

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18342

研究課題名(和文) 発達期小脳におけるミクログリア依存的シナプス刈り込み機構の解明

研究課題名(英文) Microglia Dependent Development of Neuronal Circuits in the Cerebellum

研究代表者

中山 寿子(Nakayama, Hisako)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・助教

研究者番号：70397181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：小脳登上線維シナプス刈り込みへミクログリアが関与するか、関与するならばどのような機序であるかを明らかにする研究を行った。ミクログリアを枯渇させる薬剤または活性化を抑制する薬剤を小脳皮質に投与したマウスや、脳内のミクログリアが減少した遺伝子改変マウスを用いた実験から、登上線維が正常に1本化するためには生後2週目にミクログリアが存在することが必要であることを明らかにした。作用機序に関して、ミクログリアが不要な登上線維を貪食していないことを示唆する結果を得たほか、一本化に重要であることが既に報告されているシナプスの機能に作用することによって登上線維シナプスの発達を制御することを示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether microglia was crucial for the development of cerebellar neuronal circuits. We studied whether and how microglia contribute to climbing fiber (CF) synapse elimination in the developing cerebellum. By ablating microglia from the developing cerebellum pharmacologically and genetically, we found that microglia was needed for CF synapse elimination during the second postnatal week. We observed almost no sign of microglia engulfing CFs, suggesting that microglia contribute to CF synapse elimination in a mechanism other than phagocytosis. Instead, synapses which have been reported to be crucial for the CF synapse elimination were affected in transgenic mice with reduced microglia. These results suggest that microglia contribute to CF synapse elimination through regulating synaptic input to Purkinje cells.

研究分野：神経科学

キーワード：ミクログリア 小脳 神経回路形成 発達 プルキンエ細胞 登上線維 シナプス再編成

### 1. 研究開始当初の背景

神経回路が正常に機能するには、神経細胞が“適切な相手”と、“適切な強さ”でシナプス結合することが必要である。回路形成初期には過剰なシナプス結合が形成されるが、その後、競合する神経結合が選別され、不必要な結合の除去(シナプス刈り込み)と必要な結合の強化を経て、機能的な神経回路が形成される。申請者はこれまで、生後発達期シナプス刈り込みの機序の解明を目指して、マウス小脳の登上線維-プルキンエ細胞間シナプスの刈り込みの制御機構を研究してきた。成熟動物のプルキンエ細胞は一本の登上線維により支配されているが、誕生直後のプルキンエ細胞は複数の登上線維により多重支配されている。生後発達に伴い過剰な登上線維が減少し、マウスでは生後3週目までに一本支配になる。登上線維のシナプス刈り込みには、プルキンエ細胞へのもうひとつの興奮性入力である平行線維シナプスにおける mGluR1 の活性化とその下流のシグナル伝達が必要であることが報告されている(Hahimoto and Kano, 2009)。また、申請者自身の先行研究によって、プルキンエ細胞体への GABA 作動性抑制性入力が登上線維の1本化に重要であることも分かっている(Nakayama et al., 2012)。これらの登上線維の1本化に関わる機構の研究は、主にシナプス前部または後部の神経細胞に発現、機能する因子に着目しているが、しかし、はたしてシナプス刈り込みが神経細胞の内部因子でのみ制御されているものなのか、外部からの制御因子の関与は必要ないのか、については不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、シナプス刈り込みの正常な進行を支えるための外部因子として、脳内のマクロファージ様細胞であるミクログリアに着目した。ミクログリアは、マクロファージのように脳内の異物を認識して貪食する作用があるため、刈り込まれるべき登上線維シナプスがミクログリアに貪食されることによって形態学的に除去されるのではないかと考えたのである。実際、申請者自身の予備実験によって、登上線維のシナプス刈り込みが起こる時期に、ミクログリアの突起と細胞体がプルキンエ細胞を支配する登上線維近傍に分布していることが確認された。この結果は、ミクログリアが生後発達期のニューロンに何らかの作用を及ぼしている可能性を強く示唆するものであった。そこで、本研究課題では、登上線維の刈り込みにミクログリアが関与するかどうか、関与するならばどのような機構で相互作用するのかを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

