

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460094

研究課題名(和文) 自閉症におけるシナプスバランス不全機構の解明とシナプス競合誘導によるその回復

研究課題名(英文) The role of microglia in ASDs.

研究代表者

小山 隆太 (Koyama, Ryuta)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・准教授

研究者番号：90431890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：神経回路の精密化には不要なシナプスの除去が必須である。発達期におけるシナプス除去の不全は神経回路機能の低下につながり、自閉スペクトラム症 (autism spectrum disorders; ASDs) の発症と関連することが示唆されている。本研究では、海馬神経回路に着目し、ASD発症におけるシナプス除去不全の関与とそのメカニズムを検証した結果、脳内免疫細胞であるマイクログリアによるシナプス貪食の不全が ASD発症と関連することを明らかにした。よって、マイクログリアの活性化を制御することにより、ASD発症を抑制できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Selective elimination of inappropriate synapses is fundamental to the refinement of neural circuits. Deficits in synapse elimination are suggested in autism spectrum disorders (ASDs). Here we investigated whether and how the deficits in synapse elimination in the hippocampus are involved in the pathogenesis of ASDs. We found that the deficits in microglia-mediated synapse elimination induce excess synaptic connections in the dentate gyrus-CA3 neural circuits in ASDs. Thus, we propose that the regulation of microglial activity is a key to suppress the development of ASDs.

研究分野：神経科学

キーワード：マイクログリア シナプス 自閉症

1. 研究開始当初の背景

神経回路の形成は神経活動依存的なシナプスの形成、競合と除去、そして維持と成熟という過程を経て完成する。そして、脳が正常に機能するためには、発達期における適切なシナプス競合によって興奮性 (Excitatory) および抑制性 (Inhibitory) シナプスの数と機能のバランス (E/I バランス) が制御され、これが成体期に維持される必要がある。E/I バランスの不全は神経回路の機能障害をもたらす、自閉症スペクトラム (autism spectrum disorders: ASD) などの神経発達障害の要因になる (Gatto et al., Front. Synaptic. Neurosci. 2:4 2010)。ASD は社会的相互作用の質的な欠如、言語・非言語での意思伝達の障害、常同行動・固執的行動の顕在化という三つの主症状により定義される脳の発達障害であり、現時点での関連研究は、病態モデルの作成とその行動試験や免疫染色学および生理学的な解析に留まっている。そして、ASD 発症メカニズムの分子細胞生物学的な解明および、これに基づく ASD 発症の予防や治療法の提唱には至っていない。特に、ASD 脳ではシナプスバランスが興奮性優位になっていると推察されているが、ASD の発症においてシナプス競合が不全となる可能性の正否やそのメカニズムは未解明である。

2. 研究の目的

自閉症スペクトラム (autism spectrum disorders: ASD) 発症の原因のひとつとして、脳内の興奮性シナプスの増加が示唆されている。本研究では ASD モデルマウスの海馬の歯状回顆粒細胞 CA3 野錐体細胞間のシナプス競合機構に着目する。同脳領域をひとつのモデルとして、ASD 脳におけるシナプス競合不全のメカニズム解明と、シナプス競合メカニズムの制御による ASD 様症状の改善を試みる。具体的には以下の目的 A と目的 B に的を絞って研究をおこなう。なお、申請者は既に ASD モデルマウスの海馬 CA3 野にお

いて興奮性シナプス数が上昇することを発見している (図 3)。目的 A: 発達期における海馬 CA3 野のシナプス競合メカニズムおよびこれに関与する分子を解明する。目的 B: 成体期において、新生顆粒細胞の活動を制御することでシナプス競合を誘導し、ASD 様症状の改善を目指す。

3. 研究の方法

ASD モデルマウスの発達期の海馬におけるシナプス形成の特徴を構造的 (免疫染色法) および機能的 (電気生理学的手法) な側面から明らかにする。

シナプス競合が神経活動依存的である可能性を検証するために、DREADD (designer receptors exclusively activated by designer drugs) システムを利用し、苔状線維シナプスの競合に神経活動が関与する可能性を検証する。

4. 研究成果

本研究では、成体期において ASD 様行動を示す母体免疫活性化モデルマウスを利用した。具体的には、妊娠マウスに二重鎖 RNA である poly (Inosine: Cytosine) (poly(I:C)) を妊娠 12.5 日 (E12.5) および E17.5 において投与することで、免疫反応を惹起し、その仔を利用した。

