

令和元年6月11日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10221

研究課題名(和文) 社会経験で発達する前頭前野の局所的興奮・抑制性回路は治療ターゲットになるか

研究課題名(英文) Local excitatory / inhibitory neuronal circuit in prefrontal cortex developed by social experience can be a target for treatment?

研究代表者

芳野 浩樹 (Yoshino, Hiroki)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10347560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：社会的経験の剥奪により前頭葉機能の低下を示すヒトにおける研究に基づいて、社会的隔離マウスモデルを用いて、隔離飼育によりマウス内側前頭前野の錐体細胞(興奮性)と介在神経細胞(抑制性)がどのように影響を受けるかを調べた。先行研究において、第五層の特定の錐体細胞における興奮性の低下を明らかにしていたが、今回の研究において同じタイプの錐体細胞においてのみ抑制性シナプス入力が増加することを明らかとし、その抑制性シナプス入力を行う主要な候補であるfast-spiking interneuronにおいて興奮性が上昇すること、そのinterneuronへの興奮性入力も低下することも確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの高度な脳機能を発揮するには、神経回路が適正な興奮性と抑制性のバランスを保つ必要がある。一方で、ヒトらしい高度な脳機能を支える重要な脳領域の前頭葉の発達には、発達期の社会的経験が必要である。そこで、隔離飼育され社会的経験を剥奪されたマウスの前頭葉において、神経回路の興奮性/抑制性バランスにどのような変化が見られるかを調べた。結果、興奮性を担う錐体細胞の活動は低下しており、抑制性を担う介在神経細胞の活動が増加して興奮性/抑制性バランスが崩れていることがわかった。ヒトの発達期の乏しい社会的経験は、前頭葉神経回路の興奮性/抑制性のアンバランスによる脳の機能低下につながる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Based on the previous report that lack of social experience impair development of human prefrontal cortex, I started the project to examine whether isolate-rearing affect pyramidal cell (excitatory) and interneuron (inhibitory) in mouse medial prefrontal cortex. In my previous study, it was found that social isolation lowered the excitability of specific pyramidal cell in mouse medial prefrontal cortex. In this study, social isolation also increased inhibitory synaptic inputs onto the specific pyramidal cell, and increased the excitability of fast-spiking interneuron which is main candidate of the source of inhibitory inputs onto the pyramidal cell. Furthermore social isolation decreased excitatory synaptic inputs onto fast-spiking interneuron.

研究分野：神経生理

キーワード：社会的経験 前頭葉 興奮性 抑制性 錐体細胞 介在ニューロン

## 1. 研究開始当初の背景

社会性の障害やワーキングメモリーを含む認知機能障害は統合失調症や自閉症スペクトラム障害などの精神疾患の障害の核をなしている。しかし現存の治療ではそれらに対して十分な効果があるとは言い難く、未だ細胞・分子レベルで具体的な障害部位を説明できていない。よりピンポイントに、たとえば前頭前野の第5層のあるサブタイプの神経細胞の機能不全といった、具体的な障害部位の同定ができれば、治療のターゲットが具体化されて新しい治療方法を確立する上で重要な起点となりうる。

視覚や聴覚といった各種の感覚機能同様に、認知機能、社会的相互作用は社会経験依存的に発達することが知られており、霊長類、齧歯類を使用した研究において確認されてきた。(Sanchez MM. et al. Brain Res 1998) ルーマニアのチャウシェスク政権の人口増加政策下で人的にも物的にも劣悪な環境の孤児院で放置されて育てられた孤児の実例から、ヒトにおいても認知機能の発達には豊かな社会的接触が必要であると示された。またこの例において、一定の年齢を過ぎてしまうとその後里子になるなどして豊かな環境で育てられても、その認知機能は回復しないことも明らかとなり、社会的経験依存性の社会的機能、認知機能の獲得にもいわゆる臨界期が存在することがヒトにおいても示唆された。(Chugani HT. et al. Neuroimage 2001, Elovathingal TJ. et al. Pediatrics 2006)

