

マカクザルを用いた心の理論の脳基盤の解明

江川 純

新潟大学大学院 医歯学総合研究科 精神医学分野

【研究の背景】

自閉スペクトラム症 (Autism Spectrum Disorder; ASD) は、社会的コミュニケーションの障害を中核症状とした神経発達障害であり、その有病率は1~2%と高い (Shaw et al., 2021)。ASD の中核症状である社会的コミュニケーションの障害を最もよく説明できるのは「心の理論」の障害とされているが、「心の理論」とは「他者の心の動きを類推したり、他者が自分とは違う信念を持つことを理解する機能」と定義される。「他者が事実とは異なる信念を持つことを理解する能力」を調べる「誤信念課題」を用いて「心の理論」の障害の有無が判定されてきたが、同課題を半数が通過する言語発達年齢は定型発達児で約4歳、ASD 患児で約9歳と大きな差が認められ、これにより ASD と定型発達が判別されることが期待された (Frith, 2001)。しかし、①従来の誤信念課題通過には言語教示の理解や記憶、反応抑制などの認知能力を必要とするため、この課題を通過しないことが「心の理論」の障害の証明にならないこと、②言語発達年齢が高い ASD 患者は従来の誤信念課題を通過するが、現実の社会的場面では困難さを示す、という問題点が指摘されている (Southgate et al., 2007)。以上の問題点を踏まえ、言語的教示は与えない、より自然な条件下で、誤信念場面の動画を提示し、自発的な視線の動きを眼球運動解析装置で計測する「非言語的」誤信念課題が考案され、幼児のみならず従来の誤信念課題を通過する成人においても ASD 者は他者の誤信念に基づいた予期的注視において定型発達者とは、大きく異なることが報告された (Senju et al., 2009)。

【目 的】

本研究の目的は、その障害が自閉症の中核症状に直結すると考えられている「心の理論」の脳基盤を明らかにすることである。そのために、実験動物の中で最もヒトに近い種であるマカクザルにおいて、言語的教示が不要でヒト以外の霊長類でも施行可能な「非言語的」誤信念課題および侵襲的な脳回路操作や脳イメージング技術を適用する。本実験により心の理論の脳基盤が明らかになり、自閉症の霊長類動物モデルを確立できれば、分子細胞レベルの病態解明が飛躍的に進み、診断法および治療法開発に寄与すると考えられる。

【方 法】

【脳回路操作を用いた責任脳回路の同定】

我々は、抑制性 DREADD である hM4Di (逆行性レンチウイルスベクター、FuG-B2-hM4D-WPRE) を mPFC に注入し、hM4Di に対する特異的リガンドであるクロザピンN-オキシド (CNO) を注射し mPFC を不活性化し、サルにおける mPFC の不活性化が、誤信念ターゲットに対する注視バイアスを特異的に変化させることを確認した (Hayashi et al., 2020)。しかし、この研究ではマカクザルの内側前頭前野へのすべての投射を遮断したために内側前頭前野と脳のどの部位のネットワークが心の理論に重要であるかはわからない。そこで、注入された抑制性 DREADD がどの脳部位に輸送されているかを調べるために、ポジトロンエミッショントモグラフィ (PET) 撮影を行う。PET 撮影は共同研究者の南本敬史 (放射線医学総合研究所システム神経回路研究グループグループリーダー) が所属する放射線医学総合研究所にて行うが、サル脳内に導入した人工受容体を PET で生きたまま画像化する技術は南本が世界で初めて実証した (Nagai et al., Nat Commun, 2016)。この PET 撮影により最も強いシグナルが得られた投射先と内側前頭前野との回路を責任脳回路候補として最低3頭のサルで PET 撮

影にて確認を行う。また今回から、CNO に代わり、hM4Di に対してより高い結合特異性を持つ新規リガンド Deschloroclozapine (DCZ)を用いて実験を行なった。

【電気生理学実験による確認】

次に脳表面の内側前頭前野に、共同研究者の長谷川功(新潟大学大学院医歯学総合研究科神経生理学分野)が特許を持つメッシュ状皮質脳波 (ECoG) 電極を挿入する。また責任脳回路候補が脳表面であった場合は ECoG 電極を、脳の深部であれば 3D array 電極を手術にて挿入し、非言語的誤信念課題を視聴中の脳活動を計測し、電気生理学的に責任脳回路を確認する。

