

■受領No.1413

精神神経疾患の発症に関わる小脳神経回路基盤

代表研究者

堤 新一郎

理化学研究所 脳神経科学研究センター 多階層精神疾患研究チーム 副チームリーダー



Cerebellar circuit basis for psychiatric pathogenesis

Principal Researcher

Shinichiro Tsutsumi,

RIKEN Center for Brain Science Laboratory for Multi-scale Biological Psychiatry Deputy team leader

自閉症や統合失調症などの精神神経疾患は、病態の中核が明らかとなっておらず、有効な治療法の創出が阻まれている。特に自閉症においてリスク連関が高く、高次脳領域と密接な連絡を持つ小脳外側部の役割と、精神神経疾患の病態との関連の解明は重要課題であるが、依然として不明な点が多い。本研究では、2光子イメージングや感覚運動連関タスクなどの新技術を疾患モデルマウスに適用し、自閉症をはじめとする精神神経疾患の小脳における神経回路基盤を明らかにすることを目標とした。

Pathological neural circuit basis for psychiatric disorders such as autism spectrum disorders and schizophrenia remains elusive, hindering the generation of effective treatments. The role of the lateral part of the cerebellum, interconnecting with higher order brain areas and its lesion being the second highest risk for autism spectrum disorders, in sensorimotor function and psychiatric pathogenesis is largely unknown. This research project aims to apply the cutting-edge neuroscience techniques such as two-photon imaging and sensorimotor association task in psychiatric model mice to elucidate the cerebellar circuit basis for the psychiatric pathogenesis.

1. 研究内容

1.1 研究目的

自閉症や統合失調症などの精神神経疾患は、若年での罹患率が高く(1-2%)、社会的影響が大きい一方、病態の中核が明らかとなっておらず、有効な治療法の創出が阻まれている。これらの疾患は遺伝的素因の影響を受けるが、特に自閉症においては小脳の先天的な低形成が発症に関連する二番目の危険因子であることが知られている(Wang, *Neuron* (2014))。小脳は一般的に運動機能や運動学習に関与すると考えられているが、高次脳領域と密接な連絡を持つ小脳外側部は、高度な感覚処理と、それに基づく時間的に正確な行動開始に重

要であることが示唆されている(**Tsutsumi** et al., *eLife* (2019); *Cell Rep* (2020))。近年、小脳特異的な遺伝子改変に基づいた自閉症モデルマウス(Tsc1+/-)の解析で、小脳外側部(Crus I領域)のプルキンエ細胞活動を操作することで社会行動を改善できることが報告された(Stoodley et al., *Nat Neurosci* (2017); Kelly et al., *Nat Neurosci* (2020))。従って、小脳外側部が高次脳機能に果たす役割と、その精神神経疾患の病態との関連の解明は重要課題であるが、感覚処理と、それに基づく適切なタイミングでの行動を支える小脳の局所神経回路基盤と、その学習への寄与、さらにはその回路異常と病態との関係は依然として不明で

ある。研究代表者はこれまで、小脳の感覚運動連関における役割を調べるため、感覚運動連関タスク中のマウス小脳の二光子イメージング手法を開発・発展させてきた(図1)。本研究では、これらの新技術を疾患モデルマウスに適用し、自閉症をはじめとする精神神経疾患の小脳における神経回路基盤を明らかにすることを目標とした。以下に詳細な目的を述べる。

