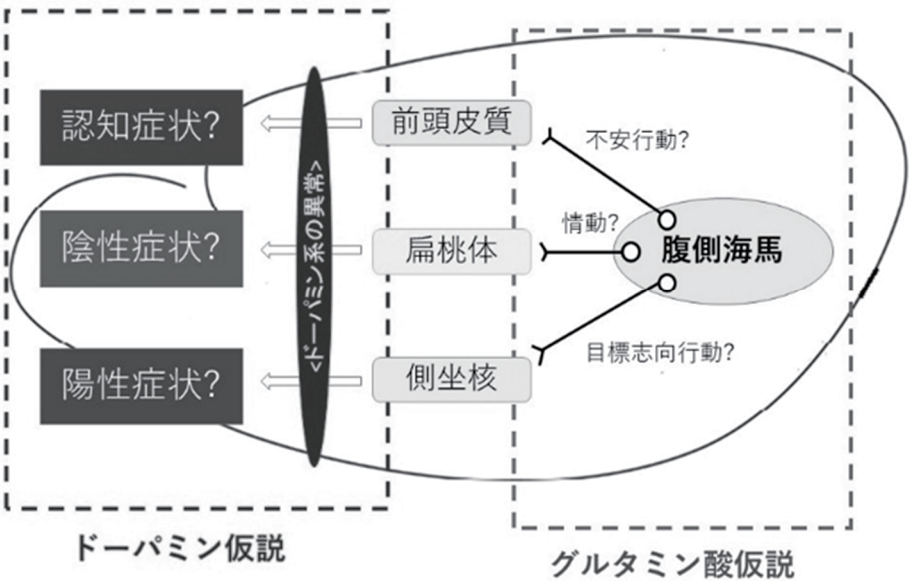
131　光遺伝学操作によって統合失調症メカニズムを解明する	中園　智晶

【目的】統合失調症について、多くの人は「幻覚や妄想を生じる」と言うような断片的な知識を持っていてもその病気としての正確なイメージは曖昧なのではないだろうか。その曖昧さの原因は、「統合失調症の症状は患者ごとに大きく異なり多種多様である」ことにあるだろう。この多様さは統合失調症の機序の解明を困難にしており、そのため現在でも効果的な治療法が確立されているとは言い難い。しかし、逆にこの症状の多様さを生む原因を突き止めることが出来たならば、統合失調症の克服に向けた大きな一歩となる。このような統合失調症の多様性を解明するためには、実際に脳の多様な情報処理を担っている「神経サーキット」に着目してのアプローチが不可欠となる。統合失調症発症に関与すると考えられているのが腹側海馬を起点とする複数の神経サーキットである。本研究では、統合失調症の多様な症状の原因となる神経サーキットとその活動の異常を解明するための手段としての光遺伝学的操作の有効性について検証した。

【方法】統合失調症の原因の候補とされている神経サーキットの１つとして「腹側経路 → 前頭皮質」の経路が考えられている（下図）。実験１として、この経路の活動を特異的に光刺激することによって、動物の行動が変化し統合失調症のような行動異常が現れるかどうかを検証した。その第１段階として、注目する経路の終着点である前頭皮質のみを刺激する実験を実施した。また並行して、統合失調症モデル動物では実際に生体内でどのようなサーキットの活動の変化が発生しているのかどうかを電気生理学的手法によって記録・解析し、実験１で用いた光操作によるアプローチの妥当性を検証した（実験２）。

【結果】実験１においては、前頭皮質の光遺伝学的操作を実施した個体とコントロール個体とでその行動の変化に違いがあるとする予備データが得られた。これは慢性的な光操作によって動物の行動を変化させることで異常を起こしている神経ネットワークが、明らかに新たなモデル動物を作製し研究に利用できることを示唆する結果であった。また実験２においては、統合失調症モデル動物の作製に用いられるフェンサイクリジン（PCP）の投与による前頭皮質神経細胞への影響は一様ではないことが示された。これは実験１のような特定の脳部位の神経細胞を一様に光操作するだけでは病態の再現にそのまま繋がらないであろうことを示している。また PCP 投与による腹側海馬の局所脳波のダイナミクスの変化は、腹側海馬を起点としたサーキット特異的な操作が今後の研究においても有用であることを示す結果であった。本研究で有用性が示された操作手段を神経ネットワーク特異的に使用することは、今後の精神疾患メカニズム解明において有用なツールになりうると考えられる。