全ての実験は、広島大学動物実験規則および広島大学組換え DNA 実験安全管理規則に

則って実施した。実験には野生型マウス(C57BL/6)または、floxed-csf1r マウス(ジヤクソン研究所)と iba1-cre マウス(新潟大学・崎村建司先生、阿部学先生より分与)との交配により得られた csf1r-ck0 マウスを用いた。ミノサイクリン(minocycline hydrochloride, TOCRIS)は一日1回、体重1g 辺り 70 $\mu$ g を皮下注射で投与した。対照群には同体積の PBS を皮下注射した。クロドロン酸内包リポソーム(片山化学)を小脳皮質に微量注入する実験では、マウスをイソフルラン吸入麻酔下におき、キシロカインを頭部に塗布したのちに小脳皮質虫部第6-8小葉付近の頭蓋骨を切除、薬剤を充填したガラスキャピラリーを小脳に刺入し、微量注入装置(NANOJECT II, DRUMMOND 社)を用いて 0.1-0.15 $\mu$ l を 20 分かけて注入した。対照群には空のリポソーム液を注入した。薬剤投与マウスは、野生型マウスで刈り込みが完了する生後 21 日目以降に CO<sub>2</sub> 麻酔下で断頭し、小脳虫部の急性スライスを作成した。スライス上のプルキンエ細胞からホール・セル記録を行い、顆粒細胞層を電気刺激した際に誘発される登上線維シナプス電流を測定、入力線維の本数や電気生理学的性質を解析した。下オリーブ核ヘトレーサーを注入する実験では、イソフルラン吸入麻酔を施したマウス延髄を露出させ、ピオチン化デキストランアミン(BDA-10,000, Invitrogen 社)を充填したガラス電極を下オリーブ核に刺入し、電気泳動的に注入した。免疫組織染色は、4%パラホルムアルデヒドで還流固定したマウス小脳虫部から作成した切片を用いて行った。

### 4. 研究成果

平成 27 年度には、発達期の小脳皮質からミクログリアを欠落または不活性化する実験を行い、登上線維の1本化がどのように影響されるかを解析した。生後 6 日目にクロドロン酸内包リポソームを注入したところ、薬剤注入領域において、2 本以上の登上線維が入力するプルキンエ細胞の割合が有意に増加していた。クロドロン酸リポソームによるミクログリアの減少は抗 Iba1 抗体(Anti Iba1, Rabbit, Wako)を用いた免疫染色により確かめた。次に、ミクログリアの活性化を抑制することが知られているミノサイクリンを生後 7-11 日目の野生型マウスに皮下注射する実験を行い、クロドロン酸内包リポソームの小脳皮質内投与と同様に、登上線維の1本化が障害されるという結果を得た。一方、クロドロン酸内包リポソームまたはミノサイクリンの投与を生後 11 日目以降で施した場合には、登上線維の1本化は正常であった。これらのことから、登上線維の1本化が正常に進行するためには生後 6-10 日目に適切な活性を持ったミクログリアが存在することが必要であることが示唆された。

しかしながら、ガラスキャピラリーを用いた薬剤投与は脳組織の損傷は避けられな

い。また、ミノサイクリンはマクロファージ/ミクログリアに作用する以外にもニューロンの電気活動に関わるいくつかのイオンチャンネルなどにも作用することが報告されているため、それらの同定困難な因子が上記の結果に影響している可能性も懸念された。そこで、ミクログリアの分化・生存に必須である colony stimulating factor 1 receptor (csf1r) の floxed マウスを米国ジャクソン研究所より入手し、マクロファージ/ミクログリアで特異的に cre リコンビナーゼを発現するマウス (Iba1-cre) と交配させ、csf1r を Iba1 陽性細胞で特異的に欠損する遺伝子改変マウス (csf1r-cK0) を新たに作出した。Csf1r-cK0 マウスの登上線維の刈り込み課程を生後日齢を追って電気生理学的に解析したところ、生後 6-8 日目では登上線維の投射本数に对照群と cK0 間の違いは認められなかったが、生後 10-12 日目に僅かに有意差が認められた。生後 12 日目以降で有意差は顕著化し、以降、継続した。登上線維の異常な複数支配は、生後 2 か月齢のマウスでも認められたため、刈り込み課程の遅延が原因ではないと考えられる。上記の結果から、平成 27 年度には、登上線維の刈り込みには生後 10-12 日目頃にミクログリアが小脳皮質に存在することが必要であるという結論に至った。

