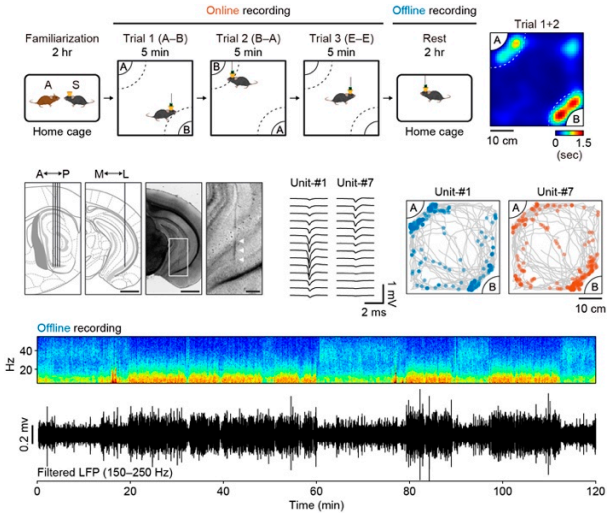
| 133　自閉症におけるオキシトシン作用の機能解析 | 奥山　輝大 |
|---|---|

**【目的】**自閉症が先天的な発達障害である点より、大規模遺伝子スクリーニングが精力的に行われ、Shank ファミリーなど数多くの原因遺伝子が同定された。それらの遺伝子の大半は、樹状突起スパイン（以下、スパインと表記）やシナプス形成に関与する、脳に広範に発現している分子をコードしていた。スパインは樹状突起にある棘状構造で、その構造上に興奮性シナプスが形成される点より、情報処理を行うための物理的な「足場」だと考えられている。以上の点より、自閉症病態の原因は、特定脳領域のスパインの形成異常の結果、適切な社会性行動を発現するための情報処理が行えなくなったことに起因すると推測されるが、「どの脳領域のスパイン形成異常が、どのようにして自閉症という病態を引き起こすのか」という本質的な問いは未だ解けていない。本研究では、社会性記憶に関与する海馬腹側 CA1（vCA1）領域に注目して、自閉症の病態解明を目指した。

**【方法】**本実験では、野生型マウス、および、自閉症モデルである Shank3-ノックアウト（KO）マウスを用いて、社会性行動中（Online セッション）・その後の睡眠中（Offline セッション）の vCA1 ニューロンの *in vivo* 電気生理学的な活動の解析を行った。Online セッションでは、テストマウスの行動と共に、vCA1 ニューロンの活動を記録し、その両方のデータをもとに社会性記憶ニューロンを同定した。Offline セッションでは、シャープウェーブリップル波（SPWR）の解析を行った。

**【結果】**ヒト臨床研究により自閉症患者は社会性記憶が低下することが報告されている。そこでまず、自閉症モデル Shank3-KO においても社会性識別テストによって社会性記憶を検証したところ、Shank3-KO は既知のマウス A にも未知のマウス B にも同程度接近し、社会性記憶に異常があることが分かった。さらに、Online セッション中の vCA1 ニューロンの活動を調べたところ、野生型マウスで観察されるような社会性記憶形成に依存したマウス A ニューロンの形成は見られないことがわかった。また、Offline 中の SPWR についても解析したところ、Shank3-KO では SPWR のピークアンプリチュードが低いことが分かった。さらに、アンプリチュードの強度ごとの SPWR のイベント数をカウントしたところ、Shank3-KO マウスでは強い SPWR の数が野生型よりも有意に少ないことがわかった。SPWR は記憶の定着に必須であることが、海馬背側 CA1 ニューロンの空間記憶タスクの研究で明らかになっている。本研究により、社会性記憶においても vCA1 ニューロンの SPWR が記憶定着に関与していることが示唆された。現在は、自閉症治療薬として期待されているオキシトシンシグナルと、上記異常の関係性について検証を行っている。