本研究の仮説の模式図



131. 光遺伝学操作によって統合失調症メカニズムを解明する

中園　智晶

*福島県立医科大学 医学部 システム神経科学講座

Key words：統合失調症，光遺伝学，腹側海馬，前頭皮質，フェンサイクリジン

緒　言

統合失調症について、多くの人は「幻覚や妄想を生じる」と言うような断片的な知識を持っていてもその病気としての正確なイメージは曖昧なのではないだろうか。その曖昧さの原因は、「統合失調症の症状は患者ごとに大きく異なり多種多様である」ことにあるだろう。症状の大まかな分類としても、陽性症状・陰性症状・認知症状と三種類が存在し、さらに多様な症状がそれぞれに含まれている。この多様さは統合失調症の機序の解明を困難にしており、そのため現在でも効果的な治療法が確立されているとは言い難い。しかし、逆にこの症状の多様さを生む原因を突き止めることが出来たならば、統合失調症の克服に向けた大きな一歩となる。このような統合失調症の多様性を解明するためには、実際に脳の多様な情報処理を担っている「神経サーキット」に着目してのアプローチが不可欠となる。脳の神経細胞は、同一部位に存在している細胞同士であっても投射先が異なるならばそれぞれ異なる情報処理に関与していることが明らかになってきており［1］、近年では「複数の神経サーキットがそれぞれ機能異常を起こすことで、統合失調症は多様な症状を示す」という仮説が提唱されている［2］。この仮説の中で統合失調症発症に関与すると考えられているのが腹側海馬を起点とする複数の神経サーキットである。統合失調症の多様さをよく再現するフェンサイクリジン（PCP）投与モデル動物において、腹側海馬 - 前頭皮質間のサーキットが過剰活動を示すという報告［3］は、この仮説を強く支持している（図 1）。

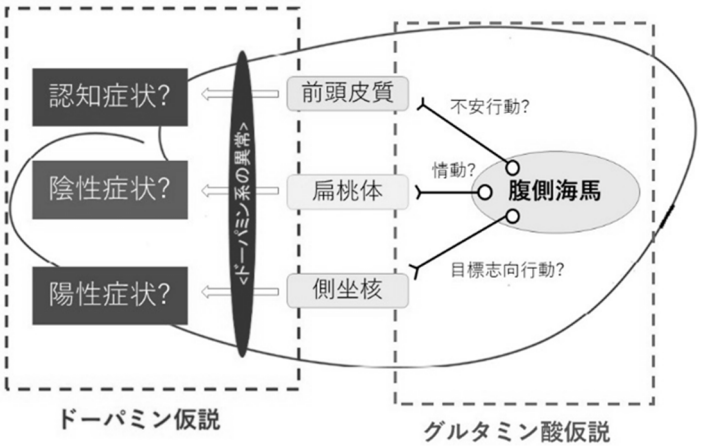


図 1. 本研究の仮説の模式図

光刺激を用いて神経細胞の活動を操作する光遺伝学（オプトジェネティクス）は、時間分解能の高さという工学的利点と、特定の細胞のみを制御しうる遺伝学的利点を併せ持ち、脳内の神経ネットワークレベルの活動を制御しうる技術である。この技術を用いて精神疾患の新しい治療の可能性を探る試みが国外では既に始まっており、統合失調症に対しても有効なアプローチだと考えられる。本研究では、オプトジェネティクスを用いること

*現在の所属：大阪公立大学 大学院医学研究科 脳神経機能形態学

によって、特定の神経回路のみを狙って操作することにより精神疾患の行動異常（社会行動の低下など）が再現できるかどうか試み、神経ネットワーク活動異常と精神疾患との間に存在している因果関係を明らかにすることを目指した。

