

日本神経化学会奨励賞受賞者研究紹介

幼少期逆境体験による前頭前野–視床室傍核回路への影響と 社会性行動への関与

山室 和彦

奈良県立医科大学 精神医学講座

A prefrontal–paraventricular thalamus circuit requires juvenile social experience to regulate adult sociability

Kazuhiko Yamamuro

Department of Psychiatry, Nara Medical University School of Medicine

抄 録

幼少期の社会的孤立は成人期の社会性行動を低下させるが、その神経回路のメカニズムの詳細は不明のままである。本研究では離乳直後の2週間の社会的隔離により、新規マウス曝露時に視床下部後部に投射する内側前頭前野 (mPFC→pPVT) 錐体細胞が活性化しないことを明らかにした。それに基づき、mPFC→pPVT 神経回路の活動を光遺伝学的手法にて抑制すると社会性行動障害がみられた。また、幼若期隔離によって、成体期で mPFC→pPVT 投射錐体細胞の細胞興奮性が低下し、ソマトスタチン発現低閾値スパイクインターニューロンからの抑制性入力が増加するという社会性行動障害を引き起こす神経回路メカニズムを明らかにした。さらに、mPFC→pPVT 神経回路を光遺伝学的に活性化することで、幼若期隔離による社会性行動障害を改善できることが示唆された。本研究では、社会性行動に必要な mPFC→pPVT 投射錐体細胞の細胞興奮性およびその関連する抑制性回路が幼若期の社会的経験によって大きく影響を受けることを明らかにした。

Abstract

Juvenile social isolation reduces sociability in adulthood, but the underlying neural circuit mechanisms are poorly understood. We found that, in male mice, 2 weeks of social isolation immediately following weaning leads to a failure to activate medial prefrontal cortex neurons projecting to the posterior paraventricular thalamus (mPFC→pPVT) during social exposure in adulthood. Chemogenetic or optogenetic suppression of mPFC→pPVT activity in adulthood was sufficient to induce sociability deficits without affecting anxiety-related behaviors or preference toward rewarding food. Juvenile isolation led to both reduced excitability of mPFC→pPVT neurons and increased inhibitory input drive from low-threshold-spiking somatostatin interneurons in adulthood, suggesting a circuit mechanism underlying sociability deficits. Chemogenetic or optogenetic stimulation of mPFC→pPVT neurons in adulthood could rescue the sociability deficits caused by juvenile isolation. Our study identifies a pair of specific medial prefrontal cortex excitatory and inhibitory neuron populations required for sociability that are profoundly affected by juvenile social experience.

Key words: sociability, social isolation, medial prefrontal cortex, posterior paraventricular nucleus thalamus, low-threshold-spiking somatostatin

社会的孤独がメンタルヘルスへの深刻な脅威として注目されるようになってきている¹⁻³⁾。特に幼少期の社会的孤立は、ヒトだけでなく哺乳類の成体期の社会性行動に悪影響を与える⁴⁻⁷⁾。幼少期に里親に預けられて社会的に恵まれない施設の養育環境から離れた子どもは、里親に預けられたことがない子どもや、後の年齢で里親に預けられた子どもと比較して、機能的転帰が不良であると報告されている^{6,7)}。マウスの離乳直後2週間(生後21~35日齢)のみ1匹飼いをする幼若期隔離マウスモデル(jSI: juvenile social isolation)は、成体期での社会性行動の低下につながる⁵⁾。これは、幼若期の社会的経験が成体期の社会性行動の確立にとって敏感な時期であることを示唆している。また、ヒトと齧歯動物での多くの研究は社会性行動を調節する脳ネットワークの重要な中枢として内側前頭前野(mPFC: medial prefrontal cortex)が広く知られている⁸⁾。マウスの最近の研究ではmPFCの皮質下に投射する深層の錐体細胞が幼若期隔離に対して脆弱であり、成体期での錐体細胞の細胞興奮性とシナプス駆動を低下させることが報告されているが⁹⁾、皮質下投射部位は不明のままであった。そのため、社会性行動を構築するために幼若期の社会的経験を必要とするmPFC→皮質下領域の神経回路の特定を試みた。