連携研究者の牧之段、Corfas は、マウスを離乳から2週間社会的隔離するだけで行動学的に社会性の障害、前頭前野機能障害が生じ、つまり社会経験依存的な前頭前野機能の発達に臨界期があることを確認し、その際に内側前頭前野の髄鞘化が低下することが機能障害の基盤であることを明らかにした。(Makinodan M. et al. Science 2012)

続いて申請者は、同様の社会的隔離によりマウス前頭前野第五層の錐体細胞の興奮性が低下し、興奮性シナプス入力が見出された。またその現象は第五層の錐体細胞のなかでも、皮質下に軸索を投射する h-current 陽性の錐体細胞 (prominent h-current cell: PH cell) のみで見られることを見出した。また、この効果は感覚野などの他の脳領域にはなく前頭前野特異的に起こり、隔離の時期を遅らせると影響はなく、離乳後の2週間が社会的隔離の影響を受ける臨界期であることを明らかにした。(Yamamuro K. et al. in submission) つまり、発達期のある一定の時期において社会的接触が欠如すると特異的に前頭前野の特定の錐体細胞を取り巻く興奮性神経回路の発達が妨げられることが分かった。一般に神経回路は興奮性と抑制性のシグナルのバランスでなっており、上記のような興奮性のシグナルの減少が発達期に生じるならば、一方の抑制性シグナルにも変化が生じる可能性が非常に高い。実際に経験依存性の形成される回路についての研究、例えば単眼遮蔽による視覚野での実験においても、抑制性シナプス伝達を行う介在ニューロンの働きが非常に重要であることがわかっている (Hensch TK. Nat Rev Neurosci 2005)

**仮説 1** 社会的経験の剥奪が機能不全を起こす前頭前野第五層の PH cell と接続する抑制性神経回路にも異常を来す。

社会的隔離により PH cell の興奮性シナプス入力が見出されていることから、PH cell への抑制性シナプス入力に変化が見られている可能性が高い。発達期における視覚や感覚の遮断の影響についての他の研究からすると、抑制性シナプス入力は増強しているのではないかと考える。

**仮説 2** Ih current 陽性の錐体細胞に入力する PV-IN において特異的に興奮性に変化が生じている。また、PV-IN に入力する興奮性または抑制性シナプス伝達も変化が生じている。

皮質内には抑制性シナプス伝達の担い手となる多種のインターニューロンが存在する。そのなかでもパルプアルブミン陽性インターニューロン (PV-IN) は統合失調症の死後脳研究において異常が数多く報告され (Lewis DA. et al. Nat Rev Neurosci. 2005)、統合失調症の認知機能障害の基盤である  $\gamma$ -Oscillation 低下の原因であると考えられており (Gonzalez-Burgos G et al. Biol Psychiatry 2015)、ヒトの高次の認知機能を支える重要な神経細胞の一つである。最近になり Lee らの報告で、この PV-IN は第五層の錐体細胞のなかでも PH cell に対してより多くの入力を行っていることが見いだされている。(Lee AT. et al. Neuron. 2014) こうした背景から社会的隔離により内側前頭前野第五層の PH cell (興奮性) と PV-IN (抑制性) のワンセットが特異的に障害されるのかもしれない。仮に隔離により PH cell に入力する抑制性シナプス伝達が増強しているとするれば、もっとも PH cell に入力している PV-IN の興奮性が上昇していると考えられる。

**仮説 3** 障害された PH cell と PV-IN を薬理的に同時に制御し、機能を補うことができる

PH cell はドパミン D2 受容体が発現していることが確認されており、PV-IN もドパミンにて興奮性が上がることが確認されている。ドパミン受容体アゴニストやアンタゴニストが両方の細胞に何等かの効果を及ぼしうる。

## 2. 研究の目的

以下の点を明らかにする

A. 社会的隔離マウスの内側前頭前野第五層の錐体細胞の抑制性シナプス伝達が増加しているか  
B. 同じ第五層の PV-IN の興奮性が上昇しているか、または PV-IN へのシナプス入力にも変化が生じていないかどうか。また、インターニューロンの中でも PV-IN にのみ異常がみられて、

