

令和 5 年 6 月 17 日現在

機関番号：82611

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20705

研究課題名（和文）視床-皮質回路形成における発達期小脳活動の意義解明

研究課題名（英文）Unraveling the physiological function of developing cerebellar activity for thalamo-cortical circuit formation

研究代表者

上條 諭志（Kamijo, Satoshi）

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所 精神薬理研究部・リサーチフェロー

研究者番号：20910491

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）：発達期の小脳活動の異常が自閉症スペクトラム障害（ASD）の原因であるという「発達期小脳機能異常仮説」に注目し、マウスの系を用い、生後11-15日の間の小脳活動を抑制することで、オス特有的に社会性の低下が生じることを示した。常同行動などの他のASD様表現型は観察されず、メスでは異常が見られなかったことから、各表現型には固有の臨界期が存在し、小脳の活動異常に対する感受性が性別により異なっていることが示唆された。また、ASDに高率で併存する感覚異常と小脳との関係を調べるため、広視野カルシウムイメージングの系を構築し、感覚刺激に対する大脳皮質の反応を解釈可能性の高い形で計測することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発達期の小脳活動の異常が成体の行動に影響を与えることは、ASDの発達期小脳機能異常仮説をより強固にするのみならず、ASDで見られる諸症状のうち、何が可逆か（治療可能性）、治療をいつ開始すべきか（介入時期の決定）といった疑問へのヒントを与えている。また、オスのみで表現型が観察されたことは、ASD患者が男児に多い事実と符合し、小脳活動の異常に対する感受性の違いによってASD患者の性比の偏りを説明できる可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：Focusing on the "developmental cerebellar dysfunction hypothesis" that abnormal cerebellar activity during the developmental period is the primary cause of autism spectrum disorder (ASD), we showed that suppressing Purkinje neurons' activity from postnatal day 11 to 15 caused male-specific social deficits. Other ASD-like phenotypes such as repetitive behaviors were not observed in both males and females, suggesting that each phenotype has a unique critical period and that the susceptibility to abnormal cerebellar activity differs by sex. It is reported that ASD patients have sensory abnormalities at high rates. To investigate the relationship between the cerebellum and the sensory abnormalities, we set up widefield calcium imaging system to measure the cortical response to various sensory stimuli and adopted a novel method to analyze the data in a highly interpretable manner.

研究分野：自閉症スペクトラム障害

キーワード：小脳 自閉症スペクトラム障害 プルキンエ細胞 脳の性差

### 1. 研究開始当初の背景

ASD の病態形成メカニズムには未知の部分が多かったが、周産期の小脳損傷が ASD の発症確率を数十倍に上げるという疫学データから、ASD の発症原因を発達期の小脳活動の異常に求める「発達期小脳機能異常仮説」が近年注目されるようになっていた。小脳プルキンエ細胞が徐々に死滅するモデルマウスを使った先行研究により、小脳の異常が ASD 様症状をひきおこしうることが示されていたが、細胞死という不可逆なプロセスを伴うため、どの時期の小脳活動の異常が ASD 様の表現型をひきおこすか(時期特異性)、観測された表現型は治療可能か(可逆性)といった疑問にアプローチすることが困難であった。また、ASD は高頻度で感覚異常を併発することが知られているが、その病態形成メカニズムおよび小脳機能の異常との関係についてはほとんどわかっていなかった。

### 2. 研究の目的

発達期の小脳活動の一過性の異常が、個体の神経回路、機能、行動にどのような影響を与えるかをモデルマウスを用いた系により明らかにし、ASD の発症メカニズム解明の一助とする。活動操作の時期特異性、可逆性を活かし、観測された表現型の臨界期および治療可能性に注目して解析する。また、感覚刺激に対する大脳皮質の反応をリアルタイムで記録するために広視野カルシウムイメージング法を導入し、ASD に高率で随伴する感覚異常のメカニズムおよび小脳機能との関係を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### 1) 発達期の小脳プルキンエ細胞活動の抑制

発達期の小脳活動を可逆的に抑制するため、小脳プルキンエ細胞特異的に組み換え酵素 Cre を発現する L7-Cre ヘテロマウスと Cre 依存的に抑制性分子 DREADD-hM4Di を発現する LSL-hM4Di ホモマウスを交配した。DREADD-hM4Di を発現する神経細胞の活動は、クロザピン-N-オキシド (CNO) 存在下で抑制される。交配して産まれた仔に、生後 11-15 日の間、マイクロピペットを用いて 5 mg/kg の用量で CNO を経口投与し、その後は通常飼育した。Cre 発現マウスを小脳活動抑制群、Cre 非発現マウスを対照群として、一連の行動実験および組織解析を行った。

#### 2) 広視野カルシウムイメージング

細胞内カルシウム濃度に応じて蛍光輝度が増減する緑色カルシウムプローブ GCaMP6s を全脳で発現する SNAP25-GCaMP6s マウスを用いて実験を行った。頭皮を除去し、頭部固定用のチタンプレートを着着した後、頭蓋骨の上部を透明なシアノアクリレート樹脂で被覆した。感覚刺激装置、蛍光画像取得装置を作製し、感覚刺激を提示しながら *in vivo* イメージングを行った。得られたデータは自作プログラムおよびオンライン解析プラットフォームである NeuroCAAS を用いて解析した。

