



幼少期の一定の時期に孤立して育つと 前頭葉の特定の神経細胞の機能が低下することを解明！

—Cerebral Cortex 誌に論文を発表—

<概要>

本学 奈良県立医科大学精神医学講座（教授：岸本 年史）の研究グループは、幼少期のある一定の時期（マウスの離乳後2週間）に孤立して育てられると、最も高次の脳機能を司る前頭葉皮質の深層において、あるタイプの神経細胞の機能（電気的活動）が低下することを、マウスを使った実験で突き止めました。この時期以降に孤立させても機能低下が起こらないことから、マウスにおいて離乳後間もない時期の社会的経験が、このタイプの神経細胞の機能の発達に、もしくは高次の脳機能の発達に、非常に重要であることがわかりました。

同様にヒトにおいても、発達期の社会的経験が正常な脳の発達に重要であることが予想されます。実際に発達期の社会的経験が乏しいことで脳の発達不全や精神疾患を引き起こすことが、すでに報告されており、そこで呈する精神症状の基盤には今回提示した特定の神経細胞の機能低下に関連している可能性が考えられます。将来的に、その特定の神経細胞の機能を改善するような薬物を探索することなどにより精神症状に対する新たな治療法につながることを期待されます。

この成果をまとめた論文が、脳科学分野のトップジャーナルである『**Cerebral Cortex**』（セレブラル コルテックス）（Oxford University Press）（2月3日付）のオンライン版に掲載されました。

<背景>

ヒトの脳が健康に発達するためには、親との関わりはもちろん、子供同士の集団での関わりも重要です。逆に子供の発達期に孤立して過ごすとも脳の発達が阻害され、精神疾患を発症する例も報告されています。例えば、1980年代のルーマニアのチャウシェスク政権下で行われた多産政策の弊害として生み出された多数の孤児が、その後、十分な人的なケアがなされない劣悪な環境で育てられた例があります。それらの孤児には、認知機能障害、不注意多動症状、自閉症様症状、など様々な精神症状が見られ、脳画像研究において前頭葉中心に異常がみられました。また重要なことに、ある一定期間このような貧しい環境下での療育がなされると、その後先進国の豊かな環境下の里子になっても、これらの症状や異常は改善しなかったということがあります。このことから子供の脳が発達するには、ある限られた時期の社会的接触が非常に重要であることがうかがえます。

社会的に群れて育つことが常であるヒトや動物において、発達期のある時期に社会的接触を欠かさせたときに観察される行動障害や、脳画像検査での異常、脳の神経細胞の解剖学的異常については、いくつか報告されてきました。しかし、脳のどの神経細胞にどのような機能異常がみら

れるかといった、より詳細で具体的な知見はなく、行動障害の原因についてはわかっていませんでした。この研究では、行動障害の原因を明らかにすることを目的として、前頭前野皮質の神経細胞の機能を詳細に解析しました。

<研究手法>

最初に、母マウスに育てられた仔マウス4匹を生後21日に離乳すると同時に1匹の隔離飼育マウスと3匹の集団飼育マウスに分けて別の容器で14日間飼育しました。その後、生後35日に再度一緒に一つの容器で飼育します。生後65日に各マウスより得た神経細胞の活動を電気生理学的に記録しました(図1)。

マウスの前頭前野皮質と呼ばれる領野の深層(第V層)の錐体細胞の中から一つの神経細胞をランダムに選び、ホールセルパッチクランプ法を用いて、その活動を電氣的に記録しました。大脳皮質の主要な出力細胞である第V層の錐体細胞には二つのタイプがあることが知られています。その名称は研究者により異なっていますが、私共は「PH細胞」と「non-PH細胞」という用語を用いました。PH細胞は太い先端樹状突起を持ち、皮質以外の脳領域に神経線維を送っている細胞で、細胞膜にHCNチャネルが豊富に存在しているという特徴を持っています。一方、non-PH細胞は先端樹状突起が細く、反対側の皮質に神経線維を送っている細胞で、細胞膜にはHCNチャネルが余り存在していません。私共は、このHCNチャネルの存在の程度を電気生理学実験(電流固定法)で調べることで、non-PH細胞とPH細胞の分類を行いました(図2)。

