を検出した。腹側被蓋野のドーパミン作動性細胞においては、ノックアウトマウスの TH 染色像に変化はなかった(図 3 A-C)。一方、扁桃体基底外側核の前側核 (BLA) と後側核 (BLP) から TH 染色を検出すると、扁桃体基底外側核領域の前側核において、ノックアウトマウスのドーパミン線維 (TH 陽性線維) がコントロールマウスに比べて有意に減少した(図 3 D-F)。後側核においてはドーパミン線維の有意差は検出されなかった。

扁桃体基底外側核の細胞外基質に含まれるコンドロイチン硫酸は、恐怖記憶の自発的回復に寄与することが報告されている¹⁸⁾。コンドロイチン硫酸を酵素分解したマウスでは、恐怖記憶の自発的回復が見られなくなる。WFA を用いてコンドロイチン硫酸を標識すると、扁桃体基底外側核領域の前側核 (BLA) において、ノックアウトマウスのコンドロイチン硫酸がコントロールマウスに比べて有意に減少していた(図 4 A-C)。一方、後側核 (BLP) においては有意な差は検出されなかった。

さらに扁桃体基底外側核には、記憶の形成や維持に必要な興奮性神経細胞とともに、記憶を抑制する抑制性神経細胞も含まれている。近年、特定の GABA 作動性抑制性神経細胞 (Parvalbumin 陽性細胞、PV 細胞) が、恐怖記憶の消去に関与することが報告されている²⁰⁾。抗 PV 抗体を用いて PV 細胞を検出し、細胞数を比較した結果、扁桃体基底外側核の前側核 (BLA) と後側核 (BLP) とともにグループ間での違いは認められなかった (図 4 D-F)。一方で、PV 発現の強さを解析すると、前側核 (BLA) においてのみ、ノックアウトマウスの PV 発現がコントロールマウスに比べて有意に低下することが分った(図 4 G)。

これらの結果から、特に扁桃体基底外側核の前側核 (BLA) において、Otx2 欠損によるドーパミン線維の減少、およびコンドロイチン硫酸と PV の発現の減少が示唆された。

考察

本研究では、ドーパミン作動性細胞特異的な Otx2 欠損により、扁桃体基底外側核の前側核においてドーパミン線維が減少することを見出した。Otx2 が発現する腹側被蓋野は、扁桃体にドーパミン線維を伸ばす主な神経核として知られる。これまでに、Otx2 は胎生期に、腹側被蓋野のドーパミン作動性細胞の増殖と分化を促すことが示唆されている。Otx2 を胎生初期に欠損すると、腹側被蓋野のドーパミン作動性細胞が著しく減少するのに対し²¹⁾、Otx2 を過剰発現させると、ドーパミン作動性細胞が増え、大脳辺縁部に投射するドーパミン線維も増加する^{7,8)}。胎生後期には、Otx2 の増減によってドーパミン作動性細胞の数を変化させることは難しく、DAT-Cre を用いた Otx2 ノックアウトマウスにおいても細胞数の変化は観察されない⁹⁾。この結果は、本研究において腹側被蓋野ドーパミン作動性細胞の TH 染色像が変化しないことと一致している。一方、生後においても、Otx2 はドーパミン作動性細胞の機能維持に関わると考えられ、例えば、パーキンソン病を引き起こす神経毒 (MPTP) からドーパミン作動性細胞を保護する役割がある⁹⁾。本研究により、Otx2 は、扁桃体に入力するドーパミン線維の発達あるいは維持に関与することが示唆された。すなわち、Otx2 はドーパミン作動性細胞の機能を促進し、保持する上で重要な役割を果たすと考えられる。

腹側被蓋野は、恐怖刺激に対して発火応答するドーパミン作動性細胞と、報酬刺激に対して発火応答するドーパミン作動性細胞を含んでいる^{10,22)}。同様に、扁桃体基底外側核も、恐怖刺激に対して応答する前側核 (BLA) と、報酬刺激に対して応答する後側核 (BLP) に分けられることが示されている²³⁾。本研究では、特に前側核においてドーパミン線維が減少し、コンドロイチン硫酸と PV の発現も低下した。前側核は恐怖記憶にまつわる行動の表出を担うことから、Otx2 欠損による前側核の異常が、恐怖行動の減弱化に関与すると考えられる。