mPFC→pPVT 神経回路は社会性行動に重要

mPFCからの投射を受け取るどの皮質下領域が社会性行動に重要であるかを検証するために、まず初期遺伝子c-Fosを用いて全脳マッピングを行った。後部視床室傍核(pPVT: posterior paraventricular nucleus thalamus)が、最も強く反応したのが新規マウスへの暴露、次に新規オブジェクトへの暴露、続いて暴露なしの順であった。次にpPVTに投射するmPFC深層の錐体細胞は、グループ飼育(GH: group housing)マウスでは新規

オブジェクトへの曝露と比較して新規マウスへの曝露によって活性化されたが、一方でjSIマウスではその活性化がみられなかった。さらにファイバーフォトメトリーを用いて、社会性行動中のmPFC→pPVT投射錐体細胞のリアルタイム活動を検証した。GCaMP6fを発現するmPFC→pPVT投射錐体細胞は、GHマウスに新規オブジェクトを暴露するよりも、新規マウスを暴露した方がより強力に活性化されたが、jSIマウスではその活性がみられなかった。これらの結果から、社会性行動に関わるmPFC→pPVT神経回路が適切に構築されるためには、幼若期の社会的経験が必要であることが示唆された。mPFC→PVT投射錐体細胞の活動が社会性に必要であることをさらに検証するため、pPVTのmPFC投射末端の活動を光遺伝学的手法により抑制を行った。CaMKIIプロモーター下でeNpHR3.0を発現するAAVウイルスをmPFCに注入し、pPVT上に埋め込まれた黄色の発光ダイオード(LED)をワイヤレスで照射することにより、mPFC→pPVT神経回路を選択的に抑制した。この操作は、pPVTの細胞の活動を部分的に低下させるが、不安関連または運動行動に影響を与えることなく社会性行動を低下させた。一方でmCherryを発現する対照マウスでは行動への影響はなかった。重要なことに、この操作は自然の食物嗜好に影響を与えなかったことから、社会性行動の低下は自然の報酬関連行動の結果ではないことが示唆されている。つまり、これらの結果はmPFC→pPVT投射錐体細胞と社会性行動との間の因果関係を示しているといえる。

mPFC→pPVT神経回路の活性化がGHマウスの社会性を高めるかについて光遺伝学的手法と3chamberを用いて検証した。CaMKIIプロモーター下でチャンネルロドプシン(ChR2: channel rhodopsin 2)を発現するAAVウイルスをmPFCに注入し、pPVT上に埋め込まれた青色LEDをワイヤレスで照射することにより、mPFC→pPVT神経

回路を選択的に活性化した。3chamberの片方のチャンパーには新規マウスを、もう片方には新規オブジェクトを入れ、それらの周囲でのみ活性化を行ったところ、新規マウス周囲の活性化は新規マウスへの、新規オブジェクト周囲の活性化は新規オブジェクトへの接触時間を増加させた。さらに、3chamberでいずれのチャンパーも空にした状態で、片方のチャンパーでのみ活性化を行ったところ、活性化を行ったチャンパーでの探索時間が増加した。この効果は、光刺激の終了後すぐに消えた。これらの結果から、mPFC→pPVT神経回路の光遺伝学的手法による活性化は、社会性を高めるために活用できる可能性が示唆された。

幼若期の隔離による mPFC→pPVT 神経回路の細胞興奮性の低下と自発的抑制性シナプス後電流の増加

次に幼若期隔離によって引き起こされた mPFC→pPVT 神経回路を細胞および回路レベルのメカニズムの解明のためホールセルパッチクランプ法を用いた。jSIマウスの mPFC→PVT 投射錐体細胞は GHマウスと比較して、細胞興奮性の低下と自発的抑制性シナプス後電流 (sIPSC: spontaneous inhibitory postsynaptic current) の頻度が有意に増加した。さらに、jSIマウスでは GHマウスと比較して自発性興奮性シナプス後電流 (sEPSC: spontaneous excitatory postsynaptic current) の頻度が減少する傾向がみられた。これらの変化は、GHマウスと比較して jSIマウスでの mPFC→PVT 投射錐体細胞における sEPSC/sIPSC 頻度の比 (E/I ratio) の有意な減少につながる事が明らかになった。注目すべきことに、生後35日齢 (生後21日から2週間隔離飼育をした最終日) では幼若期隔離の影響はみられなかった。つまり、幼若期隔離の効果は成体期になった初めて観察されるといえる。幼若期隔離の影響が mPFC→PVT 投射錐体細胞において特異的であることを検証するため、側坐核および対側 mPFC への投射錐体細胞を同様の方法を用いて検証を行ったが、細胞興奮性および E/I ratio に影響はみられなかった。これらの結果から、

mPFC→pPVT 投射錐体細胞および関連する抑制性回路が幼若期隔離に対して特に脆弱であることが示唆される。

mPFC→pPVT 神経回路の機能的障害を検証するために、ChR2を発現する AAV ウイルスを mPFC に注入する光遺伝学的手法を用いた活性化と、pPVT 神経細胞からのホールセルパッチクランプ法を組み合わせることを行った。GH および jSI マウスでも pPVT 神経細胞の大部分は誘発反応を示した。一方で、GH マウスと比較して jSI マウスでは、シナプスの放出機構 (PPR: paired pulse inhibition) に違いはみられなかった。一方で、幼若期隔離が pPVT 神経細胞へ誘発された興奮性シナプス伝達の持続的な減少を引き起こすことが示唆された。また、mPFC→pPVT 投射錐体細胞とは対照的に、pPVT 神経細胞自体は幼若期隔離による影響はみられなかった。

mPFC におけるソマトスタチン発現低閾値スパイク (LTS-SST: low-threshold-spiking somatostatin) インターニューロンのサブグループは、GH マウスと比較して jSI マウスの細胞興奮性が増加し、このインターニューロンの eDREADD (excitatory designer receptors exclusively activated by designer drugs) による化学遺伝学的手法を用いた選択的な活性化は GH マウスの社会性行動を低下させた。これらの結果は、幼若期隔離が LTS-SST インターニューロンの活動を増加させ、mPFC→pPVT 投射錐体細胞の活動の低下と社会性行動の低下に寄与することが示唆される。

幼若期隔離マウスにおける mPFC→pPVT 神経回路の活性化による社会性行動障害の改善

次に、mPFC→pPVT 神経回路の活性化が jSI マウスの社会性行動を改善させるかについて光遺伝学的手法と 3chamber を用いて検証した。CaMKII プロモーター下で ChR2 を発現する AAV ウイルスを mPFC に注入し、pPVT 上に埋め込まれた青色 LED をワイヤレスで照射することにより、mPFC→pPVT 神経回路を選択的に活性化した。結果として、不安関連または運動行動に影響を与え

ることなく、jSI マウスでみられる社会性行動の低下を改善させた。一方で、mCherry を発現するコントロール jSI マウスではいずれのタスクにおいても影響がみられなかった。

最後に mPFC→pPVT 神経回路を選択的で持続的な活性化が jSI マウスの社会性行動の持続的な改善につながるのかを検証した。具体的には、3chamber の片方のチャンパーには新規マウスを、もう片方には新規オブジェクトを入れ、連続2日間、新規マウスの周辺でのみ同回路を活性化させ翌日は光刺激なしで同様の実験を行ったところ、社会性行動の改善が持続した。これらの結果から、光遺伝学的手法による社会性行動の改善は一過性のみではなく、連続で刺激することにより持続することが明らかになった。

