

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26290025

研究課題名(和文)社会的隔離動物の脳皮質回路形成の解析

研究課題名(英文) Analysis of neural circuit formation in the neocortex of socially isolated animals

研究代表者

高橋 琢哉 (TAKAHASHI, Takuya)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20423824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：養育放棄は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置かれる。このような体験は様々な精神疾患を引き越し、脳内回路形成に影響を及ぼしていると考えられているが、その分子メカニズムは不明である。本研究では幼若期の社会的隔離が、社会行動の中核である内側前頭前野(medial prefrontal cortex; mPFC)スパイン内部でのcofilin活性を抑制し、アクチン線維流動性の低下およびAMPA受容体のシナプス移行性障害を引き起こすことを発見し、その結果mPFC依存的な社会行動異常が誘導されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Social maltreatment early in life can lead to the development of impaired interpersonal relationships and profound social disorders. However, the underlying cellular and molecular mechanisms involved are largely unknown. Here, we found that isolation of neonatal rats induced social dominance over non-isolated control rats from the same litter in juveniles that was glucocorticoid-dependent. Furthermore, neonatal isolation inactivated the actin-depolymerizing factor (ADF)/cofilin in the juvenile medial prefrontal cortex (mPFC). Isolation-induced inactivation of ADF/cofilin resulted in the decrease of glutamate synaptic AMPA (-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid) receptor (AMPA) contents by the increase of stable actin fractions at dendritic spines in the juvenile mPFC. Thus, neonatal isolation affects spines in the mPFC by reducing actin dynamics, leading to abnormal social behavior later in life.

研究分野：神経科学

キーワード：社会的隔離 内側前頭前野 social dominace cofilin

1. 研究開始当初の背景

大きな社会問題となっているうつ病、不安障害、対人関係障害などは、幼児期に受けた母親による育児放棄（ネグレクト）などの、不遇な養育環境が危険因子であることが報告されている（Kaufman et al., *PNAS*, 2004, Hengartner et al., *Eur. Psychiatry*, 2013）。ネグレクトでは、幼児が母親や他の子供との社会的接触を失うことにより、社会的に隔離された養育環境が形成される。

げっ歯類においても、ネグレクトのように長期間社会的に隔離（社会的隔離）されると、不安症、満足を感じるとる機能の不全など、うつ病様症状を示し（Wallace et al., *Nature Neurosci.*, 2009 など）また幼児期の社会的隔離ストレスが与える影響については、不安、意欲、記憶、学習などの異常が、行動レベルで示唆されている（Bianchi et al., *Eur. J. Neurosci.*, 2006, Hellemans et al., *Dev. Brain Res.*, 2004, Weiss et al., *Behav. Brain Res.*, 2004 など）。

このように多くの研究者によって、幼児期における母親や兄弟とのコミュニケーションが、発達期の脳内回路網形成に重要な影響を及ぼし、正常な社会行動の形成を左右すると考えられている。しかしながら、その詳細な分子メカニズムは明らかにされていない。

2. 研究の目的

これまでに我々は社会的隔離による低養育環境が、体性感覚野のバレル皮質における経験依存的な AMPA 型グルタミン酸受容体のシナプス移行を阻害することを明らかにし、またその分子・細胞メカニズムを突き止めてきた（Miyazaki et al., *J Clin Invest.*, 2012, Miyazaki et al., *Eur. J. Neurosci.*, 2013）。本研究ではさらにその現象とシナプス内での詳細な分子メカニズムを社会行動の中核である内側前頭前野（medial prefrontal cortex ; mPFC）を中心に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劣悪な養育環境によって引き起こされる難治性精神疾患の有効な新規治療法開発につながると期待される。

3. 研究の方法

本研究では、社会的隔離（生後 7 日目から 11 日目まで、1 日 6 時間、母親兄弟ラットから隔離）を施した 4 週齢のラットを用い下記解析を行った。

mPFC での AMPA 受容体移行性の評価
mPFC の PSD 領域を抽出し、GluA1 のたんぱく質量を測定する。またホールセルパッチクランプ法を用いた電気生理学的解析により、mPFC におけるシナプス応答性を評価する。

mPFC でのアクチン線維流動性の評価
in utero electroporation 法により mPFC に GFP アクチンを導入し、神経細胞スパイン内での光褪色後蛍光回復法（Fluorescence Recovery After Photobleaching: FRAP）を用いて観察する。蛍光褪色後の GFP アクチンの蛍光回復率を測定し、アクチン線維流動性を解析する。

mPFC での cofilin 活性の評価
アクチン線維の流動性を制御する分子として、cofilin のリン酸化を正常群と社会的隔離群の mPFC での発現を比較検討する。mPFC 神経細胞シナプトニューロソーム分画を精製し、ウェスタンブロット法により定量解析する。

