

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：82401

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H05136

研究課題名（和文）大脳小脳大規模多軸観察による精神疾患における全体性崩壊機構の解明

研究課題名（英文）Large scale dual-axis two-photon imaging of the cerebro-cerebellar interactions to disentangle the mechanisms of the disruption of holism in psychiatric disorders

研究代表者

堤 新一郎 (TSUTSUMI, Shinichiro)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・副チームリーダー

研究者番号：20862676

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 25,200,000円

研究成果の概要（和文）：自閉スペクトラム症（ASD）モデルマウスにおいて、一旦成立した認知学習が突如崩壊する、ASD児のメルtdownに酷似した症状を発見した。前頭連合野（FrA）第2/3層神経細胞の大規模2光子イメージングにより、メルtdown様症状特異的に発火する細胞群を同定した。さらに薬理遺伝学的介入により、FrA神経回路の脱抑制の程度がメルtdown様症状と相関することが分かった。以上の結果は、遺伝的負因と認知負荷とが組み合わさることで、高次脳領域において興奮・抑制性神経回路の相互作用が破綻し、異常回路活動が生じることが、メルtdown症状をはじめとする精神疾患における全体性の崩壊の回路基盤であることを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、大規模2光子イメージングにより精神疾患における「全体性」崩壊の機序に細胞レベルで迫った。薬理遺伝学的介入により、前頭連合野が興奮・抑制・興奮回路を形成していることを発見した。自閉スペクトラム症モデルマウスが臨床症状に酷似したメルtdown様症状を示すことを発見し、この症状に特異的に発火する細胞群（メルtdown細胞）を突き止めた。抑制性神経細胞の機能低下によりメルtdown細胞が増加することから、大脳高次領域の興奮・抑制・興奮回路の破綻が、精神疾患における「全体性」の崩壊を引き起こしていることが示唆された。これらの結果は、精神疾患の新たな診断・治療法の開発に向けた重要な基礎的知見となる。

研究成果の概要（英文）：We found that autism spectrum disorder (ASD) model mice showed a sudden disruption of learned cognitive performance, indicative of meltdown symptoms in ASD patients. By a large-scale two-photon imaging of frontal association cortex (FrA) layer 2/3 neurons, we identified a subset of neurons specifically firing during the meltdown-like symptoms. Pharmacogenetic manipulation revealed that the degree of FrA neural circuit disinhibition was correlated with the occurrence of meltdown-like symptoms. These results suggest that a disruption of sophisticated interactions between excitatory and inhibitory neural circuits and resultant hyper-activation of circuit activity in higher-order brain areas induced by a combination of negative genomic factors such as psychiatric disease-related genes and cognitive loads, is a core circuit pathogenesis of a destruction of holism exemplified by meltdown symptoms, in psychiatric disorders.