平成 28 年度には、ミクログリアがどのような機構で登上線維の 1 本化に関わるのかを明らかにするための実験を行った。ミクログリアは貪食能をもった細胞であることから、不要な登上線維を貪食する可能性を検討した。生後 6-8 日目の野生型マウスをイソフルラン麻酔下におき、順行性トレーサーであるピオチン化デキストラミンを登上線維起始核である延髄下オリブ核に注入し標識した。生後 10-12 日目に登上線維標識マウスを灌流固定し、抗 Iba1 抗体によるミクログリア可視化も行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて両者の位置関係を 3 次元的に詳細に解析した。これまでのところ、Iba1 陽性ミクログリア内に内包された登上線維を観察できておらず、ミクログリアによる登上線維の貪食は起きていても稀であろうと予想している。登上線維が蛍光タンパクを発現する遺伝子改変マウスの使用も含め、引き続き、形態観察を進めていく計画である。

ミクログリアは貪食作用以外にも、様々な生理活性物質の産生・放出を介して周囲の細胞機能に影響を与える可能性がある。そこで、先行研究によって、登上線維シナプス刈り込みに影響を与えることが知られているシナプス伝達に着目し、csf1r-cK0 マウスと野生型マウスにおいて形態や電子生理学的な性質に差異が認められるかどうかを解析した。その結果、csf1r-cK0 マウスでは登上線維の 1 本化に重要であるシナプス機能が変化していることを示すデータを得つつある。今後、csf1r-cK0 マウスで変化しているシナ

プスを特定し、それが csf1r-cK0 マウスでの登上線維の刈り込み異常の原因になっているかを検討する実験を進める計画である。また、併せて、ミクログリアがどのような因子を介して、そのシナプスの機能に影響を与えるのかについても、生化学的手法も取り入れながら進めていく。

神経回路形成過程にミクログリアが重要な役割を担うことは既にいくつかの脳部位で報告があるが、それらの部位では入力線維を個別に識別して解析することが困難である。それに比べて、小脳登上線維-プルキンエ細胞間シナプスは入力線維数も少ないため、形態やシナプス伝達を線維ごとに詳細に解析できる。さらに、登上線維シナプスの刈り込み機構については多くの研究の積み重ねがある。しかしながら、従来の研究の多くがニューロンに発現する分子、ニューロン間の相互作用に着目したものであり、小脳神経回路形成においてこれまで全く解析されていないミクログリアに着目した点は非常に独創的である。さらに、外側膝状体などのいくつかの脳部位ではミクログリアはその貪食作用を介してシナプス刈り込みに関わると報告されているが、本研究は何らかの因子の産生・放出を介してシナプス機能を調節することで刈り込みに関わるという、神経回路発達におけるミクログリアの新たな役割を提唱できる可能性を秘めている。本研究を通して得られる知見と先行するニューロンの知見を合わせることによって、グリアとニューロンネットワークの相互作用による脳機能成熟の統合的理解が深まると期待できる。さらに、ミクログリアの活性化制御の破綻が神経変性疾患だけでなく自閉症、統合失調症などの神経疾患の病態の一端を担うと考えられ、治療薬のターゲットとしても注目されているので、健常脳の発達におけるミクログリア機能の解明は、それらの神経疾患の病態の解明と治療法の開発の観点からも意義があるといえる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

CAPS1 RNA Editing Promotes Dense Core Vesicle Exocytosis.