社会的階層性形成の解析
tube test 法を用いた解析により、集団内の社会的階層性（social dominance）を評価する。

mPFC での cofilin 恒常的活性による社会的隔離効果抑制の検証

cofilin の活性に差が見られた場合、cofilin 恒常的活性化型変異体を社会的隔離動物 mPFC 領域にレンチウイルスを用い導入し、社会的階層性、シナプス応答性、アクチン線維流動性変化を評価する。

4 . 研究成果

本研究では、最初に社会的隔離動物のmPFCのスパイン内でのアクチン線維流動性の変化について検証した。Green Fluorescent Protein (GFP) のタグをつけたアクチンを mPFC に発現させ、FRAP 解析を行った。FRAP 実験においては二光子顕微鏡を用いてレーザー光をスパイン部位に照射し、スパインにおける GFP アクチンの蛍光を消失させる。GFP アクチンがダイナミックな動態を有していれば、消失した蛍光が回復する。我々は、正常動物と比べると社会的隔離動物では、mPFC のスパインにおいて消失した蛍光の回復が低下していることを見出した。このことは社会的隔離動物の mPFC のスパインではアクチン線維の流動性が低下していることを示唆している。またこのアクチン線維流動性低下はアクチン脱重合因子 cofilin の不活性化によるものであり、それに伴い AMPA 受容体の一つ GluA1 のシナプス膜提示量が減少していることを明らかにした。

さらに tube test 法を用いた行動解析により、社会的隔離動物では mPFC 依存的な social dominance が高くなることを発見した。一方で、社会的隔離動物の不安行動には正常動物と差がなかった。また社会的隔離による social dominance の上昇にはグルココルチコイドシグナルを介していることも明らかになった。グルココルチコイド受容体アンタゴニストの RU486 を社会的隔離期間中に投与することにより social dominance が抑制された。また社会的隔離動物の mPFC においては LIMK のリン酸化亢進が認められた。

以上のことより、社会的隔離によるグルココルチコイドの過剰分泌に伴い mPFC でのスパインでの LIMK のリン酸化が誘導され、cofilin が不活性化し、アクチン線維流動性が低下した結果、AMPA 受容体シナプス移行抑制が引き起こされ、social dominance が上昇したと示唆された。実際、cofilin の恒常的活性

化型変異体である S3A を mPFC に導入した社会的隔離動物では、アクチン線維の流動性低下、シナプス応答性低下が回復し、さらには social dominance の上昇が正常化された (Tada et al., PNAS, 2016)。

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 9 件)

Takemoto K, Iwanari H, Tada H, Suyama K, Sano A, Nagai T, Hamakubo T, Takahashi T.

"Optical inactivation of synaptic AMPA receptors for artificial memory erasure."

Nature Biotechnol., 査読有, 35(1): 38-47, 2017.

Tada H, Miyazaki T, Takemoto K, Takase K, Jitsuki S, Nakajima W, Koide M, Yamamoto N, Komiya K, Suyama K, Sano A, Taguchi A, Takahashi T.

"Neonatal isolation augments social dominance by altering actin dynamics in the medial prefrontal cortex."

PNAS, 査読有, 113(45): E7097-E7105, 2016.

Fujimori K, Tezuka T, Ishiura H, Mitsui J, Doi K, Yoshimura J, Tada H, Matsumoto T, Isoda M, Hashimoto R, Hattori N, Takahashi T, Morishita S, Tsuji S, Akamatsu W, Okano H.

"Modeling neurological diseases with induced pluripotent cells reprogrammed from immortalized lymphoblastoid cell lines."

Molecular Brain, 査読有, 9(1): 88, 2016.

Matsumoto T, Fujimori K, Andoh-Noda T, Ando T, Kuzumaki N, Toyoshima M, Tada H, Imaizumi K, Ishikawa M, Yamaguchi R, Isoda M, Zhou Z, Sato S, Kobayashi T, Ohtaka M, Nishimura K, Kurosawa H, Yoshikawa T, Takahashi T,

Nakanishi M, Ohyama M, Hattori N, Akamatsu W, Okano H.

"Functional Neurons Generated from T Cell-Derived Induced Pluripotent Stem Cells for Neurological Disease Modeling."

Stem Cell Reports, 査読有, 6(3) 422-435, 2016.

