

163. 光と情報で解くレット症候群の病態とその回復制御

青木 祥

東北大学 大学院生命科学研究科 脳生命統御科学専攻 神経ネットワーク講座

Key words : レット症候群, *Mecp2* 遺伝子, 行動シーケンス, 線条体, 神経イメージング

緒言

レット症候群は自閉症スペクトラム (ASD) に含まれる神経発達障害であり、その根本的治療法は確立されていない。レット症候群における症状の多様さや個人差を考慮すると、特定の行為障害に焦点を絞った “*Domain-specific*” な責任脳回路や分子に関するレット症候群の病態解明研究は必要不可欠といえる。レット症候群には、自閉症状に加えて運動障害が所見されるが、その中でも常同行動と呼ばれる特定の行動を繰り返す障害が顕著である [1]。同じ動きを繰り返す常同行動は、一連の行動を適切に遂行できない、あるいは同じ行動を止められない行動シーケンスの制御障害と解釈される [2]。レット症候群の原因遺伝子として *Mecp2* (*Methyl-CpG-Binding protein 2*) が同定されているものの、*Mecp2* の変異が行動障害を引き起こす神経機序は不明な点が多い。今後、*Mecp2* を標的とした核酸医薬等の開発が望まれるが、そのためには同疾患の特定の行為障害を引き起こす脳回路や神経表象を解明する基礎研究が求められる。我々は最近、独自のマウス行動実験系を用いて、*Mecp2* 欠損マウスの常同行動がみられることを見出した。本研究は、この常同行動を定量できる行動実験系を用いて、ウイルスベクターを用いた神経回路選択的な機能欠損により常同行動を引き起こす神経基盤の解明と、マウスが常同行動を示す際の神経活動を可視化、記録・解析できる生体内光学的ライブイメージング [3] を適用することで、レット症候群の行動障害の病態機序の解明に繋げる基礎知見を取得することを目的とした。

方法および結果

1. 常同行動を引き起こす責任神経回路の探索

全ての実験において、C57BL/6J (オス、2ヶ月齢) を用いて行った。行動学習実験の24から48時間前に給餌制限を行い、レバーを押すと1つの報酬 (砂糖ペレット) が得られる課題 (Fixed-ratio 1 : FR1) を完了させた。その後、L L R R の順でレバーを押すことで報酬が得られる行動シーケンス課題に移行した。正常野生型マウスでは、L L R R の順で押すと行動シーケンスの獲得が2週間に渡るトレーニングにおいて観察され、R R R R という常同行動のような表現系は徐々に減衰することが示された。そこで、特定の神経回路の機能不全を引き起こすことで同様の行動表現系を示すことを実証できれば、常同行動の責任脳回路の候補を特定できると考えた。先行研究から、線条体が常同行動の神経基盤であることが推測されており [2, 4, 5]、さらに線条体の興奮性シナプス入力を有する視床束傍核 (Parafascicular nucleus : PF 核) もまた線条体の機能を支える役割を果たしていると推測されている [6]。そこで、AAVretro.Cre ウイルスを線条体に注入し、Cre 組換え酵素依存的に PF 核のなかでも線条体に投射する細胞集団の選択的な機能欠損を施した (図 1)。これらの処置を線条体の内側 (DMS) および外側 (DLS) に投射する PF 核に局限し施し、行動シーケンス学習と常同行動に及ぼす影響を観察した [7]。また、正常野生型マウスを用いた対照群に加えて、同様のウイルス注入操作は行うが、選択的欠損は生じないウイルスを注入されたウイルスコントロール群を設定した。その結果、PF→DMS および PF→DLS の欠損どちらにおいても、行動シーケンスの著しい学習障害が生じることがわかった (図 1B, C)。また、この学習障害は、R R R R の常同行動の表出が原因であることが示された (図 1D)。この知見は、PF 核

から線条体への興奮性入力への欠損 (図 1E、F) は常同行動を生み出すことを示し、常同行動の表出に因果的に関わる脳神経回路として、PF 核から線条体の連絡経路の存在が明らかになった。

