

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 5 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461778

研究課題名(和文) 社会経験依存的に発達する前頭前野の興奮性神経回路は治療の手がかりとなるか

研究課題名(英文) The research of social experience-dependent development of prefrontal excitatory neural circuit for psychiatric treatment

研究代表者

芳野 浩樹 (Yoshino, Hiroki)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：10347560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：幼少期の社会的経験が脳の発達、特に前頭葉の発達にどのように影響を与えるかについて調べるために、生後21日から35日の間に隔離飼育されたマウスと集団で飼育されたマウスが、成体となった後に取り出した脳の内側前頭前野の第五層という領域にある錐体細胞といわれる神経細胞の電気活動を比較した。集団飼育されたマウスと比較して隔離飼育されたマウスにおいて、この錐体細胞の興奮性が低下し、またこの錐体細胞に入力してくる興奮性神経伝達の頻度が低下していることがあきらかとなった。この錐体細胞は2群に種類分けすることができ、一方の種類においてのみ、隔離飼育による影響がみられることがあきらかとなった。

研究成果の概要(英文)：To elucidate how social experience during early childhood influence the development of prefrontal cortex, we compared the electrical activity of layer 5 pyramidal cell of medial prefrontal cortex in adulthood between isolate-housing mouse (be housed in isolation from postnatal 21 day to 35 day) and group-housing mouse. We found that the pyramidal cells of isolate-housing mouse has lower excitability than that of group-housing mouse, and the frequency of excitatory inputs into the pyramidal cell is lower in isolate-housing mouse than in group-housing mouse. Furthermore once we classified the pyramidal cells into two groups by the electrical character, we found that only one group of the pyramidal cells was influenced by social isolation.

研究分野：精神医学

キーワード：前頭葉 社会経験 興奮性 神経細胞 発達

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広汎性発達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層の錐体細胞の興奮性が低下しているといった、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。(M.M.Sanchez 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ている。また、一定の年齢を過ぎてしまうとその後には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ている。(H.T.Chugani et al. Neuroimage 2001, T.J.Eluvathingal 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。

(M.Makinodan et al. Science 2012)

仮説 1 髄鞘はグルタミン酸を放出する興奮性神経細胞の軸索に形成され、軸索の伝達速度を飛躍的にあげる。そしてその構造的関係からすると、社会的経験の剥奪による髄鞘形成不全はまず興奮性の神経回路の発達に影響を及ぼすことが予想される。

興奮性の神経回路の発達については、たとえば、興奮性後シナプス電流、またはその電流における AMPA 受容体、NMDA 受容体がそれぞれ占める割合、錐体細胞自体の活動電位スパイクを生じる頻度やその閾値にて評価する。

牧之段らにより隔離マウスにおいて髄鞘形成不全を確認したのは内側前頭前野の第五層であった。研究代表者はこれまでマウス前頭前野皮質の第五層錐体細胞からの興奮性シナプス伝達を研究してきた。(D.C.Rotaru, H.Yoshino et al. J.Neurosci. 2011)近年、齧歯類の内側前頭前野第五層の錐体細胞はその電気的性質、解剖学的特徴から大きく2種類のタイプに分けられるようになっている。(S.Gee, et al. J.Neurosci. 2012, N.Dembrow et al. J.Neurosci 2010)ひとつは対側皮質に軸索を投射し、HCN channel による Ih current が観察されないもの、もう一方は同側の皮質下(橋や視床)に軸索を投射し、前述のタイプに比して樹状突起がより枝分かれして広がり、Ih current が観察されるものである。

Ih current とは神経細胞を過分極した際に外向きに流れる電流である。Ih current が観察される、皮質下へ軸索を投射する錐体細胞は、そうでない錐体細胞に比べて、自身が発火するためにはタイミングが同調したより多くの興奮性入力が必要とすることが分かっており、そのことから機能的には情報を統合する意味合いがより強い性質を持った錐体細胞であると考えられている。

仮説 2 錐体細胞に種類があるのであれば、各

自が回路内でそれぞれ異なった機能的役割を担い、社会的経験の剥奪による発達不全の表現も錐体細胞ごとに異なることが予想される。

たとえば、Ih current が観察される錐体細胞と観察されない錐体細胞では上記で例示した隔離による興奮性入力の変化などが異なる可能性がある。

2. 研究の目的

マウスを離乳後2週間のみ社会的隔離、つまり同腹の子から引き離して一匹で飼育すると、内側前頭前野第5層の髄鞘化の低下が起こり、回復困難な社会性の障害、前頭葉機能障害を呈する。この社会的隔離マウスの神経細胞の機能的障害部位を同定し、逆説的に社会機能障害、前頭葉機能障害を伴う精神疾患の新しい治療ターゲットを提案したい。障害部位として、低髄鞘化により影響が見られる可能性の高い興奮性神経回路に着目した。内側前頭前野第5層の錐体細胞を中心とする興奮性神経回路について電気生理学的に記録を行い、どのタイプの錐体細胞が、または興奮性シナプス伝達のこういった要素が、貧しい社会経験により発達障害を起こすのかを調べる。