### 4. 研究成果

#### 1-1) 発達期小脳プルキンエ細胞の活動を可逆的に抑制する系の樹立

発達期の小脳活動を可逆的に抑制するため、L7-Cre ヘテロマウスと LSL-hM4Di ホモマウスを導入し、交配した仔に練乳で風味づけした CNO をマイクロピペットで経口投与した。薬剤投与を開始する生後 11 日の段階で、Cre 陽性個体でのみ大部分のプルキンエ細胞に DREADD-hM4Di が発現していることを確認した。この操作により、小脳活動が抑制された群と対照群との間に有意な体重の差および死亡率の上昇などの有害事象を認めなかった。

#### 1-2) 発達期の小脳プルキンエ細胞活動抑制によりオス特異的に社会性の低下が生じる

小脳活動が抑制された群では、マウスの社会性を定量する 3-チャンパー試験において、オス特異的に Social preference index の低下が観察された(図 1)。一方で、常同行動を定量するグルーミング試験および本能に基づく穴掘り行動を定量するガラス玉覆い隠し試験ではオス、メスともに小脳活動抑制群、対照群間で有意な差が見られなかった。小脳活動抑制により、プルキンエ細胞密度、小脳分子層の厚さ、登上線維終末の分布といった基本的な組織構築には有意差を認めなかったものの、協調運動学習の指標である rotarod 試験では、オスでのみ課題前半での成績低下が見られた。また、ASD に高率で随伴する感覚異常の表現型が存在するか、聴覚性驚愕反射試験を用いて定量したが、5 日間の抑制においては、オス、メスともに有意な差を認めなかった。

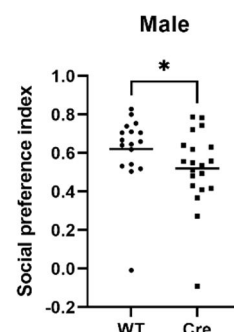


図 1: オスの social preference index

以上の結果から、発達期の一過性の小脳活動異常により生じる ASD 様表現型は、プルキンエ細胞の永続的な異常を伴うマウスを用いた先行研究で観察された表現型のうち、一部であることが明らかになった。原因として、介入期間、強度が不足していた、介入の時期と臨界期の不一致があった、異常は生じたが、発達中に代償された、小脳非依存的な表現型であった等の可能性が考えられる。また、観察された表現型はすべてオスに集中しており、発達期の小脳活動異常に対する感受性が、性別により異なる可能性が示唆された。ヒト ASD 患者の男女比はおよそ 4:1 であり、偏った性比の原因が発達期の小脳活動異常への感受性の違いに起因するとすれば興味深いと考えられる。

#### 2-1) 広視野カルシウムイメージング系の構築

先行研究から小脳プルキンエ細胞が失われるマウスでは、視床から内側前頭前皮質への投射の興奮性が増強することが報告されており、視床が感覚ゲーティングの中核として重要であることを考慮すると、視床を介した同様の機序で感覚処理の異常が出現する可能性が考えられた。感覚刺激に対する大脳皮質の反応性を測定するため、マクロスコップを作製し、緑色蛍光型カルシウムプローブ GCaMP6s を発現するマウスを用いて覚醒下イメージングを行った。感覚刺激の提示装置を作製、実装し、撮像と同期して刺激を提示した。記録される脳活動の 70%程度は自発行動に由来することが報告されているため、自発行動をモニターするための赤外線カメラおよび運動状態を記録するホイールも追加実装した。本手法の導入により、感覚刺激に対する背側大脳皮質の反応を安定して記録することが可能となった。

#### 2-2) LocaNMF 法の導入

得られたデータは刺激提示のタイミングで整列して画像を平均するという古典的な手法で解析を行っているが、刺激に対する皮質の活動は脳全体に分散しており、解釈が難しいという欠点があった。その問題を解決するため、脳活動を解剖学的に同定される脳領域に局限した活動の和として分解する LocaNMF という手法を導入した。この手法は解釈可能性が高いのみならず、分解の結果が比較的安定しているため、トライアル間、個体間での比較が可能となった。

発達期の一過性の小脳活動の抑制では感覚異常が出現しなかったため、現在、イメージング中の小脳活動を抑制した場合の感覚刺激に対する反応を調べている。作製したマクロスコップは緑、赤の二色型であり、今後は興奮性細胞と抑制性細胞の活動を同時に計測する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Inoue Yukiko U., Miwa Hideki, Hori Kei, Kaneko Ryosuke, Morimoto Yuki, Koike Eriko, Asami Junko, Kamijo Satoshi, Yamada Mitsuhiko, Hoshino Mikio, Inoue Takayoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Targeting Neurons with Functional Oxytocin Receptors: A Novel Set of Simple Knock-In Mouse Lines for Oxytocin Receptor Visualization and Manipulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eneuro	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/eneuro.0423-21.2022	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------