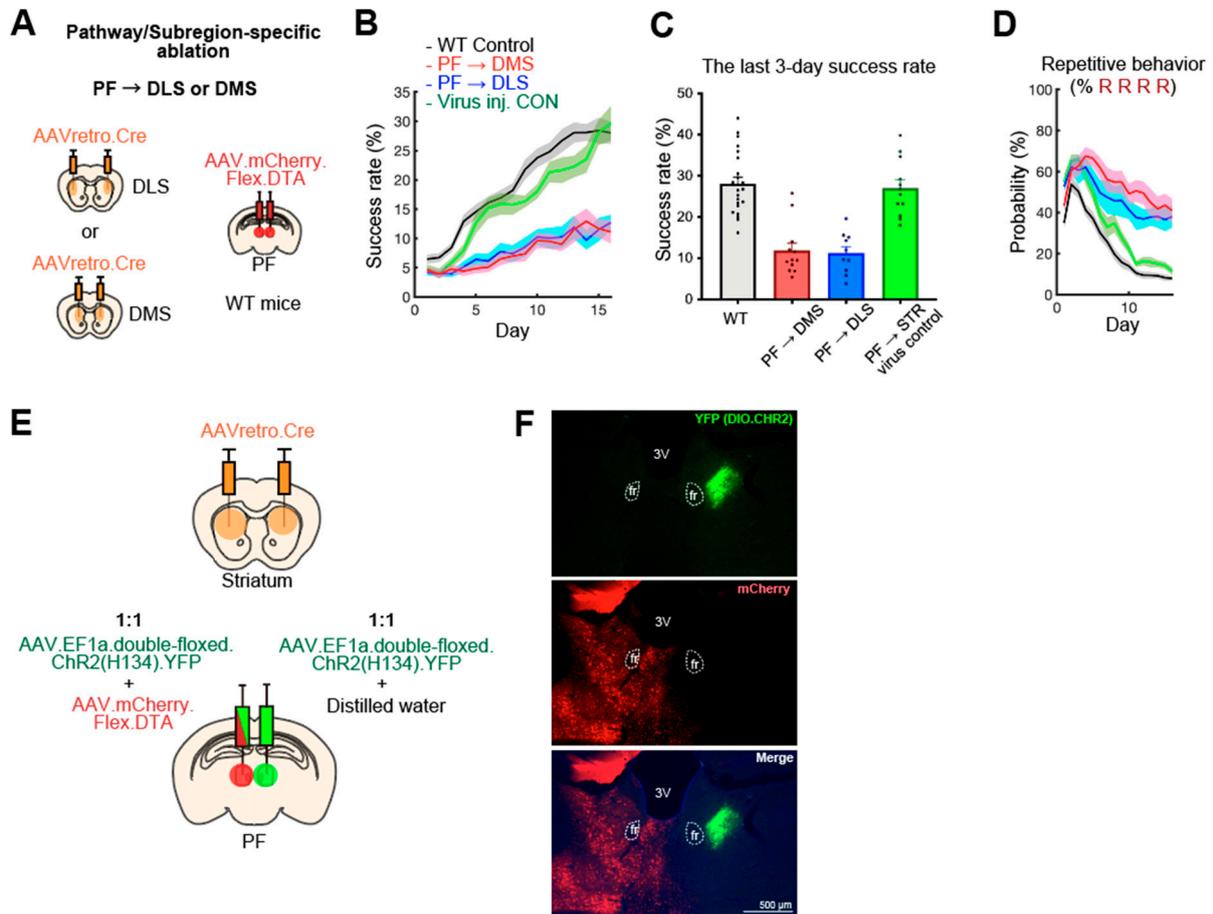


図 1. 責任脳回路の候補の特定

- A) 視床 PF 核から線条体への連絡経路の遮断。
- B) 同遮断が行動シーケンスの学習に及ぼす影響。
- C) 学習の最終成績。
- D) R R R R の常同行動の程度。
- E) 回路選択的欠損の確認のための解剖学的実験。
- F) 回路選択的な欠損を示す組織画像。スケールバー：500 μm。