Nakajima W, Jitsuki S, Sano A, **Takahashi T**. Sustained Enhancement of Lateral Inhibitory "Circuit Maintains Cross Modal Cortical Reorganization"

PLoS One, 査読有, 11(2):e0149068, 2016.

Jitsuki S, Nakajima W, Takemoto K, Tada H, Takahashi-Jitsuki A, Sano A, **Takahashi T**.

"Nogo receptor signaling restricts adult neural plasticity by limiting synaptic AMPA receptor delivery."

Cerebral Cortex, 査読有, 26(1), 427-439 2016.

Tada H, Koide M, Ara W, Shibata S, Funabashi T, Suyama K, Goto T, **Takahashi T**.

"Estrous Cycle-Dependent Phasic Changes in the Stoichiometry of Hippocampal Synaptic AMPA Receptors in Rats."

PloS One, 査読有, 10(6):e0131359, 2015.

Tada M, Uchida H, Maeda T, Konishi M, Umeda S, Terasawa Y, Nakajima S, Mimura M, Miyazaki T, **Takahashi T**.

"Fear Conditioning Induced by Interpersonal Conflicts in Healthy Individuals. "

Plos One, 査読有, Published: May 15, 2015.

Uchimoto K, Miyazaki T, Kamiya Y, Mihara T, Koyama Y, Taguri M, Inagawa G,

Takahashi T, Goto T.

"Isoflurane impairs learning and hippocampal long-term potentiation via the saturation of synaptic plasticity. "

Anesthesiology, 査読有, 121(2) : 302-10, 2014.

〔学会発表〕(計 10 件)

Takahashi T. Synaptic plasticity: from bench to bedside.

Current Trends and Future Directions of Synaptic Plasticity Research. Baltimore, USA. 2016年6月1日

多田敬典、**高橋琢哉**

若年期優劣関係を決定する分子メカニズムの解明

第93回日本生理学会大会 2016年3月24日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

多田敬典、**高橋琢哉**

低養育環境ストレスによる若年期優劣関係に影響を及ぼす内側前頭前野分子メカニズムの解明

第58回日本神経化学学会大会 2015年9月12日、大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)

Tada H, Suyama K, **Takahashi T**.

Neonatal isolation augments social dominance by altering actin dynamics in the medial prefrontal cortex

Neuroscience2015 2015年7月29日、神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

Koide M, Tada H, Ara W, Shibata S, Funabashi T, Suyama K, Goto T, **Takahashi T**.

Estrous Cycle-Dependent Phasic Changes in the Stoichiometry of Hippocampal Synaptic AMPA Receptors in Rats

Neuroscience2015 2015年7月29日、神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

若年期優劣関係を決定する分子メカニズムの解明

多田敬典, 須山紅美子, 高橋琢哉

包括型脳科学研究推進支援ネットワーク 冬のシンポジウム 2014年12月12日、東京医科歯科大学（東京都文京区）

Neonatal chronic stress alters actin dynamics and experience-driven synaptic plasticity via ADF/cofilin inactivation in the rat neocortex.

Tada H, Suyama K, **Takahashi T.**
Neuroscience2014 2014年9月13日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

Phasic synaptic incorporation of GluR2-lacking AMPA receptors at gonadotropin-releasing hormone neurons is involved in the generation of the luteinizing hormone surge in female rats.

Kuroki Y, Tada H, Funabashi T, Kamiya Y, Goto T, Suyama K, Sano A, Mitsushima D, Etgen AM, **Takahashi T.**

Neuroscience2014 2014年9月12日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

低養育環境ストレスによる攻撃行動発現制御の脳内ネットワーク分子メカニズムの解明

多田敬典，須山紅美子，**高橋琢哉**

第21回日本行動神経内分泌学研究会全国集会 2014年9月4日、ホテル美やま（埼玉県秩父市）

Neonatal chronic stress alters actin dynamics and experience-driven synaptic plasticity via ADF/cofilin inactivation in the rat neocortex.

Tada H, Suyama K, **Takahashi T.**
CSHL meeting 2014年5月31日、ニューヨーク（米国）

〔図書〕（計 1 件）

高橋琢哉, 精神神経疾患における AMPA 受容体の役割: ベランパネルの基礎と可能性, 科学評論社 精神科, 2017, (30)2, 170-175. 2月発行

〔産業財産権〕

○出願状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔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

多田敬典 (TADA, Hirobumi)

国立長寿医療研究センター・神経内分泌学

研究室・室長

研究者番号：20464993

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし