

博士論文

マイクログリアによるシナプス貪食メカニズムの
リアルタイムイメージングによる解明

氏名 安藤 めぐみ

目次

背景	1
実験方法	3
結果	8
考察	17
図	26
引用文献	49
謝辞	58

【背景】

神経細胞はプレシナプスとポストシナプスから構成されるシナプスという微小構造を介して情報を伝達する (図 1A)。そのため、シナプスの適切な結合による神経回路の構築が正常な脳機能の発揮に重要である。シナプスの結合は、シナプスの形成・除去・活動変化によって調節され、これらが生物の生涯に亘って繰り返されることにより神経回路のダイナミクスが実現されている (図 1B)。近年、シナプスの結合が脳内免疫細胞であるマクログリアによるシナプスへの接触や貪食、液性因子の放出によって制御されることが示された (図 1B、Tremblay et al., 2010; Paolicelli et al., 2011; Li et al., 2012; Schafer et al., 2012; Lim et al., 2013; Miyamoto et al., 2016)。マクログリアは脳内の主要な貪食細胞であることから、特にシナプスの貪食について精力的に研究が進められてきた。そして、マクログリアは主にプレシナプスを貪食することや (Weinhard et al., 2018)、プレシナプスの貪食に関わる様々な分子メカニズムが示唆されている (Paolicelli et al., 2011; Schafer et al., 2012; Filipello et al., 2018; Lehrman et al., 2018; Li et al., 2020; Scott-Hewitt et al., 2020; Cong et al., 2020)。

従来の研究では、マクログリアがシナプスを貪食することや、その分子メカニズムは、電子顕微鏡や蛍光顕微鏡を用いた固定組織標本の観察により検証されてきた。これらの方法では、マクログリアの中にシナプスタンパク質が存在する、ということを示すことはできるが、マクログリアがシナプスを貪食する過程を明らかにすることはできない。そのため、マクログリアによるシナプスの貪食には未だ 2 つの大きな疑問が残されている。1 つ目は、マクログリアはどのようにしてシナプスを貪食したのか、という点である。神経科学では、マクログリアが生きた神経細胞からシナプスのみを貪食可能であることが前提として研究が行われる場合がほとんどであるが、これを実験的に示した研究はない (図 1C)。また、生きた神経細胞からシナプスを貪食可能であるとしても、貪食の際に神経細胞の突起構造が保たれるのか、という点も不明である。もし突起が

切断されてしまうと、その後の神経細胞の生死や活動に悪影響を及ぼす可能性がある (図 1D)。そして 2 つ目の疑問は、マイクログリアは貪食するシナプスをどのようにして決定するのか、という点である。これまで、シナプス貪食を制御する様々な分子が報告されてきたが、それらの分子が付着したシナプスの中で、特定のシナプスが貪食されるメカニズムは不明である (図 1E)。

そこで本研究では、マイクログリアによるシナプス貪食をリアルタイムイメージングにより証明すること、マイクログリアが特定のシナプスを貪食するメカニズムを解明すること、そして特定のシナプスの貪食が脳機能に与える影響を解明すること、を目的とした。

【実験方法】

実験動物

東京大学大学院薬学系研究科のガイドラインに従い、実験動物への苦痛を最小限に抑える努力の下、CX3CR1-GFP トランスジェニックマウス (JR#005582, The Jackson Laboratory, Maine, America)、CR3 ノックアウトマウス (JR#003991, The Jackson Laboratory)、および C57BL/6J マウス (SLC, Shizuoka, Japan) を用いた。これらのマウスは、自由摂食・摂水下、午前7時から午後7時まで点灯の条件で飼育した。マイクログリアの培養に際しては、CX3CR1-GFP トランスジェニックマウスと C57BL/6J マウスとを交配させて作製したヘテロ接合体を用いた。

使用薬液の組成および調整法

Ca²⁺, Mg²⁺-free Hank's balanced salt solution (HBSS (-))

NaCl 8.00 g、NaHCO₃ 0.35 g、Na₂HPO₄·12H₂O 0.12 g、KCl 0.40 g、KH₂PO₄ 0.06 g、D-glucose 24 g を蒸留水 1 L に溶かし、0.2 μm フィルター滅菌 (28 mm Syringe filter 0.2 Micron; Corning) して使用した。

Horse serum (HS) (Thermo Fisher Scientific)

0.2 μm フィルター滅菌 (28 mm Syringe filter 0.2 Micron; Corning) して使用した。

Fetal bovine serum (FBS) (Thermo Fisher Scientific)

56°Cの湯浴中にて 30 分間非働化を施したものを使用した。

Ca²⁺, Mg²⁺-free phosphate-buffered saline (PBS (-))

KH₂PO₄ 0.2 g、Na₂HPO₄·12H₂O 2.9 g、KCl 0.2 g、NaCl 8.0 g を蒸留水 1 L に溶か

し、0.2 μm フィルター滅菌 (28 mm Syringe filter 0.2 Micron; Corning) して使用した。

4% Paraformaldehyde in PBS (PFA)

Paraformaldehyde 40.00 g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 27.65 g を蒸留水 1 L に加え、60°C で溶かした後、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.95 g を溶かして使用した。

In vitro

磁気分離法によるマイクログリアの単離

本研究では、Neural Tissue Dissociation Kit (P) (Miltenyi Biotec) を用い、添付された工程書に従ってマイクログリアを単離した。単離したマイクログリアは、24 ウェルプレートに入れた poly-D-lysine をコーティングしたカバーガラス上に播種し、培養した。

マイクログリアと神経細胞の共培養

本研究では、まず皮質のマイクログリアを培養し、後から海馬の神経細胞を加え共培養した。皮質のマイクログリア、海馬の神経細胞の単離は、それぞれ先行研究を参考にしている (Schildge et al., 2013; Seibenhener and Wooten, 2012)。

アデノ随伴ウイルスの作製

アデノ随伴ウイルスの作製はコスモ・バイオ株式会社が公表する工程 (https://www.cosmobio.co.jp/support/technology/cbl_aav-genedelivery/cbl-aav-01.asp) に従って、当研究室にて作製した。

培養標本の固定および免疫細胞化学染色

培養したカバーガラスまたはガラスベースディッシュを 4% PFA に 15 分間浸漬させ、細胞を固定した。PBS (-) で 5 分間の洗浄を 3 回行った後、0.3% Triton-X100、10% goat serum (GS; Vector Laboratories) を含む PBS (-) を室温にて 1 時間処置し、0.3% Triton-X100、10% GS を含む一次抗体溶液を 4°Cにて 16 時間処置した。PBS (-) で 5 分間の洗浄を 3 回行った後、0.3% Triton-X100、10% GS を含む二次抗体溶液を室温にて 4 時間処置した。PBS (-) で 10 分間の洗浄を 3 回行った後、DAPI を含む VECTASHIELD (ナカライテスク) を使用し封入した。一次抗体は以下のものを使用した: chicken anti-GFP (1:1000), rabbit anti-RFP (1:1000), rabbit anti-c-Fos (1:5000), rat anti-mouse CD11b (1:500)。二次抗体はそれぞれの一次抗体に対応した動物種の Alexa Fluor 488-, 594-, and 647-conjugated 二次抗体 (1:500) を用いた。

蛍光画像の取得と定量

培養サンプルの観察には SpinSR10 (Olympus) を使用した。リアルタイムイメージング、固定標本共に、以下の対物レンズと Z 軸間隔の組み合わせにより画像を取得した (10 倍: 2 μm 、20 倍: 1 μm 、40 倍: 0.5 μm 、60 倍: 0.33 μm)。カルシウムイメージングには FN1 (Nikon) を使用し、16 倍の対物レンズにより単一平面の画像を取得した。画像の解析には、NIH ImageJ (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いた。

In vivo

熱性けいれんの誘導

熱性けいれんの誘導は、当研究室が発表した論文 (Kasahara et al., 2019) に従って行った。

カイニン酸投与によるけいれん発作の誘導

熱性けいれん誘導の3日後、マウスの腹腔内にカイニン酸 (Tocris, 3 mg/kg) を投与し、時間経過に伴うけいれん発作を観察した。けいれん発作の悪性度は Racine scale (Racine, 1972) を参考に評価した。

灌流固定切片の作製と免疫組織化学染色

マウスにイソフルラン麻酔を施し 4% PFA により灌流固定した後、全脳を摘出し、4% PFA 中にて 24 時間の後固定を行った。その後、ヴィヴラトームを用いて 100 μ m 厚の切片を作製し、PBS (-) に浮遊させ免疫染色を行った。固定された切片を PBS (-) で洗浄し、10% Goat serum および 0.3% Triton-X100 を含む PBS (-) を室温にて 1 時間処置した後、0.3% Triton-X100、10% GS を含む一次抗体溶液を 4°C にて 16 時間処置した。PBS (-) で洗浄後、0.3% Triton-X100、10% GS を含む二次抗体液を室温にて 4 時間以上反応させた。PBS (-) で 10 分間の洗浄を 3 回行った後、切片をスライドに貼り付け、DAPI を含む VECTASHIELD を使用し封入した。一次抗体は以下のものを使用した: guinea pig anti-VGLUT1 (1:1000), guinea pig anti-VGAT (1:1000), rabbit anti-Homer1 (1:500), rabbit anti-Gephyrin (1:1000), anti-mouse Reelin (1:500), mouse anti-GAD67 (1:500), rabbit anti-c-Fos (1:5000), chicken anti-GFP (1:1000), rabbit anti-Iba1 (1:400), rat anti-CD68 (1:500), rabbit anti-Cleaved Caspase-3 (1:400), rabbit anti-C1q (1:100), rabbit anti-human C3d (1:100), rat anti-mouse CD11b (1:500)。二次抗体はそれぞれの一次抗体に対応した動物種の Alexa Fluor 488-, 594-, and 647-conjugated 二次抗体 (1:500) を用いた。

蛍光画像の取得と定量

観察には FV1200 (Olympus) を使用し、以下の対物レンズと Z 軸間隔の組み合わせにより画像を取得した (20 倍: 2 μm 、60 倍: 0.33 μm 、100 倍: 0.33 μm)。画像の解析には、NIH ImageJ (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いた。なお、1 匹のマウスから 6 領域撮影、解析した値の平均値を 1 例の値としてプロットした。

【結果】

1. シナプス貪食のリアルタイムイメージングによる証明

In vitro リアルタイムイメージングシステムの構築

マイクログリアによるシナプス貪食をリアルタイムで詳細に観察するため、本研究では *in vitro* 実験系を利用した。しかしながら、従来の方法で培養したマイクログリアは、過剰に活性化した形態を示し *in vivo* のマイクログリアに見られる細長く分岐した突起を失うため、シナプス貪食の検証には不適切であるとされてきた (図 2A)。この問題点を克服するため本研究では、マイクログリアを脳内の他の細胞種と共培養し、培地組成や培養タイムコースを詳細に条件検討することで、*in vivo* に近いマイクログリアの形態を再現することに成功した (図 2A)。また、本研究ではマイクログリアが GFP で標識された遺伝子改変マウス (CX3CR1-GFP⁺マウス) から培養を作製することで、マイクログリアのリアルタイムイメージングを可能とした。次に、この培養システムにアデノ随伴ウイルスを適用し、神経細胞のプレシナプスおよび突起を RFP、iRFP により標識し、これらを同時にリアルタイムイメージングすることを可能にした (図 2B)。

マイクログリアは神経細胞の突起を切断することなくシナプスのみを貪食する

共焦点顕微鏡を用いて本培養システムのリアルタイムイメージングを行ったところ、マイクログリアがプレシナプスを取り込む様子を複数回観察することに成功した (図 2C, D)。マイクログリアは自身の枝分かれした突起の先端部分でシナプスをつかむように接触しており、細長く分岐した突起構造がシナプス貪食に重要であることが伺える (図 2C, D)。次に、貪食の前後において神経細胞の突起構造を観察した。すると、マイクログリアによってシナプスが完全に貪食された後も神経細胞の突起構造が保たれていた (図 2C, D)。この結果から、マイクログリアは神経細胞の突起を切断することなくシナプス部分のみを貪食可能であることが明らかとなった。

2. マイクログリアが特定のシナプスを貪食するメカニズムの解明

神経活動上昇が補体依存的なシナプス貪食を促進する

次に、本培養システムを用いて、マイクログリアが特定のシナプスを貪食するメカニズムを検証した。そのメカニズムを担う分子として、補体分子である C1q に着目した。先行研究では、C1q が補体経路を活性化させ、マイクログリアの C3 受容体が C1q の下流分子である C3 を認識することでシナプス貪食が促進されることが示唆されている (Schafer et al., 2012)。また、この補体経路は、発達期の脳におけるシナプス除去やアルツハイマー病脳におけるシナプス損失に関与することが報告されている (Schafer et al., 2012; Hong et al., 2016)。そこで、本培養システムに C1q のサブユニット A (C1qA) のリコンビナントタンパク質 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; abcam) を添加し、シナプス貪食が促進される可能性を検証した。C1qA 添加後 2 時間に亘ってリアルタイムイメージングを行い、マイクログリアが貪食したシナプスの数を測定した (図 3A, B)。その結果、単位時間あたりのシナプス貪食数はコントロール群と C1qA 添加群とで同程度であり、シナプス貪食の促進には別の因子が必要であることが示唆された (図 3C)。

そこで本研究では、神経活動に着目した。多くの先行研究により、神経活動を上昇させるとマイクログリアによる神経細胞への接触が促進されることが報告されている (Wake et al., 2009; Li et al., 2012; Eyo et al., 2014; Andoh et al., 2019; Andoh et al., 2020; Cserép et al., 2020)。そのため、神経活動の上昇により、マイクログリアがシナプスに付着した補体分子を認識しやすくなる可能性が考えられる。神経活動を上昇させるため、本研究では Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drug (DREADD) システムを利用した。DREADD は改変型の G タンパク質共役型受容体であり、デザイナーリガンドである Clozapine N-oxide (CNO) により特異的に活性化される。本研究では、アデノ随伴ウイルスを用いて興奮性の DREADD である hM3Dq を神経細胞に発現させ、培地に CNO (20 μM ; Tocris) を添加することで神経活動の上

昇を試みた。まず、CNO 添加により神経活動が上昇することを、神経活動マーカーとして頻用される c-Fos の発現上昇により確認した (図 3D, E)。次に、C1qA 添加と神経活動上昇とを組み合わせ、シナプス貪食のリアルタイムイメージングを行い、マイクログリアが貪食したシナプスの数を測定した (図 3A, B)。その結果、C1qA 添加や神経活動上昇単独ではシナプス貪食数が変化しなかった一方、C1qA を添加し、かつ神経活動を上昇させた群でのみシナプス貪食数が有意に増加した (図 3C)。次に、各処置の前と 24 時間後における、マイクログリア内に取り込まれたシナプスの体積を比較した (図 3F)。すると、図 3C の結果と一致するように、C1qA 添加と神経活動上昇を組み合わせた群でのみ、処置前と比較してマイクログリア内に取り込まれたシナプスの体積が有意に増加した (図 3G)。以上の結果から、神経活動上昇が補体依存的なシナプス貪食を促進する可能性が示された。