3. 研究の方法

(1) 社会的隔離マウスの作製 と行動学的検証

連携研究者ら（牧之段 学、Gabriel Corfas / Harvard medical school）との連携により、同じ母親からの雄仔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（Isolation 群：IS-RE）残りの3匹を同じケージ内でグループ飼育する。（Regular Environment 群：RE）また、隔離飼育の期間を生後35日から49日にずらしたIsolation 群（RE-IS）も作製する。生後60日の時点で行動実験（Prepulse inhibition Test と Y-maze task）を行い各群を比較する。

(2) 電気生理学的実験

生後65日のマウスから脳を取り出し、スライスを作成する。細胞外液を灌流しながら内側前頭前野第5層の錐体細胞からWhole-cell patch clamp 法にて記録を行う。まず、電位固定法にて自発性興奮性後シナプス電流（sEPSC）を記録し比較検討する。次に微小興奮性後シナプス電流、刺激誘導性後シナプス電流を記録する。刺激誘導性後シナプス電流においては適宜、AMPA 受容体の阻害剤（CNQX）、NMDA 受容体の阻害剤（APV）を使用してそれぞれの成分について検討し、AMPA 電流と NMDA 電流の割合について比較検討する。次に電流固定法にて活動電位の頻度や閾値について比較検討を行う。同時に過分極性の電流を与えることで Ih current についても観察を行う。細胞間における Ih current のばらつきがあると考えられ、その Ih current の大きさによって細胞分類を行い、すでに確認されている隔離飼育の影響がどちらの細胞に認められるか調べる。

4. 研究成果

(1) 行動実験

Prepulse inhibition test、Y-maze test において、隔離飼育と集団飼育において差を認めた。この差は P21-P35 に隔離することによって出現し、それ以降に隔離しても差がみられないことから、行動異常を呈するには P21-P35 の期間の社会的経験の剥奪が重要であることがわかった。

(2) 電気生理学的実験

行動実験と同様に P21-P35 の期間に隔離飼育されたマウスは集団飼育されたマウスと比べて様々な電気生理学的性質が変化していた。

- 自発性興奮性後シナプス電流の頻度の低下、微小興奮性後シナプス電流の頻度の低下
- 活動電位の閾値の上昇、発火頻度の低

下

- c) 誘発性興奮性後シナプス電流の刺激強度に対する増加度の低下（機能的シナプス数減少の可能性）
- d) AMPA/NMDA 割合の低下（グルタミン酸受容体が未成熟である可能性）

さらに、内側前頭前野第五層の錐体細胞を大きな Ih current を持つかどうか（基準値を独自に設定）によって2つに分類した。すると大きな Ih current を持つ錐体細胞群においてのみ、上記の隔離飼育による電気生理学的機能変化を認めることがわかった。

以上のことから離乳後2週間の期間にマウスの社会的経験を剥奪すると、前頭葉機能障害を示唆する行動異常を認めるとともに、内側前頭前野第5層の大きい Ih current を持つ錐体細胞群においてのみ興奮性シナプス入力の低下、発火に至る興奮性の低下、また機能性シナプスの減少、グルタミン酸受容体の発達低下の可能性が見られることが明らかとなった。

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）

〔学会発表〕（計6件）

Social isolation during the critical period affects excitatory neuronal activity in mouse medial prefrontal cortex

Yamamuro K, Yoshino H, et al

Society for Neuroscience 45th annual meeting 2015

Chronic social isolation reduces excitatory synaptic inputs in medial prefrontal cortex

Yamamuro K, Yoshino H, Ogawa Y, Makinodan M, Gabriel C, Kishimoto T

Society for Neuroscience 44th annual

meeting 2014

神経細胞の電気活動から精神新患へ

芳野 浩樹

第111回日本精神神経学会学術総会 教育講演 / 2016

Social isolation during the critical period and excitatory neuronal activity in mouse medial prefrontal cortex

Hiroki Yoshino, Kazuhiko Yamamuro et al.

第38回日本神経科学大会 / 2015

社会的孤立によるマウス内側前頭前野皮質の興奮性シナプス伝達の減弱

山室和彦、芳野浩樹 et al

第36回日本生物学的精神学会 / 2014

臨界期の社会的孤立によるマウス内側前頭皮質の興奮性シナプス伝達の減弱

山室和彦、芳野浩樹 et al

第92回日本生理学会大会 / 2015

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芳野 浩樹 (YOSHINO, Hiroki)

奈良県立医科大学 医学部 講師

研究者番号：10347560

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

牧之段 学 (MAKINODAN, Manabu)

奈良県立医科大学 医学部 助教

研究者番号：00510182