面白いことに、前側核と後側核は、抑制性神経細胞を介して互いの応答を抑制しあうことが示されている²³⁾。すなわち、両神経核の応答バランスによって恐怖記憶の強さが決定され、例えば、前側核の抑制性神経細胞の機能が低下すると、後側核によるポジティブな情動記憶が強まり、前側核による恐怖記憶は弱まると考えられる。本研究では、前側核の抑制性神経細胞の 1 つである PV 細胞において、PV の発現低下が認められた。PV の発現は、神経活動に依存して強くなり、抑制機能の強さを反映する²⁴⁾。そのため、Otx2 の欠損による前側核の PV の発現低下は、この抑制性神経細胞の抑制機能の低下を示唆しており、その結果として恐怖記憶が低下した可能性が推測される。

さらに本研究では、Otx2 欠損により前側核のコンドロイチン硫酸の量が減少し、恐怖記憶の自発的回復も観察されなかった。消去学習は、条件付けされた恐怖記憶を消去するのではなく、元の恐怖記憶を保持したまま別の記憶を形成する過程と考えられている。そのため、消去学習後にホームケージで 1 週間飼育されることにより、元の恐怖記憶がよみがえる (自発的回復)。コンドロイチン硫酸は、シナプス周囲に局在して、恐怖記憶を担うシナプス結合の保持に寄与すると考えられており、この恐怖記憶のよみがえりのために必要となる¹⁸⁾。Otx2 欠損によるコンドロイチン硫酸の減少は、シナプスの可塑性を高め、恐怖記憶の完全な消去を誘導すると推測される。

生後の脳において、Otx2 はドーパミン経路だけでなく、視覚経路にも発現する。Otx2 は視覚経験に依存して視覚機能の可塑性を制御することが知られており、ドーパミン経路を含め、広く回路の可塑性に関与することが推測される。実際に、Otx2 が作用する視覚野と扁桃体にはいくつかの類似点が見られる。どちらの領域もコンドロイチン硫酸と PV 細胞の機能が回路の可塑性に影響を与えており、成体マウスにおけるコンドロイチン硫酸の分解や PV 細胞の機能低下により可塑性が再誘導されることが知られている^{1,3,18)}。重要なことに、Otx2 は視覚野においてもコンドロイチン硫酸の量の増加と PV 細胞の機能成熟を促すことが分って

いる。これらの共通点は、ドーパミン経路が視覚経路と似た可塑性メカニズムを持つことを推測させる。視覚野には Otx2 は発現せず、視覚経路を通過して Otx2 蛋白質が PV 細胞へと供給されている。扁桃体にも Otx2 は発現しないが、ドーパミン経路を通過して Otx2 蛋白質が移動する可能性があり、今後の検討課題として挙げられる。

これまでに、恐怖記憶におけるドーパミン作動性細胞の関与についての研究は数多く蓄積されている。しかしながら、その多くはドーパミン受容体の薬理学的な解析と、ドーパミン受容体ノックアウトマウスを用いた解析であり、両者の結果が一致しないなど、ドーパミンの恐怖記憶における明確な役割を示すには至っていない^{11,12)}。さらに、ドーパミン受容体の種類によりグルタミン酸受容体への働きかけが異なるなど、シナプス伝達におけるモジュレーターとしての機能にも多様性が認められる²⁵⁾。本研究の結果は、ドーパミン作動性細胞が入力した領域あるいは細胞により、ドーパミン線維がもたらす作用に違いが生じることを示唆している。Otx2 を手掛かりに、領域（細胞）特異的なドーパミンの作用メカニズムを明らかにすることができれば、情動の不安定さを伴う様々な精神疾患（うつ病、統合失調症、自閉症、心的外傷後ストレス障害など）の治療法の開発に役立つと期待される。

謝辞

本研究においてご指導を賜りました新潟大学医歯学総合研究科神経発達学分野の杉山 清佳先生、侯 旭濱氏、酒井 晶子氏、吉岡 慧史氏、國見 順子氏、鈴木 明美氏、そして第一解剖教室、第二解剖教室の皆様、ならびに遺伝子改変マウスを頂きました大阪母子医療センター松尾勲先生、サニーブルック健康科学センター Corrinne G Lobe 先生に深謝申し上げます。