Miyake K, Ohta T, Nakayama H, Doe N, Terao Y, Oiki E, Nagatomo I, Yamashita Y, Abe T, Nishikura K, Kumanogoh A, Hashimoto K, Kawahara Y.

*Cell Reports*, 査読有, Nov

15;17(8):2004-2014, 2016

DOI: 10.1016/j.celrep.2016.10.073.

Ionic Basis for Membrane Potential Resonance in Neurons of the Inferior Olive.

Matsumoto-Makidono Y, Nakayama H,  
Yamasaki M, Miyazaki T, Kobayashi K,  
Watanabe M, Kano M, Sakimura  
K, Hashimoto K  
*Cell Reports*, 査読有,  
Jul26;16(4):994-1004, 2016  
DOI: 10.1016/j.celrep.2016.06.053.

A CDC42EP4/septin-based perisynaptic  
glial scaffold facilitates glutamate  
clearance.

Ageta-Ishihara N, Yamazaki M, Konno  
K, Nakayama H, Abe M, Hashimoto K,  
Nishioka T, Kaibuchi K, Hattori S,  
Miyakawa T, Tanaka K, Huda F, Hirai H,  
Hashimoto K, Watanabe M, Sakimura K,  
Kinoshita M  
*Nat Communications*, 査読有, Dec  
10;6:10090, 2015  
DOI: 10.1038/ncomms10090.

[学会発表](計8件)

神経細胞の Resonance 特性に関わるイオン  
チャンネルの解析  
橋本浩一、榎殿佳子、中山寿子、山崎美  
和子、宮崎太輔、小林和人、渡辺雅彦、  
狩野方伸、崎村建司、第94回日本生理  
学大会、2017年3月28日~3月30日、  
浜松市

Genetic manipulation of mTORC1  
signaling in mouse cerebellar  
Purkinje cell.  
Kassai, H., Sakai, Y., Nakayama, H.,  
Maeda, T., Hashimoto, K., Kano, M.,  
Aiba, A., Neuroscience 2016 annual  
meeting Society for Neuroscience,  
2016/11/12-2016/11/16, San Diego, USA.

細胞膜 Resonance 特性に関わるイオン  
チャンネル  
橋本浩一、榎殿佳子、中山寿子、第68  
回日本生理学会中国四国地方会、2016  
年11月5日~11月6日、岡山市

Ion channels responsible for the  
resonance property of neurons in the  
inferior olive  
橋本浩一、中山寿子、松本佳子、第59  
回日本神経化学大会、2016年9月8日~  
9月10日、福岡市

プルキンエ細胞における CTCF 欠損は樹  
状突起に Giant Lamellar Body の形成を  
即す  
角岡佑紀、平山晃斉、中山寿子、足澤悦  
子、崎村建司、Niels Galjart、吉村由  
美子、橋本浩一、八木健、第38回日本  
分子生物学会年会、第88回日本生化学  
会大会 合同大会、2015年12月2日~12

月4日、神戸市

Spatial and temporal distribution of  
microglia and climbing fiber-Purkinje  
cell synapses during postnatal  
cerebellar development

Nakayama Hisako, Chie Morimoto, Ryo  
Takimoto, Kouichi Hashimoto, 第38回  
日本神経科学大会、2015年7月28日~  
7月31日、神戸市

Analysis of spontaneous slow currents  
in inferior olivary neurons  
Yoshiko Matsumoto, Hisako Nakayama,  
Kouichi Hashimoto, 第38回 日本神経  
科学大会、2015年7月28日~7月31  
日、神戸市

Functional roles of microglia in  
postnatal refinement of the  
cerebellar circuit  
Hisako Nakayama and Kouichi Hashimoto,  
Glial Assembly International Summer  
Workshop in 2015, 2015/7/10-2015/7  
/11, 岡崎市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 寿子 (NAKAYAMA, Hisako)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究所・  
助教  
研究者番号: 70397181