社会性行動社会性行動中（Online セッション）・その後の睡眠中（Offline セッション）の vCA1 活動記録



# 133. 自閉症におけるオキシトシン作用の機能解析

奥山　輝大

東京大学 定量生命科学研究所 行動神経科学研究分野

Key words：自閉症，海馬腹側 CA1，Shank3，社会性記憶

## 緒　言

自閉症が先天的な発達障害である点より、大規模遺伝子スクリーニングが精力的に行われ、Shank ファミリーなど数多くの原因遺伝子が同定された。それらの遺伝子の大半は、樹状突起スパイン（以下、スパインと表記）やシナプス形成に関与する、脳に広範に発現している分子をコードしていた。スパインは樹状突起にある棘状構造で、その構造上に興奮性シナプスが形成される点より、情報処理を行うための物理的な「足場」だと考えられている。以上の点より、自閉症病態の原因は、特定のスパインの形成異常の結果、適切な社会性行動を発現するための情報処理が行えなくなったことに起因すると推測されるが、「どの脳領域のスパイン形成異常が、どのようにして自閉症という病態を引き起こすのか」という本質的な問いは未だ解けていない。本研究では、自閉症の病態解明を目指して、病態原因となる脳領域・ニューロンを同定し、自閉症の新規治療法の開発を試みる。

本研究課題では、社会性行動の異常を示す自閉症スペクトラムの病態解明を目指し、他者についての記憶（社会性記憶）とその他者に対して親和的行動を司る、海馬の腹側 CA1（vCA1）ニューロンの詳細な機能解析を行った。自閉症モデルマウスである Shank3 遺伝子変異マウス（Shank3-KO）を用いて社会性行動アッセイを行い、今後の解析のための標的ニューロンの絞り込みを行った。また、私たちは、これまでの研究により、海馬 vCA1 ニューロンが、ニューロン集団の組み合わせで社会性記憶を表象していることを明らかにしてきたが、自閉症スペクトラムモデルである Shank3-KO マウスにおいてその社会性記憶の表象に変化が生じていることを見出した。

## 方　法

### 1. シリコンプローブを用いた *in vivo* 電気生理記録

本実験では、野生型マウス、および、Shank3-KO マウスを用いて、社会性行動中（Online セッション）・その後の睡眠中（Offline セッション）の vCA1 ニューロンの電気生理学的な活動の解析を行った。具体的な、行動実験プロトコルについては結果の項に記載する。Online セッションでは、テストマウスの行動と共に、vCA1 ニューロンの活動を記録し、その両方のデータをもとに社会性記憶ニューロンを同定した。Offline セッションでは、シャープウェーブリップル波（SPWR）の解析を行った。

## 結果および考察

### 1. 社会性記憶を形成することにより、vCA1 に社会性記憶ニューロンが生まれた

筆者らのグループによる先行研究により、社会記憶形成後に vCA1 の一部のニューロンが記憶したマウス特異的に反応するように生理学的特徴を変える事が $Ca^{2+}$イメージングの実験により分かっていた［1］。そこでまず、電気生理記録によっても同様のデータを得る事ができるかを検討し、さらに、その後の睡眠時 SPWR において、それらのニューロンがどのように活動しているかを検討することにした。

まず、テストマウスをマウス A とホームケージで 2 時間共に過ごさせ、マウス A のことを記憶させた。その後、

アリーナ内に既知マウスA、未知マウスBの両者を配置した上で、Onlineセッションを行った。図1aに示すように、アリーナ内でのマウスAとマウスBの位置を変更しカウンターバランスを取ることで、空間情報による影響（Place cellの検出）を排除した。マウスは既知個体よりも未知個体へと接近するという生得的性質を示すので、行動実験により相手のことを記憶していたかどうかを調べることができる。図1b～dに示すように、テストマウスは確かに未知のマウスBへと有意に接近し、マウスAを記憶していたことを確認した。

