

論文の内容の要旨

論文題目：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

【序論】

脳内免疫細胞マイクログリアは、発達や疾患の過程で神経細胞シナプスを貪食する。しかし、これらの知見は固定標本の観察に基づいており、マイクログリアが生きた神経細胞からシナプスを貪食することを示す報告はなかった。そこで、本研究では生体脳におけるマイクログリアの形態と機能を再現する新規培養系を構築し、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試みた。そして、マイクログリアが神経細胞の突起構造を切断することなくシナプスを貪食することを発見した。さらに、マイクログリアによるシナプス貪食が、補体と神経活動による時空間的制御を受けることを明らかにした。

【結果・考察】

1. マイクログリアは生きた神経細胞のシナプスを貪食する

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、培養系を利用した。従来の培養方法では、マイクログリアは過剰に活性化した形態を示し、生体脳で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った (図 1A)。そこで、マイクログリアを脳内他種細胞と共培養し、培養条件を詳細に検討することで、生体脳に近い環境を構築した。その結果、生体脳マイクログリアの形態を培養環境において再現することに成功した (図 1A)。この共培養系において、マイクログリア、プレシナプス、神経細胞膜をそれぞれ緑、赤、近赤外の蛍光で標識し、三者の同時リアルタイムイメージングを可能にした。そして、マイクログリアが生きた神経細胞の突起構造を切断することなく、シナプスを貪食する一連の過程を捉えることに成功した (図 1B)。

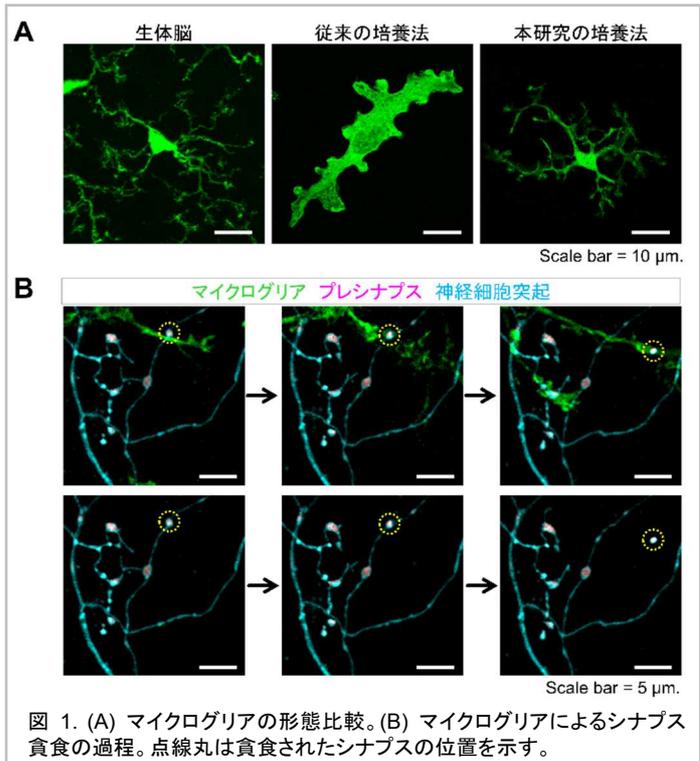
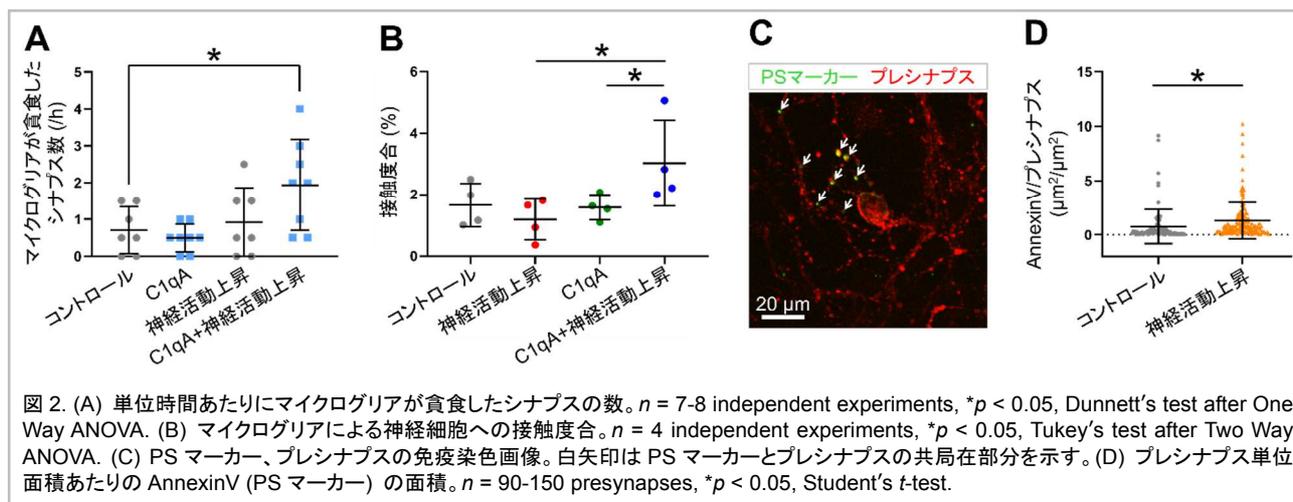