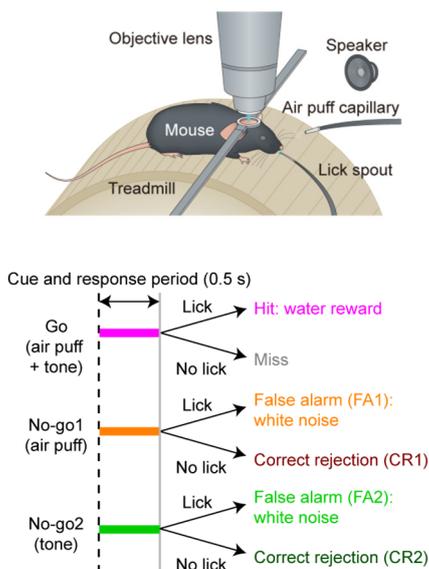


図1 多感覚運動連関タスクと小脳外側部のイメージング

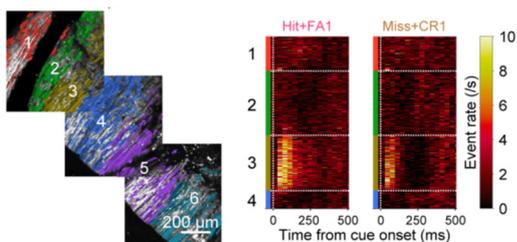


図2 小脳縞状構造における登上線維入力同期性の上昇

第一の目的は、疾患モデルマウスの感覚運動連関の異常を定量化することである。小脳外側部の機能と考えられている、感覚処理に基づく運動開始の制御機構について調べるため、研究代表者は多感覚運動連関タスクを開発した(Tsutsumi et al., *Cell Rep* (2020))。このタスクでは、0.5秒以内に多感覚刺激(体性感覚+音刺激)と単感覚刺激(体性感覚もしくは音刺激)を弁別するもので、多感

覚刺激に対して舌舐め運動を開始することで報酬が獲得できる(Hit)が、単感覚刺激に対して舌舐め運動を開始すると罰が与えられる(False alarm (FA))(図1)。多感覚刺激に反応しない場合(Miss)や、単感覚刺激に対して運動を我慢できた場合(Correct rejection (CR))は報酬も罰も与えられない(図1)。従って、このタスクにおいて、マウスは多感覚刺激と単感覚刺激を素早く弁別し、適切に行動を開始しなければならないため、小脳外側部の機能を最大限に引き出すことが期待される。これまでの研究により、正常マウスは2週間以内に多感覚刺激と舌舐め運動を連関させ、素早く運動を開始すると同時に、単感覚刺激に対しては60%程度舌舐め運動を我慢することが可能になった。さらに、特に多感覚刺激に対して、行動の開始タイミングが早く正確になることが分かっている。本研究では、自閉症モデルマウス(patDp/+)において、タスクの学習の様式や速さ、最終的なパフォーマンスを調べることで、自閉症における行動異常を定量することを目的とした。

第二の目的は、疾患モデルマウスの小脳神経回路活動の異常を明らかにすることである。研究代表者はこれまでの研究で、多感覚運動連関タスク中のマウス小脳外側部 Crus I 領域のプルキンエ細胞の二光子カルシウムイメージングを行った。プルキンエ細胞樹状突起における大きなカルシウム上昇は登上線維入力によることが知られている。Crus I の広い領域をイメージングすることで、プルキンエ細胞への登上線維入力の集団活動を記録できる(図2左)。登上線維入力は矢状方向の縞状構造内で同期しており、一つおきの縞状構造(図2, 縞状構造1, 3, 5)が感覚刺激に反応することが分かった。さらに、感覚情報が運動に変換される際(図1, Hit, FA1: 空気圧刺激+舌舐め)に、感覚刺激のみの場合(図1, Miss, CR1: 空気圧刺激のみ)と比べ、縞状構造内での登上線維入力同期性が上昇することを明らかにした(図2右)。さらに、同期した登上線維入力は学習により獲得さ

れ、それが感覚刺激に基づいた運動開始と関連していることを明らかにした (Tsutsumi et al., *Cell Rep* (2020))。本研究では、自閉症モデルマウスにおいて、登上線維入力の機能構造や同期性、さらには感覚運動連関による同期性の上昇やその獲得様式がどのように異なるかを調べることを目的とした。