他のインターニューロンには異常がみられないかどうか。

C. PH cell とペアで接続する PV-IN のみが機能異常を来しているかどうか

D. ドパミンアゴニスト、アンタゴニストなどの薬物を用いて、社会的隔離により PH cell と PV-IN の両方の機能異常を同時に補正する方向に制御できないか

### 3. 研究の方法

#### A. 社会的隔離マウスの作製 と PH cell における抑制性入力の詳細

これまでの研究同様に連携研究者ら（牧之段 学、Gabriel Corfas / Harvard）との協力により確立されたプロトコルにより、前回の研究同様に社会的隔離マウスを作製する。C57BL6 系統の母親からの雄仔 1 匹を離乳後の生後 21 日から 35 日までケージ内で隔離飼育し、その後同腹の雄仔と再度同じケージで飼育する。生後 65 日のマウスから脳を取り出し、脳スライスを作成する。内側前頭前野第五層の錐体細胞 PH cell から Whole-cell patch clamp 法にて抑制性シナプス電流の記録を行う。前回の研究から採用している第五層錐体細胞の分類（過分極時の h-current の有無による）を行い、prominent h-current cell (PH cell) と non-prominent h-current cell (non-PH cell) に分類を行い、それぞれの細胞群における隔離による sIPSC への影響を調べる。

#### B. GAD67-GFP マウスから PV-IN の膜興奮性または PV-IN への興奮性入力の詳細

PV-IN をスライス上で効率よく見つけ出して、記録を行うために、主に PV-IN が蛍光にて識別される GAD67-GFP マウスを使用する。このマウスを用いて PV-IN を見つけて、その活動電位の頻度、閾値、振幅などを記録し、集団飼育と隔離飼育で比較する。PV-IN から whole-cell patch clamp 法にて活動電位の発火パターンを記録し、発火頻度、閾値、振幅などについて隔離マウスにおいて影響があるかどうかを調べる。また、その非蛍光性、発火パターンから PV-IN 以外のインターニューロンを識別し、同様に発火パターンか発火頻度、閾値、振幅について分析する。

#### C. Paired patch clamp による PH cell と PV-IN の同時記録

隔離による抑制性シナプス入力への影響が興奮性神経細胞である PH cell にのみに認められ、一方で抑制性神経細胞として PV-IN にのみに影響が認められることを満たすには PH cell と PV-IN の関係に二つのモデルが考えられる。

モデル A: PV-IN は優位に PH cell に接続している。

モデル B: PV-IN にはこれまで認識されていないサブタイプがあり、一つのサブタイプが PH cell と優位に接続している。

これらのどちらのモデルが正しいのかを検証するため、お互いに接続している PH cell と PV-IN を pair で同時に記録する。PV-IN と接続する錐体細胞が PH cell ばかりであればモデル A が妥当であり、PV-IN のなかに PH cell と接続せずにも隔離の影響を受けないサブタイプがあるとすればモデル B が妥当であると考えられる。どちらのモデルであっても、隔離によって PH cell と PV-IN のペアが同時に異常を来していることが確認する。これにより内側前頭前野第五層において興奮性神経細胞の一つのサブタイプ PH cell と抑制性神経細胞の一つのサブタイプ PV-IN のペアが特異的に発達期の社会的隔離により障害を受けることが明らかとなる。

#### D. 隔離による PH cell と PV-IN のペアの同時リカバリーを目指す薬物の探索

これまでに PH cell には D2 受容体が発現していることが報告されている。逆に h-current を持たない non-PH cell は D1 受容体作動性であることが報告されている (Gee S. et al. J. Neurosci. 2012, Seong HJ. et al. J. Neurosci. 2012) が、それらの受容体の作動によりそれぞれの神経細胞がどのように制御されるのかはわかっていない。また、PV-IN については D1 受容体作動性でその興奮性が高められることが報告される一方で (Kroner S. et al. Cereb cortex. 2007) D2 受容体作動性にも興奮性の上昇がみられるとも報告されている (Tseng KY. and O' Donnell P J. Neurosci. 2004)

まず、隔離によって機能低下がみられる PH cell の興奮性を D1 アゴニスト、または D2 アンタゴニストなどで上げることが出来るか脳スライス上の電気生理学的研究により確認する。同時に、隔離によって興奮性が高まっている PV-IN に対して D2 アンタゴニストなどが抑制的に作用してその興奮性を正常化することが出来るか確認する。