図 1. (A) マイクログリアの形態比較。(B) マイクログリアによるシナプス貪食の過程。点線丸は貪食されたシナプスの位置を示す。

2. 神経活動上昇がマイクログリアによる補体依存的なシナプス貪食を促進する

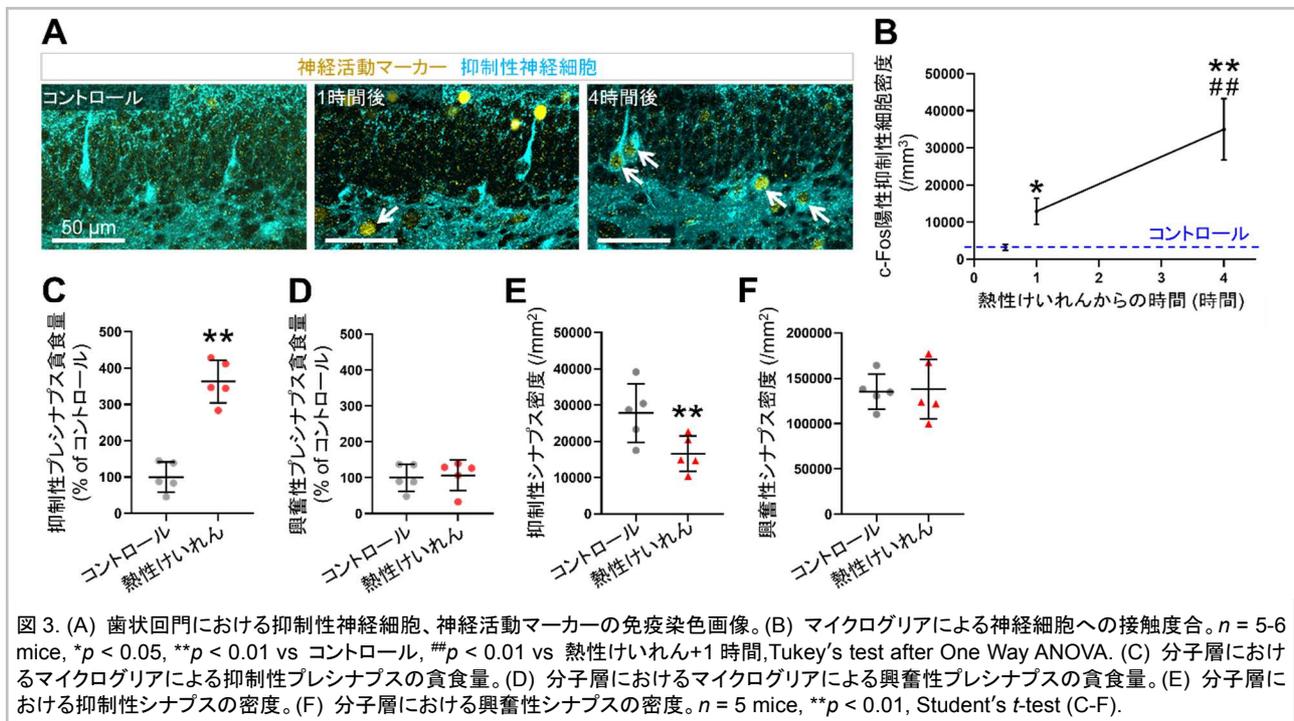
発達脳では、古典的補体経路の活性化がシナプス貪食を促進する。古典的補体経路開始の一部を担う補体分子 C1q は eat-me signal と呼ばれ、マイクログリアが貪食するシナプスを選別する際の目印となる可能性がある。そこで、共培養系に C1q サブユニット A (C1qA) のリコンビナントタンパク質を添加し、シナプス貪食が促進される可能性を検証した。その結果、単位時間あたりのシナプス貪食数はコントロール群と C1qA 添加群とで同程度であり、シナプス貪食の促進には別の因子が必要であることが示唆された (図 2A)。神経活動が上昇すると、マイクログリアの突起の運動性は上昇する。そこで、神経活動の上昇により、マイクログリアがシナプスに付着した補体を認識しやすくなる可能性を考えた。本研究では、アデノ随伴ウイルスを用いて神経細胞に興奮性の DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drug) を発現させ、DREADD のリガンドである CNO を添加して神経活動を上昇させた。そして、C1qA 添加と神経活動上昇を組み合わせ、シナプス貪食のリアルタイムイメージングを行った。その結果、C1qA 存在下で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 2A)。以上より、神経活動上昇が補体依存的なシナプス貪食を促進することが示された。