4シャンク64チャネルのシリコンプローブを用いて、vCA1を標的としてプローブをインプラントした。記録した情報をスパイクソーティングにより各ユニット（各ニューロンに相当）の情報へと分割し、それぞれのユニットの活動情報を解析した。図1f、gに示すように、既知のマウスAに統計的に有意に強く反応したマウスAニューロン（Unit-#1）と、同様に未知のマウスBに反応したマウスBニューロン（Unit-#7）と、それ以外のニューロンへと分類した。すると、先行研究の$Ca^{2+}$のデータと同じく、マウスAに対するニューロンが有意に多く同定されることがわかった。およそ30%の細胞がマウスAニューロン、4%の細胞がマウスBニューロンだった。

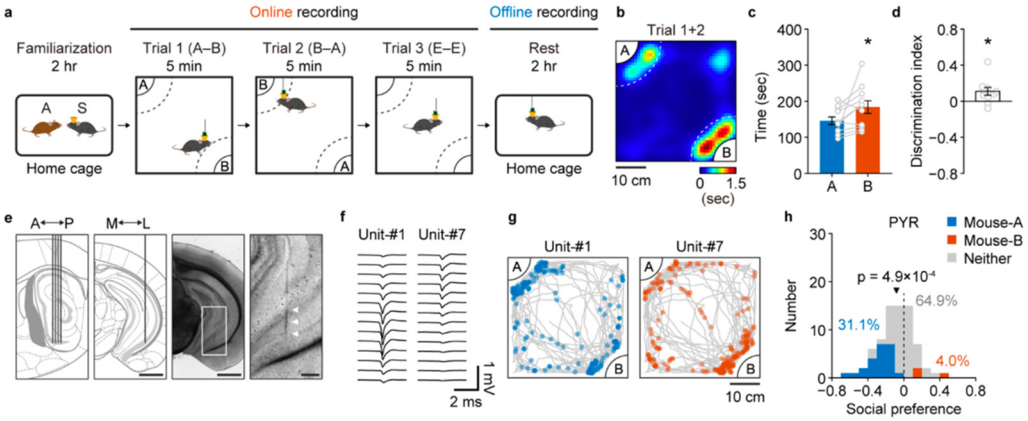



図1. 社会性記憶ニューロンの同定（Onlineセッション解析）

a）実験プロトコル。2時間マウスAとホームケージで同居させ、記憶を形成させたOnlineセッション・Offlineセッションを行った。

b）Onlineセッションでのテストマウスの滞在位置。見知らぬマウスBへの選好性があり、確かにマウスAを記憶できていることがわかる。

c）滞在時間の測定（paired t-test、$p=0.045$）。

d）識別スコアを（B−A）／（B+A）で計算した（Wilcoxon signed-rank test、$p=0.025$）。

e）vCA1を標的としたシリコンプローブインプラント。

f）特徴的な2ユニットの波形データ。

g）特徴的なマウスAニューロンとマウスBニューロン。

h）記録ユニットの中のマウスAニューロン・マウスBニューロン・それ以外のニューロンの割合を示すヒストグラム（Wilcoxon signed-rank test、$p=4.9\times10^{-4}$）。

**2. 社会性記憶ニューロンが睡眠時のSPWR中に活動する**

さらに、vCA1ニューロンの社会性記憶形成後の睡眠中のSPWRについて解析した。図2aにあるマウス個体から記録された1～7のユニットを示した。Trial1・Trial2の記録を元に、各ユニットのマウスA・マウスBに対する反応性を解析した。マウスAへの反応性が高いものがUnit-1側、マウスBへの反応性が高いものがUnit-7側とした。

Onlineセッション後に、テストマウスをホームケージに戻した上で、2時間Offlineセッションの記録を行い、その際のLFPを図2bに示した。低周波数帯のデルタ波（1～4 Hz）が強く活動する睡眠中にSPWR（150～250 Hz）が観

測された（1.1±0.5×$10^3$／2 時間）。非常に興味深いことに、SPWR 中における各ユニットの活動を解析したところ、既知なマウス A への反応性が高いマウス A ニューロン同士は SPWR 中で同期して活動しやすいことが明らかになった。この事実は、SPWR ごとに、ある特定の個体を表象している可能性を示唆している。