神経活動上昇が補体依存的なシナプス貪食を促進するメカニズム

では、神経活動上昇はいかにして補体依存的なシナプス貪食を促進するのだろうか。先述の通り本研究では、神経活動上昇がマイクログリアによるシナプスへの接触を増加させ、マイクログリアがシナプスに付着した補体を検知する確率が上昇するとの仮説を立てた。そこで、C1qA 添加または神経活動上昇の処置の 12 時間後から 2 時間に亘ってリアルタイムイメージングを行い、マイクログリアによる神経細胞への接触度合を測定した (図 4A)。すると、C1qA 添加または神経活動上昇のいずれか一方では接触度合が変化しなかった。一方で、その両方を処置した場合には接触度合が有意に増加した (図 4B)。この結果から、神経活動上昇はマイクログリアによるシナプスへの接触促進とは別のメカニズムによりシナプス貪食を促進する可能性が考えられる。

そこで、神経活動上昇がシナプス貪食を促進するメカニズムとして、アポトーシス関連分子に着目した。近年、プレシナプスに限局して、アポトーシスマーカーである

Cleaved Caspase-3 や Phosphatidylserine が発現しうることが報告されている (Györfly et al., 2018, 2020)。また、Cleaved Caspase-3 が Phosphatidylserine の露出を促進すること (Mandal et al., 2002) や、Cleaved Caspase-3 や Phosphatidylserine を発現するシナプスに C1q が共局在すること (Györfly et al., 2018, 2020) が示されている。そこで、持続的な神経活動上昇によってプレシナプスにおけるアポトーシス関連分子の発現が上昇し、プレシナプスへの C1q および C3 の付着が促進される可能性を考えた (図 4C, D (a-d))。また、神経活動上昇がマイクログリアの C3 受容体の発現を上昇させることで、補体依存的なシナプス貪食を促進する可能性を検証した (図 4C, D (e))。

まず、Phosphatidylserine の露出を定量するため、細胞膜表面に露出した Phosphatidylserine に結合する AnnexinV に 647 nm 波長の蛍光団が付与された AnnexinV-647 (Thermo Fisher Scientific) を、各処置の 24 時間後に培地に添加した。すると、興味深いことに AnnexinV-647 は一部のプレシナプスに限局して観察された (図 4E)。次に、個々のプレシナプスあたりの AnnexinV-647 の面積を測定したところ、コントロール群と比較して神経活動を上昇させた群では有意に増加した (図 4F)。この結果から、活動が上昇した神経細胞由来のシナプスにおいて、Phosphatidylserine の露出が促進されることが示された。

次に、各処置から 6 時間後のマイクログリアにおける C3 受容体の発現度合を免疫染色により検証した。マイクログリアの中でも、細胞体や突起など細胞内の部位によって C3 受容体のシグナルは異なる強度を示した (図 4G)。そこで、マイクログリアがプレシナプスに接触した部分における、C3 受容体の平均蛍光強度を定量したところ、神経活動を上昇させた群ではコントロール群と比較して有意に増加した (図 4H)。この結果から、神経活動が上昇した細胞のシナプスの周囲では、マイクログリアによる補体の検知が促進される可能性が示された。以上の結果より、持続的な神経活動の上昇が補体依存的なシナプス貪食を促進することが明らかになった。さらに、この現象はシナプ

スにおける Phosphatidylserine の露出促進やマイクログリアにおける C3 受容体の発現上昇を介していることが示唆された。

3. 熱性けいれん後にマイクログリアが抑制性シナプスを特異的に貪食する

熱性けいれん後に抑制性シナプス密度が減少する

In vitro 実験系で観察された、活動の高い神経細胞由来のシナプスの貪食は生体脳でも生じるのだろうか。そこで、マイクログリアの活性化や貪食能の亢進が確認されている、熱性けいれんモデルマウスを用いて検証した (Andoh et al., 2020)。これはヒトの乳幼児期に頻発する熱性けいれんを模倣しており、熱性けいれんは将来のてんかん発症を惹起する可能性が示されている。実験的には、幼児期のマウスの体温を人工的に 38°C 以上に保持することで、けいれん発作を誘導する (Koyama et al., 2012)。本研究では、脳領域のうち、てんかんの発作焦点である海馬に着目し、海馬の顆粒細胞に作られるシナプスについて検証した (図 5A)。まず、顆粒細胞が樹状突起を伸ばす領域である分子層における興奮性シナプスおよび抑制性シナプスの密度を測定した。本研究では、プレシナプスマーカー (興奮性:VGluT1、抑制性:VGAT) とポストシナプスマーカー (興奮性:Homer1、抑制性:Gephyrin) が共局在する部分をシナプスとした (図 5A)。その結果、熱性けいれん後に興奮性シナプス密度は変化しなかった一方で、抑制性シナプス密度が有意に減少した (図 5B, C)。

熱性けいれん後にマイクログリアが抑制性プレシナプスを貪食する

抑制性シナプス密度の減少がマイクログリア依存的である可能性を検証するため、マイクログリアによるシナプスの貪食を検証した (図 5D)。マイクログリアのリソソーム内に取り込まれた抑制性シナプスの体積を測定したところ、熱性けいれん後にはプレシナプス (VGAT) のみ貪食量が増加した (図 5G, H)。マイクログリアがプレシナプス特

異的に貪食することは、先行研究 (Weinhard et al., 2018) や本研究の *in vitro* 実験系の結果と一致している。また、興奮性シナプスについても検証したところ、マイクログリアによる興奮性シナプスの貪食量は、コントロール群と熱性けいれん群とで同程度であった (図 5E, F)。以上の結果から、熱性けいれん後にマイクログリアが抑制性プレシナプスを貪食することで、抑制性シナプス密度が減少することが明らかとなった。

4. 熱性けいれん後にマイクログリアが抑制性シナプスを特異的に貪食するメカニズム 熱性けいれん後に抑制性神経細胞が持続的に活動を上昇させる

熱性けいれんモデルにおいても、*in vitro* 実験系で発見した、持続的な活動上昇がシナプス貪食を促進するメカニズムが働く可能性を検証した (図 4C, D)。そこでまず、抑制神経細胞の活動について検証した。顆粒細胞に対して抑制性シナプスを形成する抑制性神経細胞に着目し、熱性けいれん後の神経活動マーカー (c-Fos) の発現度合を観察した (図 6A, B)。すると、熱性けいれんの 1 時間後には抑制性神経細胞の活動が上昇し始め、熱性けいれんの 4 時間後においても活動上昇が持続していた (図 6C)。一方、顆粒細胞に対して興奮性シナプスを形成する、嗅内皮質第 II 層の興奮性神経細胞における c-Fos の発現度合を観察すると、熱性けいれんの 1 時間後に増加したものの、4 時間後にはコントロールレベルまで低下した (図 6C)。これらの結果から、熱性けいれん後に抑制性神経細胞の活動が持続的に上昇することが示された。

熱性けいれん後に抑制性シナプスにおけるアポトーシス関連分子の発現が増加する

次に、活動が上昇した抑制性細胞のシナプスにおいて、アポトーシスマーカーである Caspase-3 が活性化する可能性を検証した。Cleaved Caspase-3、抑制性プレシナプス (VGAT) の免疫染色を行ったところ、熱性けいれん後には Cleaved Caspase-3 の量

が増加し、それらのほとんどが抑制性プレシナプスと共局在していた (図 7A)。この結果から、熱性けいれん後の持続的な活動上昇が Caspase-3 の活性化を引き起こす可能性が示された。

さらに、Cleaved Caspase-3 量の多いシナプスがマイクログリアによって貪食されやすいとの仮説を立て、これを検証した。そこで、マイクログリア、抑制性プレシナプス、Cleaved Caspase-3 の免疫染色を行い、これら 3 者の空間的分布を観察した (図 7B)。抑制性プレシナプスには、マイクログリアによって接触されるものとされないものが確認されたため、接触の有無により抑制性プレシナプスを 2 群に分け、それぞれのシナプスにおける Cleaved Caspase-3 の量を測定した (図 7C)。すると、マイクログリアが接触する抑制性プレシナプスにおける Cleaved Caspase-3 の量が、接触のない抑制性プレシナプスと比較して有意に増加した (図 7D)。これらの結果から、Cleaved Caspase-3 量の多いシナプスがマイクログリアによって貪食されやすい可能性が示された。

熱性けいれん後の抑制性プレシナプスの貪食は補体依存的である

熱性けいれん後にマイクログリアが補体依存的に抑制性プレシナプスを貪食する可能性を検証するため、まず抑制性プレシナプスへの補体の付着を観察した。抑制性プレシナプス (VGAT) と C1q または C3 の免疫染色を行ったところ、C1q、C3 共に熱性けいれん後に発現量が増加し、抑制性プレシナプスとの共局在も増加した (図 8A-F)。

次に、熱性けいれん後にマイクログリアによる補体の検知が促進される可能性を検証するため、C3 受容体の発現量を測定した。すると、C3 受容体の mRNA 量は熱性けいれんの 1 時間後および 4 時間後に有意に増加した (図 8G)。この結果と一致するように、C3 受容体のタンパク質発現も熱性けいれんの 6 時間後に有意に増加した (図 8H, I)。

熱性けいれん後の抑制性シナプスの貪食が補体依存的であることをより確実に示すため、C3 受容体のノックアウトマウスを用いて熱性けいれんを誘導した。すると、野生型マウスの熱性けいれんモデルマウスにおいて確認された、マイクログリアによる抑制性シナプスの貪食量の増加や、抑制性シナプスの密度の減少が生じなかった (図 8J, K)。以上の結果から、熱性けいれん後に補体経路 (C1q-C3-C3 受容体) が活性化されることで、マイクログリアによる抑制性プレシナプスの貪食が促進される可能性が示された。

5. 特定のシナプスの貪食が脳機能に与える影響

ここで私は、活動の高い神経細胞のシナプスが貪食されることの意義は何なのか、という疑問に直面した。神経科学一般的には、神経活動の上昇がシナプスの強化を介して記憶・学習能力の向上につながる事が報告されている (Ishikawa et al., 2014)。また、発達期の脳では、活動の低いシナプスがマイクログリアによって貪食され、活動の高いシナプスが残存することで神経回路が成熟することが示唆されている (Schafer et al., 2012)。では、活動の高い神経細胞由来のシナプスの貪食は、脳機能を悪化させてしまうのだろうか。そこで私は、活動上昇が持続すると、その神経細胞のシナプスが貪食され、神経回路の機能が変化する可能性を考えた。

熱性けいれん後の抑制性プレシナプスの貪食が神経回路の興奮性を上昇させる

マイクログリアによるシナプスの貪食が異常になると、神経回路の興奮抑制バランスが変化し、社会性行動などの脳機能の発揮に影響することが示されている (Andoh et al., 2019)。そこで、熱性けいれん後のマイクログリアによる抑制性プレシナプスの貪食が、神経回路の興奮抑制バランスを変化させる可能性を検証した。本研究では、熱性

けいれんの誘導後、グルタミン酸受容体のアゴニストであるカイニン酸の腹腔内投与によりけいれん発作を惹起し、けいれん感受性を評価した。

まず、熱性けいれんモデルマウスでは、けいれん発作スコアがコントロール群と比較して有意に増加した (図 8L)。この結果から、熱性けいれん後の抑制性シナプスの減少が、神経回路の興奮性を上昇させることが示唆された。さらに、C3 受容体のノックアウトによりマイクログリアによるシナプス貪食を阻害すると、野生型マウスで確認された、熱性けいれんによるけいれん発作スコアの増加が抑制された (図 8L)。以上の結果から、熱性けいれん後のマイクログリアによる抑制性プレシナプスの貪食が、神経回路の興奮抑制バランスを興奮性優位に変化させる可能性が示された。

【考察】

本研究は、マイクログリアによるシナプス貪食のリアルタイムイメージングのシステムを確立し、これを用いて以下の2点を明らかにした。1点目は、マイクログリアが神経細胞の突起を切断することなくシナプスを貪食できることである。本研究により、マイクログリアが神経細胞を損傷することなく神経回路を組替えることができるという、これまで想像でのみ語られてきた現象が世界で初めて証明された。そして2点目は、貪食されるシナプスの選択メカニズムを明らかにしたことである。すなわち、神経活動の上昇が、シナプスにおけるアポトーシス関連分子の発現上昇やマイクログリアにおけるC3受容体の発現上昇を介して、貪食されるシナプスの選択に寄与することが明らかになった。これは、補体分子の分布を時空間的に制御するという、シナプス貪食における神経活動の役割の新たな発見をもたらすものである。さらに、熱性けいれんモデルマウスを用いた検証では、持続的に活動の高い神経細胞由来のシナプスの貪食が神経回路の興奮性を変化させるという生理学的意義が示された。

マイクログリアによるシナプス貪食の検証に *in vitro* 実験系を利用することの意義

本研究では、分散培養系を用いてマイクログリアによるシナプス貪食のリアルタイムイメージングを行った。今後は、生体脳においてもマイクログリアが神経細胞突起を切断することなくシナプスを貪食することを証明することが必要となる。先行研究により、マイクログリアの *in vivo* リアルタイムイメージングは盛んに行われてきた。*in vivo* リアルタイムイメージングでは、脳を露出させるための頭蓋骨除去手術によりマイクログリアが活性化し細長く分岐した突起構造が失われることが問題視されてきた。そこで、手術と観察の期間を数週間空けたり、頭蓋骨を除去する代わりに薄く削ったりする手法が開発され、現在ではほぼ生理学的な状態のマイクログリアを観察することが可能となっている (Dorand et al., 2014)。

しかしながら、以下の理由から、マイクログリアによるシナプス貪食の *in vivo* リアルタイムイメージングおよびメカニズム解明は依然として実現可能性が低いと考えられる。

