

令和元年6月12日現在

機関番号：24601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K15432

研究課題名（和文）社会的経験依存性前頭前野ミエリン形成と同部位シナプス形成との相関についての検証

研究課題名（英文）Social experience-dependent myelination in the mPFC and its relevant synapse formation

研究代表者

牧之段 学（Makinodan, Manabu）

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：00510182

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本課題では、*in vitro* (neuron-oligodendrocyte co-culture)、*ex vivo* (slice culture)、*in vivo* (幼若期隔離マウス、BTBRマウス)の複数のモデルを用い、ミエリン形成と同部位のニューロン機能およびシナプス機能との相関を検証した。因果の証明には至らなかったものの、上記の複数のモデルにより、ミエリン形成と同部位のニューロン機能および同部位のニューロンへの興奮性入力との相関が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前頭前野V/VI層のミエリン形成と同部位の活動性、および前頭前野V/VI層のミエリン形成と同部位に存在する錐体細胞への興奮性入力との間の何らかの相関が示唆された。これまでは脳機能といえば、ニューロンを中心とした脳回路の機能に着目されてきたが、本研究成果は、ニューロンでないグリア細胞の一つであるオリゴデンドロサイトが形成する前頭前野のミエリンも精神疾患の治療ターゲットになる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we performed *in vitro* (neuron-oligodendrocyte co-culture)、*ex vivo* (slice culture)、*in vivo* (juvenile social isolation mice and BTBR mice) experiments and aimed to validate the association between myelin formation and its relevant neuronal function and synapse formation. Our study provides no evidence for the causation, but indicates that there are associations between myelin formation and neuronal function as well as myelin formation and synapse function.

研究分野：精神医学

キーワード：ミエリン 前頭前野 シナプス オリゴデンドロサイト

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝のみならず経験が脳発達に影響を与えることは周知されていた。しかし、その“影響”とは、多くの場合神経活動やシナプス形成といった、ニューロンに関するものを意味した。2012年、申請者らは、マウスの幼若期社会的経験が前頭前野のオリゴデンドロサイト及びミエリン発達に影響を与えること、そしてそのオリゴデンドロサイトの応答の仕様が後の脳機能、行動を変化させることを明らかにし、経験が脳に与える影響はニューロンのみでないことを示した (Makinodan et al, *Science*, 2012)。この結果を受け、申請者らはその脳機能の変化を電気生理学的に解析し、生後 21 日目から生後 35 日目までの 2 週間の社会的経験の不足は、前頭前野に存在する錐体細胞及び抑制性神経細胞への興奮性入力を著明に変化させることを明らかにした。これらの知見から申請者は、社会的経験がオリゴデンドロサイト及びミエリン形成に影響を与える臨界期、つまりマウスの生後 21 日目から生後 35 日目の間において、社会的経験による前頭前野のミエリン形成が、興奮性軸索の伝導速度を変化させ、その結果、各神経細胞への興奮性入りに影響を与えるのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

幼若期の経験が、前頭前野のオリゴデンドロサイト・ミエリン形成に影響を与えること、そして同部位の神経細胞機能やシナプス機能が変化することは明らかであった。しかし、オリゴデンドロサイト・ミエリン形成の変化が、神経細胞機能やシナプス形成に直接関与しているかどうかについては不明であった。本研究では、マウス前頭前野での、社会的経験-オリゴデンドロサイト・ミエリン形成-神経細胞機能・シナプス機能の因果関係につき、多角的解析により明らかにし、幼少期の社会的経験が影響し、かつ前頭前野機能が障害される注意欠陥多動性障害や自閉症スペクトラム障害などの精神疾患の病態解明を目的とした。

