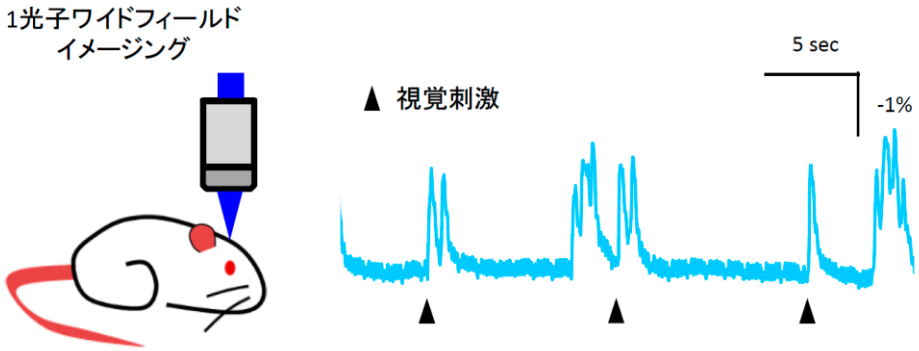
| 161　自閉症における社会性障害の神経メカニズム | 阪東　勇輝 |
|---|---|

**【目的】**自閉症は、他者への無関心、他者との意思疎通の困難などの社会性障害を伴う。社会性が障害されるメカニズムの解明は、自閉症の治療戦略を確立し、自閉症患者が社会生活を送れるよう効果的な支援を可能にするために必要不可欠である。これまでに、自閉症関連遺伝子をノックアウトした自閉症モデルマウスでは、細胞レベルから局所神経回路レベルに至るさまざまな階層で異常が認められているが、これらの異常がどのように社会性障害につながるか、未だ明らかではない。それは、社会性行動は、感覚野、前頭前野、運動野など、大脳皮質及び大脳辺縁系、大脳基底核など、様々な領野が協調して引き起こされると考えられるが、社会性行動中の領野間相互作用は調べられていないからであると考えられる。そこで、野生型および自閉症モデルマウスにおいて、社会性行動中に大脳皮質の各領野の入出力特性を記録し、領野間相互作用を比較し、自閉症モデルマウスにおいて、社会性行動が障害されるメカニズムの解明を目指した。本研究では、まず、社会行動中のマウス大脳皮質の複数の領野から神経活動を記録するための技術開発を行った。

**【方法】**まず、標準的な分子生物学的手法を用いて緑色蛍光膜電位プローブ、ArcLight-MT を改良した。次に、ArcLight 変異体を、海馬初代培養神経細胞において 1 光子イメージング法を用いてテストした。これらの ArcLight 変異体を、子宮内電気穿孔法を用いてマウス大脳皮質 2/3 層神経細胞に発現させた。その後、生後 35～60 日齢において、1 光子ワイドフィールド、2 光子イメージング法を用い、麻酔下のマウスにおいて *in vivo* で視覚入力を記録した。

**【結果】**まず、シナプス入力を高感度に検出できる膜電位プローブの開発を行った。これまでの研究から、ArcLight-MT が 1 光子、2 光子イメージングの両方の手法でシナプス入力を検出することができることが明らかになった。そこで、本研究では、ArcLight-MT に突然変異を導入し、シナプス入力に対する感受性がより高い ArcLight-ST を開発した。ArcLight-ST は、1 光子ワイドフィールドイメージング法で広視野のシナプス入力の時空間分布をより高感度に可視化でき、2 光子イメージング法を用いた単一細胞レベルの高感度なシナプス入力検出に成功した。現在、膜電位イメージング法と $Ca^{2+}$イメージング法と組み合わせることで、大脳皮質全体から入出力を同時記録する技術開発を行っており、社会行動中のマウスへの適用を目指している。