まず、高解像度かつ安定した視野を保持した状態での長時間に亘る

観察が難しい点である。観察中に実験動物の頭部が揺れると、視野が容易にずれてしまう。シナプスは 1 μm 程の微小構造であるため、視野のずれにより同一シナプスを時間ごとに追うことが困難であると考えられる。視野のずれは動物の麻酔深度を深めることで改善されるが (Davalos et al., 2012)、麻酔自体が神経活動やマイクログリアの突起複雑性および突起運動性を低下させるとの多数の報告がある (Huh et al., 2013; Madry et al., 2018; Hristovska et al., 2020)。このことにより、マイクログリアによるシナプス貪食の発生頻度が低下し、シナプス貪食の観察自体が困難となる可能性が高くなる。さらに、脳の観察面に直接薬液を添加できない、薬理学的実験が難しいという問題点もある。腹腔内投与による薬物処置は可能だが、この方法では血液脳関門を通過しない化合物の使用や、局所的な処置が困難である。また、同様の理由により、光遺伝学的手法などを用いた局所的な刺激による細胞機能の操作とリアルタイムイメージングを組み合わせた実験も困難である。

急性脳切片や培養脳切片を利用したマイクログリアのリアルタイムイメージングも盛んに行われている。脳切片では細胞外基質や様々な種類の細胞が存在することから、分散培養と比較してより *in vivo* に近い環境が保たれていると考えられる。しかしながら、急性脳切片を利用する際には、マイクログリアの性質変化の影響を排除するために切片作製から 4 時間程度で観察を完了させなくてはならないという制約がある (Madry et al., 2018)。また、培養脳切片を利用する際には、切片表面からの深度によって細胞の形態などの性質が変化することに注意が必要である (Kasahara et al., 2016)。さらに、脳切片はアデノ随伴ウイルスなどによる細胞への遺伝子導入が難しいという障壁もある。

以上の事実から、現時点では、マイクログリアによるシナプス貪食の検証には分散培養の利用が最適であると考えられる。

マイクログリアによるシナプス貪食の検証における本培養システムの妥当性と課題

本研究では、長年に亘り問題視されてきた、*in vitro* マイクログリアの形態異常を克服した新規培養システムを構築した。*in vivo* マイクログリアの形態を *in vitro* で再現する上で最も重要な要素は、培地組成と培養容器のコーティングである。そしてこれら両者の最適化を実現するのが、グリア細胞の一種であるアストロサイトであると考えられる。1990年代以降、マイクログリアの単離培養にアストロサイト自体、またはアストロサイトの培養上清を加えることで、マイクログリアの形態が改善されることが示唆されていた (Suzumura et al., 1990; Eder et al., 1998; Stence et al., 2001)。そして近年、アストロサイト由来の液性因子の中で、CSF-1、TGF- β 、cholesterol がマイクログリアの形態改善に必要であることが報告された (Bohlen et al., 2017)。この研究は *in vitro* マイクログリアにおけるブレークスルーをもたらしたが、視野内のすべてのマイクログリアの形態が一律に改善されるわけではないことや、神経細胞やアストロサイトなど他の細胞種との共培養においては形態改善の効果が消失すること (Goshi et al., 2020) を鑑みると、さらなる検証が必要であると考えられる。一方、本培養システムにおいては、一律なマイクログリアの形態改善が実現された (図 9A)。その最も大きな要因として、アストロサイトによる立体的な足場構造の構築が考えられる。明視野観察ではアストロサイトが培養容器の一面を覆うことが確認されており (図 9B)、リアルタイムイメージングではマイクログリアがアストロサイトの細胞表面に沿って突起を動かしている様子が観察された。これらの結果から、アストロサイト由来の液性因子に加えて接着因子も *in vitro* マイクログリアの形態改善に重要である可能性が伺える。

本培養システムのマイクログリアは、*in vivo* マイクログリアの形態に加えて、移動や突起伸縮、増殖など、*in vivo* マイクログリアの機能をも再現することが確認された (図 9C-E)。しかしながら、近年の RNA シーケンス解析により、*in vivo* マイクログリアと *in vitro* マイクログリアの遺伝子発現プロパティが異なることが報告されている (Bohlen et al., 2017; Gosselin et al., 2017; He et al., 2018)。本培養システムのマイクログリアが *in vivo* マイクログリアの特徴を反映できていることを真に示すためには、RNA シーケンス解析により *in vivo* マイクログリアの遺伝子発現プロパティと比較する必要がある。

本培養システムを用いて、マイクログリアが神経細胞突起上のプレシナプスを貪食することが示された。しかしながら、本培養システムのような分散培養では、神経細胞の細胞体の位置や突起の走行様式、シナプス結合の位置を制御することはできない。そのため、神経細胞のどの部位のシナプスが貪食されやすいか、という点を正確に検証することは困難である。今後、神経細胞の形態 (軸索・樹状突起・細胞体の本数や位置) を制御しながら培養することが可能である「マイクロプレート」デバイス (Yoshida et al., 2018) などの利用により、上記の疑問を解明することができると考えられる。

マイクログリアによるシナプス貪食様式

本研究では、マイクログリアが神経細胞突起を切断することなくシナプスを貪食することが証明された。このような神経細胞の一部のみの貪食は、先行研究において観察されてきた貪食対象全体を取り込むファゴサイトーシス (Sierra et al., 2010; Cunningham et al., 2013; Mazaheri et al., 2014) とは異なるメカニズムで生じると考えられる。神経細胞を損傷することなくシナプスのみを貪食する方法として、膜融合を利用したメカニズムが想定される。先行研究では、マイクログリア内に取り込まれたシナプス関連タンパク質が、エンドサイトーシスを制御するクラスリン被覆ピット (Stern et al., 2012) で覆われた小胞内に存在することが示されている (Paolicelli et al., 2011)。これ

らの事実から、マイクログリアがシナプスに接触しエンドサイトーシスによりシナプスタンパク質を吸い取る、というシナプス貪食メカニズムが存在する可能性がある。細胞骨格やクラスリンを標識した状態でマイクログリアによるシナプス貪食のライブイメージングを行うことで、詳細な貪食メカニズムが明らかとなるかもしれない。

マイクログリアによるプレシナプス特異的な貪食

熱性けいれん後の抑制性シナプスの密度減少は、マイクログリアによるプレシナプス特異的な貪食による結果である可能性が示された (図 5C, G, H)。このプレシナプス特異性はシナプスの構造に依存して生じる可能性が高い。電子顕微鏡により抑制性シナプスの構造を観察すると、抑制性プレシナプスはふくらんだ構造を有しているが、抑制性ポストシナプス関連分子は細胞体や樹状突起上に構造的に突出して存在するわけではないことが明らかとなっている (Flores and Méndez, 2014)。この結果から、マイクログリアは物理的に、抑制性ポストシナプスよりも抑制性プレシナプスにアクセスしやすい可能性が考えられる。また、ポストシナプスと対になっていないプレシナプスが優先的に貪食される可能性もある。この点は、本培養システムを応用し、マイクログリアとプレシナプスに加えて、ポストシナプスをも蛍光標識し、これらをリアルタイムに観察することで解明可能である。

神経活動の操作方法

先行研究により、マイクログリアによるシナプス貪食には神経活動の差が重要であることが示唆されている (Schafer et al., 2012)。本研究の *in vitro* 実験では、アデノ随伴ウイルスを用いて神経細胞に発現させた DREADD の活性化により神経活動の上昇を促進した。DREADD は系内のほぼすべての神経細胞に発現し、神経細胞全体に分布している。そのため、本培養システムではおそらく神経活動の差を誘起することは

きていない。本手法を用いた場合でも活動上昇の度合が隣接するシナプスによって異なる可能性はあるが、個々のシナプスの活動を詳細に検出するためには、パッチクランプ法やカルシウムイメージングを行う必要がある。また、光遺伝学的操作の技術開発が進んできたおかげで、グルタミン酸アンケーシングやチャンネルロドプシンなど、隣接するシナプスの活動を個別に操作することが可能となっている。これらの光遺伝学的操作を本培養システムに適用することで、個々のシナプスの活動の変化がマイクログリアによるシナプス貪食に与える影響をリアルタイムで検証することが可能となるだろう。

また、DREADD による神経活動の上昇が生理学的状態での活動上昇を反映できているかという点については疑問が残る。単離培養した神経細胞に hM3Dq (興奮性 DREADD) を発現させ、CNO (DREADD のリガンド) 添加後の神経活動をカルシウムインジケータである GCaMP7f を用いたカルシウムイメージングにより観察したところ、複数の神経細胞が同期的に細胞内カルシウム濃度を上昇させた (図 10)。そして、そのような同期した神経活動は CNO 添加の少なくとも 3 時間後まで持続していた。神経細胞の同期発火はてんかん脳に見られる神経活動の特徴であり、本研究の *in vitro* 実験系における神経活動上昇がてんかん様の神経活動を模倣している可能性がある。

活動の高い神経細胞由来のシナプスの貪食

本研究では、*in vitro* および *in vivo* 実験系の両者において、マイクログリアが活動の高い神経細胞由来のシナプスを貪食すること、そしてそれが補体依存的に生じることを発見した。しかしながら、発達期の外側膝状体においては、相対的に神経活動の低いシナプスがマイクログリアによって貪食されやすいこと、そしてそれが補体依存的に生じることが示されている (Schafer et al., 2012)。このことは本研究の結果と一致しないように見受けられるが、この不一致は神経回路の形成の段階の違いから説明可能であ

ると考えている。先行研究において対象とされた発達期は、神経回路が形成される最中であるため、活動の高いシナプスが残存し成熟することが機能的な神経回路の構築に重要であると考えられる。一方、本培養システム（神経細胞が培養 21 日目）および熱性けいれんモデルマウス（11 日齢）では、一旦構築された神経回路が修飾される段階にあり、神経回路の興奮抑制バランスがある程度一定に保たれることが重要であると考えられる。そのため、本研究は、活動が持続的に上昇したシナプスが貪食により除去されるという現象の発見につながったと考察している。本研究では、神経活動を低下させる実験は行っておらず、神経回路の修飾段階で活動の低いシナプスがマイクログリアによって貪食される可能性は否定できない。

神経活動上昇がシナプスにおけるアポトーシス関連分子の発現を促進するメカニズム

本研究では、活動が上昇した神経由来のプレシナプスにおいて、アポトーシス関連分子である Phosphatidylserine (in vitro) や Cleaved Caspase-3 (in vivo) の発現が上昇することが示された (図 4F, 7A)。そのメカニズムとして、神経活動上昇に伴うカルシウム流入を想定している。神経細胞膜上に発現する電位依存性カルシウムチャネル (Voltage-dependent calcium channel, VDCC) は、細胞膜の脱分極により開口し細胞外から細胞内へカルシウムイオンを選択的に透過させる (Nanou et al., 2018)。また、ミトコンドリアへの過剰なカルシウムイオンの流入は、ミトコンドリア膜透過性遷移孔 (mPTP) の開口を介して Cytochrome c の放出を促進する (Orrenius et al., 2003)。さらに、Cytochrome c は procaspase-3 の活性化を介して Cleaved Caspase-3 の発現量を増加させる (Ow et al., 2008)。以上の結果を踏まえると、神経活動上昇が VDCC の活性化を介してアポトーシス関連分子の発現を増加させる可能性が考えられる。先行研究では、ピロカルピン投与によるてんかん重積の誘導後、海馬の抑制性神経細胞における VDCC の発現が増加することが示されており (Xu et al., 2007)、本研究で用いた

熱性けいれんモデルマウスの抑制性神経細胞においても VDCC の発現が増加することは十分にあり得るだろう。

神経活動上昇が補体経路を活性化するメカニズム

本研究の *in vitro* 実験系および *in vivo* 実験系において、神経活動上昇後にマイクログリアにおける C3 受容体の発現増加が確認された (図 4H, 8G, I)。カイン酸の腹腔内投与によりてんかん重積状態を誘起した先行研究においても、カイン酸投与の 24 時間後に海馬マイクログリアの C3 受容体発現量が増加することが示されており (Drexel et al., 2012)、神経活動上昇が C3 受容体の発現を増加させることはほぼ間違いないと考えられる。ではそのメカニズムは何か。活動が上昇した神経細胞からは、ATP や BDNF、Norepinephrine などの様々な液性因子が放出され (O'Donnell et al., 2013; Eyo et al., 2014; Wong et al., 2015)、それぞれがマイクログリアの突起運動性や貪食能に影響することが報告されている (Haynes et al., 2006; Gyoneva and Traynelis, 2013; Dissing-Olesen et al., 2014; Madry et al., 2018; Bernier et al., 2019; Stowell et al., 2019; Onodera et al., 2020)。これらの分子がマイクログリアによって受容され細胞内シグナリングが活性化されることで、C3 受容体の発現が調節される可能性が考えられる。

また、熱性けいれんモデルマウスにおいて、C1q および C3 の発現量が有意に増加した (図 8C, E)。C1q の免疫染色画像を観察すると、熱性けいれん後にはマイクログリアと思しき形状に C1q の強いシグナルが確認された。このことから、神経活動上昇がマイクログリアにおける C1q の産生および放出を促進する可能性が考えられる。ただし、*in vitro* 実験系において、DREADD による神経活動上昇単独ではマイクログリアによるシナプス貪食が促進されなかったことに注意されたい。おそらく本培養システムでは、マイクログリアによる C1q の産生または放出の度合いがシナプス貪食に十分ではなかったと考えている。

マイクログリアによるシナプス貪食へのアストロサイトの関与

本研究では、活動が上昇した神経細胞由来のシナプスがマイクログリアによって貪食されることを発見した。しかしながら、活動が上昇したシナプスの中でマイクログリアに貪食されるものは一部に過ぎない。ではその選定はどのようにして行われるのだろうか。まず、活動上昇の度合によってシナプスにおけるアポトーシス関連分子の発現量、ひいては補体の付着量が異なり、補体の量が多いシナプスほど優先的に貪食される可能性が考えられる。また、神経細胞とマイクログリア以外の細胞種、例えばアストロサイトが被貪食シナプスの選定に関与する可能性もある。アストロサイトの微小突起はプレシナプスおよびポストシナプスを取り囲み、これら3者による tripartite synapse という構造を形成する (Ventura and Harris, 1999)。そのため、tripartite synapse がマイクログリアによるシナプスへの接触および貪食を妨げる可能性がある。また、神経活動の増加に伴い、アストロサイトの細胞内カルシウム濃度が上昇すること (Bernardinelli et al., 2011)、および tripartite synapse の形成が促進されること (Genoud et al., 2006)、が示唆されている。これらの報告から、神経活動の強弱が tripartite synapse の構造変化を引き起こす結果、マイクログリアによるシナプスへの接触および貪食が制御される可能性が考えられる。この点は、本培養システムのアストロサイトを蛍光標識し、マイクログリア、プレシナプスと同時にリアルタイムイメージングを行うことにより解明可能である。

