

氏 名 宮本 愛喜子

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1690 号

学位授与の日付 平成26年3月20日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Microglia contribute to excitatory synapse formation in
developing mouse neocortex

論文審査委員 主 査 教授 池中 一裕
教授 鍋倉 淳一
教授 吉村 由美子
教授 中西 博 九州大学

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

論文内容の要旨
Summary of thesis contents

論文題目: Microglia contribute to excitatory synapse formation in developing mouse neocortex.

It has recently been reported that microglia, the immune cells of the central nervous systems (CNS), actively interact with synapses in their resting state. Resting microglia selectively and physically contact synapses in the intact brain, and are also involved in synapse elimination in immature brain and in the penumbra region, the cortical area adjacent to ischemic core. This synapse elimination contributes to neural circuit reorganization during development, and possibly to circuit recovery from injury. However, although activated microglia can release several molecules related to synapse formation (e.g. thrombospondins (TSPs), neurotrophins), whether microglia can also actively contribute to synapse formation is not known. Therefore in this study, I focused on 1) whether microglia are involved in synapse formation in the intact mice neocortex during the developmental period when rapid increase in excitatory synapses occurs (postnatal day (P) 8-10), and 2) the possible mechanisms underlying any of such effects observed.

To elucidate whether microglia play any roles in synaptogenesis in the developing neocortex, I separately visualized and analyzed both microglia and neurons. I used Iba1-EGFP mice, in which enhanced green fluorescent protein (EGFP) is selectively expressed in microglia of the CNS. To visualize layer (L) 2/3 pyramidal neurons, I performed *in utero* electroporation of embryonic day (E) 14-15 Iba1-EGFP mice with constructs which express red fluorescent protein. Using these mice, I could simultaneously observe microglia and neurons, and detect any contacts or interactions between the two, using *in vivo* two-photon imaging under physiological conditions. During *in vivo* time-lapse imaging, the formation of dendritic protrusion was detected

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

following microglia contact with dendrites. The formation rate of these protrusion was significantly higher in dendritic regions that had been contacted by microglia, as compared with adjacent dendritic regions (10 μm lateral) in which contacts had not generally been observed. Ninety percent of these newly formed protrusions had a filopodia structure. Although these filopodia sometimes retracted or disappeared during an imaging session, their overall survival rate was not significantly different from other newly formed filopodia. Real time imaging (with higher temporal resolution) revealed that the protrusions were usually formed very soon (< 10 minutes) after microglia contact. Thus, microglia contact with dendrites appears to be involved in the initiation of filopodia.

I also observed microglia-neuron interactions at P12-14 and at P26-30. However, there was no significant difference in the formation rate of filopodia between microglia contacted and adjacent dendritic regions, indicating the microglia associated filopodia formation was age-specific. It is known that microglia in the immature brain show an activated morphology. Injection of minocycline, which inhibits the activation of microglia, decreased microglia-induced filopodia formation. To investigate possible mechanisms mediating microglia-related spine formation, I checked TSP expression using immunohistochemistry and revealed that TSP1 was present in P8 microglia processes. Co-expression of TSP1 and EGFP (in Iba1-EGFP mice) was reduced at P14 and virtually absent in adult microglia. Confocal imaging indicated that TSP1 is present within the microglia themselves. Furthermore, multiple dosing of mice with gabapentin (GBP), a blocker of TSP1 receptor $\alpha 2\delta$ -1 subunit of voltage-dependent Ca^{2+} channel, significantly decreased filopodia formation. Together these data suggest that TSP1 is released from activated microglia and involved in the microglia-induced filopodia formation. Filopodia are known to be actin rich structures and I proposed that actin accumulation was needed for the structural re-arrangements accompanying

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

filopodia formation. To visualize actin filaments, I cultured P5 cortical slices and transfected them with pCMV-lifeact-mCherry by ballistic gene transfer. Lifeact is a peptide that binds to actin. Real time imaging revealed that actin accumulated at the microglia contacted dendritic site, and filopodia formed at the peak of this actin accumulation. This suggests that microglia contact attracts the recruitment and formation of actin for filopodia formation.

Finally I investigated whether microglia contact mediated filopodia become functional synapses. Double transgenic mice were generated by crossing Iba1-tetracycline transactivator (Iba1-tTA) mice and tetracycline operator-diphtheria toxin A (tetO-DTA) mice. This enabled the selective ablation of microglia upon withdrawal of doxycycline (Dox) from the diet. The density of microglia was significantly decreased three days after of Dox removal, and spine density was significantly decreased by six days of Dox removal during P5-11. Minocycline injected mice had reduced spine density. Miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) were recorded from L2/3 pyramidal neurons, and mEPSCs frequency was significantly reduced in microglia-ablated mice. These data indicate that microglia-induced filopodia mature into functional synapses during cortex development.