【結 果】

1. PET による DREADD (逆行性レンチウイルスベクター、FuG-B2-hM4D-WPRE) の発現部位の同定:

今回実験に用いた DCZ は hM4Di DREADD レセプターに対する最も特異性が高い機能リガンドであるが、それでも今回のターゲット部位である前頭前野を含む一部脳領域では、内在性のレセプターと結合することが知られている。そのため、ウイルスベクターによって導入された hM4Di レセプターの発現部位を同定するためには、DREADD 導入前に、放射性ラベルを施した DCZ を投与して、PET 撮像を行う必要がある (PET プレ撮像)。本課題期間中に 2 頭のニホンザルで PET プレ撮像を行なった。そのうち 1 頭については、逆行性レンチウイルスベクター (FuG-B2-hM4D-WPRE) を mPFC に注入し、その後再度 PET 撮像を行った (PET ポスト撮像)。あらかじめ撮像した構造 MRI データと重ね合わせる手法を確立した (図 1)。いくつかのマカクザルのテンプレートを試し、DREADD (hM4D) レセプターの発現部位を同定した (図 2)。

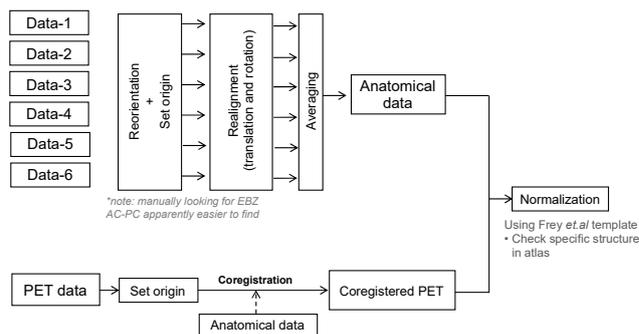


図 1.サル MRI データと PET データの重ねせ手続き

大脳皮質の注入部位の周辺である前頭前野部の他、側頭頭頂接合部脳溝内部、上側頭溝内部、さらに皮質下の視床、被殻、視床枕周辺に強い放射性標識を確認した。

2. mPFC の神経活動の記録

1 頭のサルに mPFC と pulvinar に深部用電極を刺入するために、それぞれの部位に対応した頭蓋領域に細胞外電位記録用のチャンバーを設置した。mPFC から、単一細胞記録と電場電位記録を行なった (図 3)。視覚刺激に応答する領域を確認した。

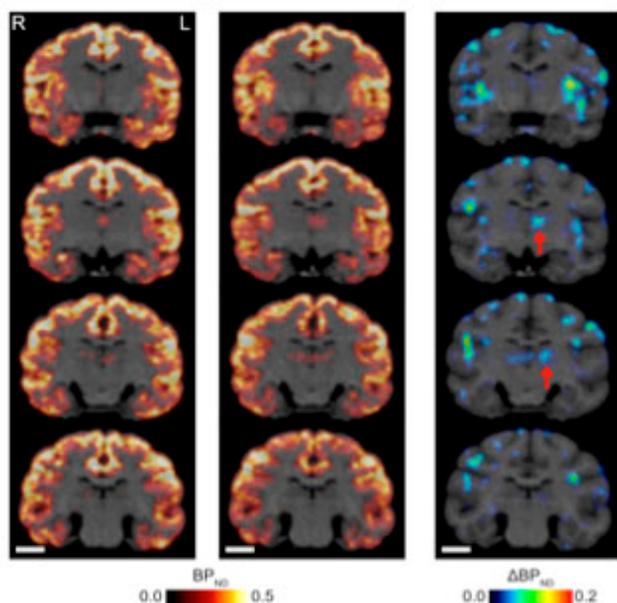


図 2.プレ撮像とポスト撮像の信号とその差分の信号分布

【考 察】

PET 撮像で強い信号が得られた側頭頭頂接合部脳溝内部、上側頭溝内部領域はこれまで、解剖学的な研究において神経投射トレーサーによって同定された 9m 野への投射が報告されている領域に大まかには一致する。しかし、これまでの報告は、本研究より広い領域にトレーサーを注入したものが多く、より単一機能領域に近い限局した領域への投射様式が明らかになった点は、意義深い。また PET、MRI による全脳イメージングによって、皮質下の構造への投射も同時に明らかになったことは重要である。ただ特に皮質下の MRI 画像の解像度不足に課題が残った。より解像度の高い MRI データを取得して、

投射元の部位の推定精度を上げることで未知の機能ネットワークの明らかにできると考えられる。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本実験により心の理論の脳基盤の理解が進み、特に皮質下の脳ネットワークの関与が明らかになった。これらの知見は自閉スペクトラム症の診断法および治療法開発に寄与すると考えられる。