【図】

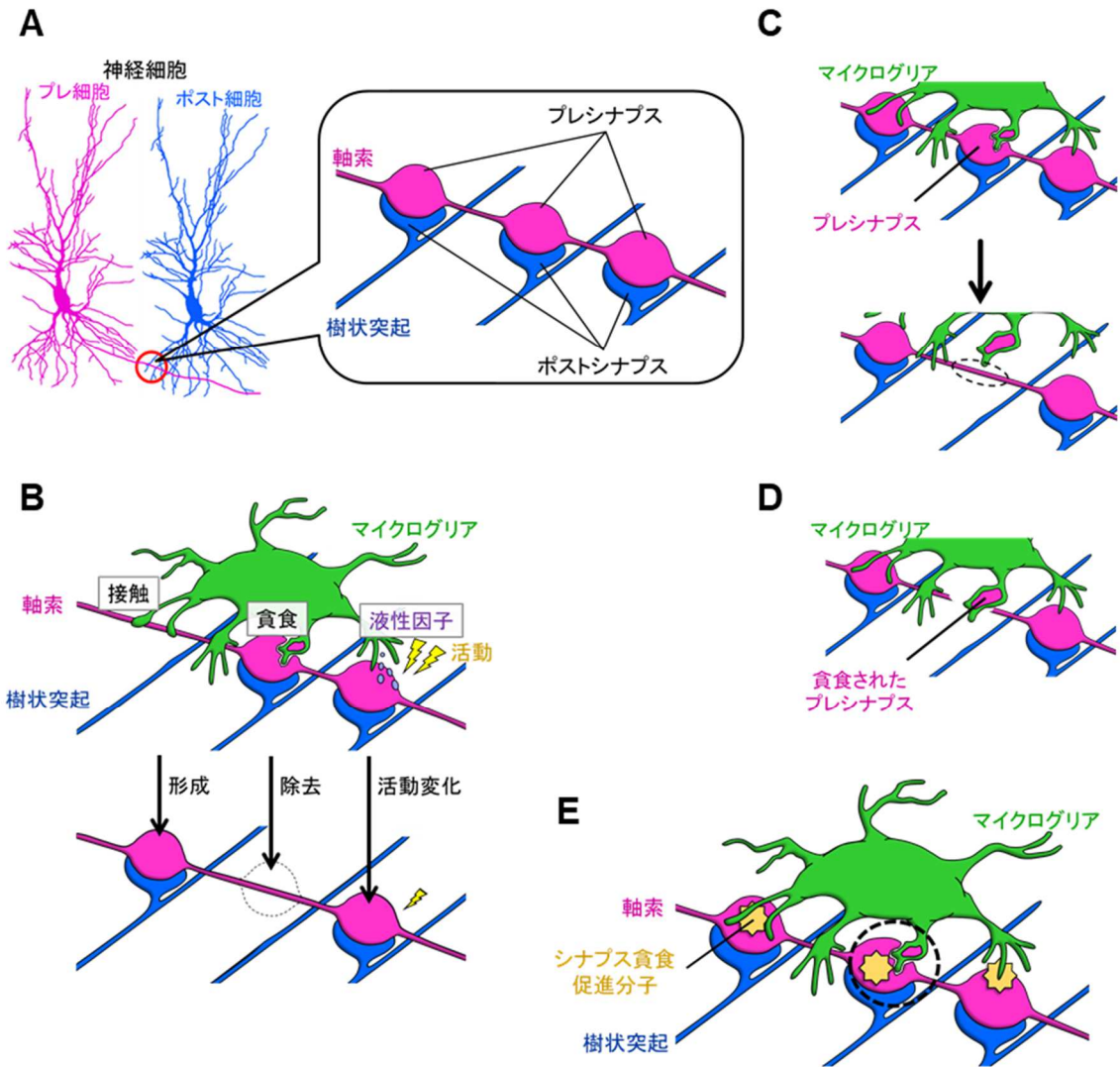
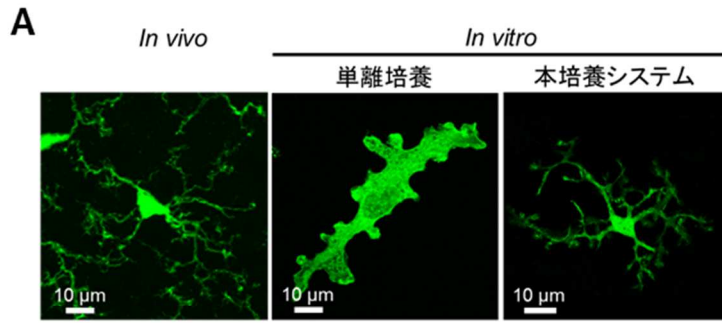


図 1 シナプス結合の制御におけるマイクログリアの関与

- (A) 神経細胞はプレシナプスとポストシナプスから構成されるシナプスを介して情報を伝達する。
- (B) シナプス結合の制御は主にシナプスの形成・除去・活動変化により調節される。マイクログリアはシナプスへの接触・貪食・液性因子の放出によりシナプス結合の制御に関与することが示唆されている。
- (C) マイクログリアがシナプスを貪食する過程の仮説。神経科学では、マイクログリアが生きた神経細胞からシナプスのみを貪食可能であることが前提として研究が行われる場合がほとんどであるが、これを実験的に示した研究はない。
- (D) マイクログリアがシナプスを貪食する際に神経細胞の突起構造が保たれるのかは明らかとなっていない。
- (E) シナプス貪食を制御する因子が付着したシナプスの中で、特定のシナプスが貪食されるメカニズムは明らかとなっていない。



マイクログリア (GFP) プレシナプス (RFP) 神経細胞突起 (iRFP)

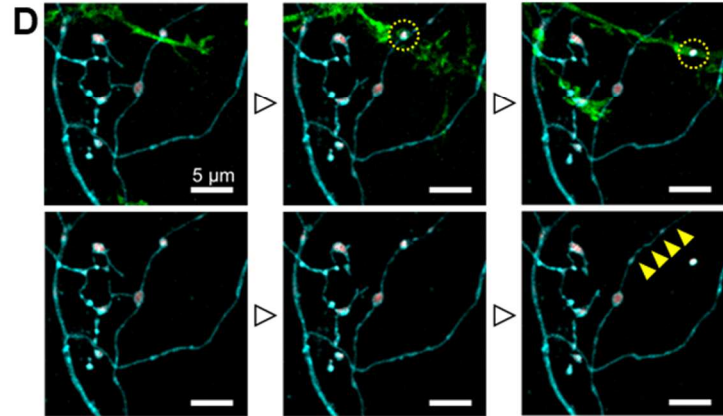
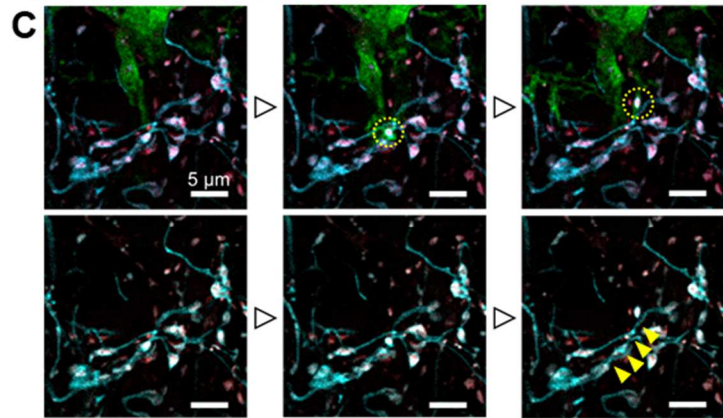
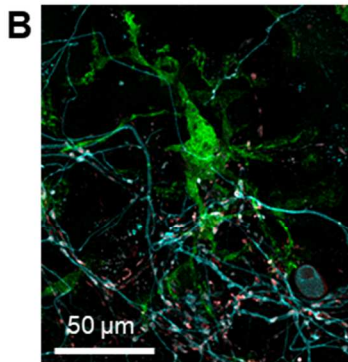


図 2 マイクログリアによるシナプス貪食のリアルタイムイメージングによる証明

(A) In vivo および in vitro のマイクログリアの免疫染色画像。

(B) マイクログリア、プレシナプス、神経細胞突起を蛍光標識したサンプルを用いてリアルタイムイメージングを行った。

(C) (上段) マイクログリアがシナプスを貪食する過程をリアルタイムで観察した画像。黄色の丸枠は貪食されたシナプスの位置を示す。(下段) 上段の画像のプレシナプスと神経細胞突起のみを表示した画像。黄色線はシナプス貪食後に残存した神経細胞突起を示す。

(D) (上段) マイクログリアがシナプスを貪食する過程をリアルタイムで観察した画像。黄色の丸枠は貪食されたシナプスの位置を示す。(下段) 上段の画像のプレシナプスと神経細胞突起のみを表示した画像。黄色線はシナプス貪食後に残存した神経細胞突起を示す。

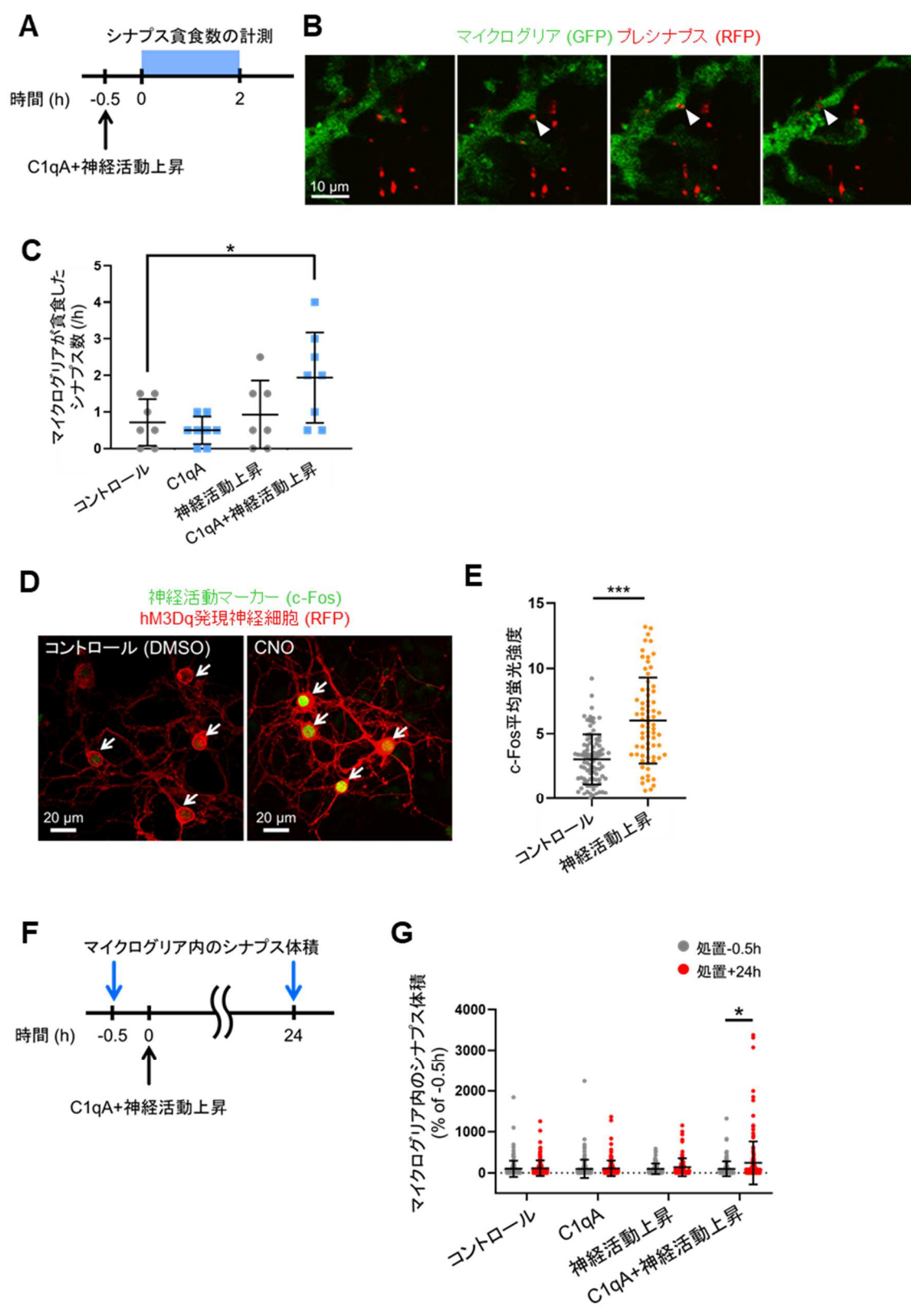
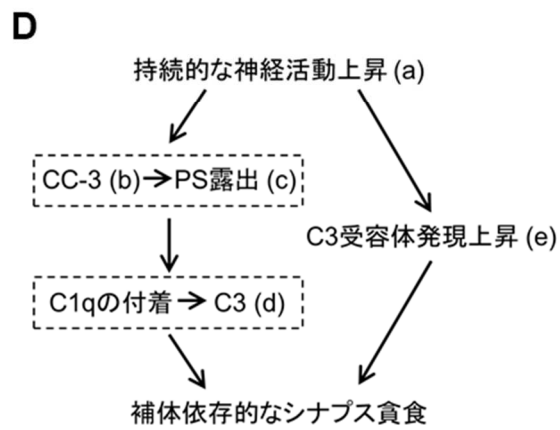
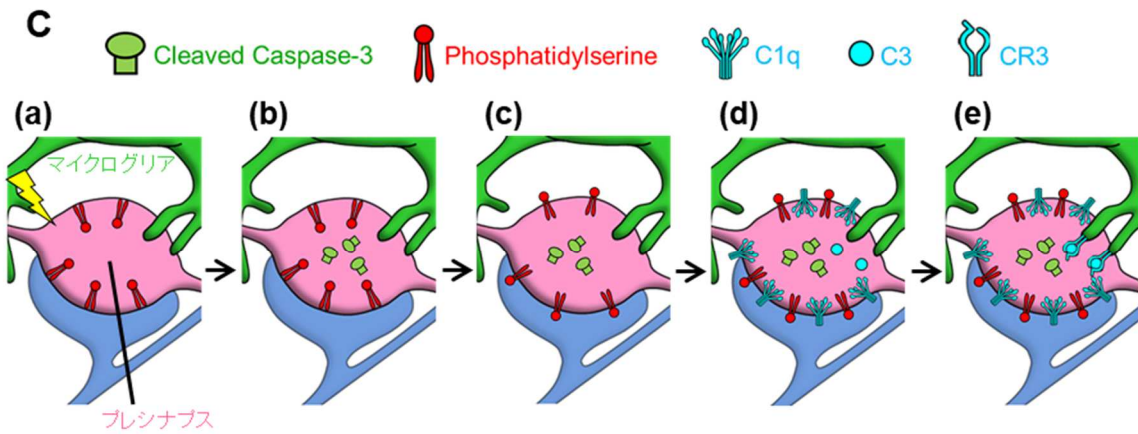
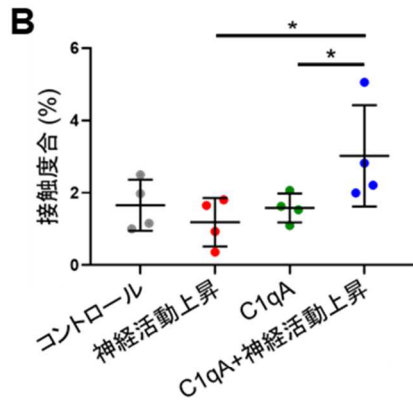
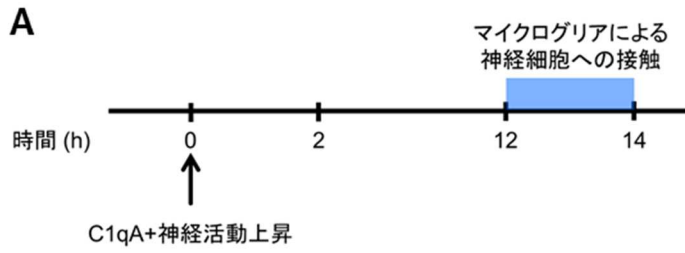


