

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20300131

研究課題名（和文） 社会的隔離が脳内回路形成に及ぼす影響

研究課題名（英文） The effect of social isolation on the circuit formation in the brain

研究代表者

高橋琢哉（TAKAHASHI TAKUYA）

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：20423824

研究成果の概要（和文）：

幼少時のストレスは生涯にわたって認知情緒行動に影響を及ぼす。しかしながらストレスが幼若期の脳回路形成に及ぼす影響のメカニズムについてはよくわかっていない。本課題では幼若期の社会的隔離が脳回路形成に及ぼす影響を分子レベルで解析している。幼若期の社会的隔離はバレル皮質における経験依存的 AMPA 受容体シナプス移行を雄においては阻害するが、雌においては阻害しない。

研究成果の概要（英文）：

Stressful events during early childhood can have a profound lifelong influence on emotional and cognitive behaviors. However, the mechanisms by which stress affects neonatal brain circuit formation are poorly understood. In this program, we analyzed the effect of neonatal social isolation on the brain circuit formation at the molecular level. We found that neonatal social isolation disrupts experience-dependent synaptic AMPA receptors delivery in the barrel cortex of male rats but not female rats.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2009 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2010 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：分科）神経科学 細目）神経化学・神経薬理学

キーワード：AMPA 受容体, 社会的隔離, シナプス, 可塑性, バレル皮質, 経験依存的

1. 研究開始当初の背景

幼児虐待の一つの型である養育放棄はわが国においても深刻な社会問題である。養育放棄により子供は親や他の子供との接触を失い、社会的に隔離された状況におかれる。このような幼児期の体験は様々な精神疾患を引き起

こすと考えられており（Insel et al. 2004, Khonicheva et al. 2006）、脳内回路形成に影響を及ぼしていると思われる。しかし、その分子メカニズムは全く知られていない。申請者は社会的隔離が経験依存的な AMPA 受容体

(グルタミン酸受容体) のシナプス移行を阻害するというをすでに突き止めており (高橋ら、Science 2003 ; 高橋ら、preliminary data : 研究計画および図2参照)、本研究ではさらにその分子メカニズムを明らかにすることを目的としている。本研究は社会的隔離をはじめとしたストレスによって引き起こされる様々な精神疾患の有効な治療法開発につながるかと期待される。

研究の学術的背景 : シナプス長期増強 (Long-term Potentiation:LTP) は記憶、学習の細胞レベルのメカニズムと信じられてきた。LTP の分子メカニズムの研究は最近爆発的に進んだ。申請者が以前在籍していた米国 Cold Spring Harbor 研究所の Malinow 博士の研究室ではグルタミン酸受容体の一つである AMPA 受容体に着目した。AMPA 受容体は数種類存在する (GluR1-4)。申請者が所属していた Malinow 研究室は LTP を誘導する刺激によりイオンチャネルである AMPA 受容体がシナプスへ移行し、シナプスにおける AMPA 受容体の数が増えることがシナプス長期増強のメカニズムであるという仮説を立てた。Malinow らは組換え AMPA 受容体のシナプスへの挿入を検出する方法として「電気生理学的標識」という方法を開発した (林ら Science 2000)。生体内の AMPA 受容体は膜電位が負のときも正のときもイオンがチャネルを通過することができる。したがっていずれの場合もシナプス前神経の刺激に対する反応が観察されるが、組換え受容体は膜電位が負のときのみイオンがチャネルを通過する。これを内向き整流と言う。もしこの内向き整流を示す組換え受容体がシナプスに挿入された場合、挿入されていないシナプスに比べてより内向きの整流を示すようになる。Malinow らはまず Sindbis virus を用い

て *in vitro* の培養海馬スライスに組み替え AMPA 受容体を発現させ、LTP 誘導時に GluR1 がシナプスへ移行するということを発見した (Shi ら、Cell 2001)。申請者はこのモデルが *in vivo* における経験依存的な神経の可塑的变化においても見られるかどうかを調べた。申請者は電気生理学的標識法を Sindbis virus を用いた *in vivo* インジェクション法と合わせ、ラットのひげからの入力があるバレル皮質 (生後 12 日-14 日 : 第 4 層から第 2 / 3 層に形成されるシナプス) において、ひげ存在下では GluR1 がシナプスへ移行し、ひげがない状態では移行しないということを *in vivo* で証明した (高橋ら、Science, 2003)。これは経験依存的に AMPA 受容体がシナプスへ移行するということを *in vivo* で証明した世界で初めての発見である。それでは社会的隔離は脳内神経回路形成に一体どのような影響を及ぼしているのだろうか？