新規蛍光膜電位プローブ、ArcLight-ST を用いたワイドフィールドイメージング



# 161. 自閉症における社会性障害の神経メカニズム

阪東　勇輝

浜松医科大学 医学部 医学科 器官組織解剖学講座

Key words : 膜電位イメージング，ArcLight-ST，ワイドフィールドイメージング，領野間相互作用

## 緒　言

自閉症は、他者への無関心、他者との意思疎通の困難などの社会性障害を伴う。社会性が障害されるメカニズムの解明は、自閉症の治療戦略を確立し、自閉症患者が社会生活を送れるよう効果的な支援を可能にするために必要不可欠である。これまでに、自閉症関連遺伝子をノックアウトした自閉症モデルマウスで、神経細胞移動、樹状突起スパインの形成異常など、発生期における異常が報告されている［1］。また、シナプス伝達の異常、シナプス可塑性の異常や興奮・抑制バランスの異常といった、単一細胞レベルでの神経生理学的な異常も報告されている［2〜4］。さらに、近年、遺伝学的モデルではなく、薬理学的モデルではあるが、マウス大脳皮質神経細胞の過剰産生は、自閉症様行動を引き起こし、第一次視覚野内の局所回路において、同期活動する神経細胞群“アンサンブル”の性質が変化させることが報告されている［5］。このように、自閉症モデルでは、細胞レベルから局所神経回路レベルに至るさまざまな階層で異常が認められているが、これらの異常がどのように社会性障害につながるか、未だ明らかではない。それは、社会性行動は、感覚野、前頭前野、運動野など、大脳皮質及び大脳辺縁系、大脳基底核など、様々な領野が協調して引き起こされると考えられるが、社会性行動中の領野間相互作用は調べられていないからであると考えられる。そこで、本研究では、野生型および自閉症モデルマウスにおいて、社会性行動中の大脳皮質全体から入力と出力を同時記録し、領野間相互作用を比較し、自閉症モデルマウスにおいて、社会性行動が障害されるメカニズムの解明を目指した。本研究では、まず、社会行動中のマウス大脳皮質の複数の領野から神経活動を記録するための技術開発を行った。

まず、シナプス入力を高感度に検出できる膜電位プローブの開発を行った。これまでの研究から、ArcLight-MT が 1 光子、2 光子イメージングの両方の手法でシナプス入力を検出することができることを報告した［6, 7］。そこで、本研究では、ArcLight-MT に突然変異を導入し、シナプス入力に対する感受性がより高い ArcLight-ST を開発した。ArcLight-ST は、1 光子ワイドフィールドイメージング法で広視野のシナプス入力の時空間分布をより高感度に可視化でき、2 光子イメージング法を用いた単一細胞レベルの高感度なシナプス入力検出に成功した。（Bando et al., in revision）。現在、膜電位イメージング法と $Ca^{2+}$イメージング法と組み合わせることで、大脳皮質全体から入出力を同時記録する技術開発を行っており、社会行動中のマウスへの適用を目指している。

## 方　法

### 1. 動物

野生型の ICR マウス（Charles River）を用いた。動物実験は、アメリカ合衆国 National Institute of Health 及び浜松医科大学の動物実験ガイドラインに従って行った。

### 2. プラスミド

ArcLight-MT プラスミドは、Vincent Pieribone 博士（Yale 大学）から提供を受けた。ArcLight-MT への点変異導入は、PCR 法を用いて行った。ArcLight-MT、ArcLight 変異体遺伝子は、pCAG プロモーターの下流で発現させた。

### 3. 培養神経細胞における ArcLight-MT および変異体の評価

実験は、これまでの研究に基づいて行った［6］。胎生 18 日齢の ICR マウス胎仔海馬から神経細胞を分散培養し、リン酸カルシウム法を用いてトランスフェクションを行った。トランスフェクションの 1～2 日後に、1 光子イメージング法及びパッチクランプ法を用いてプローブの評価を行った。

### 4. *In vivo* イメージング

まず、ArcLight 変異体及び jRGECO1a 遺伝子は、子宮内電気穿孔法を用い、大脳皮質 2/3 層錐体細胞に発現させた［6, 8］。マウスの外科手術及び *in vivo* イメージングは、これまでの研究に基づいて行った［6］。

## 結果および考察

### 1. ArcLight-ST の開発

膜電位イメージング法の長所の一つは、閾値化のシナプス入力を検出できることである。そこで、ArcLight-MT に点変異を導入し、シナプス入力の検出に特化した蛍光膜電位プローブの開発を行った（新たに開発した変異体を ArcLight-ST と呼ぶ）。まず、ArcLight-MT と新規蛍光膜電位プローブ、ArcLight-ST の膜電位依存性を解析した。結果、ArcLight-ST は ArcLight-MT と比べ、膜電位依存性がより左にシフトすることが明らかになった（図 1）。次に、ArcLight-ST が閾値下シナプス入力に対してより高い感受性を持つか否か調べるため、−70 mV から、20 mV の大きさの脱分極パルスを与え、蛍光強度の変化を調べた。結果、ArcLight-ST は、ArcLight-MT と比べ、閾値下の小さな脱分極に高い感受性を持つことを明らかにした（図 1）。