図 3 神経活動上昇が補体依存的なシナプス貪食を促進する

- (A) 実験タイムコース。C1qA 添加、または CNO 添加による神経活動上昇の後、2 時間のリアルタイムイメージングを行い、マイクログリアが貪食したプレシナプスの数を計測した。
- (B) マイクログリアによるプレシナプス貪食の例。白鏟は貪食されたプレシナプスの位置を示す。
- (C) 単位時間あたりにマイクログリアが貪食したプレシナプスの数。C1qA 添加や神経活動上昇単独ではシナプス貪食数が変化しなかった一方、C1qA を添加し、かつ神経活動を上昇させた群でのみシナプス貪食数が有意に増加した。Mean \pm SD, $n = 7-8$ independent experiments, $*p < 0.05$, Dunnett's test after One Way ANOVA.
- (D) 神経活動マーカー (c-Fos)、hM3Dq を発現した神経細胞 (RFP) の免疫染色画像。白矢印は神経細胞の細胞体を示す。
- (E) hM3Dq を発現した神経細胞における c-Fos 平均蛍光強度。神経活動上昇群では有意に増加した。Mean \pm SD, $n = 88$ (DMSO), 71 (CNO) cells, $***p < 0.001$, Student's t -test.
- (F) 実験タイムコース。C1qA 添加、または CNO 添加による神経活動上昇の前、および 24 時間後にスナップショットを撮影し、マイクログリア内に取り込まれたプレシナプスの体積を比較した。
- (G) 各処置の前、および 24 時間後におけるマイクログリア内に取り込まれたプレシナプスの体積。C1qA を添加し、かつ神経活動を上昇させた群でのみ処置前と比較してマイクログリア内に取り込まれたシナプスの体積が有意に増加した。Mean \pm SD, $n = 92-173$ cells from 3-4 independent experiments. $*p < 0.05$, Mann-Whitney Rank Sum test.



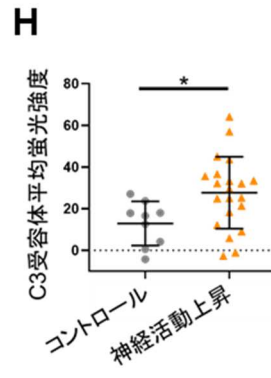
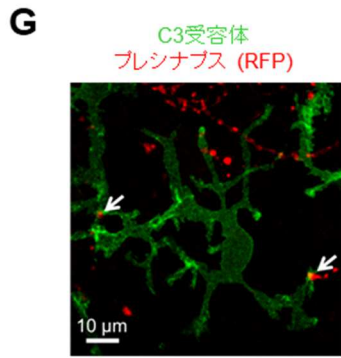
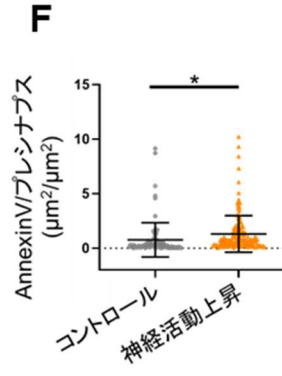
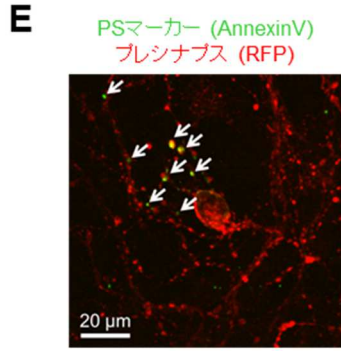


図 4 神経活動上昇が補体依存的なシナプス貪食を促進するメカニズム

- (A) 実験タイムコース。各処置の 12 時間後から 2 時間に亘りリアルタイムイメージングを行い、マイクログリアによる神経細胞への接触を測定した。
- (B) マイクログリアによる神経細胞への接触度合。神経活動上昇や C1qA 添加単独群と比較して、C1qA を添加し、かつ神経活動を促進した群で有意に増加した。Mean \pm SD, $n = 4$ independent experiments, $*p < 0.05$, Tukey's test after Two Way ANOVA.
- (C) 想定されるメカニズムの模式図。まず持続的な神経活動上昇によってプレシナプスにおいて Cleaved Caspase-3 (CC-3) の発現量が増加する (a, b)。CC-3 は Phosphatidylserine (PS) の細胞外への露出を促進する (c)。そして、PS が露出したシナプスに C1q が付着しその下流分子である C3 が活性化される (d)。また、神経活動上昇がマイクログリアの C3 受容体の発現を促進する (e)。
- (D) C の想定メカニズムのフローチャート。
- (E) AnnexinV、プレシナプスの免疫染色画像。白矢印は AnnexinV とプレシナプスが共局在する部分を示す。
- (F) プレシナプスの単位面積あたりの AnnexinV の面積。神経活動上昇群で有意に増加した。Mean \pm SD, $n = 90-150$ presynapses from 2 independent experiments. $*p < 0.05$, Student's *t*-test.
- (G) C3 受容体、プレシナプスの免疫染色画像。白矢印はマイクログリアがプレシナプスに接触した部分を示す。
- (H) マイクログリアがプレシナプスに接触した部分における C3 受容体の平均蛍光強度。神経活動上昇群で有意に増加した。Mean \pm SD, $n = 9-21$ microglial processes from 2 independent experiments. $*p < 0.05$, Student's *t*-test.

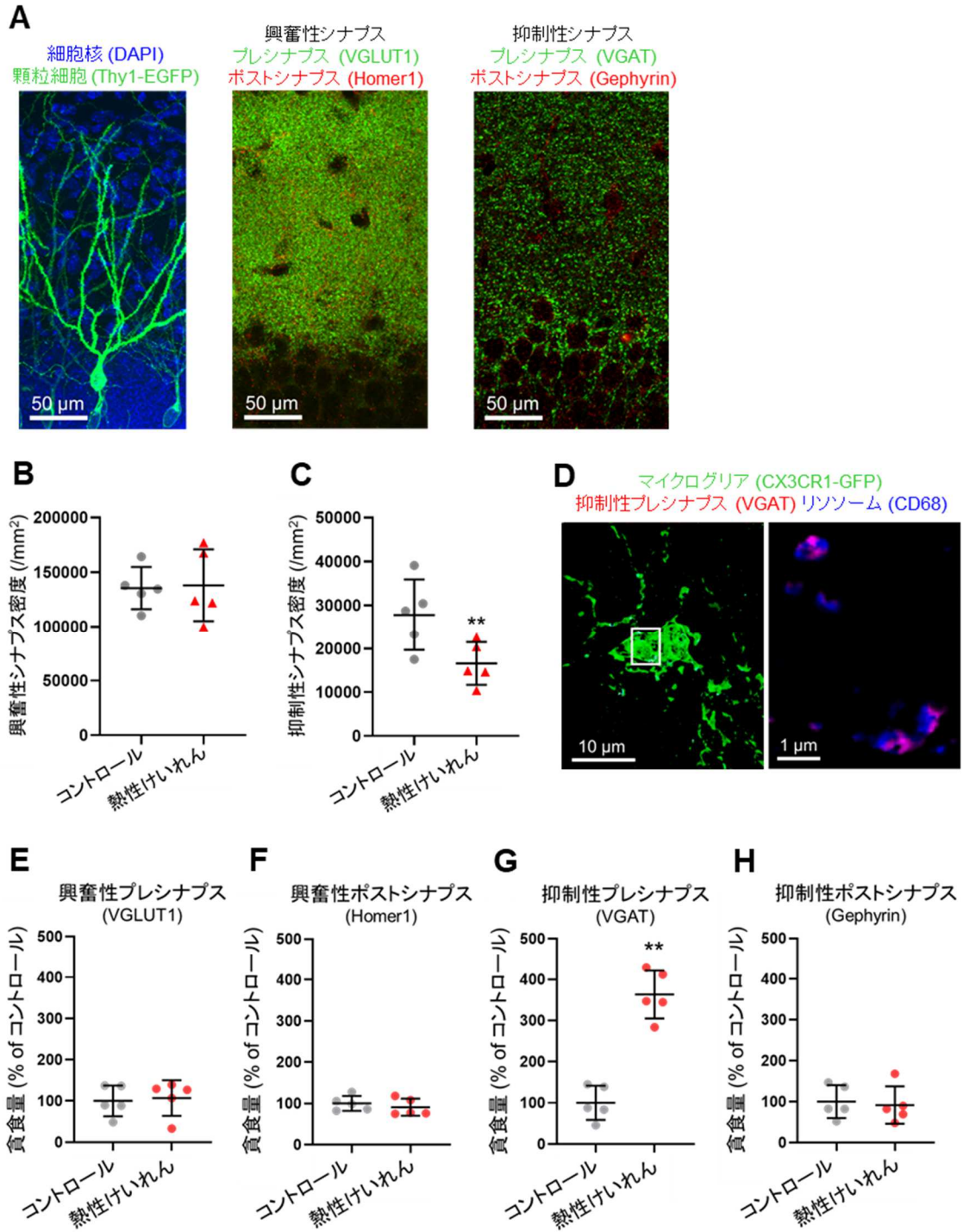


図5 熱性けいれん後にマイクログリアが抑制性プレシナプスを貪食する

(A)(左) 海馬における顆粒細胞の免疫染色画像。(中央) 顆粒細胞が樹状突起を伸ばす領域 (分子層) における興奮性シナプスの免疫染色画像。(右) 分子層における抑制性シナプスの免疫染色画像。

(B) 分子層における興奮性シナプスの密度。熱性けいれんによる変化はなかった。

Mean \pm SD, $n = 5$ mice, $p > 0.05$, Student's t -test.

(C) 分子層における抑制性シナプスの密度。熱性けいれん群において有意に減少した。Mean \pm SD, $n = 5$ mice, $**p < 0.01$, Student's t -test.

(D)(左) 分子層におけるマイクログリアの免疫染色画像。(右) 左画像の白枠内における抑制性プレシナプス、リソソームの免疫染色画像。抑制性プレシナプスがリソソーム内に取り込まれている。

(E) マイクログリアによる興奮性プレシナプスの貪食量。熱性けいれんによる変化はなかった。Mean \pm SD, $n = 5$ mice, $p > 0.05$, Student's t -test.

(F) マイクログリアによる興奮性ポストシナプスの貪食量。熱性けいれんによる変化はなかった。Mean \pm SD, $n = 5$ mice, $p > 0.05$, Student's t -test.

(G) マイクログリアによる抑制性プレシナプスの貪食量。熱性けいれん群において有意に増加した。Mean \pm SD, $n = 5$ mice, $**p < 0.01$, Student's t -test.

(H) マイクログリアによる抑制性ポストシナプスの貪食量。熱性けいれんによる変化はなかった。Mean \pm SD, $n = 5$ mice, $p > 0.05$, Student's t -test.

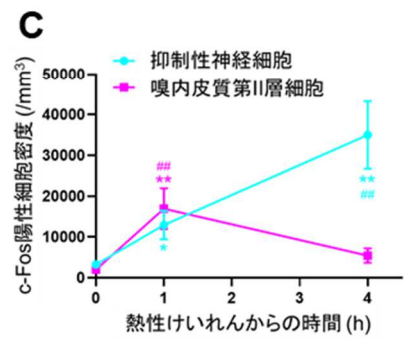
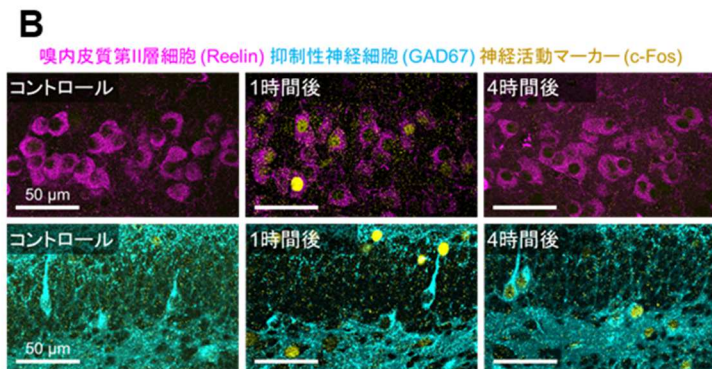
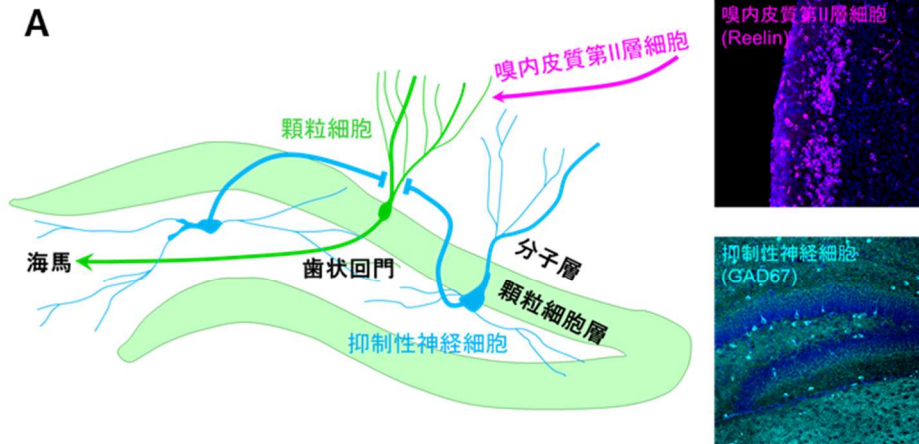


図 6 熱性けいれん後に抑制性神経細胞が持続的に活動を上昇させる

(A)(左) 海馬歯状回における顆粒細胞、抑制性神経細胞、嗅内皮質第 II 層細胞の投射間関係を示す模式図。(右上) 嗅内皮質第 II 層細胞の免疫染色画像。(右下) 歯状回門の抑制性神経細胞の免疫染色画像。

(B)(上段) 熱性けいれん後の嗅内皮質第 II 層細胞、c-Fos の免疫染色画像。(下段) 熱性けいれん後の歯状回門の抑制性神経細胞、c-Fos の免疫染色画像。

(C) 熱性けいれんからの時間経過に伴う、c-Fos を発現する嗅内皮質第 II 層細胞および歯状回門の抑制性神経細胞の密度の推移。嗅内皮質第 II 層細胞と比較して抑制性神経細胞における c-Fos 発現上昇の持続時間が長い。Mean \pm SD, $n = 5-6$ mice, $*p < 0.05$ and $**p < 0.01$ vs 0 h, $###p < 0.01$ vs 4 h (嗅内皮質第 II 層細胞), $###p < 0.01$ vs 1 h (抑制性神経細胞), Tukey's test after One Way ANOVA.