今回の研究では、mPFC→pPVT 神経回路は幼若期の社会的経験によって影響を受けること、成体期での社会性行動に必要であることがわかった。mPFC→pPVT 神経回路は幼若期の社会的経験による影響は生後35日齢（隔離期間の最終日）では観察されず、成体期になって初めてみられるということは生後35日齢からの環境によって引き起こされた可能性が示唆される。幼若期の行動の可塑性には臨界期がある可能性があり、一度閉じられると社会的戦略を調整することができないかもしれない。PVT が、側坐核、分界条床核、および扁桃体中央部を含むさまざまな報酬関連領域へ投射することを考えると^{10, 11)}、mPFC→pPVT 神経回路は脳ネットワークのトップダウン制御にとって重要な役割を演じている可能性がある。SST インターニューロンの多様なサブタイプの中で、LTS-SST 細胞は¹²⁾、ゆっくりとしたリズムカルなバースト活動とリバウンド励起を通じて、mPFC から皮質下に投射する深層錐体細胞の長期同期発火を開始および維持に関与していることが報告されている¹³⁾。したがって、LTS-SST 細胞は、mPFC→pPVT ニューロンをリズムカルに活性化し、mPFC-pPVT の同期を促進することにより、社会性行動において極めて重要な役割を果たしている可能性がある。

今回の研究 (図1) によって mPFC の社会性行動

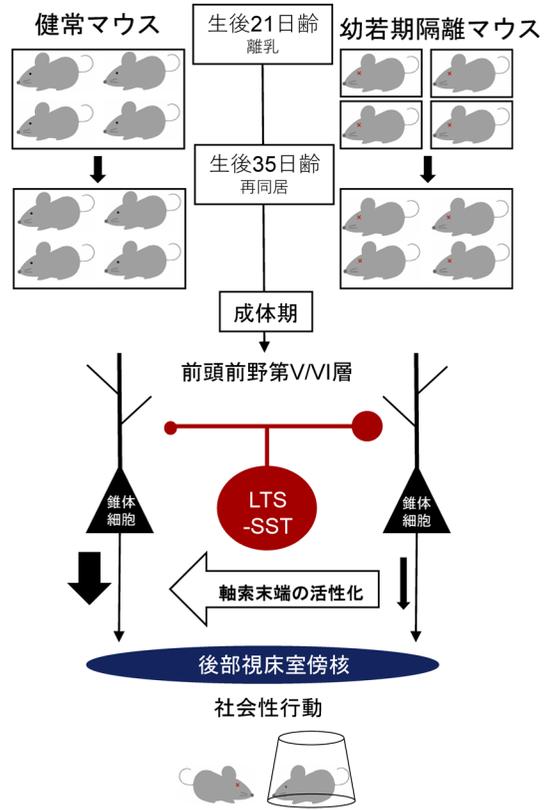


図1 mPFC-pPVT 神経回路と社会性行動

に関連するネットワークの複雑さに新たな神経回路が追加されることになるが、マウスの社会性行動中の mPFC の錐体細胞の多様な活性化パターンを示す最近の研究と一致している¹⁴⁻¹⁷⁾。mPFC から外側手綱核への投射などは、その神経回路が活性化された時に社会性行動が低下するが¹⁸⁻²¹⁾、mPFC→PVT 投射錐体細胞の活性化と同様に、小脳からと腹側被蓋野への投射は、同回路の活性化により社会性行動が高まることが報告されている²²⁾。mPFC 投射錐体細胞のさまざまな集団が如何に社会的行動を制御し、さらには皮質下ネットワークにどのように影響するかを明らかにするためにはさらなる研究が必要である。

以前の遺伝的および転写学的研究は、自閉症および統合失調症の多くのリスク遺伝子が胎児および乳児の mPFC の L5/6 錐体細胞で高度に発現していることが報告されている^{23, 24)}。齧歯動物の研究では、自閉症リスク遺伝子をノックアウトしたマ

ウスモデルで mPFC の皮質下に投射する L5/6 錐体細胞の機能が障害されることも報告されている²⁰⁾。mPFC→pPVT 投射錐体細胞および関連する LTS-SST インターニューロンは、経験依存的で、社会環境にも敏感であるため、経頭蓋磁気刺激および経頭蓋直流などの非侵襲的技術を使用することで精神疾患における社会性行動障害の有望な治療ターゲットとなることが期待される。

