

# 神経回路再編成におけるグリア活動の役割とその分子メカニズムの解析

Title in English Roles of glial activity in neural circuit refinement

(日本神経科学学会推薦)

代表研究者 東京大学 上阪 直史 The University of Tokyo Naofumi Uesaka

During postnatal development of the nervous system, necessary synapses (connections between neurons) are strengthened and maintained, while unnecessary synapses are weakened and eventually removed. This process is known as "synapse elimination" and is an important step in the maturation of immature neural circuits into functional ones. Recently, it has been reported that glial cells such as microglia and astrocytes are involved in the removal of unnecessary synapses during synapse elimination. However, the involvement of glia in the removal of unnecessary synapses in the process of synapse elimination has only been clarified, and many mysteries remain to be solved. I have found that the cerebellar astrocyte Bergmann's glia shows calcium activity during synapse elimination. In this study, we aimed to elucidate the dependence of cerebellar climbing fiber-Purkinje cell synapse elimination (a representative model of synapse elimination) on glial activity and its mechanism. First, I detected and manipulated the calcium activity of Bergmann glia using calcium imaging, optogenetics and chemical genetics to elucidate the relationship between Bergmann glia activity and synapse elimination. Furthermore, I screened for molecules that affect synapse elimination by knocking down or knocking out gene expression in Bergmann's glia.

## 研究目的

生まれたばかりの動物の神経系には、シナプスが過剰に存在している。例えばヒトの大脳皮質の場合、シナプスの密度は成熟脳の2倍程度にのぼる (Huttenlocher, 1990)。しかしこの時期のシナプスは機能的に未熟であり、動物個体としても脳機能は未熟な状態にある。成長につれて、一部のシナプスは強められて残存し、その他のシナプスは弱められ最終的に除去されることにより、成熟した機能的神経回路が完成する (シナプス刈り込み)。生後発達期のシナプス刈り込みの異常は自閉スペクトラム症や統合失調症の病態の基盤にあると広く考えられており、精神神経疾患の病態解明の点からも極めて高い注目を集めている。

近年、網膜—外側膝状体シナプスにおいてアストロサイトやマイクログリアが食細胞として働き、C1q, MEGF10などの分子を介して発達期シナプス刈り込みに関与することが報告された (Stevens et al., 2007; Chung et al., 2013)。また小脳においてもマイクログリアや小脳特有のアストロサイトであるバグマングリアが登上線維シナプスの刈り込みに関わることが報告されている (Iino et al., 2001; Watase et al., 1998; Miyazaki et al., 2017; Nakayama et al., 2018)。しかし、グリアが発達期シナプス刈り込みを制御する様式や分子メカニズムはこれら以外わかっておらず、多くの謎が残されている。このような状況下で申請者はシナプスが刈り込まれる時期に小脳特有のアストロサイトであるバグマングリアが活発に活動していること、バグマングリアの活動を操作した時にシナプス刈り込みが異常になることを見出した。本研究では、バグマングリアに注目し、バグマングリアがシナプス刈り込みを制御する様式やその分子メカニズムを明らかにすることを目指した。

## 研究経過

まず、バグマングリアの  $\text{Ca}^{2+}$ 活動が出生後の発達期にどの程度発生しているかを調べた。バグマングリアでカルシウム指示タンパクである  $\text{GCaMP6f}$  を発現させた遺伝子改変マウスを用いた。まず、このマウスのバグマングリアが  $\text{GCaMP6f}$  を発現しているかどうか免疫組織化学染色により確認した。 $\text{GCaMP6f}$  を発現している細胞のほとんどが、バグマングリアを含むアストロサイトのマーカーである  $\text{S100}\beta$  に対して陽性であることを確認した。次に発達中のバグマングリアの自発的な  $\text{Ca}^{2+}$ 活動を *in vivo* の 2 光子  $\text{Ca}^{2+}$ イメージングを用いて記録した。マウスを軽く麻酔し、その頭を固定しイメージングした。バグマングリアは、プルキンエ細胞層と分子層内を脳膜表面に伸びる放射状の突起とプルキンエ細胞層にある細胞体とによって同定した。その結果、バグマングリアの  $\text{Ca}^{2+}$ 活動の振幅と頻度は、バグマングリアの細胞体と突起の両方で、生後の発達中に変化しなかった。これらの結果から、バグマングリアの  $\text{Ca}^{2+}$ 活動は生後の発達期にはほとんど変化していないことが示唆された。