生後 21 日目から 35 日目までの社会的経験の不足が前頭前野のミエリン形成に影響を与え、前頭前野錐体細胞、抑制性神経細胞の機能を変化させ、そして同部位依存性の行動を修飾するが、これらの変化が単に偶然生じているのか、因果関係があるのかは不明であった。アストロサイトとシナプス形成、マイクログリアとシナプス刈り込みなどの関係については多くの報告がみられるが、意外なことにオリゴデンドロサイトとシナプス形成については報告がなかった。ミエリン形成の程度は軸索の伝導速度を著明に変化させるため、軸索の活動は必然的に変化し、当然神経活動依存性シナプス形成にも変化が生じると考えられた。本課題では、まずミエリン形成がシナプス形成に与える影響について検討し、次に幼若期社会的経験の不足による前頭前野錐体細胞及び抑制性細胞の活動性変化は、ミエリン形成異常を介したものか否かを追究した。

3. 研究の方法

(1) 海馬スライス培養を用い、ミエリン形成とシナプス形成を免疫組織学的、分子生物学的に評価した。生後 6 日目より培養を開始し、培養開始後 28 日目に組織を固定して myelin basic protein の mRNA 測定および myelin basic protein の免疫組織学的染色を行った。また、海馬スライス培養に加え、ニューロンとオリゴデンドロサイトの co-culture も行い、ミエリン形成とシナプス形成の相関を検証した。

(2) 次に、ミエリン形成とシナプスの *in vivo* 解析するべく、前頭前野 V/VI 層のミエリン形成が障害される幼若期隔離マウス (生後 21 日目から生後 35 日まで隔離飼育) の V 層錐体細胞への電気生理学入力をパッチクランプ法により測定した。

(3) 前頭前野ミエリン形成と同部位の機能との相関を調べるべく、離乳後 (生後 21 日目) から

生後35日目から隔離されたマウス同士をその後4匹で同居させたマウスと、生後21日目から生後35日目まで隔離されたあと、隔離経験のないマウス3匹を同居させたマウスの前頭前野ミエリン形成、前頭前野ニューロン活性、前頭前野脳波を測定した。

(4)さらに、前頭前野 V/VI 層ミエリン形成と V 層錐体細胞への電気生理学的入力との相関を検討すべく、脱髄剤であるクプリゾン投与により前頭前野のミエリン形成が障害されたマウスを用い、幼若期隔離マウスと同様にパッチクランプ法をおこった。

(5)前頭前野 V/VI 層ミエリン形成と前頭前野 V 層神経細胞機能の相関をさらに検証すべく、前頭前野ミエリン形成が障害された自閉症モデルである BTBR マウスを用いた。離乳後(生後21日目)から社会性のある C57BL/6J マウスと同居した BTBR マウスの社会性は回復すると報告されているため、同様の条件のマウス前頭前野 V/VI 層ミエリン形成を観察し、ミエリン形成の程度と同部位の機能の相関を比較検討した。

4. 研究成果

(1)培養海馬スライスの stratum lacunosum のミエリン形成を分子生物学的および免疫組織学的に検討したが、予想されていたよりもスライス間でのミエリン形成の程度にばらつきをみとめた。そのため、解析対象部位を CA3 領域に切り替えたが、同様にスライス間でのミエリン形成にばらつきを認めため、ニューロン-オリゴデンドロサイトの invitro 解析 (co-culture) に切り替えた。しかしながら、同様にミエリン形成はばらつき、シナプス形成や機能との相関を検証するに十分な再現性が得られなかった。この実験の過程で、IL-6 がミエリン形成に著明な阻害効果をもつことをみつけて報告した (Makinodan et al, FASEB J, 2016)。

(2)前頭前野 V/VI 層ミエリンが低形成となる幼若期隔離マウスの前頭前野 V 層錐体細胞のシナプス機能を評価すべく、同細胞に入力する興奮性シグナルをパッチクランプ法により測定したところ、幼若期隔離マウスでは幼若期に4匹で飼育された対照マウスに比べ、興奮性入力の振幅は差がないものの、頻度が有意に低下していた。さらに、前頭前野 V 層には、近位へ投射する錐体細胞と遠位に投射する錐体細胞が存在するが、幼若期隔離は遠位に投射する錐体細胞のみに影響を与えることが明らかになった (Yamamuro et al, Cereb Cortex, 2017)。

