

審査の結果の要旨

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

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無かった。安藤は、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。さらに、マイクログリアが貪食するシナプスを選定するメカニズムの解明を試みた。

安藤は、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、マイクログリアが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。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。次に、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。

次に、この共培養系を用いてマイクログリアが貪食するシナプスを選定するメカニズムの解明を試みた。発達脳においてシナプス貪食を促進する古典的補体経路に着目し、その一部を担う補体分子 C1q サブユニット A (C1qA) を共培養系に添加することで、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。そこで、神経活動上昇がマイクログリアの突起運動性を上昇させるとの先行研究に着目し、神経活動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。そして、興奮性の DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drug) を用いて神経活動を上昇させ、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。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。

上記の結果がマイクログリアによるシナプスへの接触促進によるものである可能性を検証するため、マイクログリアと神経細胞の接触度合を測定した。しかしながら、神経活動上昇により接触度合が変化せず、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示された。そこで安藤は、アポトーシス関連分子に着目した。近年、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、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。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。

次に、共培養系で発見したシナプス貪食メカニズムを生体脳で検証するため、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 4 時間後まで維持された。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貪食量を定量すると、FS の 6 時間後に有意に増加した。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。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貪食量およびシナプス密度が FS によって変化しなかった。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貪食することが示された。

最後に、FS モデルマウスにおける抑制性シナプスの貪食が、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。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。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貪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貪食量の増加や、抑制性シナプス密度の減少が生じなかった。以上の結果から、FS 後の抑制性シナプスの貪食が補体依存的であることが示された。

本論文において安藤は、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貪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、同様のシナプス貪食メカニズムが生体脳でも生じることを示した。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。

よって本論文は博士 (薬科学) の学位請求論文として合格と認められる。