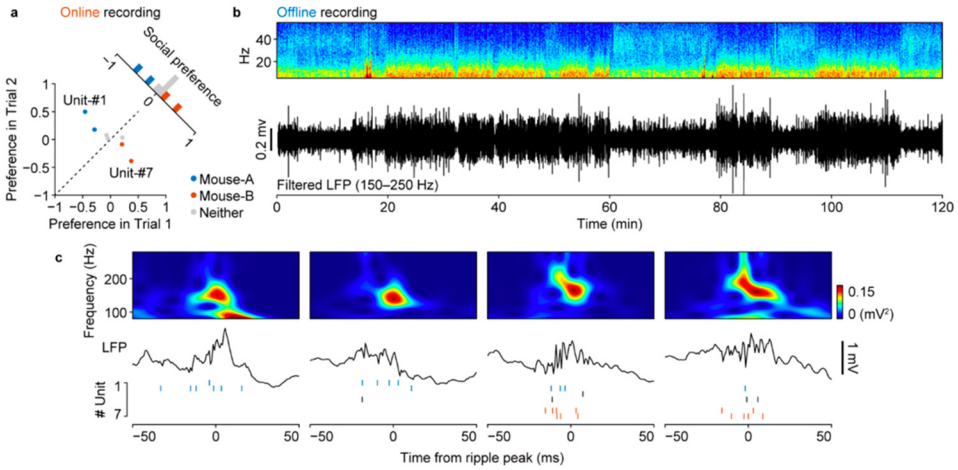



図 2. 睡眠時 SPWR の解析（Offline セッション解析）

a) Trial1・Trial2（図 1a）での各ユニットのマウス A・マウス B に対する反応性。マウス A への反応性が高いものが Unit-1 側、マウス B への反応性が高いものが Unit-7 側。

b) 2 時間の Offline セッション中の vCA1 領域の LFP。

c) SPWR 中の各ユニットの活動。

### 3. 自閉症モデルマウス Shank3-ノックアウト（KO）マウスにおける社会性ニューロンの解析

そこで次に自閉症モデルマウスである Shank3-KO マウスを用いて同様の実験を行い、Online・Offline 中の神経活動パターンを解析した。ヒト臨床研究により自閉症患者は社会性記憶が低下することが報告されている。Shank3-KO においても社会性識別テストによって社会性記憶を検証したところ、Shank3-KO は既知のマウス A にも未知のマウス B の両方に同程度接近し、社会性記憶に異常があることが分かった。さらに、Online 中の vCA1 ニューロンの活動を調べたところ、野生型にみられたような社会性記憶形成に依存したマウス A ニューロンの形成は見られないことがわかった。

さらに Offline 中の SPWR についても同様に解析した。すると、Shank3-KO では SPWR のピークアンプリチュードが低いことが明らかになった。さらに、アンプリチュードの強度ごとの SPWR のイベント数をカウントしたところ、Shank3-KO マウスでは強い SPWR の数が野生型よりも有意に少なかった。SPWR は記憶の定着に必須であることが、海馬背側 CA1 ニューロンの空間記憶タスクの研究で明らかになっている。本研究により、社会性記憶においても vCA1 ニューロンの SPWR が記憶定着に関与していることが示唆された［2］。

オキシトシンは、自閉症の薬理学的アプローチとして近年強く注目が集まっている脳内ペプチドである。その受容体が、vCA1 ニューロンに強く発現している一方、未だ社会性行動・社会性記憶における機能は未知である。今後は、vCA1 ニューロンに発現するオキシトシン受容体の機能を明らかにする目的で、vCA1 特異的なオキシトシン受容体 KO マウスを用いて、SPWR の解析を進めることを予定している。