(3)離乳後(生後21日目)から生後35日目から隔離されたマウス同士をその後4匹で同居させたマウスでは、生後21日目から生後35日目まで隔離されたあと、隔離経験のないマウス3匹を同居させたマウスに比べ、前頭前野ミエリンは低形成となり、前頭前野のニューロン活性は低下し、前頭前野のオシレーションの強度が低下していた (Makinodan et al, Sci Rep, 2017)。この結果により、因果は不明なままであるものの、前頭前野のミエリン形成と前頭前野機能との相関が示唆された。

(4)クプリゾンにより前頭前野 V/VI 層のミエリン形成を障害させ、同部位 V 層の錐体細胞への興奮性入力をパッチクランプ法により測定したところ、測定細胞間で顕著なばらつきをみとめた。この結果は、クプリゾン投与によるアストロサイト活性化やミクログリア活性化によるかもしれないが、原因は不明である。

(5)前頭前野 V/VI 層ミエリンが低形成である自閉症モデルマウス (BTBR マウス) 2 匹を生後21日目の離乳後に社会性のある C57BL/6J マウス 2 匹と同居させると、終生 BTBR マウス同士で飼育された BTBR マウスよりも社会性が向上し、同時に前頭前野のミエリン形成が C57BL/6J マウスに近づくことが明らかになった。この結果は、前頭前野ミエリン形成と前頭前野機能との相関を示唆した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Makinodan M*, Ikawa D, Yamamuro K, Yamashita Y, Toritsuka M, Kimoto S, Yamauchi T, Okumura K, Komori T, Fukami SI, Yoshino H, Kanba S, Wanaka A, Kishimoto T. Effects of the mode of re-socialization after juvenile social isolation on medial prefrontal cortex myelination and function. *Sci Rep* 14: 5481, 2017

Makinodan M*, Okumura K, Ikawa D, Yamashita Y, Yamamuro K, Toritsuka M, Kimoto S, Yamauchi T, Komori T, Kayashima Y, Yoshino H, Wanaka A, Kishimoto T. Effects of cross-rearing with social peers on myelination in the medial prefrontal cortex of a mouse model with autism spectrum disorder. *Heliyon* 3 e00468, 2017

Yamamuro K, Yoshino H, Ogawa Y, **Makinodan M**, Toritsuka M, Yamashita M, Corfas G, Kishimoto T. Social isolation during the critical period reduces synaptic and intrinsic excitability of a subtype of pyramidal cell in mouse prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 3: 1-13, 2017

Makinodan M*, Ikawa D, Miyamoto Y, Yamauchi J, Yamamuro K, Yamashita Y, Toritsuka M, Kimoto S, Okumura K, Yamauchi T, Fukami SI, Yoshino H, Wanaka A, Kishimoto T. Social isolation impairs remyelination in mice through modulation of IL-6. *FASEB J.* 30: 4267-4274, 2016

〔学会発表〕(計 3 件)

Makinodan M

Social experience changes myelination in the prefrontal cortex: an animal study of psychosocial intervention for autism spectrum disorder. IEPA, 2018

Makinodan M

Shared glial contributions to the etiology of autism and schizophrenia. WFSBP Copenhagen, Denmark, 2017

Makinodan M

Glial implications in E/I balance in autism. WFSBP Lima, Peru, 2016

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：紀本創兵

ローマ字氏名：Kimoto Sohei

所属研究機関名：奈良県立医科大学

部局名：医学部

職名：学内講師

研究者番号(8桁): 00405391

研究分担者氏名：井川大輔

ローマ字氏名：Ikawa Daisuke

所属研究機関名：奈良県立医科大学

部局名：医学部

職名：研究員

研究者番号(8桁): 00526717

研究分担者氏名：深見伸一

ローマ字氏名：Fukami Shinichi
所属研究機関名：奈良県立医科大学
部局名：医学部
職名：非常勤講師
研究者番号(8桁)：90424150

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。