研究分野：神経科学

キーワード：自閉スペクトラム症 2光子イメージング 全体性の崩壊 前頭連合野 メルtdown症状 認知タスク 神経活動シーケンス 転移学習

1. 研究開始当初の背景

統合失調症 (SZ) の難治症状の一つに作業記憶やタイミング制御などの認知機能の障害が挙げられる (Goldman-Rakic *et al.*, *Psychopharmacol*, 2004)。小脳外側部の投射先である小脳歯状核から視床腹外側核を経由して内側前頭前野に至る経路は、これらの認知機能に関わる大脳のデルタ波 (4 Hz) 振動に重要である (Parker *et al.*, *Front Syst Neurosci*, 2014)。SZ ではこの振動が失われていることでタイミング制御が障害されているが、SZ モデルラット小脳歯状核の視床腹外側核投射軸索のデルタ周波数刺激により、内側前頭前野機能が改善し、時間間隔の見積もりが回復することが示されている (Parker *et al.*, *Mol Psychiatr*, 2017)。一方、自閉スペクトラム症 (ASD) では生下時の小脳の障害が最も重要な環境因子であることが知られており (Wang, *Neuron*, 2014) 小脳右 Crus I 領域から小脳歯状核、視床腹外側核を経由して内側前頭前野に投射する経路が ASD で障害される社会性行動の表出に重要であることが示された (Kelly *et al.*, *Nat Neurosci*, 2020)。このように、SZ や ASD の異常行動に関わる小脳 - 大脳投射が同定され始めている一方、詳細な回路活動の連関が解像されておらず、脳全体としての機能異常がどのように SZ や ASD の行動異常を引き起こしているかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、SZ および ASD 脳の異常と行動異常との関連を、細胞レベルの解像度の複数脳領域活動大規模イメージングにより包括的に理解することである。精神疾患の研究は、シナプスレベルでの高解像度・狭視野の研究、行動レベルでの研究、fMRI レベルでの低解像度・広視野の研究がそれぞれ別々に行われてきており、相互の関係については不明な点が多い。それにより病態の理解が阻まれ、有効な治療法が創出できていないのが現状である。本研究は大脳小脳をはじめとした複数脳領域の細胞レベルでの神経活動異常を疾患モデル動物の同一個体から記録する、世界的にも類のない研究である。さらに、得られた結果を A03 班および A04 班の全脳・身体シミュレーションにフィードバックすることで、実験的に得られない精神疾患患者さんの脳の細胞レベルでの活動異常と、その行動との関連についての理解を試みる。このような異分野連携によるアプローチは、医学界の最後の砦である精神疾患の病態の理解に、新たな側面からブレークスルーをもたらす可能性を秘めている。

3. 研究の方法

A02-1 大脳小脳大規模 2 光子イメージング

本研究では、オリンパス社と共同で大脳小脳ともに 2.54 mm² の視野を誇る 2 領域 2 光子顕微鏡を開発することを目的とした。2 領域ともに 1,000 細胞程度の活動が記録することで、大脳では前頭前野から運動野まで、小脳では半球全体の縞状構造 (~10 帯) が同時に可視化できる。特に、小脳半球の外側と内側が認知タスクにおいて異なる階層の機能 (感覚・認知機能と運動機能) を持つことが示唆されており (Tsutsumi *et al.*, *eLife*, 2019) 大脳小脳双方で低次から高次までの階層間相互作用、およびこれらの領域間相互作用が細胞レベルで可視化できる。さらに、小脳由来の大脳皮質投射を可視化するため、視床軸索のイメージングや、GRIN レンズを使用した小脳核のイメージングも組み合わせ、大脳小脳ループ全体を包括的に可視化する。これらの実験データは A01 班の大脳大規模イメージングデータを補完し、A03・A04 班の全脳・身体シミュレーションのパラメータに強力な拘束条件を与える。

A02-2 複数の認知タスクと転移学習

外側小脳皮質から前頭前野への投射は作業記憶やタイミング制御などの認知機能に重要であることが示唆されているが (Parker *et al.*, *Mol Psychiatr*, 2017) 細胞レベルでの回路連関は未だに調べられていない。頭部固定マウスが行える認知タスクとして、遅延付き Go/No-Go タスクおよび Go/No-Go 逆転学習タスクを行う。申請者は予備実験で、Go/No-Go 学習前に Go のみのタスクを長く行うことで Go/No-Go 学習のスピードが飛躍的に向上することを発見した。これは、タスクに直接関わらない領域において何らかの学習 (転移学習) が行われている可能性を示唆する。これらの実験結果と A03 班の汎用学習モデルおよび A04 班の環境・身体・神経系発達モデルと比較することで、脳の全体性と認知行動学習との関係を明らかにする。