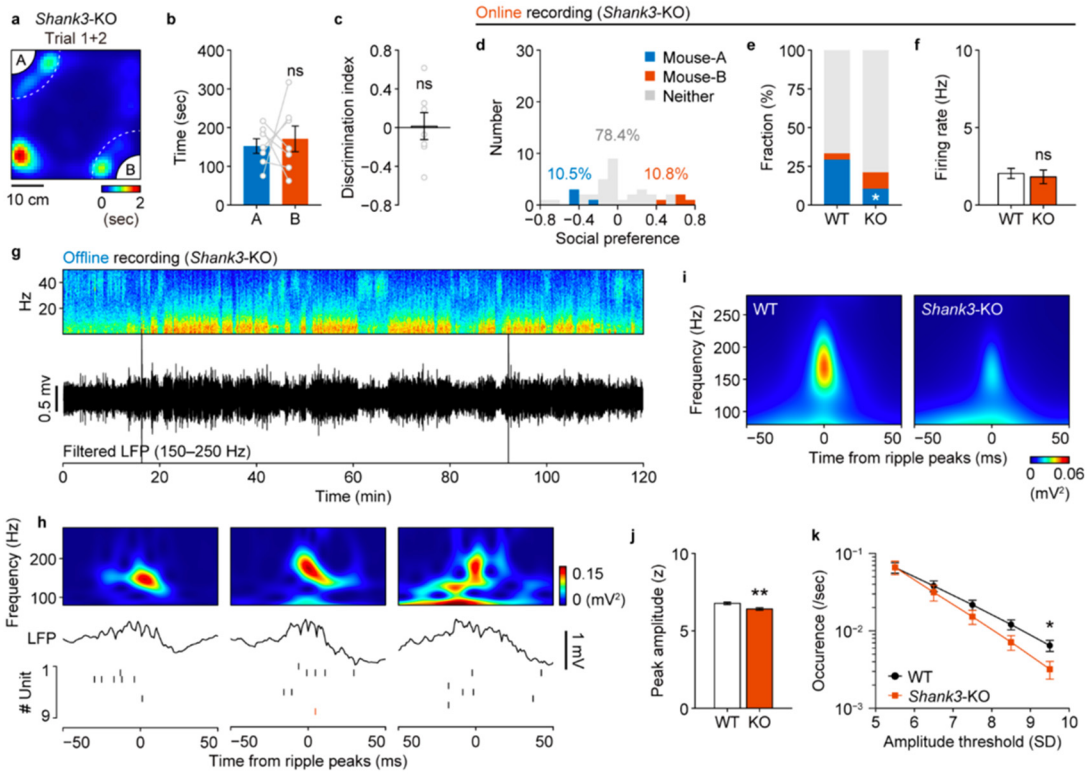



図 3. Online・Offline セッションにおける野生型と Shank3-KO マウスの比較

a) 自閉症モデルShank3-KOマウスのOnlineセッション中の行動パターン。

b、c) マウスAとマウスBへの選好性。

d) Onlineセッションにおける、Shank3-KOのマウスAニューロン・マウスBニューロンのヒストグラム。

e) 野生型とShank3-KOの比較（p＝0.019、Z test of proportions）。

f) 発火頻度比較。

g) Shank3-KOにおけるOfflineセッションでのLFP。

h) Shank3-KOにおけるSPWRの解析。

i) SPWR強度比較。

j) SPWR中のピークアンプリチュード値（p＝0.0056、Student's t- test）。

k) アンプリチュード値ごとのSPWR数比較（p＜0.05、Tukey–Kramer multiple comparison test）。

## 文　献


1) Teruhiro Okuyama, Takashi Kitamura, Dheeraj S Roy, Shigeyoshi Itohara, Susumu Tonegawa. Ventral CA1 neurons store social memory. Science. 353(6307) 1536 - 1541 (2016). PMID: 27708103

2) Kentaro Tao, Myung Chung, Akiyuki Watarai, Ziyan Huang, Mu-Yun Wang, Teruhiro Okuyama. Disrupted social memory ensembles in the ventral hippocampus underlie social amnesia in autism-associated Shank3 mutant mice. bioRxiv (2021)