

日本神経化学会奨励賞受賞者研究紹介

経験依存的な社会性形成と内側前頭前皮質発達における ミクログリア由来 BDNF の機能解析

小森 崇史

奈良県立医科大学 精神医学講座

はじめに

視覚などの感覚機能獲得には臨界期が存在し、生後の限られた期間の刺激・経験によって神経可塑性が高まる¹⁾。また、臨界期は様々な要因によってその時期が制御されている。例えば、視覚野においては臨界期の脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor; BDNF) 過剰は興奮性/抑制性神経バランス (E/I バランス) における抑制性神経強化 (E<I) の変化をもたらし、臨界期を早期閉鎖する²⁾。また、いくつかの研究はミクログリアが感覚野の臨界期に関与することを示している³⁻⁵⁾。一方、感覚機能と同様に、マウスの社会性も限られた期間の社会的経験に依存して発達する。生後21–35日目 (P21–P35) に幼若期社会的隔離 (juvenile social isolation; j-SI) を経験した j-SI マウスは、その後の再社会化によっても社会性は回復しない⁶⁾。この j-SI マウスでは、内側前頭前皮質 (mPFC) で E<I の変化を認め、さらにミクログリアが分泌する神経栄養因子の量が過剰となる^{7,8)}。これら神経栄養因子の過剰、E<I への変化、ミクログリアの関与といった現象は、視覚臨界期を制御する前述の現象を想起させるものであった。そこで、「社会性獲得の臨界期は、ミクログリアによる BDNF 過剰およびそれに付随する mPFC の E<I 変化によって制御されるのではないか」と仮説を立てて検証を行った⁹⁾。これまで、ミクログリアが社会性¹⁰⁾ や、mPFC のシナプス刈り込み¹¹⁾、mPFC 依存的な認知機能に時期特異的に関与する¹²⁾ ことは知られていたが、ミクログリアが社会性臨界期を制御するかどうかは不明であった。

j-SI 体験はミクログリア由来 *Bdnf* (MG-*Bdnf*) を増加させた

まずマウスを用いて幼少期の社会的経験剥脱が MG-*Bdnf* に与える影響を検証した。P21 で離乳を行い、集団飼育する群 (group-housed; GH マウス) と、P21–P35 まで隔離飼育して P35 で年齢・性別・系統を一致させたマウスと再社会化 (3–5 匹) を行う群 (j-SI マウス) を作成した。

先行研究と一致し^{6,13)}、3chamber 社会性テストにおいて j-SI マウスは GH マウスと比較して社会性が低下していた。そして特筆すべきことに、j-SI が終了する P35 の時点から成体期に渡るまで皮質全体および mPFC における MG-*Bdnf* 発現が増加していた。一方で、皮質および mPFC のバルク組織では、*Bdnf* 発現に差は認められなかった。これらの結果は、j-SI が MG-*Bdnf* の過剰発現を誘発し、再社会化を行っても成体期までその影響は持続し、改善が見られないことを示唆した。

MG-BDNF の過剰発現は社会性低下と mPFC 錐体細胞の機能変化を生じた

続いて、MG-BDNF を過剰発現させた遺伝子組換えマウスを用いて、社会性の低下が再現できるかを検証した。このマウスは、*Iba1-tTA* transgenic マウスと *Bdnf-tetO* knock-in マウスを交配させており (*Iba1-tTA::Bdnf^(tetO/+)* マウス; *Iba1-Bdnf* マウス)、Tet-off system によってドキシサイクリン (DOX) の非存在下で MG-BDNF が過剰発現しており、DOX

を投与すると MG-BDNF が正常化する (ELISA にて確認)。つまり、DOX の投与時期をずらすことにより、MG-BDNF が時期特異的に果たす役割についても検証することが可能である。コントロールには、*Bdnf*^(tetO/+) マウスを用いた。

3chamber 社会性テストにおいて *Iba1-Bdnf* マウスの社会性を評価したところ、コントロールマウスと比較して社会性が低下していた。また、3chamber という人為的環境を排除するため、自由環境下でマウスの動きを追跡して社会的アプローチの回数をカウント出来る装置を作成して (the augmented reality-based long-term animal behavior observing system; AR-LABO) 社会性の検証を行ったが、やはり *Iba1-Bdnf* マウスの社会性は低下していた。