倫理的配慮

本論文に記載した筆者らの研究に関して全て倫理的配慮を行っている。

利益相反

開示すべき利益相反は存在しない。

文 献

- 1) Cacioppo JT, Cacioppo S. The growing problem of loneliness. *Lancet*, 391(10119), 426 (2018).
- 2) Miller G. Social neuroscience. Why loneliness is hazardous to your health. *Science*, 331(6014), 138–140 (2011).
- 3) Pitman A, Mann F, Johnson S. Advancing our understanding of loneliness and mental health problems in young people. *Lancet Psychiatry*, 5(12), 955–956 (2018).
- 4) Freedman DG, King JA, Elliot O. Critical period in the social development of dogs. *Science*, 133(3457), 1016–1017 (1961).
- 5) Makinodan M, Rosen KM, Ito S, Corfas G. A critical period for social experience-dependent oligodendrocyte maturation and myelination. *Science*, 337(6100), 1357–1360 (2012).
- 6) Nelson CA 3rd, Zeanah CH, Fox NA, Marshall P, Smyke AT, Guthrie D. Cognitive recovery in socially deprived young children: the Bucharest Early Intervention Project. *Science*, 318(5858), 1937–1940 (2007).
- 7) Almas AN, Degnan KA, Nelson CA, Zeanah CH, Fox NA. IQ at age 12 following a history of institutional care: Findings from the Bucharest Early Intervention Project. *Dev Psychol*, 52(11), 1858–1866 (2016).
- 8) Bicks LK, Koike H, Akbarian S, Morishita H. Prefrontal cortex and social cognition in mouse and man. *Front Psychol*, 6, 1805 (2015).
- 9) Yamamuro K, Yoshino H, Ogawa Y, Makinodan M, Toritsuka M, Yamashita M, Corfas G, Kishimoto T. Social isolation during the critical period reduces synaptic and intrinsic excitability of a subtype of pyramidal cell in mouse prefrontal cortex. *Cereb Cortex*, 28(3), 998–1010 (2018).
- 10) Kirouac GJ. Placing the paraventricular nucleus of the thalamus within the brain circuits that control behavior. *Neurosci Biobehav Rev*, 56, 315–329 (2015).
- 11) Dong X, Li S, Kirouac GJ. Collateralization of projections from the paraventricular nucleus of the thalamus to the nucleus accumbens, bed nucleus of the stria terminalis, and central nucleus of the amygdala. *Brain Struct Funct*, 222(9), 3927–3943 (2017).
- 12) Nigro MJ, Hashikawa-Yamasaki Y, Rudy B. Diversity and connectivity of layer 5 somatostatin-expressing interneurons in the mouse barrel cortex. *J Neurosci*, 38(7), 1622–1633 (2018).
- 13) Hilscher MM, Leão RN, Edwards SJ, Leao KE, Kullander K. ChRNA2-martinotti cells synchronize layer 5 type A pyramidal cells via rebound excitation. *PLoS Biol*, 15(2), 2001392 (2017).
- 14) Kingsbury L, Huang S, Wang J, Gu K, Golshani P, Wu YE, Hong W. Correlated neural activity and encoding of behavior across brains of socially interacting animals. *Cell*, 178(2), 429–446 (2019).
- 15) Liang B, Zhang L, Barbera G, Fang W, Zhang J, Chen X, Chen R, Li Y, Distinct LDT, Dynamic ON. Distinct and dynamic ON and OFF neural ensembles in the prefrontal cortex code social exploration. *Neuron*, 100(3), 700–714 (2018).
- 16) Lee E, Rhim I, Lee JW, Ghim JW, Lee S, Kim E, Jung MW. Enhanced neuronal activity in the medial prefrontal cortex during social approach behavior. *J Neurosci*, 36(26), 6926–6936 (2016).
- 17) Levy DR, Tamir T, Kaufman M, Parabucki A, Weissbrod A, Schneidman E, Yizhar O. Dynamics of social representation in the mouse prefrontal cortex. *Nat Neurosci*, 22(12), 2013–2022 (2019).
- 18) Benekareddy M, Stachniak TJ, Bruns A, Knoflach F,