小胞体 (ER) からの  $\text{Ca}^{2+}$ 放出は、アストロサイトにおける  $\text{Ca}^{2+}$ 活動の主要な供給源の一つと考えられている (Kanemaru ら、2014) ため、アストロサイトの小胞体に存在することが知られている 2 型イノシトール三リン酸受容体 (IP3R2) に着目した。IP3R2 のノックアウト (KO) マウスを用いて、IP3R2 の欠失がバグマングリアにおける  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルを阻害するかどうかを解析した。まず発達期の小脳皮質で IP3R2 の発現を調べた。IP3R2 に対する抗体を用い免疫組織化学染色した結果、生後 14 日目の野生型マウスの小脳バグマングリアにおいて IP3R2 のシグナルが検出された。IP3R2 シグナルは、バグマングリアの細胞体とその放射状突起の両方で見られた。一方、IP3R2-KO マウスでは、IP3R2 シグナルは検出されなかった。また、バグマングリアの形態は、野生型マウスと IP3R2-KO マウスとで差がないことを GFAP による免疫染色で確認した。

IP3R2-KO マウスのバグマングリアにおいて  $\text{Ca}^{2+}$ 活動を解析した。遺伝的にコードされたカルシウム指示タンパクをバグマングリアに発現させるために、アストロサイト特異的プロモーター  $\text{GfaABC1D}$  の制御下で  $\text{GCaMP6f}$  を発現できるアデノ随伴ウイルス (AAV) を用いた。この AAV を  $\text{Ca}^{2+}$ イメージング実験の約 1 週間前に発育中のマウス小脳に注入した。その後、生後 10 日目から 14 日目において  $\text{GCaMP6f}$  を発現したバグマングリアの  $\text{Ca}^{2+}$ 活動を *in vivo*  $\text{Ca}^{2+}$ イメージングにより解析した。マウスはイメージングを通して軽く麻酔し、自発的な  $\text{Ca}^{2+}$ 活動をモニターした。 $\text{Ca}^{2+}$ 活動の振幅や頻度は、バグマングリアの突起部では変化が見られなかった。一方、バグマングリアの細胞体部では  $\text{Ca}^{2+}$ の振幅や頻度が IP3R2-KO マウスでは有意に減少していた。これらの結果は、バグマングリアの細胞体における  $\text{Ca}^{2+}$ 活動の発生は IP3R2 を介した ER からの  $\text{Ca}^{2+}$ 放出に部分的に由来することを示している。