また、本研究は JSPS 特別研究員奨励費（JP15J04599）による支援を受け遂行されました。

文献

- 1) Sugiyama S, Di Nardo AA, Aizawa S, Matsuo I, Volovitch M, Prochiantz A, Hensch TK: Experience-dependent transfer of Otx2 homeoprotein into the visual cortex activates postnatal plasticity. *Cell* 134: 508-520, 2008.
- 2) Sugiyama S, Prochiantz A, Hensch TK: From brain formation to plasticity: insights on Otx2 homeoprotein. *Dev Growth Differ*. 51: 369-377, 2009.
- 3) Hou X, Yoshioka N, Tsukano H, Sakai A, Miyata S, Watanabe Y, Yanagawa Y, Sakimura K, Takeuchi K, Kitagawa H, Hensch TK, Shibuki K, Igarashi M, Sugiyama S: Chondroitin Sulfate Is Required for Onset and Offset of Critical Period Plasticity in Visual Cortex. *Sci Rep* 7: 12646, 2017.
- 4) Sakai A, Nakato R, Ling Y, Hou X, Hara N, Iijima T, Yanagawa Y, Kuwano R, Okuda S, Shirahige K, Sugiyama S: Genome-Wide Target Analyses of Otx2 Homeoprotein in Postnatal Cortex. *Front Neurosci* 11: 307, 2017.
- 5) Kim HT, Kim SJ, Sohn YI, Paik SS, Caplette R, Simonutti M, Moon KH, Lee EJ, Min KW, Kim MJ, Lee DG, Simeone A, Lamonerie T, Furukawa T, Choi JS, Kweon HS, Picaud S, Kim IB, Shong M, Kim JW: Mitochondrial Protection by Exogenous Otx2 in Mouse Retinal Neurons. *Cell Rep* 13: 990-1002, 2015.
- 6) Morishita H, Cabungcal JH, Chen Y, Do KQ, Hensch TK: Prolonged Period of Cortical Plasticity upon Redox Dysregulation in Fast-Spiking Interneurons. *Biol Psychiatry* 78: 396-402, 2015.
- 7) Omodei D, Acampora D, Mancuso P, Prakash N, Di Giovannantonio LG, Wurst W, Simeone A: Anterior-posterior graded response to Otx2 controls proliferation and differentiation of dopaminergic progenitors in the ventral mesencephalon. *Development* 135: 3459-3470, 2008.

