

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

# マイクログリア依存的な成体脳シナプス再編成

氏名 柴田 和輝

#### 【序論】

発達期の脳では、脳内免疫細胞であるマイクログリアが不要なシナプスを貪食により刈り込む。一方で、成体期の脳におけるシナプス再編成にマイクログリアが関与する可能性とそのメカニズムは未解明である。本研究では、シナプス密度の過度な上昇が病因の一つとされる自閉スペクトラム症 (autism spectrum disorder, ASD) をモデルとして、成体脳におけるマイクログリアのシナプス刈り込み能力を検証した。ASD は、社会性の低下や常同行動の顕在化などを主症状とする疾患であるが、運動がこれらの症状を緩和する可能性が示唆されている。そこで、ASD 様行動を呈するモデルマウスを利用し、マウスの自発的な運動がマイクログリアによるシナプス刈り込みを誘導してシナプス密度を正常レベルに戻す可能性を検証した。

#### 【結果・考察】

##### 1. ASD モデルマウスにおいて、成体期の運動により ASD 様行動が改善する

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 (図 1A)。運動後の P60 において、社会性について 3-チャンバ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)マウスでは低下したが、運動によりコントロールマウスと同程度まで回復した (図 1B)。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マウスと同程度まで減少した (図 1C)。以上の結果より、成体期においても運動により ASD 様行動が改善することが示唆された。

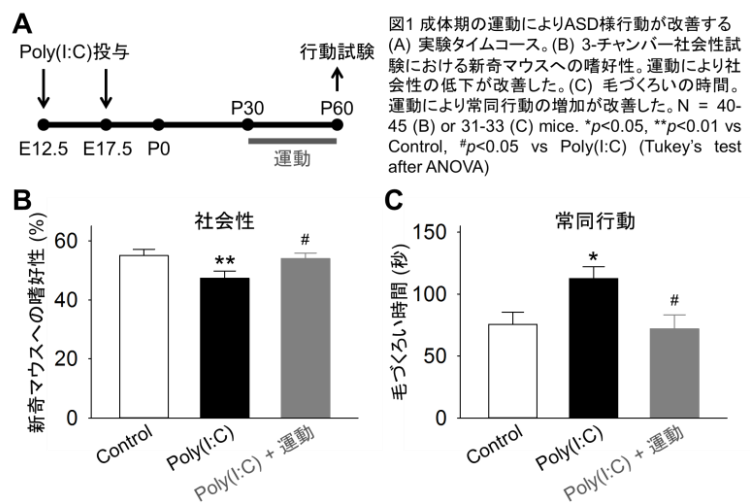


図1 成体期の運動によりASD様行動が改善する (A) 実験タイムコース。 (B) 3-チャンバー社会性試験における新奇マウスへの嗜好性。運動により社会性の低下が改善した。 (C) 毛づくろいの時間。運動により常同行動の増加が改善した。N = 40-45 (B) or 31-33 (C) mice. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs Control, # $p < 0.05$  vs Poly(I:C) (Tukey's test after ANOVA)

## 2. ASD モデルマウスにおいて、成体期の運動により海馬苔状線維シナプスの除去が誘導される

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 synaptoporin (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 (図 2A, B)。その結果、コントロールマウス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)マウスでは、苔状線維シナプス密度が減少せず、P30 ではコントロールマウスに対して有意に増加しており、これは P60 まで維持されていた (図 2C)。また、成体期の運動により、Poly(I:C)マウス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 (図 2C)。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。