次に、IP3R2-KO マウスを用いて、IP3R2 欠損が登上線維シナプスの刈り込みに影響を与えるかどうかを調べた。小脳では、対側下オリブのニューロンの軸索である登上線維がプルキンエ細胞の細胞体に興奮性シナプスを形成している。新生齧歯類の小脳では、各プルキンエ細胞はほぼ等しいシナプス入力量を持つ複数 (~5 本) の登上線維から入力を受ける。その後、1 本の登上線維が選択的にシナプス入力量を強め、他の登上線維に比べて強くなる。強くなった登上線維 (勝者の登上線維) はプルキンエ細胞の樹状突起に沿ってシナプス領域を拡大する。この登上線維とは対照的に、弱い登上線維 (敗者の登上線維) のシナプスは、勝者の登上線維の一部のシナプスとともにプルキンエ細胞の細胞体に残っている。これらの細胞体に残っているシナプスは 1 週間以上かけて除去されていき、最終的に細胞体にある登上線維シナプスはすべて除去される。これらの過程を経て、各プルキンエ細胞は単一の登上線維により支配させる (単一支配)。IP3R2-KO マウスがシナプス刈り込み異常を示すか調べるために、小脳のスライスを作製し、プルキンエ細胞からホールセルパッチクランプ記録を行った。登上線維は顆粒細胞層で電気的に刺激した。プルキンエ細胞を支配している登上線維の数を以下による推定した。登上線維からのシナプス伝達によりプルキンエ細胞で発生する興奮性シナプス後電流 (EPSC) は離散的なステップを示す。そのステップ数は記録しているプルキンエ細胞にシナプスを形成している登上線維の数とほぼ同じと考えられる (Kano et al, 1997)。野生型マウスでは、約 80% のプルキンエ細胞が単一の登上線維 EPSC ステップを有していたのに対し、2~3 ステップの登上線維 EPSC を有するプルキンエ細胞は 20% に過ぎなかった。対照的に、IP3R2-KO マウスでは約 50% のプルキンエ細胞が 2~3

ステップの登上線維 EPSC を有していた。統計的な比較をした結果、IP3R2-KO マウスのプルキンエ細胞は、コントロールマウスよりも有意に多くの登上線維を有していた。これらの結果は、IP3R2-KO では登上線維シナプスの除去が障害されていることを示している。すなわち IP3R2 が登上線維シナプスの除去に必要であることを示している。

これまでの研究では、L-グルタミン酸/L-アスパラギン酸トランスポーター (GLAST) がバグマングリアで強く発現し (Watase ら、1998)、GLAST がプルキンエ細胞上にあるシナプスを包囲することに必要であることが報告されている (Miyazaki ら、2017)。さらに GLAST-KO マウスのプルキンエ細胞では振幅の小さい登上線維 EPSC が 2 種類観察される。一方は典型的な登上線維 EPSC に類似した速い立ち上がり時間 ( $\leq 1\text{ms}$ ) を有し、他方は非典型的な遅い立ち上がり時間 ( $> 1\text{ms}$ ) を有している。後者は登上線維がプルキンエ細胞の遠位樹状突起上にシナプスを作っており、樹状突起フィルタリングによって EPSC が減衰していることを反映していると考えられる (Watase et al., 1998; Miyazaki et al., 2017)。IP3R2-KO マウスが GLAST-KO マウスと同じ表現型を示すか調べるために、IP3R2-KO マウスのプルキンエ細胞で立ち上がり時間が遅い ( $> 1\text{ms}$ ) 非定型登上線維 EPSCs が存在するかどうかを調べた。その結果、コントロールマウスと IP3R2-KO マウスの両方では非定型登上線維 EPSCs はほとんど見られなかった。これらの結果は、IP3R2-KO マウスの表現型は GLAST-KO マウスとは異なり、登上線維がプルキンエ細胞の遠位樹状突起上に非定型的なシナプスを持たないことを示唆している。

次に、IP3R2-KO マウスにおいて登上線維のプルキンエ細胞樹状突起への移行と登上線維シナプス末端がプルキンエ細胞の細胞体上に残存しているかどうかを形態学的解析により調べた。プルキンエ細胞樹状突起に沿った登上線維の末端の高さを分子層の厚さで割り、登上線維の相対的な高さを測定した。IP3R2-KO マウスでは、コントロールマウスよりも登上線維末端の相対的な高さが低いことを見出した。また、プルキンエ細胞の細胞体周辺の登上線維末端の数を計測した。その結果、IP3R2-KO マウスでは、59% のプルキンエ細胞の細胞体周囲に 1 つ以上の登上線維末端が認められたのに対し、コントロールマウスでは 29% のプルキンエ細胞にしか認められなかった。これらの結果は、IP3R2-KO マウスでは、プルキンエ細胞の樹状突起への登上線維の移行とプルキンエ細胞の細胞体からの登上線維末端の除去の両方が障害されていることを示している。