2. 常同行動に関連する線条体の神経表象

上述の結果から、線条体は *Mecp2* 欠損マウスにみられるような常同行動の責任脳回路として有力であることが示された。この知見と先行研究を照らし合わせると、線条体が常同行動を生み出すような神経表象能を有している可能性が示唆される。これを検証するために、L L R R の順でレバーを押す行動シーケンス学習を覚える過程において、線条体の神経活動を光学的神経活動イメージングにより記録・解析する実験を行った。まず、学習前のマウスの線条体において神経活動を反映するカルシウムセンサー(jGCaMP8m)を発現させた。その後、微小顕微鏡 (nVista 3.0, Inscopix 社) による光学的神経活動イメージング用の GRIN レンズを留置する処置を施した (図 2A)。これらの手法を用いることで、線条体内の多数のニューロンのカルシウム動態を観察・解析できる (図 2B)。続いて、微小顕微鏡による観察実験の準備が完了したのちに、正常野生型マウスを対象とした行動シーケンス課題を実施した。興味深いことに、行動シーケンス課題の遂行時に、R R R R の常同行動のような

右レバーへの固執を正常野生型マウスは稀に示すが、その際には右レバー押しを選択的に表象するニューロン集団が線条体に観察されることがわかった (図 2C)。具体的には、これらのニューロン集団は常同動的な固執が生じる右レバー押しのみに対応し、左のレバー押しには反応しなかった。この常同行動に選択的なニューロン集団の存在は、マウスが常同行動を示す際にはこれらの細胞の働きが優位になり、行動表現系として現れてくることを示唆している。

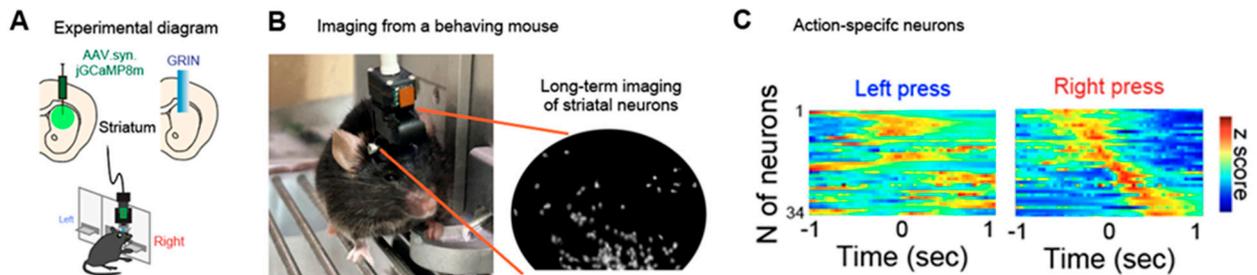


図 2. 常同行動を示す際の線条体ニューロンの神経表象

- A) 光学的な神経活動イメージング。
- B) 行動下のマウスからの線条体ニューロンの観察・記録。
- C) 右レバー押しに選択的な線条体ニューロン群。

考 察

上述の研究成果を統合すると、本研究はレット症候群の原因遺伝子 *Mecp2* 遺伝子の欠損マウスに見られる常同行動について、その責任神経回路と神経表象が現れる候補となる脳領域を同定した。まず、責任神経回路として PF 核から線条体の連絡経路の存在が明らかとなり (図 1)、この興奮性シナプス入力がかつて常同行動を引き起こす脳領域と考えられる。また、同回路の下流である線条体には、常同行動を表象するニューロン集団が現れることも発見し (図 2)、これらの細胞集団の振る舞いが常同行動の神経細胞レベルでの発現機序である可能性が示された。