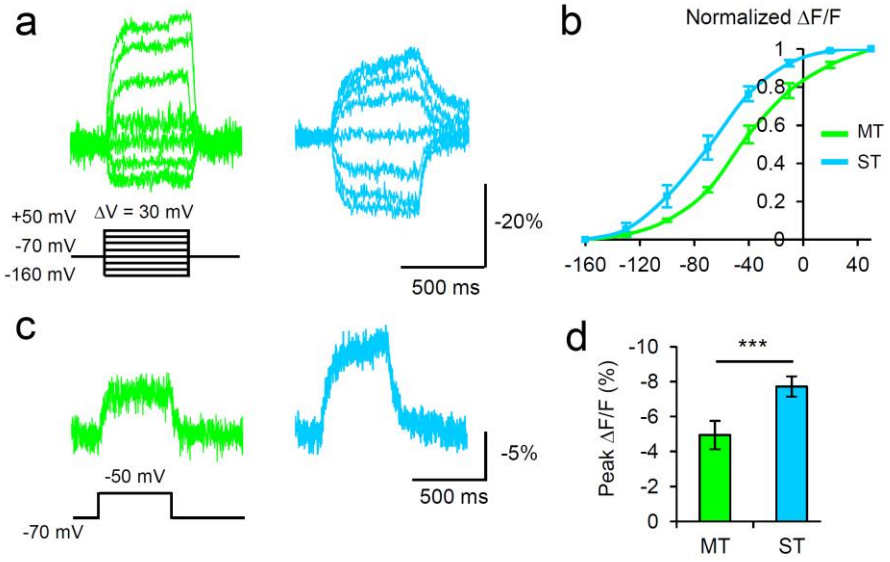



図 1. 新規蛍光膜電位プローブ、ArcLight-ST の開発

a, b）ArcLight-MT 及び ArcLight-ST の蛍光委輝度変化の膜電位依存性。

c, d）小さな脱分極パルスに対する応答。***P＜0.001、Mann-Whitney's U-test。

次に、ArcLight-ST を用い、*in vivo* においてシナプス入力を検出できるか否かを検証した。子宮内電気穿孔法を用い、ArcLight-MT 及び ArcLight-ST を大脳皮質 2/3 層衰退細胞に遺伝子導入を行った。その後、生後 35～60 日齢において 1 光子ワイドフィールドイメージングを行った。イメージングの際、フラッシュライトを用い、10 ms の視覚刺激を 10 秒に 1 回行った。結果、ArcLight-ST は、高感度に視覚入力および自発性シナプス入力を高感度に検出できることが明らかになった（図 2）。本研究で、大脳皮質において、広い領野からシナプス入力を高感度に検出することに成功した。今後、膜電位イメージング法と $Ca^{2+}$ イメージング法を組み合わせることで、広視野で入出力の時空間分布を記録する技術を開発し、社会性行動の実験系に適用する予定である。