<研究成果>

1. 隔離飼育マウスのPH細胞では興奮性が低下していた(図3)。

神経細胞は興奮し、その興奮をメッセージとして他の細胞に伝えます。興奮の頻度が高いと、強いメッセージを伝えていると考えられています。電流固定法を用いると、神経細胞の興奮を、ガラスマイクロピペットを通して、活動電位として記録することができます。また、プラスの電荷を細胞内に注入する(内向きに電流を流す)ことより、人工的に神経細胞を興奮させることができます。隔離飼育マウスのPH細胞では、内向きに電流を流すことで引き起こされる活動電位の頻度が集団飼育マウスに比べて低くなっていました。この結果は、隔離飼育マウスのPH細胞では興奮性が低下しており、強いメッセージを他の脳領域に伝える能力が損なわれていると考えられます。一方、non-PH細胞では、隔離飼育マウスと集団飼育マウスとで興奮性に差はありませんでした。

2. 隔離飼育マウスのPH細胞では興奮性のシナプス入力が増加していた(図4)。

神経細胞間では、シナプスと呼ばれる接合部を介して、メッセージが伝達されます。シナプスでは、メッセージの送り手側の細胞膜(シナプス前膜)から特定の化学物質(神経伝達物質)が放出され、その神経伝達物質(この実験の場合、グルタミン酸)はメッセージの受取り側の細胞膜(シナプス後膜)にある受容体と呼ばれるタンパク質と結合します。神経伝達物質が受容体に結合すると特定のイオン(この実験の場合、主にナトリウムイオン)が細胞内へ流入します。すなわち、メッセージの受取り側の細胞膜に電流(この実験の場合、内向き電流)が流れることとなります。電位固定法を用いると、細胞膜に流れる電流を、ガラスマイクロピペットを通して計測することができます。シナプスで生じた内向き電流は神経細胞を興奮させるように働くので、興奮性シナプス後電流(EPSC, イーピーエスシー)と呼ばれ、記録図では下向きの棘状の波形として出現します。周囲の神経細胞集団にフグ毒を作用させ、その興奮を完全に止めた状態で記録

される興奮性シナプス後電流は、微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC) と呼ばれ、シナプス結合の密度が高いと出現頻度が高くなると考えられています。隔離飼育マウスの PH 細胞では、mEPSC の出現頻度が集団飼育マウスの PH 細胞に比べて低下していました。この結果は、隔離飼育マウスの PH 細胞では興奮性のシナプス結合の密度が低下しており、神経細胞間のシナプス結合が十分に形成されていないことを示しています。また、シナプス機能のより詳しい分析の結果、隔離飼育マウスの PH 細胞の興奮性シナプスが未発達の状態にあることもわかりました。

大脳皮質の神経細胞は、興奮性のシナプス結合を介して相互にメッセージ交換を行うことにより認知や判断を可能にする情報処理を行っているため、隔離飼育マウスでは前頭前野皮質の情報処理能力が低下していることが推測されます。

3. PH 細胞の機能発達には生後 21 日から 14 日間の期間の集団飼育が決定的に重要であった。

生後 21 日から 14 日間の期間が発達の異常を生ずるのに重要であるかを確かめるために、隔離飼育の時期をずらして、生後 35 日から 14 日間の隔離飼育を行って上記と同様の電気生理学的比較を行いました。その結果、隔離飼育の時期をずらすと上記 (1, 2) でみられた異常が観察されなくなりました。

4. 隔離飼育による PH 細胞の機能低下は前頭前野皮質だけに観察された。

生後 21 日から 14 日間の隔離飼育によって前頭前野皮質以外の皮質領野に異常が出ないかどうかを調べるために、身体感覚入力を処理する体性感覚野と呼ばれる領野で同様の電気生理学的比較を行いました。しかし、隔離飼育の影響は体性感覚野では認められませんでした。この結果から、隔離飼育が高次の認知機能を選択的に損なうことが示唆されます。