まず、ASD 様行動が成体期においても改善できるかを検証した。発達期の運動が ASD 症状を緩和することが示唆されているため、これを成体期に適用し、生後 30 日齢 (P30) から 30 日間ケージにランニングホイールを入れ、マウスを自由に運動させた。運動後の P60 において、社会性について 3-チャンパー試験を用いて検証した。新奇マウスへの嗜好性を測定したところ、Poly(I:C) 群では低下したが、運動によりコントロール群と同程度まで回復した。また、常同行動について毛づくろいの時間を測定したところ、運動によりコントロール群と同程度まで減少した。以上の

結果より、成体期においても運動により ASD 様行動が改善されることが示唆された。

次に、ASD において機能異常を示す脳領域であるとともに、ランニングホイール運動によって他の脳領域よりも神経活動が強く上昇する領域でもある海馬に着目した。中でも、特に神経活動が強く上昇した歯状回顆粒細胞に着目し、その軸索である苔状線維が CA3 野の錐体細胞に形成するシナプスを検証した。蛍光免疫組織化学染色により synaptopodin (SPO) で標識した苔状線維終末および PSD95 (興奮性ポストシナプスマーカー) が共局在した領域を苔状線維シナプスと定義し、その密度を測定した。その結果、コントロール群では苔状線維シナプス密度が P15 から P30 にかけて減少した。一方、Poly(I:C) 群では、苔状線維シナプス密度が減少せず、P30 および P60 ではシナプス密度がコントロール群と比較して増加していた。また、成体期の運動により、Poly(I:C) 群においてシナプス密度がコントロールレベルまで減少した。以上の結果より、Poly(I:C) マウスにおいて、発達期における苔状線維シナプスの刈り込みが不全となっていることが示唆された。さらに、成体期の運動により苔状線維シナプスの除去が誘導され、シナプス密度が正常レベルに回復することが示唆された。

次に、Poly(I:C) 群において、発達期にシナプス除去が不全となるメカニズムおよび成体期の運動によりシナプス除去が誘導されるメカニズムを検証した。シナプス除去にはマイクログリアによるシナプス貪食が関与することが示唆されているため、マイクログリア内部のシナプスマーカーの体積をマイクログリアの体積で割った値をシナプスの貪食度合いとして算出した。その結果、発達期の Poly(I:C) 群ではマイクログリアによるシナプスの貪食度合いが減少していた。また、成体期の運動により、貪食度合いが増加した。さらに、運動と同時期にマイクログリアを抑

制するミノサイクリン (30 mg/kg) を投与した。その結果、ミノサイクリン投与により運動によるシナプス密度の減少が抑制された。以上の結果より、Poly(I:C) マウスにおいて、発達期のマイクログリアによるシナプス刈り込みが不全となっていることが示された。さらに、成体期の運動により、マイクログリアによるシナプス刈り込みが誘導されることが示された。

最後に、運動によりマイクログリアが活性化するメカニズムを検証した。シナプス除去には神経活動が重要であり、運動により歯状回顆粒細胞が活性化するため、神経活動の関与を検証した。神経活動の操作は、選択的ナリガンドである clozapine-N-oxide (CNO) を投与することにより神経活動を誘導できる designer receptors exclusively activated by designer drugs (DREADD、hM3Dq) をウイルスにより顆粒細胞に発現させることで行った。P30 において CNO を投与することで顆粒細胞を活性化し、1 日後にマイクログリアと DREADD を発現した苔状線維ブートンとの接触を検証したところ、接触率が減少した。このことから、マイクログリアが神経活動により除去すべきシナプスを区別していることが示唆された。また、マイクログリアによるシナプスの貪食度合いを検証したところ、CNO 投与群では、DREADD を発現したブートンが多いほど、すなわち、神経活動が誘導されたブートンが多いほど、貪食度合いが増加した。一方、saline 投与群では、DREADD を発現したブートンの量によらず、貪食度合いは一定であった。以上の結果より、神経活動の上昇により、マイクログリアが活性化しシナプスの貪食が増加することが示唆された。

本研究により、Poly(I:C) マウスにおいて、成体期における自発的なランニングホイール運動が海馬のマイクログリアを活性化させ、シナプスの刈り込みを誘導することが示

された。この現象により、Poly(I:C)マウスの海馬で確認されたシナプス密度の増加は、コントロールレベルにまで抑制された。さらに、ランニングホイール運動は、Poly(I:C)マウスで観察される自閉症様行動を緩和した。以上より、成体脳においてもマイクログリア依存的なシナプスの再編成を誘導できることが示唆された。さらに、マイクログリアによるシナプス再編成により成体期においてもASDを改善できる可能性が示唆された。

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)

Luo C, *Koyama R (Co-first), Ikegaya Y. Microglia engulf viable newborn cells in the epileptic dentate gyrus. *Glia*, 64:1508-1517, 2016. 10.1002/glia.23018

Andoh M, *Koyama R (Co-first), Ikegaya Y. Severity of kainic acid-induced seizures is not aggravated in the maternal immune activation mouse model of gestational poly(I:C) exposure. *Journal of Autism and Epilepsy*, 1:1013, 2016.