次に、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促進する可能性を検証するため、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。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 2B)。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。そこで次に、アポトーシス関連分子に着目した。近年、アポトーシス関連分子である Cleaved Caspase-3 (CC-3) や Phosphatidylserine (PS) が発現するプレシナプスに補体が共局在することが示されている。これらの報告から、神経活動上昇がプレシナプスにおけるアポトーシス関連分子の発現を増加させ、プレシナプスへの補体の付着を促進する可能性を考えた。CC-3 は PS の露出を促進することが知られている。そこで、PS に結合する AnnexinV を用いてプレシナプス表面における PS 量を測定したところ、神経活動上昇により有意に増加した (図 2C, D)。以上の結果から、神経活動上昇がマイクログリアによる補体依存的なシナプス貪食を促進すること、そしてそれがプレシナプスにおけるアポトーシス関連分子の発現を介している可能性が示された。



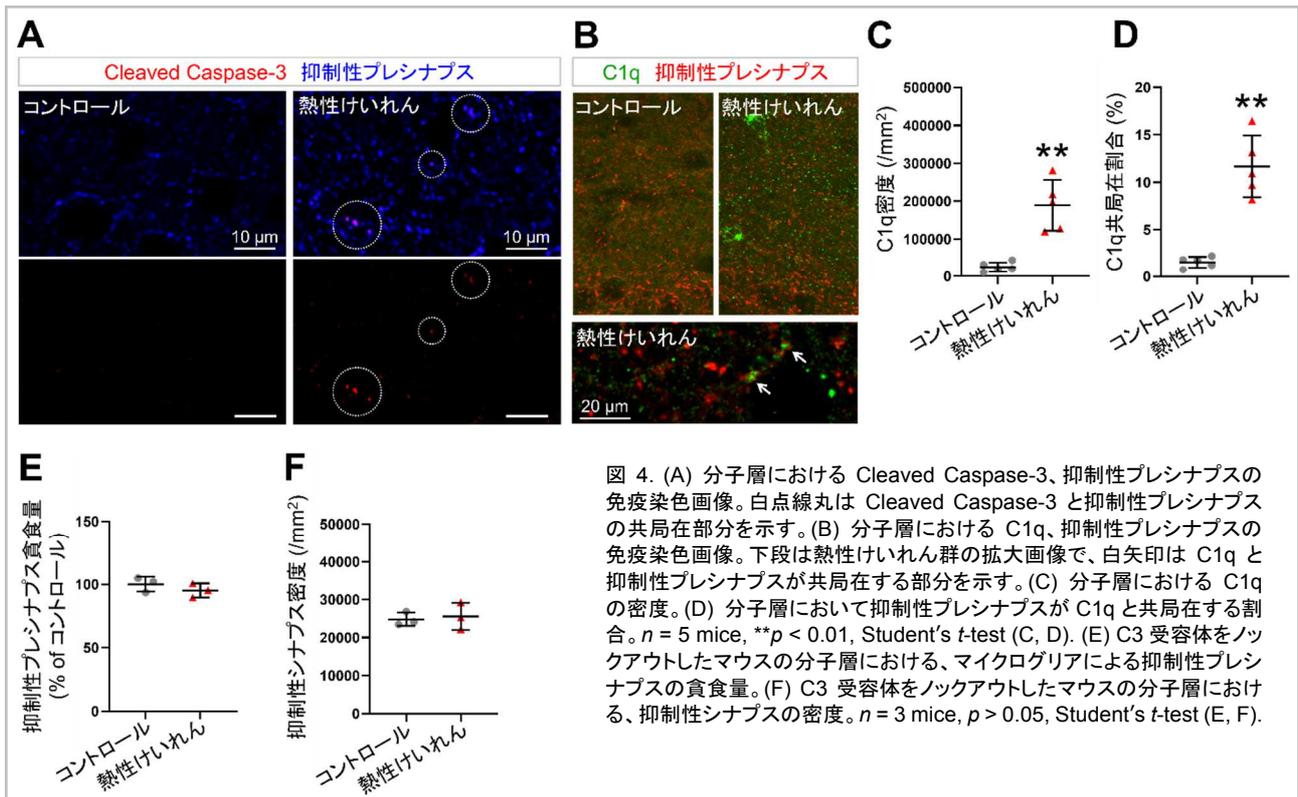
3. 抑制性神経活動が維持される熱性けいれんにおいて、抑制性シナプス特異的な食食が生じる