<今後の展望>

今回、異常が見られた前頭前野皮質の PH 細胞は、社会的経験を受けて成熟し、高次の脳機能を発達させるのに非常に重要な神経細胞であることが示唆されました。逆にいくつかの精神疾患において、このタイプの神経細胞の機能の低下が病態の基盤となっている可能性が考えられます。このタイプの神経細胞の機能を改善させる薬を見出すことができれば、自閉症スペクトラム障害などの精神疾患における精神症状の改善につなげることができるのではないかと考えます。

<用語説明>

前頭前野皮質 (prefrontal cortex) : 大脳皮質の前頭葉の前部のある連合野。認知・遂行などの高次の精神機能に関わっている。マウスでは、前頭部の内側に位置する皮質領野である。

錐体細胞 (pyramidal cell) : 大脳皮質の神経細胞であり、その軸索 (神経線維) の終末から他の細胞を興奮させる作用のあるグルタミン酸を放出する。細胞体の形が円錐状であることから、錐体細胞と呼ばれている。細胞体の頂部からは、先端樹状突起と呼ばれる 1 本の突起が表層に向かって伸びている。細胞体の側方や下方には基底樹状突起と呼ばれる数本の突起が伸びている。

ホールセルパッチクランプ (whole-cell patch clamp) 法 : 先端を細くした (2-4 μm) ガラスマイクロピペットを通して神経細胞内と電子回路を電氣的に接続することで、神経細胞の活動を観測する方法。電位固定法では、細胞内電位を一定に保つことによって、細胞膜を流れる電流を記録することができる。また電流固定法では、ガラスマイクロピペットを通して細胞内に流れる電流を一定に保ちながら、細胞内電位を記録することができる。

HCN(hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated)チャンネル：細胞膜にあるタンパク質で、細胞内電位がマイナス方向に変化すると活性化（開口）し、陽イオンを通すようになるイオンチャンネルである。心臓では、筋細胞の興奮を周期的・自動的に起こさせる働きをする。脳の神経細胞では、興奮性の調節にも関与している。HCNチャンネルの開口による電流は、h電流と呼ばれている。この研究で用いた「PH細胞」という用語は、“**prominent h-current**”（顕著なh電流）に由来する。

<論文名>

『**Cerebral Cortex**』誌 2017年2月3日付 オンライン版掲載

Social Isolation During the Critical Period Reduces Synaptic and Intrinsic Excitability of a Subtype of Pyramidal Cell in Mouse Prefrontal Cortex

（臨界期の社会的隔離はマウス前頭前野皮質の錐体細胞のサブタイプのシナプスや細胞の興奮性を減少させる）

<論文著者>

山室 和彦¹、芳野 浩樹^{1,*}、小川 陽一²、牧之段 学¹、鳥塚 通弘¹、山下 勝幸³、Gabriel Corfas⁴、岸本 年史¹

1：奈良県立医科大学 精神医学講座

2：奈良県立医科大学 生理学第一講座

3：国際医療福祉大学 基礎医学研究センター

4：米国ミシガン大学 Kresge 聴覚研究所 耳鼻咽喉・頭頸部外科

*：責任著者

<問い合わせ先>

講師 芳野 浩樹 （よしの ひろき）

奈良県立医科大学 精神医学講座

電話：0744-23-9964 (直通)