- 8) Tripathi PP, Di Giovannantonio LG, Sanguinetti E, Acampora D, Allegra M, Caleo M, Wurst W, Simeone A, Bozzi Y: Increased dopaminergic innervation in the brain of conditional mutant mice overexpressing Otx2: effects on locomotor behavior and seizure susceptibility. *Neuroscience* 261: 173-183, 2014.
- 9) Di Salvio M, Di Giovannantonio LG, Acampora D, Prosperi R, Omodei D, Prakash N, Wurst W, Simeone A: Otx2 controls neuron subtype identity in ventral tegmental area and antagonizes vulnerability to MPTP. *Nat Neurosci* 13: 1481-1488, 2010.
- 10) Cohen JY, Haesler S, Vong L, Lowell BB, Uchida N: Neuron-type-specific signals for reward and punishment in the ventral tegmental area. *Nature* 482: 85-88, 2012.
- 11) de la Mora MP, Gallegos-Cari A, Arizmendi-García Y, Marcellino D, Fuxe K: Role of dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety: Structural and functional analysis. *Prog Neurobiol* 90: 198-216, 2010.
- 12) Abraham AD, Neve KA, Lattal KM: Dopamine and extinction: a convergence of theory with fear and reward circuitry. *Neurobiol Learn Mem* 108: 65-77, 2014.
- 13) Bäckman CM, Malik N, Zhang Y, Shan L, Grinberg A, Hoffer BJ, Westphal H, Tomac AC: Characterization of a mouse strain expressing Cre recombinase from the 3' untranslated region of the dopamine transporter locus. *Genesis* 44: 383-390, 2006.
- 14) Tian E, Kimura C, Takeda N, Aizawa S, Matsuo I: Otx2 is required to respond to signals from anterior neural ridge for forebrain specification. *Dev Biol* 242: 204-223, 2002.
- 15) Novak A, Guo C, Yang W, Nagy A, Lobe CG: Z/EG, a double reporter mouse line that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre-mediated excision. *Genesis* 28: 147-155, 2000.
- 16) Kimura C, Yoshinaga K, Tian E, Suzuki M, Aizawa S, Matsuo I: Visceral endoderm mediates forebrain development by suppressing posteriorizing signals. *Dev Biol* 225: 304-321, 2000.
- 17) Di Salvio M, Di Giovannantonio LG, Omodei D, Acampora D, Simeone A: Otx2 expression is restricted to dopaminergic neurons of the ventral tegmental area in the adult brain. *Int J Dev Biol* 54: 939-945, 2010.
- 18) Gogolla N, Caroni P, Lüthi A, Herry C: Perineuronal nets protect fear memories from erasure. *Science* 325: 1258-1261, 2009.
- 19) Duvarci S, Pare D: Amygdala microcircuits controlling learned fear. *Neuron* 82: 966-980, 2014.
- 20) Trouche S, Sasaki JM, Tu T, Reijmers LG: Fear extinction causes target-specific remodeling of perisomatic inhibitory synapses. *Neuron* 80: 1054-1065, 2013.
- 21) Puelles E, Annino A, Tuorto F, Usiello A, Acampora D, Czerny T, Brodski C, Ang SL, Wurst W, Simeone A: Otx2 regulates the extent, identity and fate of neuronal progenitor domains in the ventral midbrain. *Development* 131: 2037-2048, 2004.
- 22) Brischoux F, Chakraborty S, Brierley DI, Ungless MA: Phasic excitation of dopamine neurons in ventral VTA by noxious stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 4894-2899, 2009.
- 23) Kim J, Pignatelli M, Xu S, Itohara S, Tonegawa S: Antagonistic negative and positive neurons of the basolateral amygdala. *Nat Neurosci* 19: 1636-1646, 2016.
- 24) Donato F, Rompani SB, Caroni P: Parvalbumin-expressing basket-cell network plasticity induced by experience regulates adult learning. *Nature* 504: 272-276, 2013.
- 25) Meunier CN, Chameau P, Fossier PM: Modulation of synaptic plasticity in the cortex needs to understand all the players. *Front Synaptic Neurosci* 9: 2, 2017.

表. ドーパミン細胞におけるOtx2発現とCre発現領域

	Otx2	Cre
A17 網膜	+	-
A16 嗅球	-	-
A15,14 視床下部	+	-
A13 不確帯	+	-
A12 弓状核、下垂体	-	-
A11 尾側中脳水道周囲灰白質	+	-
A10 腹側被蓋野	+	+
A9 黒質	+	+
A8 赤核後方部	+	+