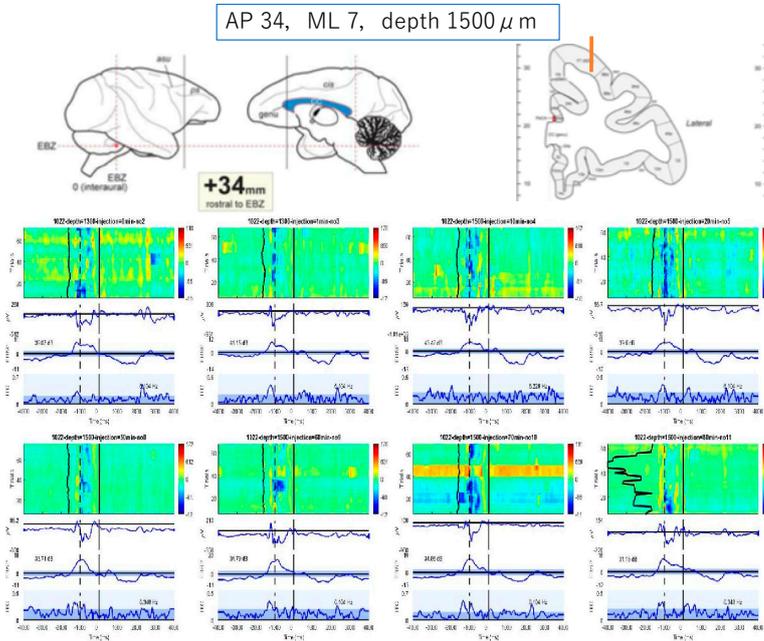


図 3.前頭前野 9m 野から記録した神経活動

【参考・引用文献】

1. Shaw KA, Maenner MJ, Bakian AV, Bilder DA, Durkin MS, Fumier SM, Hughes MM, Patrick M, Pierce K, Salinas A, Shenouda J, Vehorn A, Warren Z, Zahorodny W, Constantino JN, DiRienzo M, Esler A, Fitzgerald RT, Grzybowski A, Hudson A, Spivey MH, Ali A, Andrews JG, Baroud T, Gutierrez J, Hallas L, Hall-Lande J, Hewitt A, Lee LC, Lopez M, Mancilla KC, McArthur D, Pettygrove S, Poynter JN, Schwenk YD, Washington A, Williams S, Cogswell ME. Early Identification of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 4 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2018. *MMWR Surveill Summ.* 2021 Dec 3;70(10):1-14.
2. Frith U. Mind blindness and the brain in autism. *Neuron.* 2001 Dec 20;32(6):969-79.
3. Southgate V, Senju A, Csibra G. Action anticipation through attribution of false belief by 2-year-olds. *Psychol Sci.* 2007 Jul;18(7):587-92.
4. Senju A, Southgate V, White S, Frith U. Mindblind eyes: an absence of spontaneous theory of mind in Asperger syndrome. *Science.* 2009 Aug 14;325(5942):883-5.
5. Nagai, Y. et al. Deschloroclozapine, a potent and selective chemogenetic actuator enables rapid neuronal and behavioral modulations in mice and monkeys. *Nat Neurosci* 23, 1157–1167 (2020).
6. Nie, B. et al. A population stereotaxic positron emission tomography brain template for the macaque and its application to ischemic model. *Neuroimage* 203, 116163 (2019).
7. Rohlfing, T. et al. The INIA19 Template and NeuroMaps Atlas for Primate Brain Image Parcellation and Spatial Normalization. *Front Neuroinform* 6, 27 (2012).

8. Frey, S. *et al.* An MRI based average macaque monkey stereotaxic atlas and space (MNI monkey space). *Neuroimage* **55**, 1435–1442 (2011).
9. Weller, R. E., Steele, G. E. & Kaas, J. H. Pulvinar and other subcortical connections of dorsolateral visual cortex in monkeys. *The Journal of comparative neurology* **450**, 215–40 (2002).
10. Saalmann, Y. B., Pinsk, M. A., Wang, L., Li, X. & Kastner, S. The pulvinar regulates information transmission between cortical areas based on attention demands. *Science (New York, N.Y.)* **337**, 753–6 (2012).
11. Shipp, S. The functional logic of cortico-pulvinar connections. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **358**, 1605–24 (2003).
12. Sherman & Guillery, R. The role of the thalamus in the flow of information to the cortex. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **357**, 1695–708 (2002).
13. Romanski, L., Giguere, M., Bates, J. & Goldman-Rakic, P. Topographic organization of medial pulvinar connections with the prefrontal cortex in the rhesus monkey. *The Journal of comparative neurology* **379**, 313–32 (1997).