本研究により得られたデータは、経路特異的な光遺伝学操作が統合失調症のような精神疾患の脳内メカニズムについての有用なアプローチたりうることを示すものであった。

方　法

1. 経路特異的な光遺伝学操作による行動変容の検証

統合失調症の多様な症状を再現できる病理モデルは多く存在しているわけではない。しかしながら、フェンサイクリジン（PCP）の慢性投与は他のモデルでは難しい陰性症状の再現が可能なモデルであり、本研究計画のターゲットである「統合失調症の多様な症状」を検証するためのモデル動物として最適であると考えられた。しかしながら慢性投与によるモデル動物作製の過程において PCP は腹腔内投与されるため、実際にどのような脳内サーキットの異常を引き起こし病態が再現されるのかどうかは不明であった。腹側海馬から前頭皮質に投射するサーキットの活動異常がその原因であると目されているが、その因果関係は未だに明らかではない。この問題を解決する事前試験として、前頭皮質神経細胞に光遺伝学的操作を行うことで、PCP 慢性投与時のような行動の異常を誘発できないか検証した。

両側へのウイルスベクターの注入によって、ラット前頭皮質の錐体細胞にチャネルロドプシン 2（ChR2）を発現させ、脳内に刺入した光ファイバーによって青色光で継続的に刺激した。この手続きにおいては PCP 慢性投与による統合失調症モデルラット作製の手順を参考に、5 msec の光刺激を 10 Hz のリズムで、自由行動下のラットに対して光ファイバーを通して一時間／日のように呈示した。刺激は 15 日間にわたって実施した。

行動への影響の指標として、オープンフィールドにおいて新奇個体へのアプローチの頻度を指標とする社会性テストを刺激の前後で実施し、比較した。社会性テストは新奇個体をケージに拘束した条件と実験個体・新奇個体をともに自由行動下で接触させた 2 条件で検討した。

予備実験として 2 個体を使用し、一頭（実験個体）には ChR2 および GFP を発現するウイルスベクターを、もう一頭（コントロール個体）には ChR2 は発現せず GFP のみを発現するウイルスベクターを注入した。この手続は二重盲検法にて実施した。

2. PCP が腹側海馬 - 前頭皮質に及ぼす影響の解析

実験 1 で用いた光刺激が実際に PCP 投与時の神経活動の異常を模倣することができているかについて検証が必要であるため、(1) 光刺激によって前頭皮質の神経細胞を持続的に活動させることは可能であるか、(2) PCP 腹腔内投与時に腹側海馬／前頭皮質ではそれぞれどのような変化が生じているのか、について検討した。まず麻酔下のラットに PCP を腹腔内投与し、その際の腹側海馬の活動変化を記録・解析した。さらに前頭皮質においては、実験 1 と同様に ChR2 を発現させたうえで刺激用光ファイバーと多点電極を組み合わせたオプテトロードを刺入し、光刺激時の前頭皮質神経細胞の活動制御の確認と、また更に麻酔下で PCP を腹腔内投与した際の活動の変化を神経細胞の種類をオプトタグ法により明らかにしながら検証した。

結果および考察

1.　慢性的な光遺伝学操作は行動を変容させうる

実験個体では自由行動下での社会性テストの値（新奇個体にアプローチした時間）は刺激前の 265.37%と増加し、拘束条件での値は 95.54%とほぼ変化がなかった。一方でコントロール個体では自由行動下の値は 70.91%と減少を示し、拘束条件では 158.42%と増加した。

社会性テストは個体差が大きく、今回の１ペアのみで結論を導くことはできない。しかしながら前頭皮質の錐体細胞をターゲットとして刺激した場合は統合失調症の陽性症状ないし多動症のような傾向を示す可能性が示唆された。これは前頭皮質の神経細胞の中でも腹側海馬との特定のサーキットを形成しているものが陰性症状の発症に寄与している可能性を示唆する。

2. PCP 投与により腹側海馬を含む神経ネットワークの活動が変化する

PCP 投与前後での腹側海馬での周波数帯間カップリング強度を計測したところ、減少を示した（図 2)。周波数帯間カップリングは認知機能に深く関与しているメカニズムであり［4]、腹側海馬を含む脳内ネットワークの機能が阻害されている可能性を示唆している。