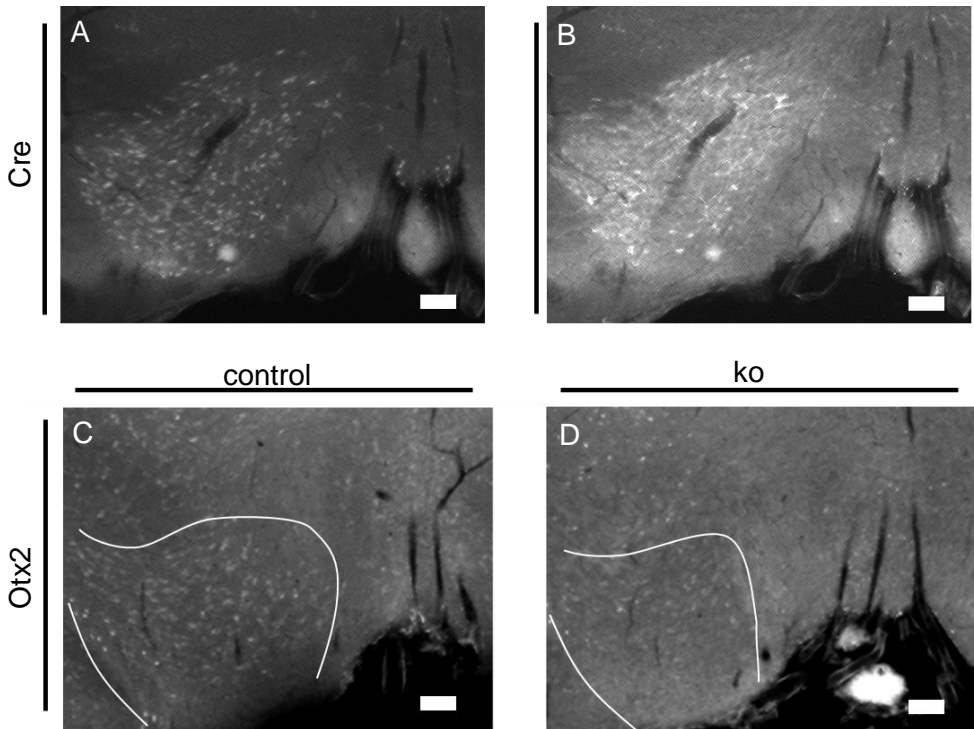
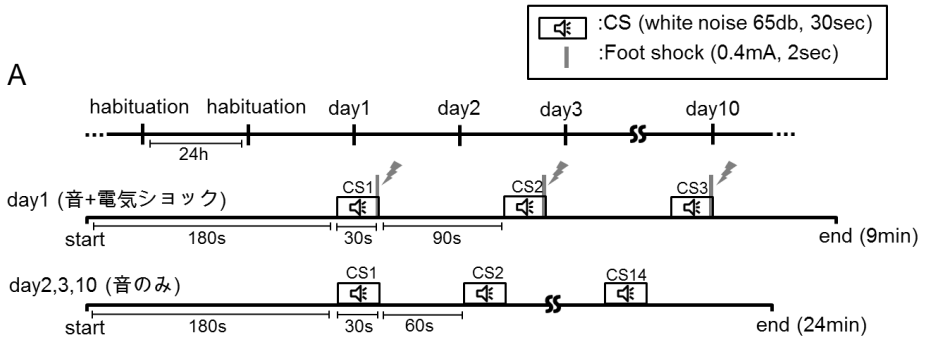
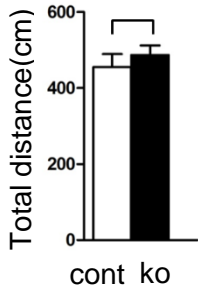


図.1 腹側被蓋野におけるCreリコンビナーゼとOtx2の発現解析

(A,B)ZEG/DAT-creマウスにおけるCreリコンビナーゼによるEGFPの発現誘導(A)。EGFPはTH陽性の腹側被蓋野ドーパミン作動性細胞に観察される(B)。(C,D)Creリコンビナーゼの発現によるOtx2の発現減少。Otx2ノックアウトマウス(ko)の腹側被蓋野(囲い線内)においてOtx2発現の抑制が観察される。
control: Otx2-floxマウス、ko: Otx2-flox/DAT-creマウス。スケールバーは200μm



B day1 No CS



C day1 CS1,2,3 + Foot shock

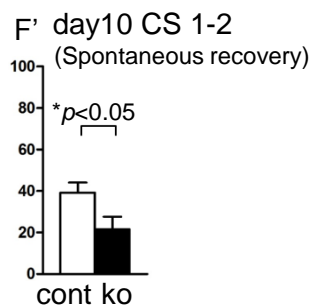
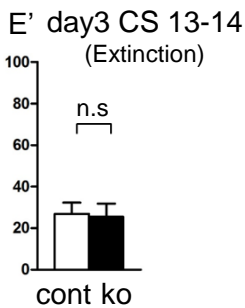
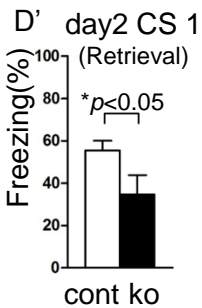
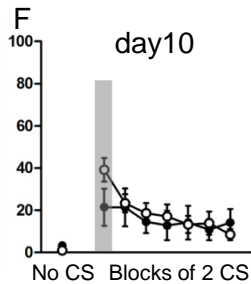
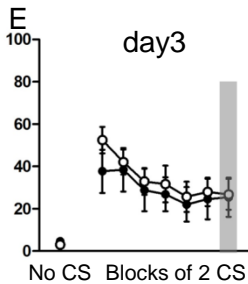
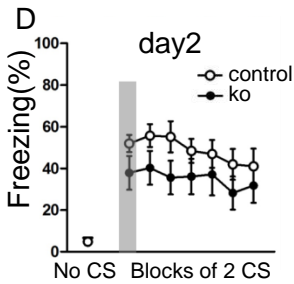
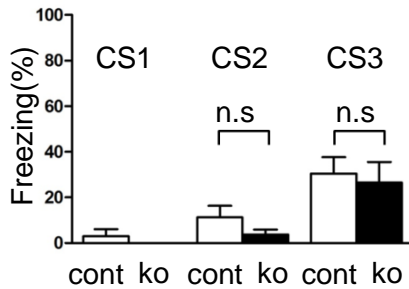