ひげを用いた接触はラットの社会的活動の基本である。また興味深いことにラットにも社会的な階層が存在するが、社会的に優位にあるラットは階層が下のラットのひげを取り除く (Whisker trimming) という行為をする。さらに社会的行動の一つである攻撃的行動のためにはひげの存在が重要であるということも知られている。このようにラットのひげ-バレル皮質系は社会的活動において非常に重要な役割を果たしている。

申請者はひげ-バレル皮質における経験依存的 AMPA 受容体のシナプス移行を指標として社会的隔離の神経回路形成に与える影響の分子メカニズムを調べる。さらに情動系にも焦点を当てて解析していく。申請者はすでに発育期の社会的隔離が同じく発育期のバレル皮質における経験依存的 AMPA 受容体シナプス移行を阻害するというを見出している。こ

これは社会的隔離が神経回路形成に与える影響を分子レベルで解明した最初の発見である。この発見は本申請の出発点である。

このようなアプローチでの社会的隔離の研究は皆無であるが、当該研究のように社会的隔離が神経回路形成に及ぼす影響を分子細胞レベルで解明することは、精神発達を含めた社会的隔離の精神活動への影響を考える上で臨床的にも非常に重要である。ここに国内外の関連する研究の中での当該研究の位置付けが存在する。本研究は社会的隔離を含めたストレス性精神疾患の革命的な治療法開発につながると期待される。

2. 研究の目的

これまで、発育段階の社会的隔離がシナプスの機能にどのような影響を及ぼしているのかということは解析されてきた。しかし、その分子メカニズムについての解析はほとんどなされていなかった。申請者は経験依存的にAMPA受容体が (*in vivo*で) シナプスへ移行するという世界ではじめて発見した (高橋ら、Science 2003)。この実験系は経験のシナプス機能への影響を *in vivo*において分子レベルで解析することができる世界的にも極めて独創的なものである。申請者はこの実験系を用いて、社会的隔離がバレル皮質における経験依存的AMPA受容体シナプス移行を阻害するという現象を発見した (高橋、preliminary data)。本研究はこれを出発点として、発育段階における社会的隔離が脳内の回路形成に与える影響の分子メカニズムを、経験依存的AMPA受容体シナプス移行を中心に明らかにしていくことを目的とする。

3. 研究の方法

生後7日から11日の期間一日6時間ラットを隔離する。隔離している期間中はヒートパッドの上に置き、cold stress がかからないようにする。6時間の社会的隔離以外の時間は母親および他の仔ラットと一緒に正常な環境に置いておく。生後12日にGFP-GluR1 発現ウイルスをラットバレル皮質第2/3層に感染させ、生後14日に急性スライスを作製して、第4層から第2/3層にかけて形成されるシナプス応答を電気生理学的に解析する。

4. 研究成果

生後7日から11日にかけての1日6時間の社会的隔離により、生後12日から14日にかけてのGFP-GluR1のシナプス移行が阻害される。まず社会的隔離の長さによる効果が依存しているか否かを調べるため、隔離の時間、期間を変えて同様の実験を行った。その結果、一日1時間を生後7日から11日にかけて行った場合、6時間の隔離を一日だけ行った場合いずれもGluR1のシナプス移行が阻害された。一方で、1時間の社会的隔離を一日だけ施した場合にはGluR1のシナプス移行阻害は見られなかった。次にこの現象を何が仲介しているのかということをつきとめるためにまずストレスホルモンであるcorticosteroneに着目した。社会的隔離期間中に血中のcorticosteroneの濃度を測ったところ、これが上昇していることが明らかになった。次にcorticosteroneの上昇が社会的隔離によるGluR1シナプス移行障害を仲介しているか否かを調べるため、社会的隔離期間中にglucocorticoid受容体 antagonist であるRU486を投与した。その結果、社会的隔離を施しているにもかかわらず正常なGluR1