In conclusion, microglia contribute to excitatory synapse formation through filopodia formation at L2/3 pyramidal neurons in developmental mice neocortex. This indicate that microglia contribute not only to neuronal circuit rearrangement but also to circuit formation.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

これまで中枢神経系の免疫担当細胞であるミクログリアについての研究は病態・傷害時の働きについてのものが主体であったが、近年、正常時のミクログリア突起が選択的にシナプス構造に接触することや接触を受けたシナプス前部・後部が除去されることが報告され、発達期や障害部位における神経回路編成にミクログリアが関与することが示唆されている。一方で活性化したミクログリアからはシナプス形成に関与すると考えられる種々の分子が放出されることが知られており、また、発達期ミクログリアの形態観察を行うと成体マウスのミクログリアと比較して細胞体の面積は大きく、突起の数や支配領域は小さいという活性化型に近い形態をしていることが明らかとなった。そこで、今回出願者は生後発達期のシナプス形成にミクログリアが関与するかどうか検討を行った。

ミクログリア特異的に緑色蛍光タンパク質（EGFP）を発現しているIba1-EGFPマウスに対して子宮内電気穿孔法を行い、大脳皮質感覚野2/3層の興奮性神経細胞を赤色蛍光タンパク質で可視化した生後8-10日目（P8-P10）のマウスにおいて、ミクログリアと樹状突起との接触観察を生体内二光子イメージングによって観察した結果、ミクログリアの接触後にフィロポディアが形成されることを見いだした。また、マウス大脳皮質のスライス培養標本を用いた実験においてミクログリアが接触した樹状突起の部位にアクチンが集積してくる様子が観察され、その後フィロポディアが形成されることを観察した。

このミクログリアによるフィロポディア形成が発達期に特異的に生じるか、P12-14、P26-30のマウスを用いて同様の観察を行った。P12-14、P26-30では接触領域と近傍領域のフィロポディアの形成確率に有意な差は見られなかったことから、ミクログリアは発達期の限られた時期にのみ、フィロポディア形成に寄与していることが判明した。フィロポディア形成にはミクログリアが活性化型であることが必要であると考え、ミノサイクリンの腹腔内投与を行いミクログリアの活性を抑えたところ、ミクログリア接触領域でのフィロポディアの形成確率は優位に減少した。活性化型ミクログリアからはシナプス形成に関与することが報告されているトロンボスポンジン（TSP）や神経成長因子（BDNF）が放出されることが報告されているので、免疫組織化学法を用いて発達期ミクログリアでのこれらの発現を検討した。BDNFの発現は確認されなかったが、P8のミクログリアの突起部分において多くTSP1が発現していることが判明した。一方、P14ではTSP1の発現は大幅に減少しており、P60ではほとんど発現していないという結果が得られた。P8のミクログリアがTSP1を放出している可能性が示唆されたので、TSP1の受容体である膜電位依存性Ca²⁺チャンネル α 2 δ -1サブユニットの阻害薬であるギャバペンチンを腹腔内投与すると接触領域でのフィロポディア形成確率は優位に減少した。以上の結果から、ミクログリアによるフィロポディア形成には活性化したミクログリアから放出されるTSP1の関与が示唆された。

ミクログリアにより形成されたフィロポディアがシナプス形成に関与しているかどうか確認を行った。ミノサイクリンを投与したマウスの脳を灌流・固定し、スパイン密度を対照群と比較したところ優位に減少していた。また、ミクログリア特異的にジフテリア毒素を発現させ、ミクログリア選択的に除去したマウスでも同様の結果が得られたので、ミクログリアによるフィロポディア形成は発達期におけるスパイン形成に寄与していると考えられる。さらに、ミクログリアを除去したマウスから作成した脳薄切片を用いて微小興奮性シナプス後電位の頻度を確認したところ対照群と比較して優位に減少していた。よって、ミクログリアにより形成さ

(Separate Form 3)

れたフィロポディアは機能的シナプスの形成に寄与していると考えられる。

以上の結果から大脳皮質体性感覚野の発達期において、時期特異的にミクログリアがフィロポディアの形成を介して機能的シナプスの形成に寄与していることが示され、その科学的価値は極めて高く評価できる。以上の理由から、審査委員会は、全員一致で、本論文が学位論文として相応しいものであると判断した。