図.2 Otx2欠損による恐怖記憶の低下

(A) 音と電気ショックによる恐怖条件付け(実験1日目)と音に対するすくみ行動(freezing)の測定(実験2,3,10日目)。

(B,C)実験1日目の恐怖条件付け解析。コントロールマウスとノックアウトマウスの間で条件付け開始前(180秒間)のマウスの歩行距離において自発運動に有意差は認められなかった(B)。恐怖条件付け過程におけるすくみ行動の割合にも有意な差は見られなかった(B)。

(D-F) 各実験日におけるCS中のすくみ行動の割合と経時変化。コントロールマウスに比べOtx2ノックアウトマウス(ko)では2日目の最初の音(CS1)に対するすくみ行動率が低く、恐怖記憶の想起不全が示唆された(D')。2-3日目の消去学習によりどちらのグループもすくみ行動が抑制される(E')。10日目にコントロールマウスのすくみ行動は自発的に回復するのに対し、ノックアウトマウスでは恐怖記憶は消去されたままだった(F')。

データは平均値±SEM。control: Otx2-floxマウス、ko: Otx2-flox/DAT-creマウス

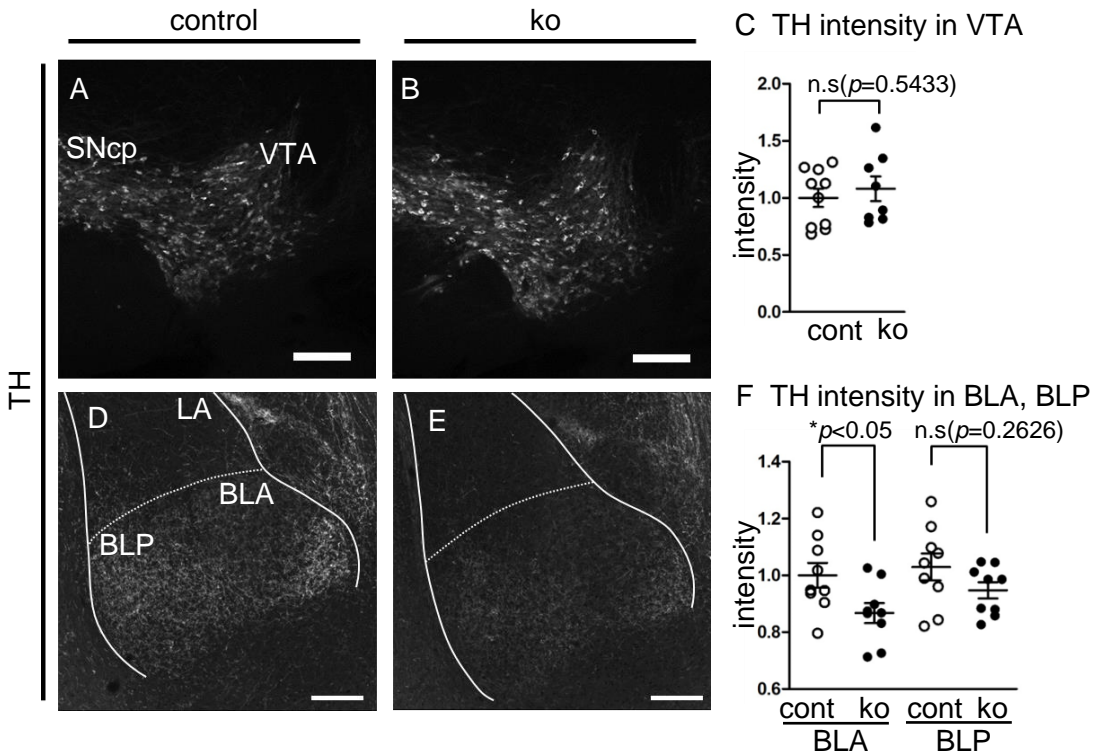


図.3 Otx2欠損による扁桃体ドーパミン線維 (TH陽性線維) の減少

(A-C) 腹側被蓋野領域におけるドーパミン作動性細胞のTH染色像(A,B)。腹側被蓋野のTH染色強度にOtx2欠損による変化は見られなかった(C)。
 (D-F) 扁桃体基底外側核におけるドーパミン線維のTH染色像(D,E)。ドーパミン作動性細胞特異的なOtx2欠損により、扁桃体基底核の前側核(BLA)においてドーパミン線維が減少した。一方で後側核では有意差は見られなかった(F)。
 control: Otx2-floxマウス, ko: Otx2-flox/DAT-creマウス。スケールバーは200 μ m