今後の研究において、*Mecp2* 遺伝子の欠損マウスに対して同様の光学的神経活動イメージングを行い、実際に常同行動が増大する際には、常同行動を表象する線条体ニューロン群の数や活動増大の程度に変化が生じるのか否かについて検証する必要がある。また、近年の研究において、*Mecp2* 遺伝子の欠損マウスの部分的な機能補填 (レスキュー実験) が可能であることが示されている [8~10]。そのため、*Mecp2* 遺伝子の欠損マウスのみならず、*Mecp2* の機能がレスキューされた線条体ニューロンの神経活動を記録・解析することでレット症候群の常同行動が生じ、またそれを減弱できる神経機能操作を施した際の、神経細胞レベルでの機能変容に言及できる。その観点で本研究は、今後のレット症候群の病態研究へ貢献する神経回路基盤と神経表象について、重要な基礎的知見を提供したと考えられる。

謝 辞

本研究は、公益財団法人上原記念生命科学財団の研究奨励金により行われました。心から感謝を申し上げます。

文 献

- 1) Temudo, T., Oliveira, P., Santos, M., Dias, K., Vieira, J., Moreira, A., Calado, E., Carrilho, I., Oliveira, G., Levy, A., et al. (2007). Stereotypies in Rett syndrome: analysis of 83 patients with and without detected MECP2 mutations. *Neurology* 68, 1183–1187. doi: 10.1212/01.wnl.0000259086.34769.78.
- 2) Estes, A., Shaw, D.W.W., Sparks, B.F., Friedman, S., Giedd, J.N., Dawson, G., Bryan, M., and Dager, S.R. (2011). Basal ganglia morphometry and repetitive behavior in young children with autism spectrum disorder. *Autism Res.* 4, 212–220. doi: 10.1002/aur.193
- 3) Remedios, R., Kennedy, A., Zelikowsky, M., Grewe, B.F., Schnitzer, M.J., and Anderson, D.J. (2017). Social behaviour shapes hypothalamic neural ensemble representations of conspecific sex. *Nature* 550, 388–392. doi: 10.1038/nature23885
- 4) Di Martino, A., Kelly, C., Grzadzinski, R., Zuo, X.-N., Mennes, M., Mairena, M.A., Lord, C., Castellanos, F.X., and Milham, M.P. (2011). Aberrant striatal functional connectivity in children with autism. *Biol. Psychiatry* 69, 847–856. doi: 10.1016/j.biopsych.2010.10.029.
- 5) Hollander, E., Anagnostou, E., Chaplin, W., Esposito, K., Haznedar, M.M., Licalzi, E., Wasserman, S., Soorya, L., and Buchsbaum, M. (2005). Striatal volume on magnetic resonance imaging and repetitive behaviors in autism. *Biol. Psychiatry* 58, 226–232. doi: 10.1016/j.biopsych.2005.03.040.
- 6) Smith, Y., Raju, D.V., Pare, J.-F., and Sidibe, M. (2004). The thalamostriatal system: a highly specific network of the basal ganglia circuitry. *Trends Neurosci.* 27, 520–527. doi: 10.1016/j.tins.2004.07.004.
- 7) Wu, Z., Autry, A.E., Bergan, J.F., Watabe-Uchida, M., and Dulac, C.G. (2014). Galanin neurons in the medial preoptic area govern parental behaviour. *Nature* 509, 325–330. doi: 10.1038/nature13307.
- 8) Tillotson, R., Selfridge, J., Koerner, M.V., Gadalla, K.K.E., Guy, J., De Sousa, D., Hector, R.D., Cobb, S.R., and Bird, A. (2017). Radically truncated MeCP2 rescues Rett syndrome-like neurological defects. *Nature* 550, 398–401. doi: 10.1038/nature24058.
- 9) Luikenhuis, S., Giacometti, E., Beard, C.F., and Jaenisch, R. (2004). Expression of MeCP2 in postmitotic neurons rescues Rett syndrome in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 6033–6038. doi: 10.1073/pnas.0401626101.
- 10) Giacometti, E., Luikenhuis, S., Beard, C., and Jaenisch, R. (2007). Partial rescue of MeCP2 deficiency by postnatal activation of MeCP2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 1931–1936. doi: 10.1073/pnas.0610593104.