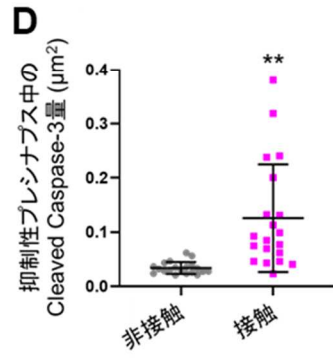
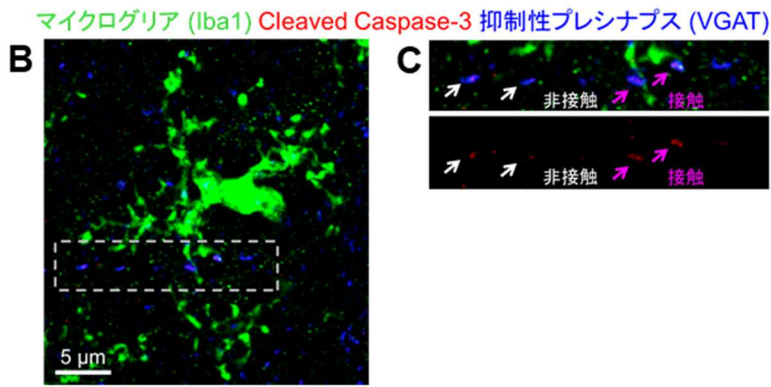
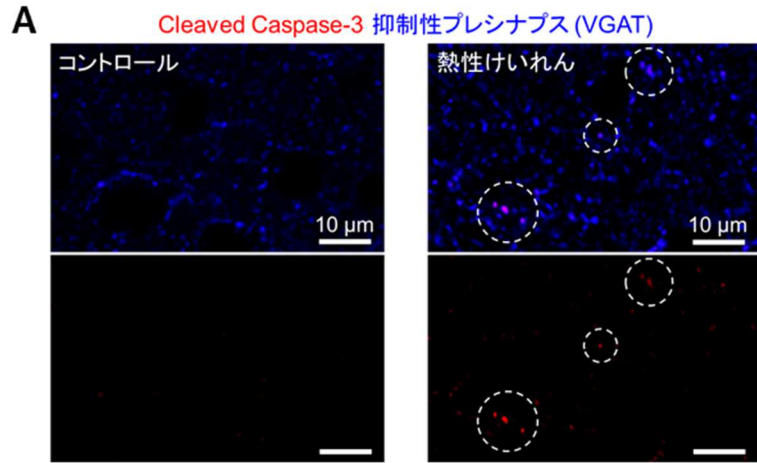


図7 熱性けいれん後に抑制性シナプスにおけるアポトーシス関連分子の発現が増加する

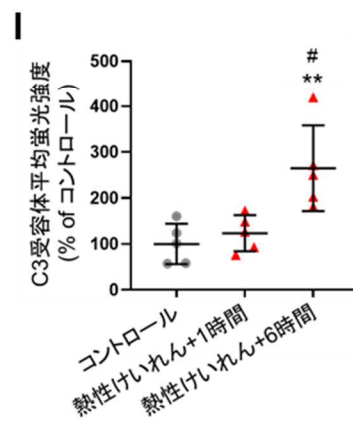
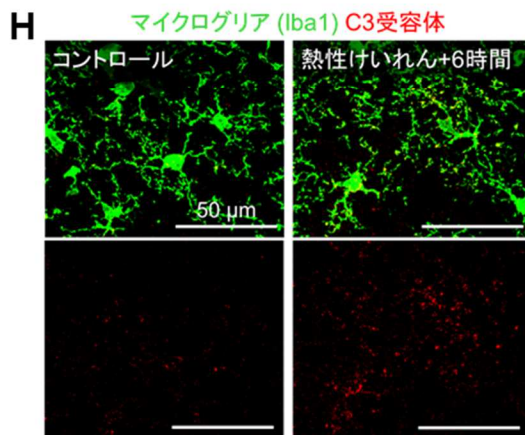
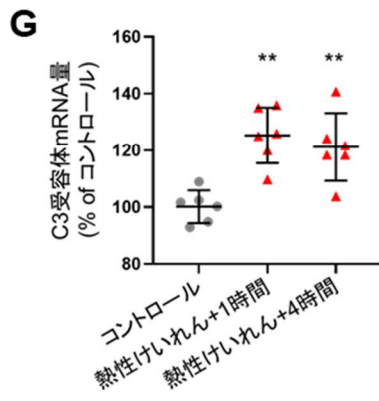
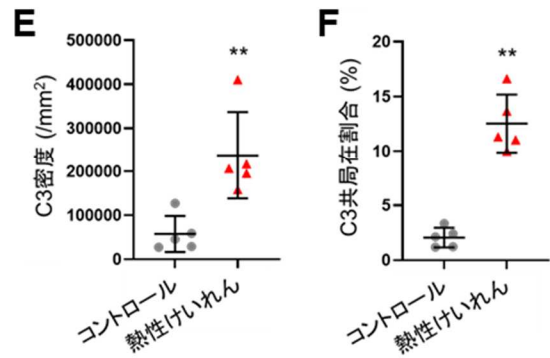
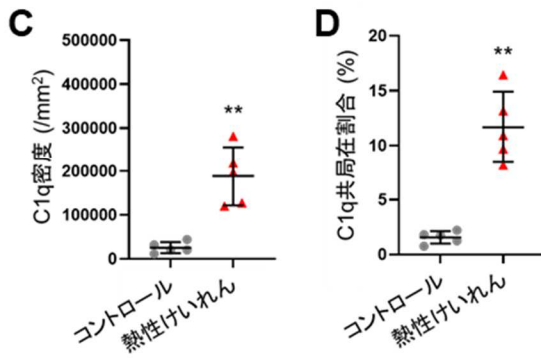
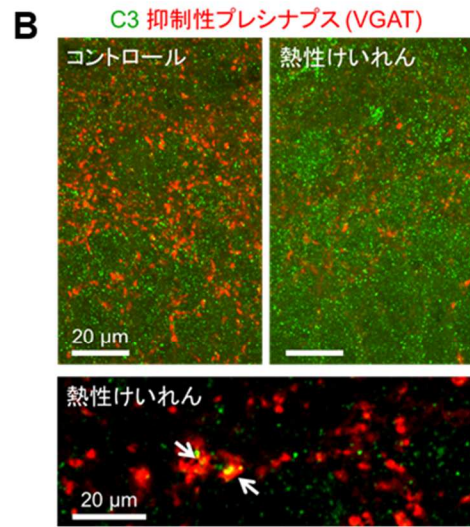
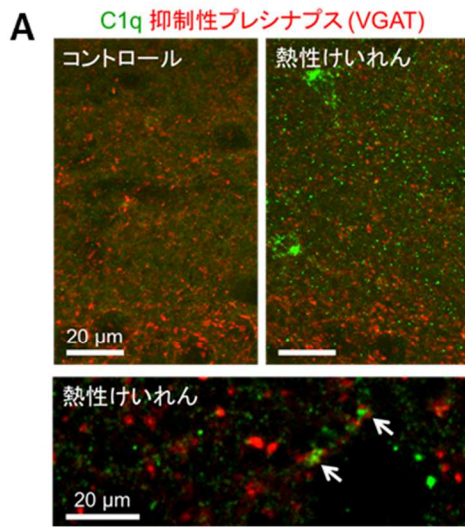
(A)海馬分子層における Cleaved Caspase-3、抑制性プレシナプスの免疫染色画像。

白点線枠は Cleaved caspase-3 を示す。熱性けいれん群では Cleaved Caspase-3 の発現量が増加し、そのほぼすべてが抑制性プレシナプスと共局在した。

(B)海馬分子層におけるマイクログリア、Cleaved Caspase-3、抑制性プレシナプスの免疫染色画像。

(C) B の点線枠内の拡大画像。抑制性プレシナプスにはマイクログリアによって接触されないもの (白矢印) と接触されるもの (マゼンタ矢印) とが確認された。

(D)抑制性プレシナプス内の Cleaved Caspase-3 の量。マイクログリアによって接触されるシナプスでは接触されないシナプスと比較して有意に増加した。Mean \pm SD, $n = 20$ microglia, $**p < 0.01$, Student's t -test.



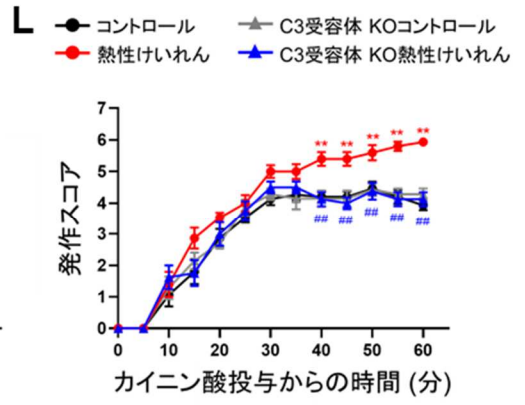
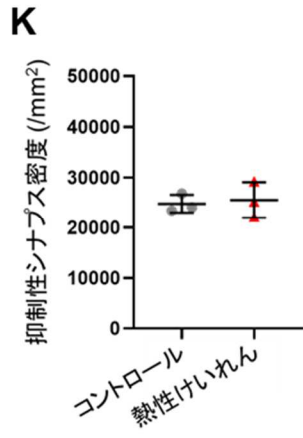
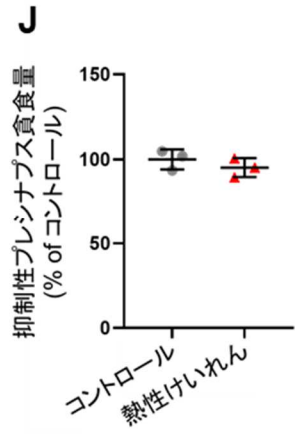


図 8 熱性けいれん後の抑制性シナプスの貪食は補体依存的である

(A)(上段) 海馬分子層における C1q、抑制性プレシナプスの免疫染色画像。(下段) 熱性けいれん群の拡大画像。白矢印は C1q と抑制性プレシナプスが共局在する部分を示す。

(B)(上段) 海馬分子層における C3、抑制性プレシナプスの免疫染色画像。(下段) 熱性けいれん群の拡大画像。白矢印は C3 と抑制性プレシナプスが共局在する部分を示す。

(C)海馬分子層における C1q の密度。熱性けいれんにより有意に増加した。Mean \pm SD, $n = 5$ mice, $**p < 0.01$, Student's *t*-test.

(D)海馬分子層における C1q と共局在する抑制性プレシナプスの割合。熱性けいれんにより有意に増加した。Mean \pm SD, $n = 5$ mice, $**p < 0.01$, Student's *t*-test.

(E)海馬分子層における C3 の密度。熱性けいれんにより有意に増加した。Mean \pm SD, $n = 5$ mice, $**p < 0.01$, Student's *t*-test.

(F)海馬分子層における C3 と共局在する抑制性プレシナプスの割合。熱性けいれんにより有意に増加した。Mean \pm SD, $n = 5$ mice, $**p < 0.01$, Student's *t*-test.

(G)海馬における C3 受容体の mRNA 量。コントロールと比較して熱性けいれんの 1 時間後および 4 時間後では有意に増加した。Mean \pm SD, $n = 6$ mice, $**p < 0.01$ vs コントロール, Tukey's test after One Way ANOVA.

(H)海馬分子層におけるマイクログリア、C3 受容体の免疫染色画像。

(I)海馬分子層における C3 受容体の平均蛍光強度。コントロールと比較して熱性けいれんの 6 時間後では有意に増加した。Mean \pm SD, $n = 5$ mice, $**p < 0.01$ vs コントロール, $\#p < 0.01$ 熱性けいれん+1 時間, Tukey's test after One Way ANOVA.

- (J) C3 受容体のノックアウトマウスにおける、マイクログリアによる抑制性プレシナプスの食食量。熱性けいれんにより変化しなかった。Mean \pm SD, $n = 3$ mice, $p > 0.05$, Student's t -test.
- (K) C3 受容体のノックアウトマウスの海馬分子層における抑制性シナプス密度。熱性けいれんにより変化しなかった。Mean \pm SD, $n = 3$ mice, $p > 0.05$, Student's t -test.
- (L) カイニン酸投与からの時間経過に伴うてんかん発作スコアの推移。コントロール群と比較して熱性けいれん群では有意に増加したが、C3 受容体のノックアウトマウスでは熱性けいれんによる発作スコアの増加が生じなかった。Mean \pm SD, $n = 9-20$ mice, $**p < 0.01$ vs コントロール, $##p < 0.01$ vs 熱性けいれん, Bonferroni test.