共培養系で発見したシナプス食食メカニズムを *in vivo* で検証するため、海馬の神経活動上昇を伴う熱性けいれん (Febrile seizure; FS) のモデルマウスを用いた。まず、最初期遺伝子である c-Fos を神経活動マーカーとして、FS 後の神経活動変化を解析した。その結果、歯状回門に存在する抑制性神経細胞における c-Fos の発現が FS の 1 時間後には有意に上昇し、少なくとも 4 時間後まで維持された (図 3A, B)。この結果から、FS 後に抑制性神経細胞が持続的に活性化することが示唆された。歯状回門の抑制性神経細胞は分子層にシナプスを形成する。そこで、FS 後の分子層に焦点を当て、マイクログリアと抑制性シナプスの相互作用を検証した。マイクログリアによる抑制性プレシナプスの食食量を定量すると、FS の 6 時間後に有意に増加した (図 3C)。そして、FS の 24 時間後には、分子層における抑制性シナプス密度が減少した (図 3E)。一方で、興奮性プレシナプスに関しては、マイクログリアによるシナプス食食量およびシナプス密度が FS によって変化しなかった (図 3D, F)。これらの結果から、FS 後にマイクログリアは抑制性プレシナプスを特異的に食食することが示された。



4. 熱性けいれん後、抑制性シナプスにおけるアポトーシス関連分子の発現および補体の付着が促進される

FS モデルマウスにおける抑制性シナプスの食食が、アポトーシス関連分子の発現や補体の付着を介している可能性を検証した。まず、アポトーシス関連分子である CC-3 の発現を免疫染色により観察したところ、FS の 6 時間後に CC-3 の量が増加し、それらのほぼすべてが抑制性プレシナプスに共局在していた (図 4A)。次に、補体分子 C1q の発現を免疫染色により観察したところ、FS の 6 時間後には C1q の発現量および抑制性プレシナプスとの共局在が増加した (図 4B-D)。以上の結果から、FS 後に活動が上昇した抑制性プレシナプスにおいて、アポトーシス関連分子の発現および補体の付着が促進されることが示された。最後に、FS 後の抑制性シナプスの食食が補体依存的であることを検証するため、脳実質内ではマイクログリア特異的に発現する C3 受容体をノックアウトしたマウスを用いて FS を誘導した。すると、FS 後のマイクログリアによる抑制性シナプスの食食量の増加や、抑制性シナプス密度の減少が生じなかった (図 4E, F)。以上の結果から、FS 後の抑制性シナプスの食食が補体依存的であることが示された。



【総括・展望】

本研究では、マイクログリアによるシナプス食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食食することを発見した。また、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上昇を介して補体依存的なシナプス食食を促進することを示唆した。さらに、熱性けいれんモデルの利用により、同様のシナプス食食メカニズムが生体脳でも生じることを示した。活動の高いシナプスがマイクログリアによって食食されるという結果は、発達期においてマイクログリアが活動の弱いシナプスを優先的に食食するという先行研究と一致しない。しかし、過活動したシナプスの食食は神経回路のホメオスタシス維持に重要であると考えられる。補体経路と神経活動が協調的に働く分子メカニズムの解明は、神経回路形成メカニズムにとどまらず、シナプス変性を伴う疾患の新規治療ターゲットの発見につながる可能性がある。