A02-3 薬理学・遺伝学的精神疾患モデル

SZ の発症機序の一つに、NMDA レセプターの機能不全が挙げられる。特に、NMDA レセプター阻害剤の MK-801 急性投与および phencyclidine (PCP) 慢性投与はそれぞれ急性精神病および SZ モデルとして確立している (Tsai and Coyle, *Annu Rev Pharmacol*, 2002)。申請者は予備実験において、MK-801 の急性投与が遅延付き go/no-go タスクのパフォーマンスを障害するが、遅延がない Go/No-Go タスクのパフォーマンスを障害しないことを見出した。この結果は作業記憶など認知負荷がかかった際の大脳皮質における演算に NMDA レセプターの機能が重要であることを示唆するが、回路レベルでの機序は不明である。作業記憶には大脳・視床ループ

およびそれを駆動する小脳の入力が重要であることが示唆されており (Guo et al., Nature, 2017); Gao et al., Nature, 2018)。これらの細胞レベルでの回路基盤を大規模に可視化する。一方で、SZ や ASD は複数の遺伝子変異が複合して発症すると考えられているが、ASD については単一遺伝子の変異で最も頻度の高い *Chd8* ヘテロノックアウト (hKO) 系統、SZ についてはヒトの遺伝子変異を最も忠実に反映した *Setd1a* hKO 系統が、ASD や SZ の主要な徴候を模す最も優れたマウスモデルであることが知られている (Katayama et al., Nature, 2017); Nagahama et al., Cell Rep, 2020)。これらの疾患モデルマウスの細胞レベルでの大脳小脳連関を正常マウスのそれと比較し、その異常を A04 班主導の大規模データ解析を使って示す。さらに認知負荷をかけた際の回路活動の変容と、A03 班の病態モデル全脳シミュレーションの結果から、全体性の崩壊と認知行動障害との関連に迫る。

4. 研究成果

A02-1 大脳小脳大規模 2 光子イメージング

前頭連合野 (frontal association cortex, FrA) 皮質第 2/3 層において、1.27 x 1.27 mm 視野の 2 光子カルシウムイメージング法を確立し、2 か月間にわたって 1,000 個以上の神経細胞活動を計測することに成功した。この技術を用い、遅延付き Go/No-Go タスク中の神経細胞活動の慢性記録を行った。その結果、Hit (成功) トライアルの 90% 以上で生じ、遅延付き Go/No-Go タスク成績とその学習に関連する、神経活動シーケンスを発見した。神経活動シーケンスは認知学習によって 20 秒程度まで伸長し、トライアル構造を完全にカバーすることが分かった。神経活動シーケンスの伸長が上手く行かないマウスでは認知学習が進まないことが分かった。さらに、イメージング中に薬理遺伝学的介入 (DREADD) を行い、FrA 神経細胞の抑制により、逆に回路活動が亢進する現象を発見した。興奮性神経細胞に限定した DREADD とイメージングにより、回路活動の亢進は、抑制性神経細胞の抑制による脱抑制に起因することが示唆された。この脱抑制の程度はタスク成績と負に相関したことから、抑制性神経回路の破綻が下記の ASD メルトダウン様症状の原因となっていることが示唆された。

A02-2 複数の認知タスクと転移学習

遅延付き Go/No-Go タスクにおいて、タスクに関係のないマウスの体動から Go/No-Go 情報をデコードできることを偶然発見した。この体動様式は学習によって獲得されることと、強制的に体動を止めるとタスク学習が遅れることを突き止めた。さらに、遅延時間が長くなると、体動による Go/No-Go 情報のデコーディング成績とタスク成績が相関するようになることが分かった。これらの結果は、認知学習が脳幹や小脳など、低次脳領域へ転移していくこと (転移学習) を示唆した。ASD および SZ モデルマウスでは、体動のデコーディング成績はむしろ高い一方、タスク成績との相関が見られないことから、転移した情報の高次脳領域における読み出し (求心性長距離投射) に問題がある可能性が考えられた。