次に、*Iba1-Bdnf* マウスにおける mPFC 第5層錐体細胞において whole-cell patch-clamp 記録を行って、電気的活動を測定した。その結果、*Iba1-Bdnf* マウスの mPFC 第5層錐体細胞において、自発発火頻度が減少していた。また、spontaneous excitatory postsynaptic current (sEPSC) の頻度が低下し、spontaneous inhibitory postsynaptic current (sIPSC) の頻度が増加していた。miniature EPSC (mEPSC) および IPSC (mIPSC) においても同様の変化を認めた。これらは、*j-SI* マウスでみられる mPFC 第5層錐体細胞の変化とほぼ一致していた。また、視床下部後部の錐体細胞ではこの変化は認められず、*j-SI* マウスと同様の結果であった¹³⁾。これらの結果は、幼少期からの MG-BDNF の持続的な増加が、mPFC 第5層錐体細胞の興奮性を低下させ、また、抑制性シナプス入力を増加させて抑制性神経回路の活性を高めていることを示唆した。まとめると、MG-BDNF の過剰発現は、*j-SI* マウスで観察された社会性障害および mPFC 機能障害を誘発した。

MG-BDNF の過剰発現は mPFC の補体系遺伝子の発現を変化させた

MG-BDNF の過剰発現が mPFC に与える影響をさらに検証するため、*Iba1-Bdnf* マウスの mPFC の RNAseq 解析を行った。その結果、*Iba1-Bdnf* マウスではコントロールマウスと比較して、*Clqa* を起

点とする補体系の遺伝子発現が減少していた。また、*C3ar1* の遺伝子発現も低下していた。一方で、各種サイトカインや神経栄養因子には変化を認めなかった。これらの結果は、MG-BDNF の過剰発現は、mPFC において補体系の混乱を生じさせ、結果として E/I バランスの異常を生み出すことが示唆された。

若年期から MG-BDNF を正常化すると社会性障害や mPFC 機能異常を生じない

社会性の臨界期である P21-P35 に MG-BDNF が関与しているかどうかを検証するため、P21 から DOX を開始して MG-BDNF を正常化させたところ、社会性に障害は生じず、mPFC の機能異常も生じなかった。一方で、臨界期を過ぎた P50 から MG-BDNF を正常化しても電気生理学的な異常は回復せず、錐体細胞の発火頻度の減少や、sIPSC・mIPSC の頻度増加は残存したままであった。しかし、社会性については改善を認めたため、これらは EPSC の改善による結果であると解釈した。まとめると MG-BDNF は、mPFC の抑制性神経発達には若年期に厳密な時期特異的役割を果たしている一方で、社会性については成人期になっても、EPSC の調整を介して社会性を回復させうることが示唆された。

ヒトのマクロファージにおける BDNF 発現は小児期の経験と相関していた

最後に、本結果がトランスレーショナルな意義をもっているかを検証した。まず、通常飼育したマウスにおいて、末梢血単核細胞と *MG-Bdnf* 発現に相関があることを明らかにした。よって、ヒトの末梢血から単球を採取してマクロファージに分化させ、それをミクログリアに見立てて *BDNF* 発現を測定することにした。また、幼少期トラウマ体験の心理指標である Child Abuse Trauma Scale (CATS)^{14,15)} を調べ、マクロファージ *BDNF* との相関を調べた。その結果、M2 マクロファージにおける *BDNF* 発現と幼少期トラウマ体験の重症度との間には正の相関を認め、トランスレーシオナ