1.2 研究手法と結果

1.2.1 疾患モデルマウスにおける感覚運動連関の異常の定量化

自閉症モデルマウス (patDp/+) に頭部金具を取り付け、頭部を固定した状態で多感覚運動連関タスクを覚えさせた (図 1)。2-3 日の水分摂取制限を行った上記のマウスに、感覚刺激として、ヒゲ領域への空気圧刺激 (5-6 psi) と、音刺激 (3,300 Hz、ともに 0.5 秒) を使用し、二感覚同時刺激の提示中に舌舐め運動を開始した場合、サッカリン水 2 μ L を報酬として与えた。単感覚刺激 (空気圧刺激または音刺激) の提示中に舌舐め運動を開始した場合、白色ノイズ (90 dB、0.5 秒) を罰として与えた。それぞれのマウスを 1 日 1 回 300-600 トライアル、2-3 週間トレーニングさせ、多感覚刺激と単感覚刺激の弁別の度合い・学習の速さ、多感覚刺激に対する舌舐め運動開始の早さとタイミングの正確性を比較した。patDp/+マウス (PD001, PD002) では正常マウス (WT005) に比して、多感覚刺激に対してリック運動を行う感覚運動連関の学習 (Association phase) が遅れた一方、その後の単感覚刺激に対する反応抑制の学習 (Rejection phase) には違いがなかった (図 3 上)。また、多感覚刺激に対するリック運動開始のタイミングは正常マウスに比べて遅く、タイミングのバラつき (lick latency residuals) も大きいことが観察された (図 3 下)。

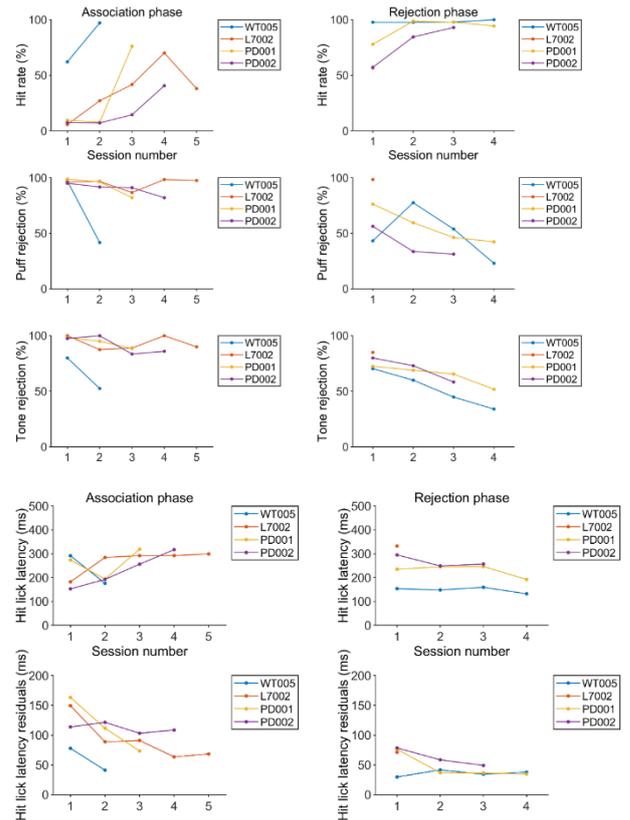


図3 自閉症モデルマウスの感覚運動連関学習および運動タイミングの障害

1.2.2 疾患モデルマウスのタスク中の小脳神経回路活動のカルシウムイメージング

自閉症モデルマウス (patDp/+) の左小脳半球 Crus I に、遺伝的にコードされたカルシウムインジケータ (jGCaMP7) をウイルスベクター (adeno-associated virus: AAV) を用いて導入した。次に、多感覚運動連関タスク中の上記マウス小脳において 2 光子カルシウムイメージングを行った。小脳プルキンエ細胞の樹状突起における大きなカルシウム上昇は下オリブ核からの登上線維入力に特異的であることが知られている。研究代表者がこれまでに明らかにした登上線維入力の縞状の同期構造と、一つおきの縞状構造に特異的な感覚応答や、感覚運動連関に特異的な登上線維入力の同期性の上昇 (図 2) が、自閉症モデルマウスと正常マウスでどのように異なるかを検証した。patDp/+マウス小脳外側部 Crus I では、登上線維入力の同期で定義される縞状構造が一部崩れ、極