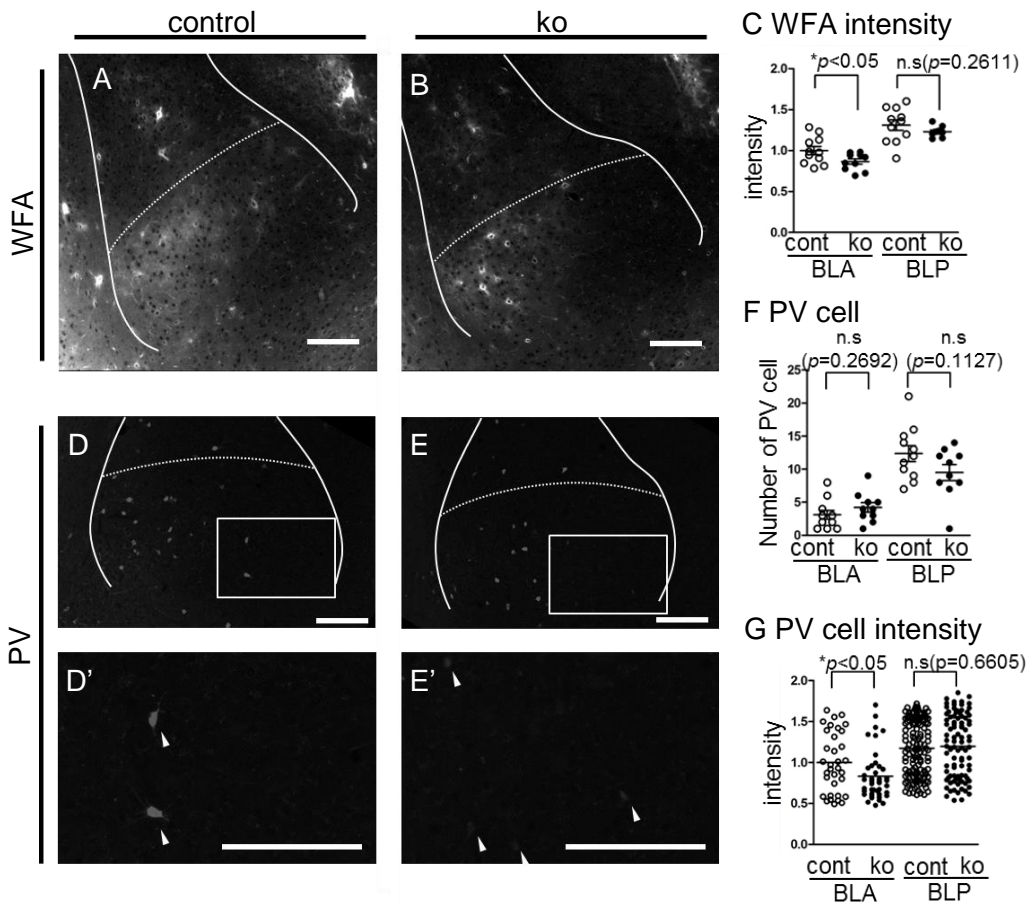


図.4 Otx2欠損による扁桃体コンドロイチン硫酸、PVの減少

(A-C) 扁桃体基底外側核におけるコンドロイチン硫酸の染色像 (A,B)。ドーパミン作動性細胞特異的なOtx2欠損により、扁桃体基底外側核の前側核においてコンドロイチン硫酸が減少した(C)。

(D-G) 扁桃体基底外側核領域におけるPV細胞の染色像(D,E)と拡大図(D',E')。扁桃体基底外側核において、Otx2欠損によるPV細胞の数の変化は見られなかった(F)。一方で、前側核においてPVの発現が減少した(G)。

control: Otx2-floxマウス、ko: Otx2-flox/DAT-creマウス。スケールバーは200 μ m。