のシナプス移行が見られた。さらに RU486 の dose を変えて同様の実験を行った。8 μ g/g の RU486 を打った場合は社会的隔離による GluR1 シナプス移行障害が rescue されたが、1.6 μ g/g の場合は rescue されなかった。以上より RU486 の効果は dose-dependent であることが明らかになった。次に corticosterone の injection により社会的隔離の効果が mimic できるか否かを調べるため、正常環境に置かれているラットに corticosterone (4.17 μ g/day) を injection した。その結果 GluR1 のシナプス移行が阻害された。一方 0.83 μ g/day の corticosterone を打った場合は阻害しなかった。以上の結果より、社会的隔離による GluR1 のシナプス移行阻害は corticosterone を介していることが明らかになった。以上の実験はすべて雄ラットを用いて行われているもので、雌ラットを用いて同様の実験を行うことにより社会的隔離の影響の雌雄差を調べた。一日 6 時間の社会的隔離を生後 7 日から 11 日にかけて雌ラットに施したところ、GluR1 のシナプス移行阻害が起こらなかった。以上より、社会的隔離の効果には雌雄差があることが明らかになった。

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)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Jitsuki S, Takemoto K, Kawasaki T, Tada H, Takahashi A, Becamel C, Sano A, Yuzaki M, Zukin RS, Ziff EB, Kessels HW, and Takahashi T. Serotonin mediates cross-modal reorganization of cortical circuits. *Neuron*, 査読有, 69, 780-792, 2011
- ② Tada H, Okano HJ, Takagi H, Shibata S, Yao I, Matsumoto M, Saiga T, Nakayama KI, Kashima H, Takahashi T, Setou M, Okano H: Fbxo45, a novel ubiquitin ligase, regulates synaptic activity. *J Biol Chem*, 査読有, 285(6),

3840-3849, 2010

- ③ Arevalo JC, Wu SH, Takahashi T, Zhang H, Yu T, Yano H, Milner TA, Tessarollo L, Ninan I, Arancio O, Chao MV: The ARMS/Kidins220 scaffold protein modulates synaptic transmission. *Mol Cell Neurosci*, 査読有, 45(2), 92-100, 2010
- ④ Mitsushima D, Takase K, Takahashi T, Kimura F: Activational and organizational effects of gonadal steroids on sex-specific acetylcholine release in the dorsal hippocampus. *Journal of Neuroendocrinology*, 査読有, 21(4), 400-405, 2009.
- ⑤ Jitsuki S, Kimura F, Funabashi T, Takahashi T, Mitsushima D: Sex-specific 24-h profile of extracellular serotonin levels in the medial prefrontal cortex. *Brain Research*, 査読有, 1260, 30-37, 2009
- ⑥ Hagiwara H, Ishida M, Arita J, Mitsushima D, Takahashi T, Kimura F, Funabashi T: The cAMP response element-binding protein in the bed nucleus of the stria terminalis modulates the formalin-induced pain behavior in the female rat. *European Journal of Neuroscience*, 査読有, 30, 2379-2386, 2009.

[学会発表] (計 32 件)

- ① 高橋琢哉: Experience driven synaptic delivery of AMPA receptors in vivo. 第 33 回日本分子生物学会年会 (BMB2010)、東京、2010.12.7 (招待シンポジウム)
- ② 高橋琢哉: 経験依存的 AMPA 受容体シナプス移行. 第 33 回日本神経科学大会, 神戸, 2010.9.3
- ③ 高橋琢哉: 経験依存的 AMPA 受容体シナプス移行. 第 32 回日本神経科学大会, シンポジウム, 名古屋, 2009, 9.18
- ④ 高橋琢哉: 経験依存的 AMPA 受容体シナプス移行. 第 31 回日本神経科学大会, シンポジウム, 東京, 2008, 7.11
- ⑤ 高橋琢哉: 経験依存的 AMPA 受容体シナプス移行. 第 85 回日本生理学会大会, シンポジウム, 東京, 2008, 3.27

[その他]

ホームページ等

<http://neurosci.med.yokohama-cu.ac.jp/2.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 琢哉 (TAKAHASHI TAKUYA)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号：20423824

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

船橋 利也 (HUNABASHI TOSHIYA)
聖マリアンナ医科大学・医学部・教授
研究者番号：70229102

美津島 大 (MITSUSHIMA DAI)
横浜市立大学・医学研究科・准教授
研究者番号：70264603

高瀬 堅吉 (TAKASE KENKICHI)
東邦大学・医学部・助教
研究者番号：80381474