A02-3 薬理学・遺伝学的精神疾患モデル

【薬理的モデル】

遅延付き Go/No-Go タスクを修得したマウスに対して、NMDA レセプター阻害剤の MK-801 急性投与および phencyclidine (PCP) 慢性投与を行った。MK-801 急性投与によってタスク成績の低下が見られた一方、PCP 慢性投与では成績低下が認められなかった。また、MK-801 急性投与中の 2 光子イメージングにより、FrA 神経細胞活動の低下と、Go/No-Go 情報のデコーディング成績の低下が見られた。以上の結果から、NMDA レセプター演算は認知機能に重要であるが、慢性的な抑制では代償機構が働くことが示唆された。

【遺伝学的モデル】

ASD モデルマウス *Chd8*hKO 系統において、認知学習が一旦成立するものの、突如として成績が低下し、その後は戻りにくくなる、ASD 児のメルトダウンに類似した行動を発見した。その他にも、タスク後に叫びだす行動や、タスク後半における瞳孔の異様な収縮など、患児の症状によく似た表現型をこのマウスモデルが示すことを発見した。前述の通り、*Chd8* hKO 系統では、体動による Go/No-Go 情報のデコーディング成績はむしろ高く、体動によって保持した情報を大脳で処理できなくなっている状態、すなわち全体性の崩壊が示唆された。タスク中の FrA 神経活動を解析したところ、神経活動シーケンスのうち、意思決定の際に発火する細胞の増加と、遅延時間で発火する細胞の減少が見られた。メルトダウン様症状を起こした時の活動を見てみると、No-Go トライアルで間違った際に特異的に、特定の細胞群が発火することを発見した (これをメルトダウン細胞と名付けた)。メルトダウン細胞の活動は間違ったリック活動の前から生じ、リック活動が終わると収まることから、メルトダウン様症状を引き起こす原因であることが示唆された。以上の結果は、精神疾患関連遺伝子などの遺伝的負因と認知負荷が組み合わせることで、高次脳領域における抑制性神経回路が破綻し、メルトダウン細胞などの回路の異常活動を引き起こすことで、メルトダウン様症状をはじめとする全体性の崩壊を引き起こしていることを示唆した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Tsutsumi Shinichiro, Hayashi-Takagi Akiko	4. 巻 67
2. 論文標題 Optical interrogation of multi-scale neuronal plasticity underlying behavioral learning	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Opinion in Neurobiology	6. 最初と最後の頁 8~15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.conb.2020.07.002	査読の有無 有
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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 堤 新一郎
2. 発表標題 Cerebello-thalamo-prefrontal circuits responsible for cognitive dysfunction in psychiatric disorders
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堤 新一郎
2. 発表標題 Thalamo-prefrontal circuit mechanisms responsible for cognitive dysfunction in psychiatric disorders.
3. 学会等名 4th Japan-UK Neuroscience Symposium 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堤 新一郎
2. 発表標題 Thalamo-cortical circuit mechanisms responsible for cognitive dysfunctions in psychiatric disorders
3. 学会等名 日本生理学会 第100回記念大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shinichiro Tsutsumi and Akiko Hayashi-Takagi
2. 発表標題 The role of prefrontal-cerebellar loop for cognitive deficits in psychiatric disorders
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 / CJK第1回国際会議 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shinichiro Tsutsumi and Akiko Hayashi-Takagi
2. 発表標題 Cerebello-thalamo-prefrontal circuits responsible for cognitive dysfunction in psychiatric disorders
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shinichiro Tsutsumi and Akiko Hayashi-Takagi
2. 発表標題 Thalamo-frontal cortex circuit mechanisms responsible for cognitive dysfunctions in psychiatric disorders
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shinichiro Tsutsumi and Akiko Hayashi-Takagi
2. 発表標題 Thalamo-frontal circuit mechanisms of autism spectrum disorder
3. 学会等名 The 2nd RIKEN CBS Co-Creation International Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shinichiro Tsutsumi and Akiko Hayashi-Takagi
2. 発表標題 Thalamo-frontal circuit mechanisms for cognitive dysfunctions in psychiatric disorders
3. 学会等名 Gordon Research Conference Thalamo-cortical Interactions (国際学会)
4. 発表年 2024年

〔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
---------	---------