Kasahara Y, *Koyama R (Co-first), Ikegaya Y. Depth and time-dependent heterogeneity of microglia in mouse hippocampal slice cultures. *Neuroscience Research*, 111:64-69, 2016. 10.1016/j.neures.2016.05.001.

Mikami Y, Kanemaru K, Okubo Y, Nakaune T, Suzuki J, Shibata K, Sugiyama H, Koyama R, Murayama T, Ito A, Yamazawa T, Ikegaya Y, Sakurai T, Saito N, Kakizawa S, *Iino M. Nitric Oxide-induced Activation of the Type 1 Ryanodine Receptor Is Critical for Epileptic Seizure-induced Neuronal Cell Death. *EBioMedicine*, 16:30369-30373, 2016.

Ohki M, Sugiyama K, Kawaia F, Tanaka H, Nihei Y, Unzai S, Takebe M, Matsunaga S, Adachi S, Shibayama N, Zhou Z, Koyama R, Ikegaya Y, Takahashi T, Jeremy R.H. Tame RH J, Iseki M, *Park S. Structural basis for photoactivation of a

light-regulated adenylate cyclase from the photosynthetic cyanobacterium *Oscillatoria acuminata*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 113:6659-6664, 2016.

Tao K, Ichikawa J, Matsuki N, Ikegaya Y, *Koyama R. Experimental febrile seizures induce age-dependent structural plasticity and improve memory in mice. *Neuroscience*, 318:34-44, 2016.

Zhou Z, Tanaka KF, Matsunaga S, Iseki M, Watanabe M, Matsuki N, Ikegaya Y, *Koyama R. Photoactivated adenylyl cyclase (PAC) reveals novel mechanisms underlying cAMP-dependent axonal morphogenesis. *Scientific Reports*, 5:19679, 2016

Sajo M, Sugiyama H, Yamamoto H, Tanii T, Matsuki N, Ikegaya Y, *Koyama R. Neuraminidase-Dependent Degradation of Polysialic Acid Is Required for the Lamination of Newly Generated Neurons. *PLoS One*, 11:e0146398, 2016

Tao K, Matsuki N, and *Koyama R. AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) mediates activity-dependent axon branching by recruiting mitochondria to axon. *Developmental Neurobiology*, 74: 557-573, 2014.

Luo C, Ikegaya Y, and *Koyama R. Microglia and neurogenesis in the epileptic dentate gyrus. *Neurogenesis*, 3:e1235525, 2016.

*Koyama R. Dentate circuitry as a model to study epileptogenesis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 39:1-6, 2016. 10.1248/bpb.b16-00125

*Koyama R, and Ikegaya Y. Microglia in the pathogenesis of autism spectrum disorders. *Neuroscience Research*, 100:1-5, 2015.

安藤めぐみ、池谷裕二、小山隆太
自閉スペクトラム症とてんかん
日本薬理学雑誌、146:263-267, 2016.

周至文、羅聡、小山隆太
胎生期および小児期におけるストレスと将来の精神神経疾患

日本薬理学雑誌、146:263-267, 2015.

小山隆太

抗てんかん薬の現在とこれから
ファルマシア、51:947-951, 2015.

周至文、小山隆太

光活性化アデニル酸シクラーゼ：神経生物学
の発展につながる新たなツール
日本薬理学雑誌、146:119, 2015

小山隆太

熱性けいれんの前方視的研究「FEBSTAT
STUDY」への期待
日本薬理学雑誌、146:66, 2015.

小山隆太

自閉スペクトラム症とマイクログリア
細胞工学、34:472-475, 2015.

〔雑誌論文〕(計 18 件)

〔学会発表〕(計 54 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://ryutakoyama.jimdo.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小山 隆太 (Koyama Ryuta)

東京大学・大学院薬学系研究科・准教授

研究者番号：90431890

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()