## 考察

本研究では、IP3R2 が小脳のアストロサイトであるバグマングリアに発現し、バグマングリアの細胞体で  $\text{Ca}^{2+}$  活動を誘導し、登上線維シナプスの除去を促進することを示した。バグマングリアの細胞体はプルキンエ細胞の細胞体と空間的に近接しているため、バグマングリアの細胞体でおこる IP3R2 依存性  $\text{Ca}^{2+}$  活動はプルキンエ細胞の細胞体からの登上線維シナプス除去を促進するシグナルを伝えている可能性が考えられる。現在、このバグマングリアからプルキンエ細胞あるいは登上線維シナプスに直接働きかけるシグナル分子を探索しており、今後の研究で明らかになると期待している。

## 参考文献

- 1 Huttenlocher, P. R. Morphometric study of human cerebral cortex development. *Neuropsychologia* 28, 517-527 (1990).
- 2 Watase, K. et al. Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice. *Eur J Neurosci* 10, 976-988, doi:10.1046/j.1460-9568.1998.00108.x (1998).
- 3 Nakayama, H. et al. Microglia permit climbing fiber elimination by promoting GABAergic inhibition in the developing cerebellum. *Nat Commun* 9, 2830, doi:10.1038/s41467-018-05100-z (2018).

- 4 Miyazaki, T. et al. Glutamate transporter GLAST controls synaptic wrapping by Bergmann glia and ensures proper wiring of Purkinje cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 7438-7443, doi:10.1073/pnas.1617330114 (2017).
- 5 Chung, W. S. et al. Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature* 504, 394-400, doi:10.1038/nature12776 (2013).
- 6 Iino, M. et al. Glia-synapse interaction through Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors in Bergmann glia. *Science* 292, 926-929, doi:10.1126/science.1058827 (2001).
- 7 Kano, M. et al. Persistent multiple climbing fiber innervation of cerebellar Purkinje cells in mice lacking mGluR1. *Neuron* 18, 71-79, doi:S0896-6273(01)80047-7 [pii] (1997).
- 8 Kanemaru, K. et al. In vivo visualization of subtle, transient, and local activity of astrocytes using an ultrasensitive Ca(2+) indicator. *Cell Rep* 8, 311-318, doi:10.1016/j.celrep.2014.05.056 (2014).

## 研究の発表

### 口頭発表

1. 遺伝研研究会「哺乳類脳の機能的神経回路の構築メカニズム」  
Astrocytes regulate synapse elimination in the developing cerebellum 上阪直史 2020年12月11日
2. 口腔病学会講演会 神経回路形成機構の解明に基づく咀嚼嚥下機能の理解 上阪直史  
2020年10月28日
3. 第62回 歯科基礎医学会学術大会 運動機能を司る小脳の発達：咀嚼嚥下の機能発達の理解を目指して-  
上阪 直史 2020年9月22日

### ポスター発表

4. 第98回 日本生理学会大会  
Astrocytes regulate synapse elimination in the developing cerebellum through type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor 上阪 直史,赤松 翼,鈴木 穂香,狩野 方伸
5. 日本神経科学学会 転写因子 ZFP64 は小脳の発達過程において P/Q 型電位依存性カルシウムチャネルを介する経路で登上線維の刈り込みを促進する 張 劍玲、渡邊 貴樹、上阪 直、狩野 方伸 2020年7月29日
6. 日本神経科学学会 Protocadherin 10 は一部のアルドラーゼC陽性の小脳プルキンエ細胞において発達期の登上線維シナプスの刈り込みを遅延させる 渡邊 貴樹、鈴木 穂香、佐郡 和人、井上 秀太郎、赤松 翼、阿部 学、崎村 建司、上阪 直史、狩野 方伸

### 誌上発表

なし