### 4. 研究成果

A. 生後 21 日から 35 日の発達期において社会的隔離を行うことで成体マウス内側前頭前野第五層の特定の錐体細胞 (PH cell) において自発性抑制性後シナプス電流の頻度が増加することを確認した。一方で微小抑制性後シナプス電流において変化はみられなかった。

隔離飼育による自発性抑制性後シナプス電流の増強効果は、隔離飼育を生後 35 日から 49 日の間に行うと効果が見られなくなった。

以上より、生後 21 日から 35 日という特定の発達時期において社会的経験を剥奪すると、内側前頭前野第五層の PH cell においてのみ抑制性シナプス入力の頻度が増加することがわかった。

隔離飼育が影響を及ぼす時期、及ぼされる錐体細胞が PH cell であるという点は、前研究の興奮性シナプスにおいて隔離の影響がみられた様式と同様であった。

B. 生後 21 日から 35 日の発達期において社会的隔離を行うと、成体マウス内側前頭前野第五層の fast-spiking interneuron( PV-IN)において発火閾値の低下、sag ratio(h-current)の増加、入力抵抗の増加を認めた。また、fast-spiking neuron に入力する自発性後シナプス電流の頻度が低下していた。以上のことから、隔離飼育により PH cell において自発性抑制性後シナプス電流の頻度が増加していた一因として、fast-spiking interneuron の興奮性が増加(発火閾値が低下、入力抵抗)することにより fast-spiking interneuron から PH cell への抑制性シナプス入力が増加したのではないかと考えた。また、fast-spiking interneuron の sag ratio が増加するとともに、fast-spiking interneuron への自発性興奮性シナプス電流の頻度が増加していたことは、fast-spiking interneuron の過剰な興奮を代償する変化が起こっているのではないかと考えられた。

C.D PH cell と PV-IN の接続に関する研究、ドパミン系薬物を用いたりカバリーを目指す研究については引き続き取り組んでいる。

## 5 . 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

### [雑誌論文](計1件)

Social Isolation During the Critical Period Reduces Synaptic and Intrinsic Excitability of a Subtype of Pyramidal Cell in Mouse Prefrontal Cortex.  
YAMAMURO K, YOSHINO H, OGAWA Y, MAKINODAN M, TORITSUKA M, YAMASHITA M, CORFAS G, KISHIMOTO T.  
Cerebral Cortex. 2018 Mar 1; 28(3): 998-1010

### [学会発表](計3件)

Social isolation during developmental critical window affects inhibitory neuronal circuit in mouse mPFC  
Hiroki Yoshino, Kazuhiko Yamamuro, Yoichi Ogawa, Manabu Makinodan, Yasuhiko Saito, Toshifumi Kishimoto  
9<sup>th</sup> Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies congress, Kobe, 2019

Social isolation during the critical period reduces synaptic and intrinsic excitability of a subtype of pyramidal cell in mouse prefrontal cortex  
Yoshino H, Yamamuro K, Ogawa Y, Makinodan M, Toritsuka M, Okamura K, Nishihata Y, Yamauchi Y, Kimoto S, Yamashita M, Corfas G, Kishimoto T  
Society for Neuroscience 47<sup>th</sup> Annual Meeting, Washington DC. 2017

Symposium 4. Multimodal Studies of Excitatory and Inhibitory Signaling Balance in Schizophrenia and Autism  
Lack of Social Experience Disrupts E/I Balance in Medial Prefrontal Cortex.  
Hiroki Yoshino  
Regional Latin American Congress of The World Federation of Societies of Biological Psychiatry 2016

### [図書](計0件)

### [産業財産権] 出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

### 取得状況(計0件)

名称：

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
奈良県立医科大学 精神医学教室  
(1) 研究分担者  
    該当なし  
(2) 研究協力者  
研究協力者氏名：牧之段 学  
ローマ字氏名：MAKINODAN, manabu  
所属研究機関名：奈良県立医科大学  
部局名：精神医学教室  
職名：講師

〔その他の研究協力者〕  
研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

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。