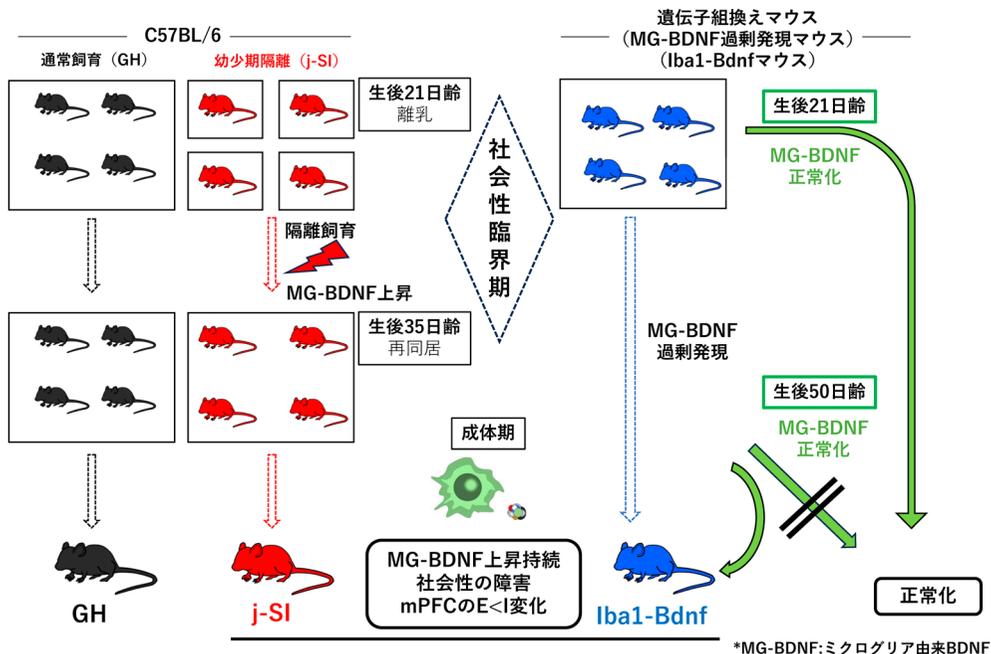


図1 社会性および mPFC 発達における MG-BDNF の影響

ルな結果が得られた。一方で、M1 マクロファージにおける *BDNF* 発現と CATS 総スコアとの間に相関は認めなかった。(なお、ヒト研究は奈良県立医科大学医の倫理審査委員会の承認を得て実施し、参加者に十分なインフォームドコンセントを行い、書面にて同意を得た。また、個人情報保護に十分な配慮を行った。)

おわりに

近年、様々な精神疾患にミクログリアが関与している可能性が示唆されている¹⁶⁾。精神疾患の多くは社会性の障害を呈するため、社会性障害のメカニズムを解明することは喫緊の課題である。本研究では、幼少期の孤立体験によって生じる社会性障害に MG-BDNF が時期特異的に関与していることを明らかにした⁹⁾。また、精神科臨床医であることを活かして、ヒトサンプルを用いてトランスレーショナルな研究を行うことが出来た。マクロファージをミクログリアに見立てて、というのは起源¹⁷⁾の問題からも大きな限界点ではあるが、幼少期逆境体験によって *BDNF* が減少するの

ではなく増加するというトランスレーショナルな結果が得られた点は興味深い。なお、DOX 投与の期間が表現系に影響している可能性があることや、mPFC の E/I 変化と社会性の可逆性の時期特異性が完全には一致しなかったことなどは限界点であり、さらなる検証を要するところである。しかしながら、この不一致は臨床において、MG-BDNF への介入による社会性回復の可能性を示唆するものであり、決してネガティブなことではない。本研究の成果を基に、幼少期にネグレクトなどの孤立・孤独体験を有する患者の治療法の開発やその効果的な時期の特定を目指し、さらに研究を続けていきたい。