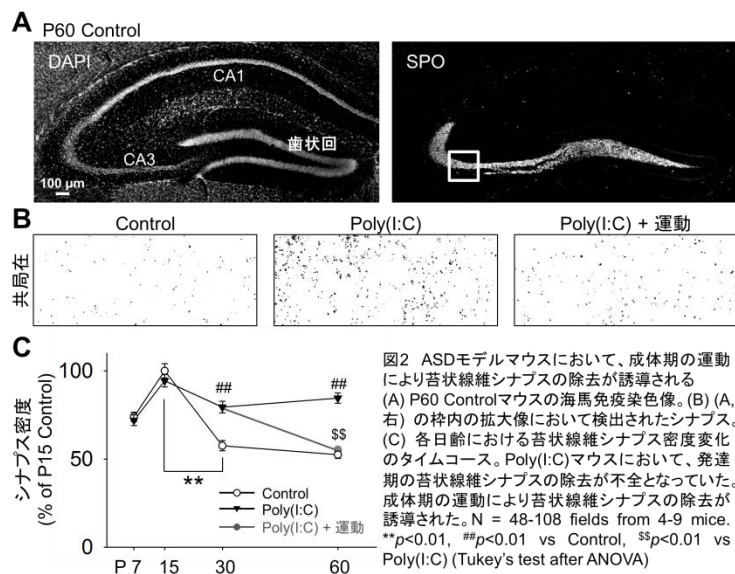


図2 ASDモデルマウスにおいて、成体期の運動により苔状線維シナプスの除去が誘導される (A) P60 Controlマウスの海馬免疫染色像。 (B) (A, 右) の枠内の拡大像において検出されたシナプス。 (C) 各日齢における苔状線維シナプス密度変化のタイムコース。Poly(I:C)マウスにおいて、発達期の苔状線維シナプスの除去が不全となっていた。成体期の運動により苔状線維シナプスの除去が誘導された。N = 48-108 fields from 4-9 mice. \*\* $p < 0.01$ , ## $p < 0.01$  vs Control, ## $p < 0.01$  vs Poly(I:C) (Tukey's test after ANOVA)

### 3. 成体期の運動により誘導されるシナプス除去はマイクログリア依存的である

Poly(I:C) マウスにおいて、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

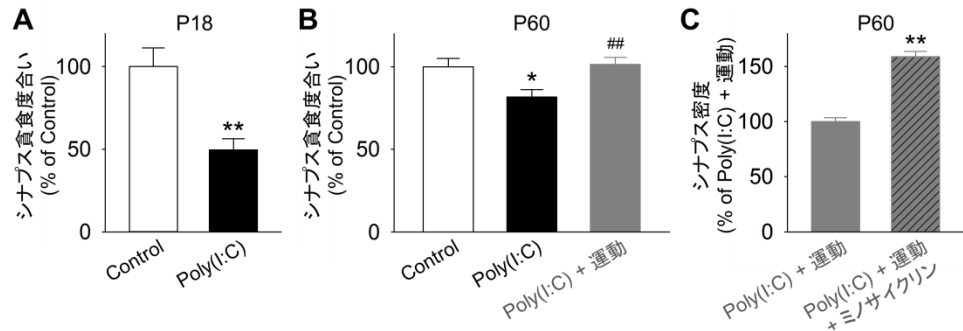


図3 ASDモデルマウスにおいて、成体期の運動によりマイクログリア依存的に苔状線維シナプスの除去が誘導される (A) P18におけるマイクログリアによる苔状線維シナプスの貪食度合い。Poly(I:C)マウスにおいてマイクログリアによるシナプスの貪食が減少していた。(B) P60におけるマイクログリアによる苔状線維シナプスの貪食度合い。運動によりマイクログリアによるシナプスの貪食が増加した。(C) 運動およびミノサイクリン投与後の苔状線維シナプス密度。ミノサイクリンの投与によりシナプス除去の誘導が阻害された。N = 33-35 fields from 8 mice (A), 66-72 fields from 11-12 mice (B), 60-70 fields from 5-6 mice. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs Control, ## $p < 0.01$  vs Poly(I:C) (Student's *t*-test or Tukey's test after ANOVA)

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)マウス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 (図 3A)。また、成体期の運動により、貪食度合いが増加した (図 3B)。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 (図 3C)。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。

### 4. 歯状回顆粒細胞を活性化することで、マイクログリアによるシナプスの貪食が誘導される

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 (図 4A)。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 (図

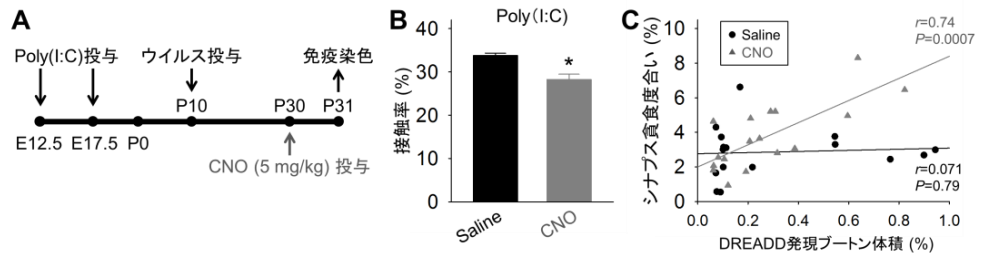


図4 歯状回顆粒細胞の活性化によりマイクログリアによる苔状線維シナプスの貪食が誘導される (A) 実験タイムコース。(B) P31におけるマイクログリアとDREADDを発現した苔状線維ブートンの接触率。CNO投与により顆粒細胞を活性化することで、マイクログリアによるブートンへの接触が減少した。N = 3 mice (saline: 398ブートン, CNO: 332ブートン) \* $p < 0.05$  (Student's *t*-test) (C) DREADDを発現した苔状線維ブートンの体積とマイクログリアによるシナプス貪食度合いの相関。CNO投与により、DREADDを発現した苔状線維ブートンの体積が多いほど、シナプス貪食度合いが増加した。Saline投与では一定であった。N = 16-17 fields from 3 mice.

が減少した (図

4B)。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 (図 4C)。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。

#### 【総括】

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 ASD 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。