- Kienlin MV, Kunnecke B, Ghosh A. Identification of a corticothalamic circuit regulating socially directed behavior. *Biol Psychiatry*, 83(7), 607–617 (2018).
- 19) Murugan M, Jang HJ, Park M, Miller EM, Cox J, Taliaferro JP, Parker NF, Bhave V, Hur H, Liang Y, Nectow AR, Pillow JW, Witten IB. Combined social and spatial coding in a descending projection from the prefrontal cortex. *Cell*, 171(7), 1663–1677 (2017).
- 20) Brumback AC, Ellwood IT, Kjaerby C, Laftri J, Robinson S, Lee AT, Patel T, Nagaraj S, Davatolhagh F, Soha VS. Identifying specific prefrontal neurons that contribute to autism-associated abnormalities in physiology and social behavior. *Mol Psychiatry*, 23(10), 2078–2089 (2018).
- 21) Yizhar O, Fenno LE, Prigge M, Schneider F, Davidson TJ, O’Shea DJ, Sohal VS, Goshen I, Finkelstein J, Paz JT, Stehfest K, Fudim R, Ramakrishnan C, Huguenard JR, Hegemann P, Deisseroth K. Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature*, 477(7363), 171–178 (2011).
- 22) Carta I, Chen CH, Schott AL, Dorzan S, Khodakhah K. Cerebellar modulation of the reward circuitry and social behavior. *Science*, 363(6424), eaav0581 (2019).
- 23) Willsey AJ, Sanders SJ, Li M, Dong S, Tebenkamp AT, Muhle RA, Reilly SK, Lin L, Fertuzinhos S, Miller JA, Murtha MT, Bichsel C, Niu W, Cotney J, Ercan-Sencicek AG, Gockley J, Gupta AR, Han W, He X, Hoffman EJ, Klei L, Lei J, Liu W, Liu L, Lu C, Xu X, Zhu Y, Mane SM, Lein ES, Wei L, Noonan JP, Roeder K, Devlin B, Sestan N, State MW. Coexpression networks implicate human midfetal deep cortical projection neurons in the pathogenesis of autism. *Cell*, 155(5), 997–1007 (2013).
- 24) Bakken TE, Miller JA, Ding SL, Sunkin SM, Smith KA, Ng L, Szafer A, Dalley RA, Royall JJ, Lemon T, Shapouri S, Aiona K, Arnold J, Bennett JL, Bertagnolli D, Bickley K, Boe A, Brouner K, Butler S, Byrnes E, Caldejon S, Carey A, Cate S, Chapin M, Chen J, Dee N, Desta T, Dolbear TA, Dotson N, Ebbert A, Fulfs E, Gee G, Gilbert TL, Goldy J, Gourley L, Gregor B, Gu G, Hall J, Haradon Z, Haynor DR, Hejazinia N, Hoerder-Suabedissen A, Howard R, Jochim J, Kinnunen M, Kriedberg A, Kuan CL, Lau C, Lee CK, Lee F, Luong L, Mastan N, May R, Melchor J, Mosqueda N, Mott E, Ngo K, Nyhus J, Oldre A, Olson E, Parente J, Parker PD, Parry S, Pendergraft J, Potekhina L, Reding M, Riley ZL, Roberts T, Rogers B, Roll K, Rosen D, Sandman D, Sarreal M, Shapovalova N, Shi S, Sjoquist N, Sodt AJ, Townsend R, Velasquez L, Wagley U, Wakeman WB, White C, Bennett C, Wu J, Young R, Youngstrom BL, Wohnoutka P, Gibbs RA, Rogers J, Hohmann JG, Hawrylycz MJ, Hevner RF, Molnár Z, Phillips JW, Dang C, Jones AR, Amaral DG, Bernard A, Lein ES. A comprehensive transcriptional map of primate brain development. *Nature*, 535(7612), 367–375 (2016).