端に細いバンドが見られた(図4上)。さらに、タスク下での登上線維入力頻度は正常マウスに比べて少ないか、あったとしても遅く、時間的なバラつきが大きかった(図4下)。

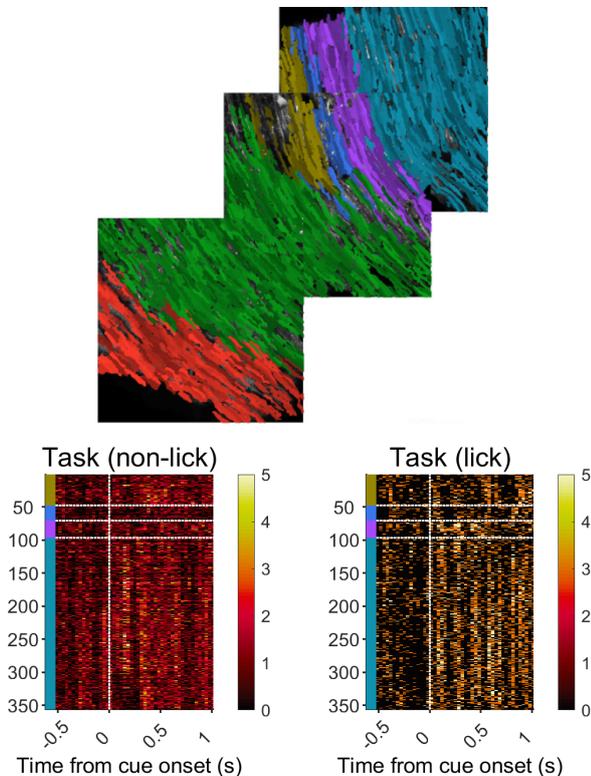


図4 自閉症モデルマウスの小脳同期構造の乱れとタスク関連集団活動の異常

以上の結果から、自閉症モデルマウス(patDp/+)において、小脳神経回路の同期構造とその機能に異常があり、それがこのモデルマウスにおける運動タイミングの遅れと感覚運動連関学習速度の低下に関わっている可能性が示唆された。今後、より広域なイメージングで小脳半球の内外側間での同期様式の違いを調べていく必要がある。また、他の自閉症モデルマウスでもこの結果が再現されるかを検証する必要がある。

2. 発表(研究成果の発表)

国内外の学会誌、学会講演会等における発表があれば5件程度記載。

記載内容：氏名、題目、誌名、巻、号、頁(年次)、学会名(場所、年次)

(1) 堤新一郎

小脳研究の未来 III.システム・運動制御 小脳の縞状構造と高次機能

生体の科学 72 (1) (2021年)

(2) Shinichiro Tsutsumi, Oscar Chadney, Tin-Long Yiu, Lavinia Farragiana, Beau Maxime, and Michael Häusser

Cerebellar Purkinje cell activity determines the latency and precision of sensory-driven motor initiation

50th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (オンラインポスター発表、2021年1月14日)

(3) Shinichiro Tsutsumi, Oscar Chadney, Tin-Long Yiu, Edgar Bäuml, Lavinia Farragiana, Maxime Beau, Michael Häusser

Purkinje Cell Activity Determines the Timing of Sensory-Evoked Motor Initiation.

Cell Reports 33 (12) 108537-108537 (2020年)

(4) Shinichiro Tsutsumi, Oscar Chadney, Tin-Long Yiu, Lavinia Farragiana, Beau Maxime, and Michael Häusser

Cerebellar circuit basis for rapid sensorimotor associations

第43回日本神経科学大会(オンライン口頭発表、2020年7月31日)