

令和 2 年 5 月 11 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07058

研究課題名(和文) 発達期小脳神経回路形成に関わるミクログリア依存的メカニズムの解明

研究課題名(英文) Microglia permit climbing fiber elimination by promoting inhibitory synaptic transmission in the developing cerebellum

研究代表者

河村 寿子(中山寿子)(Kawamura-Nakayama, Hisako)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：70397181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳機能はシナプス結合を介したニューロン間の情報伝達によって実現する。シナプス結合は、発達初期に大まかに過剰に作られたのち、生育環境・経験に合わせて選別され、不要なシナプスは刈り込まれて機能的に成熟する。本課題では、小脳登上線維 プルキンエ細胞間シナプス結合をモデルに用いて、脳の免疫細胞であるミクログリアがシナプス刈り込みへどのような機構で関与するかを研究した。その結果、ミクログリアは抑制性シナプス伝達が適切に機能することに必須であり、ミクログリアによる抑制性シナプス成熟はプルキンエ細胞に内在する、抑制性シナプスに依存した登上線維刈り込みのプロセスを間接的に活性化することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ミクログリア由来因子によってニューロン間のシナプス機能が調節され、シナプス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した点で学術的意義がある。これにより、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。また、自閉症や統合失調症などでは脳の興奮と抑制のバランスの乱れに加えて、ミクログリア機能の破綻も指摘されているので、健常脳の発達過程において、ミクログリアが抑制性シナプス伝達を修飾するという本研究成果は、それらの精神・神経疾患の病態の理解と治療方法の解明に貢献するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Synapse elimination during postnatal development is mainly regulated by neuronal interactions. Recent studies suggest participation of microglia in this process, but it is unclear how microglia cooperatively act with neuronal mechanisms. To examine roles of microglia, we ablate microglia by microglia-selective deletion of Csf1r by crossing floxed-Csf1r and Iba1-Cre mice (Csf1r-cKO). In Csf1r-cKO mice, refinement of climbing fiber (CF) to Purkinje cell (PC) innervation after P10&#8211;P12 is severely impaired. However, there is no clear morphological evidence suggesting massive engulfment of CFs by microglia. In Csf1r-cKO mice, inhibitory transmission is impaired and CF elimination is restored by diazepam, suggesting that impairment of CF elimination is caused by a defect of inhibition on PCs, a prerequisite for CF elimination. These results indicate that microglia primarily promote inhibitory transmission and secondarily facilitate the mechanism for CF elimination inherent in PCs.

研究分野：神経生理学

キーワード：小脳 プルキンエ細胞 シナプス刈り込み ミクログリア 登上線維 パッチクランプ

1. 研究開始当初の背景

神経回路は初め遺伝的プログラムに従って大まかに配線されたのち、生育環境や経験に従って再編されて機能的に成熟した神経回路になると考えられている。神経回路形成初期に過剰に形成されたシナプス結合は、再編の過程で、競合し選別され、刈り込まれて除去されるシナプス結合と強化されて維持されるシナプス結合とに選別される。これら発達期の神経回路再編が不適切であることが、自閉症などの精神疾患の一因である可能性も示唆されているので、発達期のシナプス再編の制御メカニズムを解明することはそれらの病態の理解と改善にも貢献すると期待される。

我々はこれまで、生後発達期のシナプス再編の制御メカニズムの解明を目指して、マウス小脳皮質の登上線維 - プルキンエ細胞間シナプス結合をモデル系として用いて研究を行ってきた。成熟動物のプルキンエ細胞は、一本の登上線維からのみ強力な興奮性シナプス入力を受けているが(単一支配)、誕生直後のプルキンエ細胞には各々は小さい興奮しか誘導しない複数本の登上線維から興奮性入力を受けている(多重支配)。マウスでは生後 3 週間の間に多重支配から単一支配に移行する(図 1)。

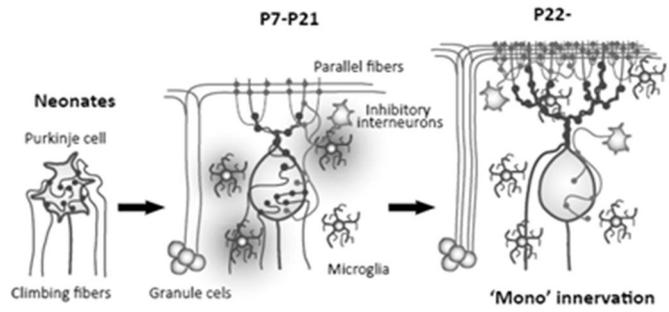


図 1. 登上線維からプルキンエ細胞へのシナプス結合の発達変化

出生直後のプルキンエ細胞には複数本の登上線維がシナプス結合する。各々のプルキンエ細胞に入力する登上線維の本数は生後 7 日目頃までは増加するが、その後、減少し、生後 3 週目終わりまでに、1 本を残して他は除去される(シナプス刈り込み)。登上線維-プルキンエ細胞間シナプス結合の他、生後 2-3 週目の小脳皮質では、様々なシナプス結合の形成と発達がダイナミックに進行する。