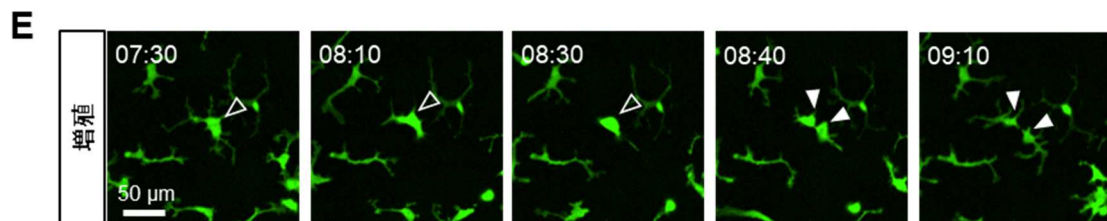
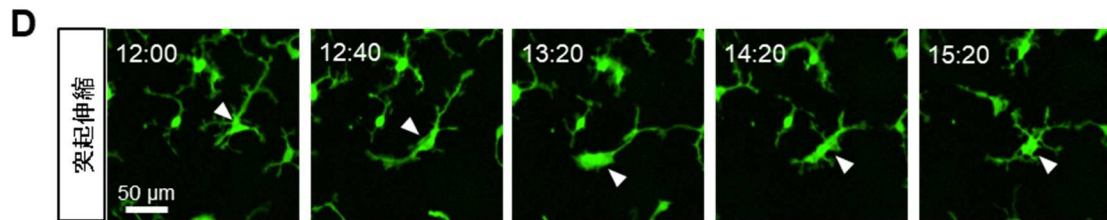
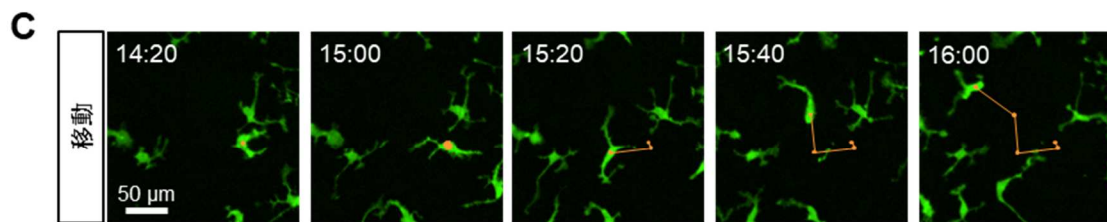
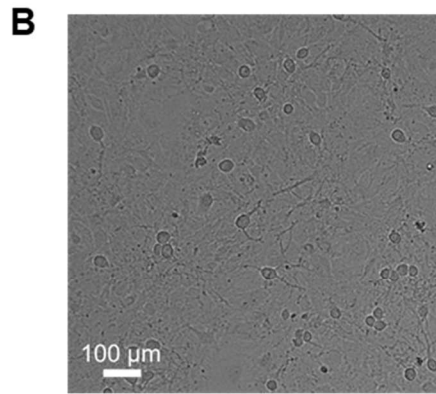
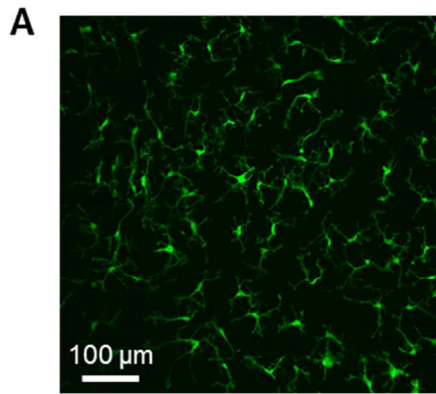


図9 マイクログリアによるシナプス貪食の検証における本培養システムの妥当性

- (A) 培養中のマイクログリアのスナップショット。どの細胞においても *in vivo* のマイクログリアが持つ、細長く分岐した突起構造が確認された。また、*in vivo* のマイクログリアと同様に、個々の細胞が重なることなく各々のテリトリーを保って分布していた。
- (B) 培養中の微分干渉像。培養容器の一面がアストロサイトによって覆われていた。
- (C) マイクログリアが移動する様子。細胞体の位置の遷移をオレンジ色で示した。
- (D) マイクログリアの突起伸縮の様子。同一細胞を白鍬で示した。
- (E) マイクログリアが分裂する様子。分裂前の細胞を白抜き鍬、分裂後の細胞を白鍬で示した。

各画像の左上はライブイメージング開始からの時間 (時間:分) を示す。

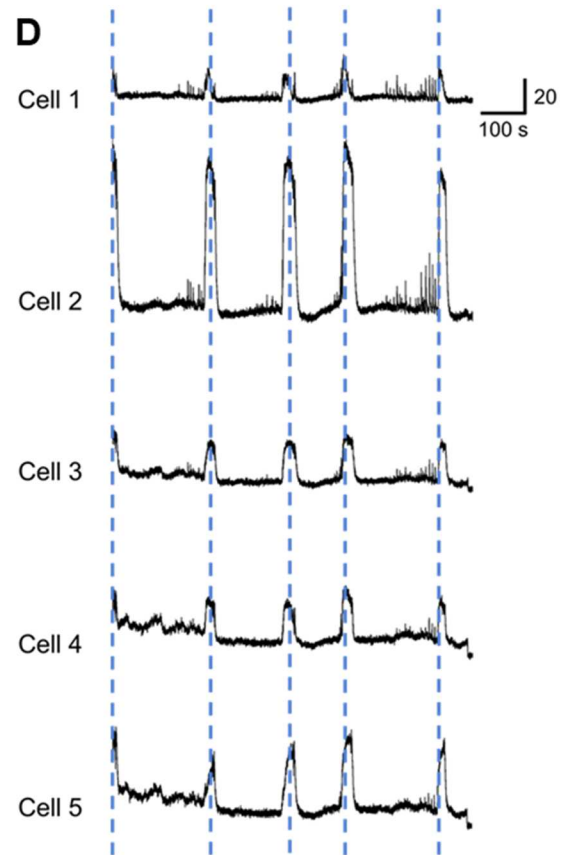
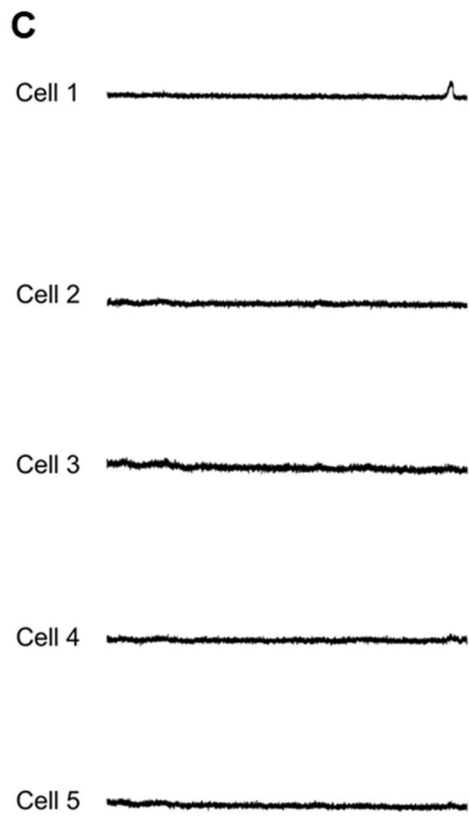
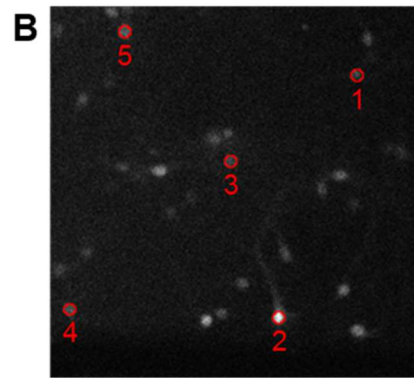
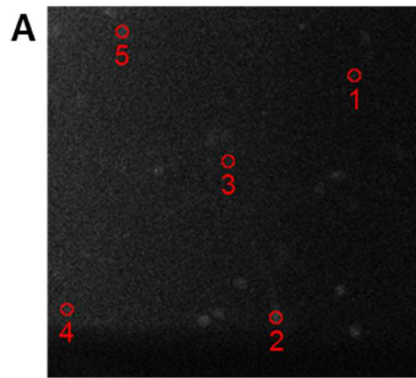


図 10 DREADD による神経活動上昇

興奮性 DREADD により促進した神経活動を観察するため、カルシウムインジケータである GCaMP7f を、アデノ随伴ウイルスを用いて神経細胞の単離培養に発現させ、カルシウムイメージングを行った。

(A) CNO を培地に添加した直後における GCaMP7f のスナップショット。

(B) CNO を培地に添加した 3 時間後における、A と同じ視野での GCaMP7f のスナップショット。

(C) A において赤丸で囲んだ神経細胞における GCaMP7f の平均蛍光強度。

(D) B において赤丸で囲んだ神経細胞における GCaMP7f の平均蛍光強度。100~200 秒間隔で複数細胞が同期的にカルシウム濃度を上昇させた。

【引用文献】

1. Andoh, M.; Ikegaya, Y.; Koyama, R. Microglia modulate the structure and function of the hippocampus after early-life seizures. *J Pharmacol Sci* **2020**, *144*, 212-217, doi:10.1016/j.jphs.2020.09.003.
2. Andoh, M.; Shibata, K.; Okamoto, K.; Onodera, J.; Morishita, K.; Miura, Y.; Ikegaya, Y.; Koyama, R. Exercise Reverses Behavioral and Synaptic Abnormalities after Maternal Inflammation. *Cell Rep* **2019**, *27*, 2817-2825.e2815, doi:10.1016/j.celrep.2019.05.015.
3. Bernardinelli, Y.; Salmon, C.; Jones, E.V.; Farmer, W.T.; Stellwagen, D.; Murai, K.K. Astrocytes display complex and localized calcium responses to single-neuron stimulation in the hippocampus. *J Neurosci* **2011**, *31*, 8905-8919, doi:10.1523/JNEUROSCI.6341-10.2011.
4. Bernier, L.P.; Bohlen, C.J.; York, E.M.; Choi, H.B.; Kamyabi, A.; Dissing-Olesen, L.; Hefendehl, J.K.; Collins, H.Y.; Stevens, B.; Barres, B.A., et al. Nanoscale Surveillance of the Brain by Microglia via cAMP-Regulated Filopodia. *Cell Rep* **2019**, *27*, 2895-2908.e2894, doi:10.1016/j.celrep.2019.05.010.
5. Bohlen, C.J.; Bennett, F.C.; Tucker, A.F.; Collins, H.Y.; Mulinyawe, S.B.; Barres, B.A. Diverse Requirements for Microglial Survival, Specification, and Function Revealed by Defined-Medium Cultures. *Neuron* **2017**, *94*, 759-773.e758, doi:10.1016/j.neuron.2017.04.043.
6. Cong, Q.; Soteros, B.M.; Wollet, M.; Kim, J.H.; Sia, G.M. The endogenous neuronal complement inhibitor SRPX2 protects against complement-mediated synapse elimination during development. *Nat Neurosci* **2020**, *23*, 1067-1078, doi:10.1038/s41593-020-0672-0.

7. Cserép, C.; Pósfai, B.; Lénárt, N.; Fekete, R.; László, Z.I.; Lele, Z.; Orsolits, B.; Molnár, G.; Heindl, S.; Schwarcz, A.D., et al. Microglia monitor and protect neuronal function through specialized somatic purinergic junctions. *Science* **2020**, *367*, 528-537, doi:10.1126/science.aax6752.
8. Cunningham, C.L.; Martínez-Cerdeño, V.; Noctor, S.C. Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* **2013**, *33*, 4216-4233, doi:10.1523/JNEUROSCI.3441-12.2013.
9. Davalos, D.; Akassoglou, K. In vivo imaging of the mouse spinal cord using two-photon microscopy. *J Vis Exp* **2012**, e2760, doi:10.3791/2760.
10. Dissing-Olesen, L.; LeDue, J.M.; Rungta, R.L.; Hefendehl, J.K.; Choi, H.B.; MacVicar, B.A. Activation of neuronal NMDA receptors triggers transient ATP-mediated microglial process outgrowth. *J Neurosci* **2014**, *34*, 10511-10527, doi:10.1523/JNEUROSCI.0405-14.2014.
11. Dorand, R.D.; Barkauskas, D.S.; Evans, T.A.; Petrosiute, A.; Huang, A.Y. Comparison of intravital thinned skull and cranial window approaches to study CNS immunobiology in the mouse cortex. *Intravital* **2014**, *3*, doi:10.4161/intv.29728.
12. Drexel, M.; Preidt, A.P.; Sperk, G. Sequel of spontaneous seizures after kainic acid-induced status epilepticus and associated neuropathological changes in the subiculum and entorhinal cortex. *Neuropharmacology* **2012**, *63*, 806-817, doi:10.1016/j.neuropharm.2012.06.009.
13. Eder, C.; Klee, R.; Heinemann, U. Involvement of stretch-activated Cl⁻ channels in ramification of murine microglia. *J Neurosci* **1998**, *18*, 7127-7137.
14. Eyo, U.B.; Peng, J.; Swiatkowski, P.; Mukherjee, A.; Bispo, A.; Wu, L.J. Neuronal hyperactivity recruits microglial processes via neuronal NMDA receptors and

microglial P2Y₁₂ receptors after status epilepticus. *J Neurosci* **2014**, *34*, 10528-10540, doi:10.1523/JNEUROSCI.0416-14.2014.

15. Filipello, F.; Morini, R.; Corradini, I.; Zerbi, V.; Canzi, A.; Michalski, B.; Erreni, M.; Markicevic, M.; Starvaggi-Cucuzza, C.; Otero, K., et al. The Microglial Innate Immune Receptor TREM2 Is Required for Synapse Elimination and Normal Brain Connectivity. *Immunity* **2018**, *48*, 979-991.e978, doi:10.1016/j.immuni.2018.04.016.

16. Flores, C.E.; Méndez, P. Shaping inhibition: activity dependent structural plasticity of GABAergic synapses. *Front Cell Neurosci* **2014**, *8*, 327, doi:10.3389/fncel.2014.00327.

17. Genoud, C.; Quairiaux, C.; Steiner, P.; Hirling, H.; Welker, E.; Knott, G.W. Plasticity of astrocytic coverage and glutamate transporter expression in adult mouse cortex. *PLoS Biol* **2006**, *4*, e343, doi:10.1371/journal.pbio.0040343.

18. Goshi, N.; Morgan, R.K.; Lein, P.J.; Seker, E. A primary neural cell culture model to study neuron, astrocyte, and microglia interactions in neuroinflammation. *J Neuroinflammation* **2020**, *17*, 155, doi:10.1186/s12974-020-01819-z.

19. Gosselin, D.; Skola, D.; Coufal, N.G.; Holtman, I.R.; Schlachetzki, J.C.M.; Sajti, E.; Jaeger, B.N.; O'Connor, C.; Fitzpatrick, C.; Pasillas, M.P., et al. An environment-dependent transcriptional network specifies human microglia identity. *Science* **2017**, *356*, doi:10.1126/science.aal3222.

20. Gyoneva, S.; Traynelis, S.F. Norepinephrine modulates the motility of resting and activated microglia via different adrenergic receptors. *J Biol Chem* **2013**, *288*, 15291-15302, doi:10.1074/jbc.M113.458901.