FAX：0744-22-3854

E-mail: psyosino@naramed-u.ac.jp

<研究助成>

本研究は、文部科学省 科学研究費助成事業 基盤研究（C）及び、挑戦的萌芽研究の助成を受けて行われました。

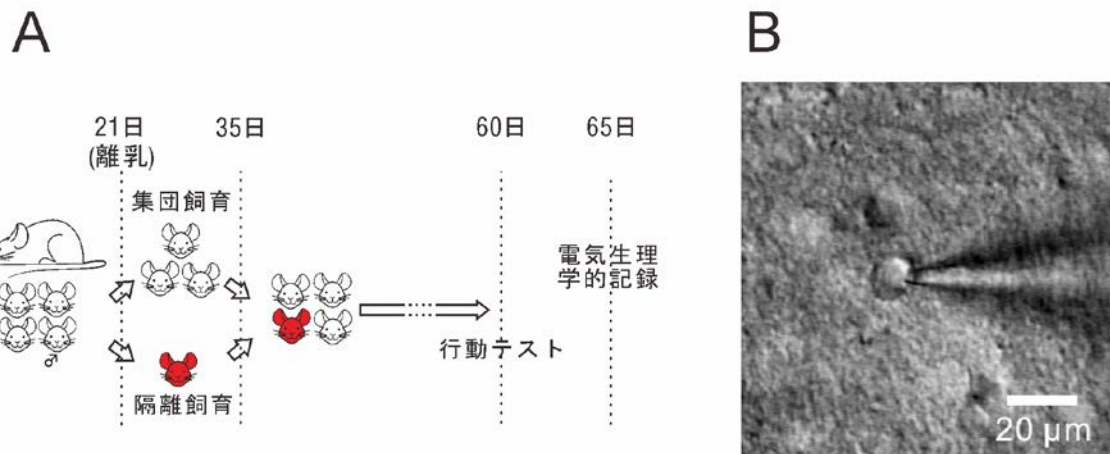


図1 実験方法

- (A) 実験スケジュール。マウスは一般に出生後21日で離乳される。離乳後、隔離飼育マウス（赤色）は兄弟マウスと離され一匹だけで2週間飼育された。三匹の兄弟マウス（集団飼育マウス）は、一つの容器で一緒に飼育された。生後35日以降は、隔離飼育マウスも集団飼育マウスと一緒にされ、一つの容器で飼育された。電気生理学的記録は、成体となった（65日）後に行われた。
- (B) 前頭前野皮質第V層の錐体細胞の顕微鏡画像。右側のガラスマイクロピペットを通して、細胞内が記録用電子回路と電氣的に接続されている。

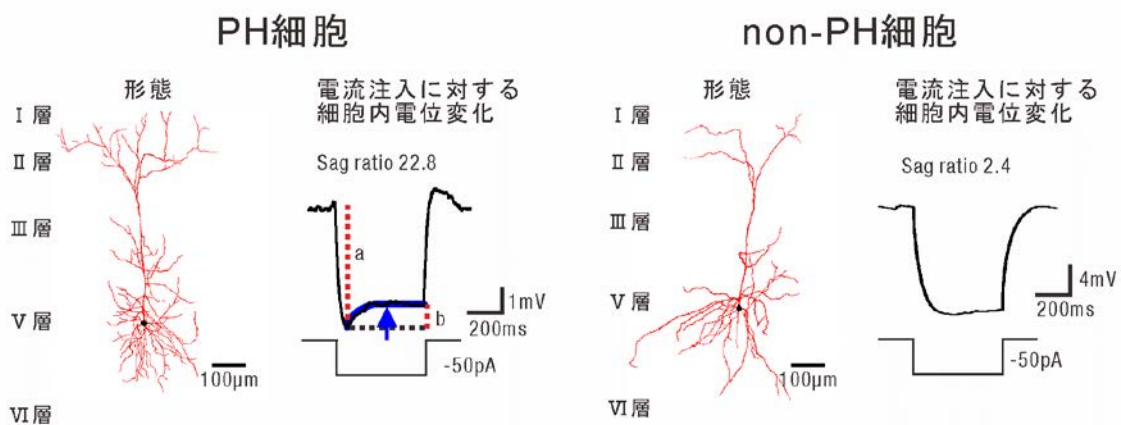


図2 二つのタイプの第V層錐体細胞。

どちらのタイプも細胞体（黒色）は第V層に位置し、側方、下方および上方に樹状突起（赤色）を伸ばしている。PH細胞の先端樹状突起での分枝がnon-PH細胞よりも多いという傾向がある。

PH細胞にマイナスの電流を注入すると、細胞内電位は、すぐにマイナス方向に変化するが、その後少しプラス方向に戻る（青矢印）。これは、HCNチャネルが活性化することによる内向きの電流（h電流）が生じるからである。一方、non-PH細胞ではこのような現象がほとんど見られない。