これまでに登上線維シナプスの刈り込みに関わる分子が多数同定されているが、それらの殆どは、シナプス前部または後部のニューロンに発現し、ニューロン内ではたらくものである。しかし、登上線維-プルキンエ細胞間シナプス結合の再編がニューロン間の相互作用に加えて、アストロサイトやマイクログリアといったグリア細胞や細胞外マトリクスによる制御も受けるのか否かについては未だ不明点が多い。

本研究課題開始以前に我々は、登上線維シナプスの刈り込みの正常な進行を支えるための外部因子として、脳内の免疫機能を担うマイクログリアの関与について検討を進めてきた。当初、小脳においては、マイクログリアの分布・形態に関する基本的な知見すら殆どなかったため、生後の小脳神経回路形成期のマイクログリアの小脳皮質内分布の解析から開始した。形態学的観察の結果、登上線維の刈り込み開始以前の生後 1 週目ではマイクログリアは白質内に局限しているが、刈り込みが開始する生後 2 週目以降では皮質にも分布した。特に、生後 8-9 日目に、一過性に、マイクログリアがプルキンエ細胞層に局在化する様子も認められた。生後 2 週目初めのプルキンエ細胞の細胞体では登上線維シナプスが抑制性シナプスに置換わる時期に相当するため、プルキンエ細胞層に集積するマイクログリアがそれら抑制性シナプスの形成や機能に作用する可能性が示唆された。そこで、遺伝子改変によってマイクログリアを除去したマウス(マイクログリアの分化・維持に必須である *csf1r* 遺伝子の floxed マウス(ジャクソン研究所)と *Iba1-cre* マウス(新潟大学・崎村健司教授と阿部学先生)の交配により得られた遺伝子組み換えマウス)を作成し、発達時期を追って登上線維シナプスの刈り込みを解析したところ、各々のプルキンエ細胞にシナプス入力する登上線維本数は生後 6-8 日目にはコントロール群と有意な差はなかったが、10-12 日目以降、マイクログリアが減少したマウスのほうが登上線維の投射本数が有意に多いという結果を得た。すなわち、マイクログリアは登上線維の初期投射には大きな影響を与えないが、生後 10-12 日目以降のシナプス刈り込みには必要であることが明らかになった。また、マイクログリアが登上線維シナプスの刈り込みに臨界期をもって作用するかを検証した。クロドロン酸内包リボソームを生後 8-9 日目または生後 12-13 日目の小脳皮質に注入し注入部位周辺のマイクログリアを除去したところ、生後 8-9 日目に薬剤を注入した場合のみ、登上線維シナプスの刈り込みが障害された。このことから、マイクログリアは生後 8-12 日目の登上線維シナプスの刈り込みに重要な役割を果たすことが示唆された。

2. 研究の目的

上述の、登上線維の単一支配化には少なくとも生後 8-12 日目のマイクログリアが必要であるという研究結果をさらに推し進めて、本研究課題で我々は、マイクログリアがどのような機構で登上線維の単一支配化に関与するのかを明らかにすることを目的として研究を実施した。マイクログリアは脳内で免疫機能を担う細胞であり、異物を貪食し除去する作用の他、様々な生理活性物質の提示または放出によって抗炎症作用のみならず炎症誘発作用も有することが知られている。そこで本課題では、マイクログリアが不要な登上線維シナプスを貪食する可能性と、何らかの生理活性因子の提示・放出によって、既に登上線維シナプスの刈り込への関与が示されている機構(平行線維-プルキンエ細胞間シナプス、および、GABA 作動性介在ニューロン-プルキンエ細胞間シナプスの形成・機能など)を修飾し、間接的に登上線維シナプスの刈り込みに貢献する可能性という、ふたつの可能性を検討した。