21. Györfy, B.A.; Kun, J.; Török, G.; Bulyáki, É.; Borhegyi, Z.; Gulyácssy, P.; Kis, V.; Szocsics, P.; Micsonai, A.; Matkó, J., et al. Local apoptotic-like mechanisms underlie

complement-mediated synaptic pruning. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2018**, *115*, 6303-6308, doi:10.1073/pnas.1722613115.

22. Györfy, B.A.; Tóth, V.; Török, G.; Gulyássi, P.; Kovács, R.; Vadászi, H.; Micsonai, A.; Tóth, M.E.; Sántha, M.; Homolya, L., et al. Synaptic mitochondrial dysfunction and septin accumulation are linked to complement-mediated synapse loss in an Alzheimer's disease animal model. *Cell Mol Life Sci* **2020**, doi:10.1007/s00018-020-03468-0.

23. Haynes, S.E.; Hollopeter, G.; Yang, G.; Kurpius, D.; Dailey, M.E.; Gan, W.B.; Julius, D. The P2Y₁₂ receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat Neurosci* **2006**, *9*, 1512-1519, doi:10.1038/nn1805.

24. He, Y.; Yao, X.; Taylor, N.; Bai, Y.; Lovenberg, T.; Bhattacharya, A. RNA sequencing analysis reveals quiescent microglia isolation methods from postnatal mouse brains and limitations of BV2 cells. *J Neuroinflammation* **2018**, *15*, 153, doi:10.1186/s12974-018-1195-4.

25. Hong, S.; Beja-Glasser, V.F.; Nfonoyim, B.M.; Frouin, A.; Li, S.; Ramakrishnan, S.; Merry, K.M.; Shi, Q.; Rosenthal, A.; Barres, B.A., et al. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science* **2016**, *352*, 712-716, doi:10.1126/science.aad8373.

26. Hristovska, I.; Verdonk, F.; Comte, J.C.; Tsai, E.S.; Desestret, V.; Honnorat, J.; Chrétien, F.; Pascual, O. Ketamine/xylazine and barbiturates modulate microglial morphology and motility differently in a mouse model. *PLoS One* **2020**, *15*, e0236594, doi:10.1371/journal.pone.0236594.

27. Huh, Y.; Cho, J. Urethane anesthesia depresses activities of thalamocortical neurons and alters its response to nociception in terms of dual firing modes. *Front Behav Neurosci* **2013**, *7*, 141, doi:10.3389/fnbeh.2013.00141.
28. Ishikawa, A.W.; Komatsu, Y.; Yoshimura, Y. Experience-dependent emergence of fine-scale networks in visual cortex. *J Neurosci* **2014**, *34*, 12576-12586, doi:10.1523/JNEUROSCI.1346-14.2014.
29. Kasahara, Y.; Igata, H.; Sasaki, T.; Ikegaya, Y.; Koyama, R. The Pharmacological Assessment of GABA. *eNeuro* **2019**, *6*, doi:10.1523/ENEURO.0429-18.2019.
30. Kasahara, Y.; Koyama, R.; Ikegaya, Y. Depth and time-dependent heterogeneity of microglia in mouse hippocampal slice cultures. *Neurosci Res* **2016**, *111*, 64-69, doi:10.1016/j.neures.2016.05.001.
31. Koyama, R.; Tao, K.; Sasaki, T.; Ichikawa, J.; Miyamoto, D.; Muramatsu, R.; Matsuki, N.; Ikegaya, Y. GABAergic excitation after febrile seizures induces ectopic granule cells and adult epilepsy. *Nat Med* **2012**, *18*, 1271-1278, doi:10.1038/nm.2850.
32. Lehrman, E.K.; Wilton, D.K.; Litvina, E.Y.; Welsh, C.A.; Chang, S.T.; Frouin, A.; Walker, A.J.; Heller, M.D.; Umemori, H.; Chen, C., et al. CD47 Protects Synapses from Excess Microglia-Mediated Pruning during Development. *Neuron* **2018**, *100*, 120-134.e126, doi:10.1016/j.neuron.2018.09.017.
33. Li, Y.; Du, X.F.; Liu, C.S.; Wen, Z.L.; Du, J.L. Reciprocal regulation between resting microglial dynamics and neuronal activity in vivo. *Dev Cell* **2012**, *23*, 1189-1202, doi:10.1016/j.devcel.2012.10.027.

34. Lim, S.H.; Park, E.; You, B.; Jung, Y.; Park, A.R.; Park, S.G.; Lee, J.R. Neuronal synapse formation induced by microglia and interleukin 10. *PLoS One* **2013**, *8*, e81218, doi:10.1371/journal.pone.0081218.
35. Mandal, D.; Moitra, P.K.; Saha, S.; Basu, J. Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes. *FEBS Lett* **2002**, *513*, 184-188, doi:10.1016/s0014-5793(02)02294-9.
36. Mazaheri, F.; Breus, O.; Durdu, S.; Haas, P.; Wittbrodt, J.; Gilmour, D.; Peri, F. Distinct roles for BAI1 and TIM-4 in the engulfment of dying neurons by microglia. *Nat Commun* **2014**, *5*, 4046, doi:10.1038/ncomms5046.
37. Miyamoto, A.; Wake, H.; Ishikawa, A.W.; Eto, K.; Shibata, K.; Murakoshi, H.; Koizumi, S.; Moorhouse, A.J.; Yoshimura, Y.; Nabekura, J. Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex. *Nat Commun* **2016**, *7*, 12540, doi:10.1038/ncomms12540.
38. Nanou, E.; Catterall, W.A. Calcium Channels, Synaptic Plasticity, and Neuropsychiatric Disease. *Neuron* **2018**, *98*, 466-481, doi:10.1016/j.neuron.2018.03.017.
39. O'Donnell, J.; Zeppenfeld, D.; McConnell, E.; Pena, S.; Nedergaard, M. Norepinephrine: a neuromodulator that boosts the function of multiple cell types to optimize CNS performance. *Neurochem Res* **2012**, *37*, 2496-2512, doi:10.1007/s11064-012-0818-x.
40. Onodera, J.; Nagata, H.; Nakashima, A.; Ikegaya, Y.; Koyama, R. Neuronal brain-derived neurotrophic factor manipulates microglial dynamics. *Glia* **2020**, doi:10.1002/glia.23934.
41. Orrenius, S.; Zhivotovsky, B.; Nicotera, P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2003**, *4*, 552-565, doi:10.1038/nrm1150.

42. Ow, Y.P.; Green, D.R.; Hao, Z.; Mak, T.W. Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2008**, *9*, 532-542, doi:10.1038/nrm2434.
43. Paolicelli, R.C.; Bolasco, G.; Pagani, F.; Maggi, L.; Scianni, M.; Panzanelli, P.; Giustetto, M.; Ferreira, T.A.; Guiducci, E.; Dumas, L., et al. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* **2011**, *333*, 1456-1458, doi:10.1126/science.1202529.
44. Racine, R.J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **1972**, *32*, 281-294, doi:10.1016/0013-4694(72)90177-0.
45. Schafer, D.P.; Lehrman, E.K.; Kautzman, A.G.; Koyama, R.; Mardinly, A.R.; Yamasaki, R.; Ransohoff, R.M.; Greenberg, M.E.; Barres, B.A.; Stevens, B. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* **2012**, *74*, 691-705, doi:10.1016/j.neuron.2012.03.026.
46. Schildge, S.; Bohrer, C.; Beck, K.; Schachtrup, C. Isolation and culture of mouse cortical astrocytes. *J Vis Exp* **2013**, doi:10.3791/50079.
47. Scott-Hewitt, N.; Perrucci, F.; Morini, R.; Erreni, M.; Mahoney, M.; Witkowska, A.; Carey, A.; Faggiani, E.; Schuetz, L.T.; Mason, S., et al. Local externalization of phosphatidylserine mediates developmental synaptic pruning by microglia. *EMBO J* **2020**, *39*, e105380, doi:10.15252/embj.2020105380.
48. Seibenhener, M.L.; Wooten, M.W. Isolation and culture of hippocampal neurons from prenatal mice. *J Vis Exp* **2012**, doi:10.3791/3634.
49. Sierra, A.; Encinas, J.M.; Deudero, J.J.; Chancey, J.H.; Enikolopov, G.; Overstreet-Wadiche, L.S.; Tsirka, S.E.; Maletic-Savatic, M. Microglia shape adult

hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell* **2010**, 7, 483-495, doi:10.1016/j.stem.2010.08.014.

50. Stence, N.; Waite, M.; Dailey, M.E. Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia* **2001**, 33, 256-266.

51. Stern, S.T.; Adiseshiaiah, P.P.; Crist, R.M. Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. *Part Fibre Toxicol* **2012**, 9, 20, doi:10.1186/1743-8977-9-20.

52. Stowell, R.D.; Sipe, G.O.; Dawes, R.P.; Batchelor, H.N.; Lordy, K.A.; Whitelaw, B.S.; Stoessel, M.B.; Bidlack, J.M.; Brown, E.; Sur, M., et al. Noradrenergic signaling in the wakeful state inhibits microglial surveillance and synaptic plasticity in the mouse visual cortex. *Nat Neurosci* **2019**, 22, 1782-1792, doi:10.1038/s41593-019-0514-0.

53. Suzumura, A.; Sawada, M.; Yamamoto, H.; Marunouchi, T. Effects of colony stimulating factors on isolated microglia in vitro. *J Neuroimmunol* **1990**, 30, 111-120, doi:10.1016/0165-5728(90)90094-4.

54. Tremblay, M.; Lowery, R.L.; Majewska, A.K. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol* **2010**, 8, e1000527, doi:10.1371/journal.pbio.1000527.

55. Ventura, R.; Harris, K.M. Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J Neurosci* **1999**, 19, 6897-6906.

56. Wake, H.; Moorhouse, A.J.; Jinno, S.; Kohsaka, S.; Nabekura, J. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci* **2009**, 29, 3974-3980, doi:10.1523/JNEUROSCI.4363-08.2009.

57. Weinhard, L.; di Bartolomei, G.; Bolasco, G.; Machado, P.; Schieber, N.L.; Neniskyte, U.; Exiga, M.; Vadisiute, A.; Raggioli, A.; Schertel, A., et al. Microglia remodel synapses by presynaptic trogocytosis and spine head filopodia induction. *Nat Commun* **2018**, *9*, 1228, doi:10.1038/s41467-018-03566-5.
58. Wong, Y.H.; Lee, C.M.; Xie, W.; Cui, B.; Poo, M.M. Activity-dependent BDNF release via endocytic pathways is regulated by synaptotagmin-6 and complexin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2015**, *112*, E4475-4484, doi:10.1073/pnas.1511830112.
59. Xu, J.H.; Long, L.; Tang, Y.C.; Hu, H.T.; Tang, F.R. Ca(v)1.2, Ca(v)1.3, and Ca(v)2.1 in the mouse hippocampus during and after pilocarpine-induced status epilepticus. *Hippocampus* **2007**, *17*, 235-251, doi:10.1002/hipo.20263.

【謝辞】

本研究は多くの方々のご指導およびご支援の下に行われました。お力添えをいただいた方々にここに謹んで感謝の意を表します。

本論文を纏めるにあたり、様々な角度からのデータ解釈、研究の展開のさせ方をご指導ご助言賜りました東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室 池谷裕二 教授には深く感謝致します。先生の幅広く深い知識に基づいた考察にいつも感銘を受けておりました。

本研究を行うにあたり、直接ご指導いただき、研究内容や視点について多大なるご支援、ご配慮を賜りました東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室 小山隆太 准教授には、心より感謝致します。知識、手技共に未熟であった学部生の頃から、研究、学会、執筆活動など多岐に亘る経験の機会を与えていただき、非常に充実した学生生活を送ることができました。また、いついかなるときも私たち学生のことを信頼、鼓舞し、助けを求めた際には全力で支えてくださる小山先生の姿を見て、教育者としての偉大さを感じておりました。今後、私自身も研鑽を重ね、小山先生のような研究者となれるよう、邁進してまいります。

本研究を行うにあたり、様々な角度から貴重なご指導ご助言を賜りました東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室 佐々木拓哉 助教には深く感謝致します。先生の的確なコメントにより研究を一層進めることができました。

本研究を行うにあたり、様々な角度から貴重なご指導ご助言を賜りました東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室 中嶋藍 助教には深く感謝致します。先生の深夜まで実験をされている姿を見て私も頑張らなくてはいつも思っていました。

本研究を行うにあたり、様々な角度から貴重なご指導ご助言を賜りました東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室 竹内春樹 特任准教授には深く感謝致します。研究室の他メンバーとは異なる角度からのご助言はいつも自身の研究を見直すきっかけとなりました。

本研究を行うにあたり、様々な角度から貴重なご指導ご助言を賜りました東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室 松本信圭 特任助教には深く感謝致します。松本先生が学生の頃より相談にのっていただき、特任助教になられた後も学生に一番近い存在として私たちを支えてくださいました。

本研究を行うにあたり、同じグループとして、共に研究に励んできました東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室 河野玲奈さん、大柿安里さんに心から感謝致します。常に余裕のない姿ばかりを見せてきてしまいましたが、快く実験の手伝いやディスカッションをしてくださり、楽しく研究を進めることができました。今後のあなたたちの活躍を心から祈っています。

本研究を行うにあたり、同じグループとして、共に研究に励んできました東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室 周至文さん、星雄高さん、平木俊光さん、小野寺純也さん、木下慎一さん、荒木匡さん、キムギョリさん、妹尾賢治さん、三上弘記さんに心から感謝致します。日頃からディスカッションにこころよく応じていただきました。あなたたちが居なければ本研究が形になることはなかったといっても過言ではありません。

本研究を行うにあたり、研究手法や方向性について多くのアドバイスを賜りました東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室 森川勝太さんに心から感謝致します。森川さんのご協力が本研究を大きく発展させたことは疑いようがありません。今後も活躍されることを祈っております。

本研究を行うにあたり、研究室の同期として共に研究に励んだ青木勇樹さん、岡田桜さん、高夢璇さん、紺野大地さん、八木佐一郎さんに心より感謝いたします。同期として切磋琢磨した日々は私にとってかけがえのないものです。各々進路は違いますが、みなさんの今後の活躍を願っています。

本研究を行うにあたり、共に過ごしました東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室の皆様へ感謝致します。

8年間共に切磋琢磨してきた東京大学薬学部の同期の皆様へ感謝致します。

実験動物の飼育を行っていただきました動物施設の方々に感謝の意を表します。

本研究で用いた実験動物に感謝し、本研究が生命科学の発展および新規治療法の開発に貢献することを強く願います。

最後に、長きにわたる学生生活を支えてくれました父 安藤修、母 安藤和子、兄 安藤景祐、祖父 安藤義明に心から感謝し、本論文の結びとさせていただきます。