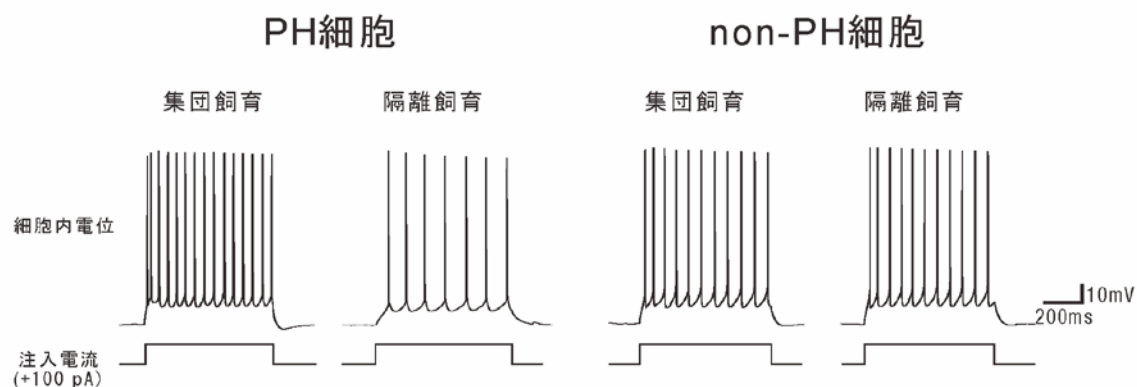


図3 隔離飼育マウスのPH細胞では興奮性が低下していた。細胞内への電流注入 (+100 μ A) に対する反応性を比較すると、隔離飼育マウスのPH細胞では、引き起こされる興奮（活動電位）の数が集団飼育マウスのPH細胞よりも少なかった。Non-PH細胞では、隔離飼育マウスと集団飼育マウスとの間の差は認められなかった。

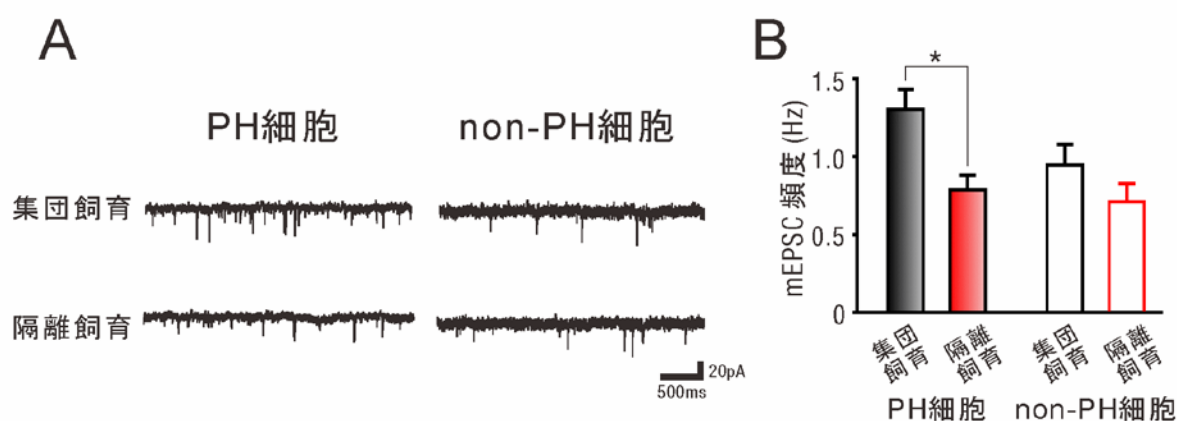


図4 隔離飼育マウスのPH細胞では興奮性のシナプス入力が増少していた。
 (A) 微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC) の記録図。下向きの棘状の振れが個々のmEPSCを表す。その振幅は、10-30 pA (ピコアンペア) のものが多い。
 (B) mEPSCの1秒間あたりの出現頻度の比較。隔離飼育マウスのPH細胞では、mEPSCの出現頻度が集団飼育マウスのPH細胞に比べて低下していた。Non-PH細胞では、隔離飼育マウスと集団飼育マウスとの間にmEPSCの出現頻度の差はなかった。*印は、統計学的検定の結果、差が有意であったことを示す。