### 3. 研究の方法

全ての実験は、広島大学および東京女子医科大学の動物実験規則と組換え 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(ジャクソン研究所、stock no. 021212)と Iba1-Cre マウス(新潟大学・崎村建司先生、阿部学先生)との交配により得られたミクログリア欠損マウス(Csf1r<sup>lox/lox</sup>;Iba1<sup>cre/cre</sup> マウス)を用いた。

電気生理実験： 生後 5-60 日目のマウス(雄および雌)は CO<sub>2</sub> 麻酔を施したうえで断頭し、小脳虫部の急性スライス(厚さ 250 μm)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、ピクロトキシン (100 μM, Tocris)存在下で、記録プルキンエ細胞近傍の顆粒細胞層を電気刺激して誘発される登上線維シナプス後電流 (CF-EPSCs)、分子層刺激で誘発される平行線維シナプス後電流 (PF-EPSCs)を測定し、それらの波形から入力線維の本数やシナプス伝達の電気生理学的性質を解析した。微小抑制性シナプス後電流 (mIPSCs)の記録は、ピクロトキシンの代わりに、テトロドトキシン (1 μM, Wako) と NBQX (10 μM, Tocris)を添加した細胞外液中で行った。シナプス応答の記録中、細胞外液は 32 に保持した。

登上線維の順行性標識： 生後 7-9 日目の野生型マウスの延髄をイソフルラン吸入麻酔下で露出させ、Alexa568 標識デキストラン (10 % in PBS, 10,000 MW; Invitrogen)を充填したガラス電極を下オリブ核に刺し、電気泳動的 (10 μA, 700 ms, 0.5 Hz, 20 min)に Alexa 標識デキストランを下オリブ核に注入した。2-3 日間通常飼育したのちに灌流固定し、マウス小脳虫部から切片を作成、抗 Iba1 抗体 (1:500, #019-19741, Wako)による免疫染色を行った。

登上線維の変性： 生後 7 日目の野生型マウスに対して上述の方法で登上線維を標識し、生後 9 日目に 3-アセチルピリジン (75 μg/g b.w.)、3 時間後にハルマリン (15 μg/g b.w.)、さらに 1.5 時間後にニコチンアミド (300 μg/g b.w.)を順次腹腔投与した。一連の薬剤投与の 1-10 日後に灌流固定、Iba1 抗体染色を施し、形態観察を行った。

ジアゼパムの投与： ジアゼパム (10 μg/g b.w.)は、後 9-12 日目のミクログリア欠損マウスに対して生後 9-12 日目に 1 日 1 回腹腔注射して投与した。対照群のミクログリア欠損マウスには、同体積の溶媒 (40 % プロピレングリコール、10 % エタノール、50 % 滅菌水)を腹腔注射した。薬剤投与マウスは、生後 21 日目以降まで通常飼育したのちに上述の方法で電気生理実験に用いた。

免疫組織染： マウスをペントバルビタール (200 μg/g b.w.)を腹腔投与して深麻酔し、4 % パラホルムアルデヒドで灌流固定した。厚さ 50 μm のピラトーム小脳切片を作成し、以下の一次抗体と動物種特異的な Alexa, DyLight 405 または Cy3 標識二次抗体を用いて免疫染色を行った。画像取得には、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM700, Zeiss)と蛍光顕微鏡 (KEYENCE BZ-X700)を用いた。一次抗体と希釈率は以下の通り。Rabbit anti-Iba1 (1:500, #019-19741, Wako)、rabbit or mouse anti-NeuN (1:1,000, #MAB377, Merck)、mouse anti-GFAP (1:500, #MAB3402, clone GA5, Merck)、chicken anti-MBP (1:100, #AB9348, Merck)、rabbit anti-neurogranin (1:200, #AB5620, Merck)、goat または rabbit anti-calbindin (1:200, #Calbindin-Go-Af1040 or #Calbindin-Rb-Se-1, Frontier Institute)、rabbit anti-VGAT (1:200, #VGAT-Rb-Af500, Frontier Institute)、goat or guinea pig anti-parvalbumin (1:200, #PV-Go-Af460; 1:500, #PV-GP-Af1000, Frontier Institute)、sheep anti-PRGN (1:250, #AF2557, R&D systems)。