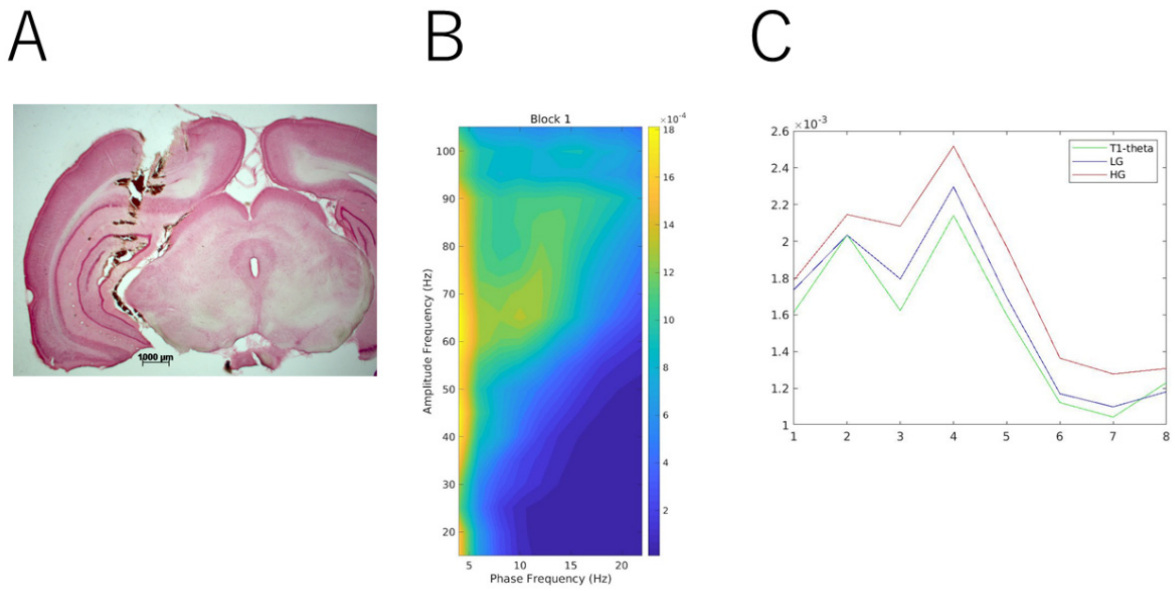


図 2. PCP 投与による腹側海馬脳波の変化

A) 電極刺入部位。

B) 周波数帯間カップリング。横軸の周波数に対する縦軸の周波数のリズムのカップリング強度をヒートマップでプロットしている。デルタ帯域がガンマ帯域など高周波数帯を変調している。

C) PCP投与によるカップリング強度の変化。投与後（横軸ブロック2の後）でカップリングが減弱を示した。

さらに、ラット前頭皮質に ChR2 を発現させ、光刺激と同時に神経細胞の活動を記録した（図 3)。光刺激に応答する神経細胞を錐体細胞と同定し、その活動が PCP 投与によってどのように変化するのか計測したところ、活動の増加を示す錐体細胞（図 3B)、減少を示す錐体細胞（図 3C）および活動の変化を示さない細胞が観測されたが、増加パターンを示す細胞がおよそ半分を占めていた。この結果は統合失調症発症時の神経細胞の活動異常が同一細胞タイプにおいても一様でないことを示しており、錐体細胞を一律に刺激した実験１の操作では完全に PCP 投与を模倣できていないことを意味している。これはまた統合失調症の発症メカニズムが特定の脳部位の神経細胞の興奮／抑制というようなシンプルな構図ではなく、ネットワークの異常として解釈するべき現象であることを示している。このような同一細胞タイプにも関わらずその影響が異なる原因は何であるのかを明らかにしていくことが病因解明には必要であり、「投射経路の違いおよびそれに起因するローカルネットワークの混乱が、多様な症状を引き起こしている」という仮説を支持する結果と言える。またこの仮説の検証のためのツールとしての経路特異的な光操作の有効性も本研究の結果は示した。