謝辞

本研究を行うにあたり、多くの共同研究者の先生方に多大なるご指導とご協力を賜りました。この場をお借りして心より感謝申し上げます。また、このような荣誉ある賞および本稿執筆の機会をいただき、選考委員の先生方や関係者の皆様方に心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) Hensch TK. Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci*, 6(11), 877–888 (2005).
- 2) Huang ZJ, Kirkwood A, Pizzorusso T, Porciatti V, Morales B, Bear MF, Maffei L, Tonegawa S. BDNF Regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. *Cell*, 98(6), 739–755 (1999).
- 3) Sipe GO, Lowery RL, Tremblay M, Kelly EA, Lamantia CE, Majewska AK. Microglial P2Y12 is necessary for synaptic plasticity in mouse visual cortex. *Nat Commun*, 7(1), 10905 (2016).
- 4) Kalish BT, Barkat TR, Diel EE, Zhang EJ, Greenberg ME, Hensch TK. Single-nucleus RNA sequencing of mouse auditory cortex reveals critical period triggers and brakes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 117(21), 11744–11752 (2020).
- 5) Gibel-Russo R, Benacom D, Di Nardo AA. Non-cell-autonomous factors implicated in parvalbumin interneuron maturation and critical periods. *Front Neural Circuits*, 16, 875873 (2022).
- 6) 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).
- 7) Yamamuro K, Yoshino H, Ogawa Y, Okamura K, Nishihata Y, Makinodan M, Saito Y, Kishimoto T. Juvenile social isolation enhances the activity of inhibitory neuronal circuits in the medial prefrontal cortex. *Front Cell Neurosci*, 14, 105 (2020).
- 8) Ikawa D, Makinodan M, Iwata K, Ohgidani M, Kato TA, Yamashita Y, Yamamuro K, Kimoto S, Toritsuka M, Yamauchi T, Fukami SI, Yoshino H, Okumura K, Tanaka T, Wanaka A, Owada Y, Tsujii M, Sugiyama T, Tsuchiya K, Mori N, Hashimoto R, Matsuzaki H, Kanba S, Kishimoto T. Microglia-derived neuregulin expression in psychiatric disorders. *Brain Behav Immun*, 61, 375–385 (2017).
- 9) Komori T, Okamura K, Ikehara M, Yamamuro K, Endo N, Okumura K, Yamauchi T, Ikawa D, Ouji-Sageshima N, Toritsuka M, Takada R, Kayashima Y, Ishida R, Mori Y, Kamikawa K, Noriyama Y, Nishi Y, Ito T, Saito Y, Nishi M, Kishimoto T, Tanaka KF, Hiroi N, Makinodan M. Brain-derived neurotrophic factor from microglia regulates neuronal development in the medial prefrontal cortex and its associated social behavior. *Mol Psychiatry*, 29(5), 1338–1349 (2024).
- 10) Zhan Y, Paolicelli RC, Sforzazzini F, Weinhard L, Bolasco G, Pagani F, Vyssotski AL, Bifone A, Gozzi A, Ragozzino D, Gross CT. Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nat Neurosci*, 17(3), 400–406 (2014).
- 11) Mallya AP, Wang HD, Lee HNR, Deutch AY. Microglial pruning of synapses in the prefrontal cortex during adolescence. *Cereb Cortex*, 29(4), 1634–1643 (2019).
- 12) Schalbetter SM, von Arx AS, Cruz-Ochoa N, Dawson K, Ivanov A, Mueller FS, Lin HY, Amporn R, Mildenerberger W, Mattei D, Beule D, Földy C, Greter M, Notter T, Meyer U. Adolescence is a sensitive period for prefrontal microglia to act on cognitive development. *Sci Adv*, 8(9), eabi6672 (2022).
- 13) Yamamuro K, Bicks LK, Leventhal MB, Kato D, Im S, Flanigan ME, Garkun Y, Norman KJ, Caro K, Sadahiro M, Kullander K, Akbarian S, Russo SJ, Morishita H. A prefrontal-paraventricular thalamus circuit requires juvenile social experience to regulate adult sociability in mice. *Nat Neurosci*, 23(10), 1240–1252 (2020).
- 14) Sanders B, Becker-Laussen E. The measurement of psychological maltreatment: Early data on the child abuse and trauma scale. *Child Abuse Negl*, 19(3), 315–323 (1995).
- 15) Tanabe H, Ozawa S, Goto K. Psychometric properties of the Japanese version of the Child Abuse and Trauma Scale (CATS). *The 9th Annual Meeting of the Japanese Society for Traumatic Stress Studies* (2010).
- 16) Tay TL, Béchade C, D’Andrea I, St-Pierre MK, Henry MS, Roumier A, Tremblay ME. Microglia gone rogue: Impacts on psychiatric disorders across the lifespan. *Front Mol Neurosci*, 10, 421 (2017).
- 17) Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, 330(6005), 841–845 (2010).