### 4. 研究成果

2017 年度には、ミクログリアによる登上線維の貪食の有無を検討する実験を行った。Alexa568 結合デキストランで登上線維を順行性標識したうえで小脳切片を作成し、抗 Iba1 抗体による免疫染色を行い、Iba1 標識ミクログリアに内包された Alexa 標識登上線維断片の頻度を解析した。その結果、刈込みが盛んに起こる生後 10 日目頃においても、プルキンエ細胞層付近にあって、登上線維断片を内包したミクログリアは極めて低頻度でしか認められなかった。しかしながら、ミクログリアに取り込まれた Alexa 標識登上線維がリソソームで分解されるために Alexa 蛍光を検出できないという懸念も考えられた。そこで、我々の実験系で、ミクログリア内に取り込まれた Alexa 蛍光を検出できることを確かめる実験を行った。登上線維を Alexa 標識デキストランで順行性標識したのちに、3-アセチルピリジン、ハルマリン、ニコチンアミドを順次腹腔投与して登上線維を変性させたマウスを作成し、灌流固定、Iba1 抗体染色を施して共焦点顕微鏡による観察を行った。この場合には、ミクログリアに内包された Alexa 標識登上線維断片を認めることができた。ゆえに、Alexa 標識登上線維断片がミクログリア内に認められないのは実験条件に起因するのではなく、ミクログリアが登上線維断片を貪食することによってシナプス刈込みの一翼を担うのではないことが示唆された。

次に、登上線維シナプスの刈込みに関与すると報告のある平行線維シナプス伝達と抑制性シナプス伝達 (mIPSCs)を、ミクログリア欠損マウスを用いて解析した。その結果、平行線維シナプス伝達に有意な変化は認められなかったが、mIPSCs の振幅と頻度が 10-12 日目に有意に減弱しているという結果を

得た。我々の先行研究で、生後 10 日目頃の抑制性シナプス伝達が減弱すると登上線維シナプスの刈り込みに障害がでることが分かっている。そこで、ミクログリア欠損マウスで認められた抑制性シナプス伝達の減弱がシナプス刈り込み異常の原因であるかを確認した。生後 9-12 日目のミクログリア欠損マウスにジアゼパムを腹腔投与し抑制性シナプス伝達を促進したところ、登上線維の刈り込み異常が正常化した。従って、正常発達においてミクログリアは抑制性シナプス伝達を促進することによって、登上線維シナプスの刈り込みを促進する作用があることが示唆された。

2018 年度には、研究成果をまとめて論文投稿しリバイスのために必要な追加実験を行った。ミクログリア欠損マウスの小脳皮質で、ミクログリア以外の構成細胞に変化が生じていないかを確認するために、小脳皮質を構成する細胞(プルキンエ細胞、顆粒細胞、分子層抑制性介在ニューロン、ゴルジ細胞、バークマン細胞)のマーカー分子を用いて免疫染色を行った。ミクログリア欠損マウスの分子層の厚さに僅かな減少が認められたが、各細胞の分布および密度に変化は認められず、ミクログリア欠損マウスにおいても小脳皮質の層構造および構成細胞の配置と密度に大きな異常はないことが確認された。また、ミクログリア欠損マウスでは生後 10-12 日目にプルキンエ細胞で記録される抑制性シナプス伝達が減弱していた点について、抑制性シナプス結合の減少を伴う変化であるかを調べた。抑制性シナプス終末を VGAT 抗体で可視化したところ、染色強度の有意な減弱が認められた一方で、プルキンエ細胞層における VGAT 陽性終末の密度には有意差はなかった。ゆえに、ミクログリア欠損マウスで認められた抑制性シナプス伝達の減弱は、シナプス密度の減少ではなく、GABA<sub>A</sub> 受容体発現の低下などを伴う変化を反映する可能性が示唆された。2018 年度までの実験結果から、小脳皮質においてミクログリアは生後 2 週目にプルキンエ細胞への抑制性シナプス伝達の機能的成熟を促進することを介して、登上線維の単一支配化に関与するという趣旨の論文を *Nature Communications* 誌に発表した。