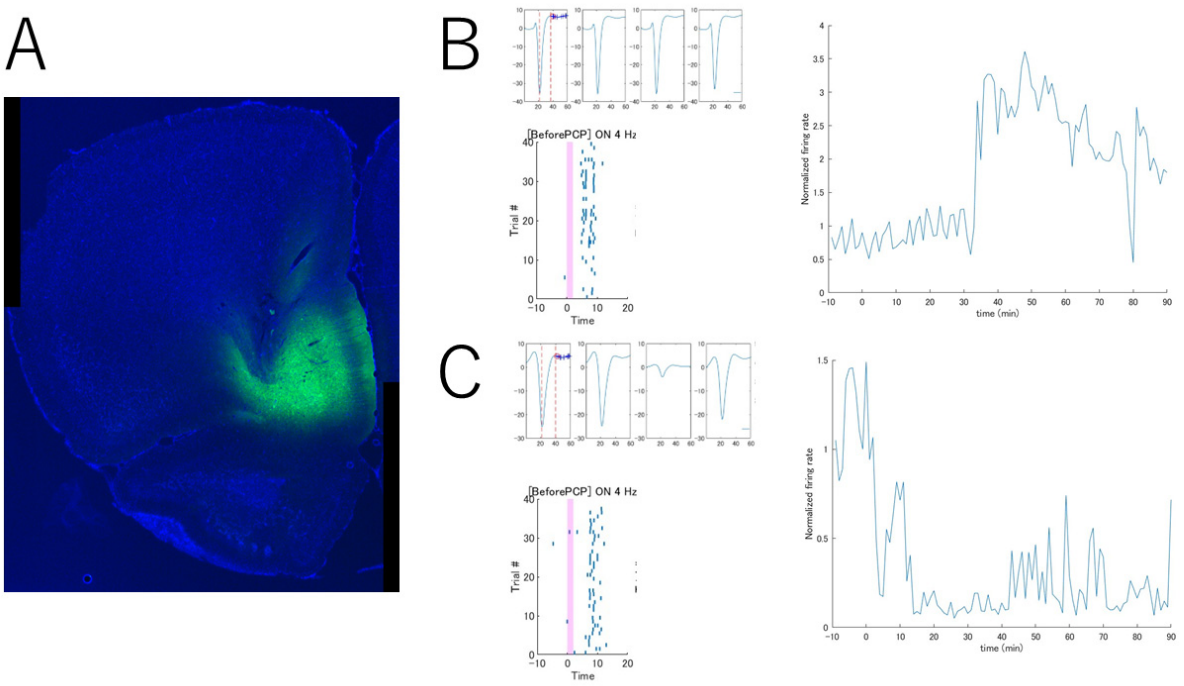


図 3. PCP 投与時の前頭皮質活動の変化

A）ChR2 の前頭皮質への発現（緑）および記録電極位置。

B）光応答を示す神経細胞のうち PCP 投与後に発火率の顕著な増加を示す例。

C）PCP 投与時に活動減少を示す神経細胞活動の例。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、福島県立医科大学医学部システム神経科学講座の浄土栄一准教授である。またウイルスベクターの作製については福島県立医科大学生体情報伝達研究所の加藤成樹准教授にご助力を頂いており、その使用法や抗体染色の技法について加藤准教授のご指導のもとで共同研究を実施している。

文　献

1） Ciocchi S, Passecker J, Malagon-Vina H, Mikus N, Klausberger T. Brain computation. Selective information routing by ventral hippocampal CA1 projection neurons. Science. 2015 May 1;348(6234):560-3. doi: 10.1126/science.aaa3245. PMID: 25931556.

2） Grace AA. Dysregulation of the dopamine system in the pathophysiology of schizophrenia and depression. Nat Rev Neurosci. 2016 Aug;17(8):524-32. doi: 10.1038/nrn.2016.57. Epub 2016 Jun 3. PMID: 27256556; PMCID: PMC5166560.

3） Jodo E, Suzuki Y, Katayama T, Hoshino KY, Takeuchi S, Niwa S, Kayama Y. Activation of medial prefrontal cortex by phencyclidine is mediated via a hippocampo-prefrontal pathway. Cereb Cortex. 2005 May;15(5):663-9. doi: 10.1093/cercor/bhh168. Epub 2004 Sep 1. PMID: 15342431.

4） Nakazono T, Takahashi S, Sakurai Y. Enhanced Theta and High-Gamma Coupling during Late Stage of Rule Switching Task in Rat Hippocampus. Neuroscience. 2019 Aug 1;412:216-232. doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.05.053. Epub 2019 Jun 4. PMID: 31170480.