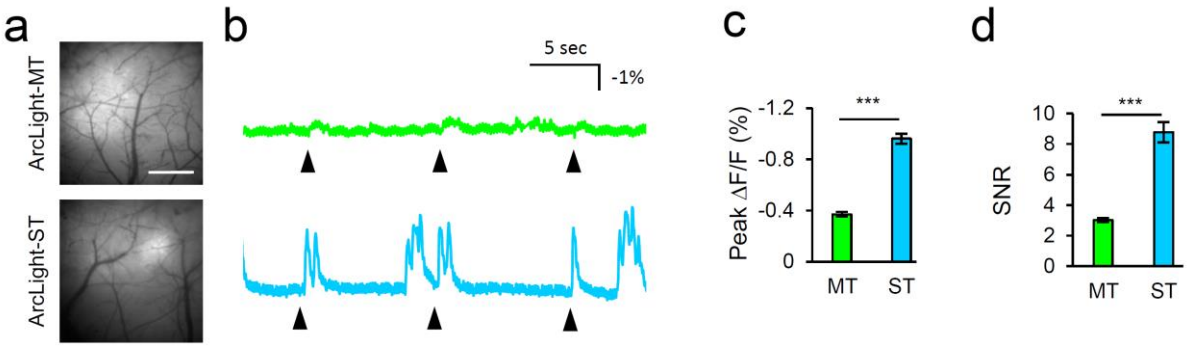



図 2. ArcLight-MT 及び ArcLight-ST を用いた *in vivo* 1 光子ワイドフィールドイメージング

a) ArcLight-MT または ArcLight-ST を発現するマウス大脳皮質第 1 次視覚野の 1 光子イメージ像。スケールバー：1 mm。

b) ArcLight-MT 及び ArcLight-ST の蛍光輝度変化。矢頭のタイミングで、フラッシュライトを用いた 10 ms の視覚刺激を行った。

c，d）視覚刺激に対する蛍光輝度変化の大きさ（c）及びシグナルノイズ比（SNR）（d）。***P＜0.001、Mann-Whitney's U-test。

## 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、Rafael Yuste 博士（コロンビア大学）、Michael Wenzel 医師（ボン大学）、佐藤康二博士（浜松医科大学）である。Vincent Pieribone 博士（Yale 大学）から ArcLight-MT 遺伝子の提供を受けた。Albert Lee 博士、田中進介博士（Janelia Research Campus）からは、*in vivo* パッチクランプ法を教わった。この場を借りて感謝申し上げます。

## 文　献

1) Roussignol G, Ango F, Romorini S, Tu JC, Sala C, Worley PF, Bockaert J, Fagni L. Shank expression is sufficient to induce functional dendritic spine synapses in aspiny neurons. J Neurosci. 2005 Apr 6;25(14):3560-70. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4354-04.2005. PMID: 15814786

2) Tabuchi K, Blundell J, Etherton MR, Hammer RE, Liu X, Powell CM, Südhof TC. A neuroligin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice. Science. 2007 Oct 5;318(5847):71-6. doi: 10.1126/science.1146221. Epub 2007 Sep 6. PMID: 17823315

3) J Tiago Gonçalves, James E Anstey, Peyman Golshani, Carlos Portera-Cailliau. Circuit level defects in the developing neocortex of Fragile X mice. Nat Neurosci. 2013 Jul;16(7):903-9. doi: 10.1038/nn.3415. PMID: 23727819

4) Samuele G Marro, Soham Chanda, Nan Yang, Justyna A Janas, Giulio Valperga, Justin Trotter, Bo Zhou, Sean Merrill, Issa Yousif, Hannah Shelby, Hannes Vogel, M Yashar S Kalani, Thomas C Südhof, Marius Wernig. Neuroligin-4 Regulates Excitatory Synaptic Transmission in Human Neurons. Neuron. 2019 Aug 21;103(4):617-626.e6. doi: 10.1016/j.neuron.2019.05.043. PMID: 31257103

5) Wei-Qun Fang, Rafael Yuste. Overproduction of Neurons Is Correlated with Enhanced Cortical Ensembles and Increased Perceptual Discrimination. Cell Rep. 2017 Oct 10;21(2):381-392. doi: 10.1016/j.celrep.2017.09.040. PMID: 29020625

6) Bando Y, Sakamoto M, Kim S, Ayzenshtat I, Yuste R. Comparative Evaluation of Genetically Encoded Voltage Indicators. Cell Rep. 2019 Jan 15;26(3):802-813.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2018.12.088. PMID: 30650368
7) Bando Y, Grimm C, Cornejo VH, Yuste R. Genetic voltage indicators. BMC Biol. 2019 Sep 12;17(1):71. doi: 10.1186/s12915-019-0682-0. PMID: 31514747
8) Bando Y, Irie K, Shimomura T, Umeshima H, Kushida Y, Kengaku M, Fujiyoshi Y, Hirano T, Tagawa Y. Control of Spontaneous Ca2+ Transients Is Critical for Neuronal Maturation in the Developing Neocortex. Cereb Cortex. 2016 Jan;26(1):106-117. doi: 10.1093/cercor/bhu180. Epub 2014 Aug 11. PMID: 25112282