2019 年度には、2018 年度に論文報告した研究結果をさらに推し進めて、ミクログリアが抑制性シナプス伝達を修飾する際に関与する分子を明らかにするための実験を行った。ミクログリアで発現することが知られている幾つかの分子に着目し、それらの分子がミクログリアによるプルキンエ細胞への抑制性シナプス伝達の機能成熟を媒介する因子である可能性について、電気生理学的に検討した。登上線維のシナプス刈り込み期にあたる生後 9-13 日目のミクログリア欠損マウスの小脳スライス上のプルキンエ細胞から mIPSCs を記録し、mIPSCs の振幅または頻度に影響を与えるミクログリア関連因子を探索した。その結果、2 つの分子、プログラニュリン(PRGN)と TNF $\alpha$ を見出した。PRGN(100 ng/ml, #2557-PG-050, R&D systems)または TNF $\alpha$ (10 ng/ml, #410-MT-010, R&D systems)を含有する ACSF で小脳スライスを 32 で 2-3 時間プレインキュベーションし、PRGN(70 ng/ml)または TNF $\alpha$ (5 ng/ml)を含有する ACSF 中で記録した mIPSCs の振幅と頻度は、通常 ACSF でプレインキュベーション、記録した場合よりも増加しており、発達同日齢の野生型マウスの mIPSCs の振幅と頻度に近づくという結果を得た。また、発達初期の野生型マウス小脳皮質において PRGN を発現する細胞を PRGN 抗体を用いて調べたところ、生後 5-10 日目頃までは PRGN は主にミクログリアで発現することが分かった。議論はあるものの、生体における PRGN 受容体としては、Sortilin, EphA2 に加えて TNF 受容体(TNFR)も挙げられていることから、今回見出された PRGN と TNF $\alpha$ の mIPSCs に対する増強作用が、共通の TNFR を介する可能性も考えられ大変興味深い。今後、PRGN と TNF $\alpha$ の mIPSCs に与える影響が生体内でも機能しているかを検討するために、Iba1-cre マウスを用いた PRGN, TNF $\alpha$ 、および候補受容体 TNFR のミクログリア特異的欠損マウスの作成や、これらの分子をウイルスを用いてミクログリアでノックダウンする実験などを行い、シナプス刈り込みへの影響を解析しすることによって、発達期小脳皮質においてミクログリアが抑制性シナプス伝達を修飾する際に関与する分子の解明を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakayama H, Abe M, Morimoto C, Iida T, Okabe S, Sakimura K, Hashimoto K.	4. 巻 Jul 19;9(1)
2. 論文標題 Microglia permit climbing fiber elimination by promoting GABAergic inhibition in the developing cerebellum.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2830
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-018-05100-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sakai Y, Kassai H, Nakayama H, Fukaya M, Maeda T, Nakao K, Hashimoto K, Sakagami H, Kano M, Aiba A.	4. 巻 Feb 26;9(1)
2. 論文標題 Hyperactivation of mTORC1 disrupts cellular homeostasis in cerebellar Purkinje cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2799
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-38730-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Hisako Nakayama, Manabu Abe, Chie Morimoto, Kenji Sakimura, Kouichi Hashimoto
2. 発表標題 Microglia permit climbing fiber refinement by promoting inhibitory synaptic transmission in the developing cerebellum.
3. 学会等名 Latest Advances in Development & Function of Neuronal Circuits meeting（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hisako Nakayama
2. 発表標題 Microglia permit climbing fiber pruning by promoting synaptic inhibition in the developing cerebellum.
3. 学会等名 9th FAOPS, 第96回 日本生理学会大会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山 寿子, 阿部 学, 森本 千恵, 崎村 建司, 橋本 浩一
2. 発表標題 小脳におけるミクログリア依存的神経回路発達
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hisako Nakayama, Shin Suzuki, Manabu Abe, Kenji Sakimura and Kouichi Hashimoto
2. 発表標題 Contribution of microglia to postnatal development of neuronal circuits in the cerebellum.
3. 学会等名 新学術領域研究「グリアアセンブリによる脳機能発現の制御と病態」第4回夏のワークショップ
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hisako Nakayama, Manabu Abe, Chie Morimoto, Tadatune Iida, Shigeo Okabe, Kenji Sakimura and Kouichi Hashimoto
2. 発表標題 Microglia-dependent refinement of the cerebellar circuit during postnatal development.
3. 学会等名 新学術領域研究「グリアアセンブリによる脳機能発現の制御と病態」第5回成果報告会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hisako Nakayama, Manabu Abe, Chie Morimoto, Tadatune Iida, Shigeo Okabe, Kenji Sakimura and Kouichi Hashimoto
2. 発表標題 Microglia-dependent GABAergic synaptogenesis promotes refinement of climbing fibers to Purkinje cell synapses
3. 学会等名 第8回新潟大学脳研究所共同研究拠点国際シンポジウム “The innovative progress of neuroscientific research through the use of advanced animal models” (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂井 祐介, 葛西 秀俊, 中山 寿子, 深谷 昌弘, 前田 達也, 中尾 和貴, 橋本 浩一, 阪上 洋行, 狩野 方伸, 饗場 篤
2. 発表標題 mTORC1シグナル亢進による小脳プルキンエ細胞の細胞内ホメオスタシスの攪乱
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山寿子, 宮田麻理子
2. 発表標題 発達期視床のヒゲ経験依存的シナプス再編における神経活動の役割
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----