

大人の神経細胞を接続する「シナプス」の数を調節するしくみ

樽松 千紘, 澤本 和延

1. はじめに

哺乳類の脳では、生後も脳室下帯や海馬歯状回では神経幹細胞が存在し、各々、嗅球や海馬の新しいニューロンが作られている。産生された新生ニューロンは、成熟過程において、他のニューロンとシナプスを形成することで、神経回路に組み込まれる。高度な神経回路を形成するためには、シナプスの形成と除去（刈り込み）のバランスをとることで、最適なシナプスの数を維持することが重要である。これまで、成体新生ニューロンのシナプス刈り込みについてはあまり研究されておらず、メカニズムも明らかになっていなかった。

中枢神経系のグリア細胞であるミクログリアは、ニューロン新生に重要な役割を果たすことがわかっている。たとえば、ミクログリアがニューロン新生領域に生じた死細胞を速やかに貪食すること、ミクログリアを除去すると成体新生ニューロンのシナプス密度に異常が生じること、成体海馬においてミクログリアがシナプス構造を貪食することなどが報告されていた。しかし、ミクログリアと成体新生ニューロンのシナプス刈り込みとの関連は十分には明らかになっておらず、それらを制御する分子メカニズムも不明だった。筆者らは、細胞膜を構成するリン脂質であるホスファチジルセリン (PS) に着目し、新しい遺伝子改変マウスを作製することで、そのメカニズムを明らかにした。本稿では、ミクログリアによる成体新生ニューロンのシナプス貪食のメカニズムについて、筆者らの知見¹⁾を含めて概説する。

2. ミクログリアによる成体新生ニューロンのシナプス貪食

ミクログリアの重要な機能として、貪食能を持つことが知られている。過去の研究によって、死細胞だけでなく、発達期や病態におけるシナプスもミクログリアによって貪食されることがわかっている^{2,3)}。また、ニューロン新生領域においては、海馬歯状回でミクログリアが細胞外マトリックスを貪食することでシナプス可塑性を調節していることが報告されている⁴⁾が、ミクログリアが成体新生ニューロンのシナプスを貪食するかについては明らかではなかった。まず我々は、新生ニューロンの移動先である嗅球におけるミクログリアとシナプスの形態を、電子顕微鏡⁵⁾により詳細に解析した。その結果、ミクログリアの中にシナプスの全体や一部が取り込まれている様子が観察された。このことから、ミクログリアが成体脳において新生ニューロンのシナプスを貪食することが示唆された。シナプスの一部分を貪食する状況は、発達期で報告されているトロゴサイトーシス⁶⁾に形態的に類似していた。マウス小脳では、グリア細胞によるシナプスの一部の貪食が神経回路の最適化に重要であることが報告されている⁷⁾ものの、成体新生ニューロンにおいてグリア細胞がシナプスの一部を貪食する意義は不明である。

3. 成体新生ニューロンのシナプスでの局所的なPSの露出

筆者らは、ミクログリアが成体新生ニューロンのシナプスを貪食するメカニズムに関与する可能性のある分子として、PSに注目した。PSは、細胞膜を形成する脂質二重膜の内側に非対称的に存在するリン脂質である。アポトーシスを起こした細胞では、PSが細胞膜の外側に露出し、周囲のマクロファージによる貪食を促すことから、PSはeat-me signalとして知られている。最近の研究で、PSが発達期のシナプス貪食においてもeat-me signalとして機能することが報告された⁸⁻¹⁰⁾が、成体新生ニューロンのシナプスにおけるPSの局在や機能は不明であった。そこで筆者らは、細胞膜外側に露出したPSを検出する試薬を用いて成体嗅球や海馬の脳切片を染色したところ、PSシグナルとシナプスマーカーであるPSD95が共局在することが確

名古屋市立大学大学院医学研究科脳神経科学研究所神経発達・再生医学分野 (〒467-8601 名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄1)

Synaptic pruning of murine adult-born neurons by microglia depends on phosphatidylserine

Chihiro Kurematsu and Kazunobu Sawamoto (Department of Developmental and Regenerative Neurobiology, Institute of Brain Science, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, 1 Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467-8601, Japan) 本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950537

© 2023 公益社団法人日本生化学会

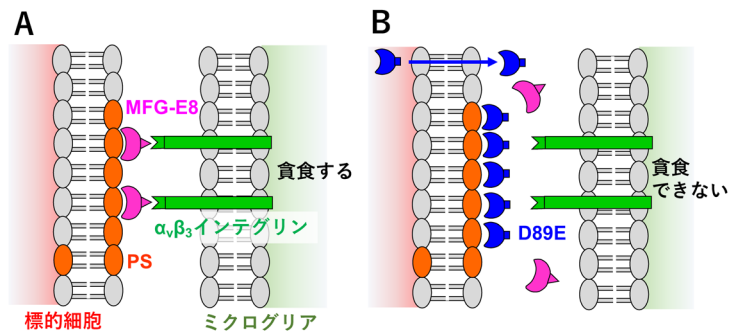


図1 D89EがPS依存的な貪食を阻害する分子メカニズム (A)内因性のMFG-E8の機能を表した図. 分泌されたMFG-E8は, 標的細胞のPSとマイクログリア側の $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに結合することで, 貪食を促進する. (B) D89Eの機能を表した図. D89Eは, PSには結合するものの, $\alpha_v\beta_3$ インテグリンには結合できず, PS依存的な貪食を阻害する.

認められた. このことから, 成体脳のシナプスでも細胞膜外側にPSが露出していることが示唆された. さらに, どのようなシナプスでPSが露出しているのかを明らかにするために, 入力の高いシナプスがEGFP (enhanced green fluorescent protein) で標識される遺伝子改変マウス¹¹⁾を用いて, PSの局在を調べた. その結果, EGFPで標識されないシナプス, すなわち入力の高いシナプスの表面に, PSが露出することが示唆された.

4. PSをマスクする新しい遺伝子改変マウスの作製

シナプス刈り込みにおけるPSの機能を調べるために, PSに結合するオプソニンであるMFG-E8の変異体を用いて, PS依存的な貪食を*in vivo*で阻害するマウスを作製した. MFG-E8は主にアストロサイトやマイクログリアから分泌される糖タンパク質で, 分泌されたMFG-E8は, 標的細胞側のPSとマイクログリア側の $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに結合することで貪食を促進する (図1A). 一方で, MFG-E8^{D89E}変異体 (D89E) は, PSには結合するものの, $\alpha_v\beta_3$ インテグリンには結合できず, PSをマスクすることでPS依存的な貪食を阻害する^{12,13)} (図1B). 筆者らは, タモキシフェンを投与することで, 成体新生ニューロンから特異的にD89Eを分泌させる遺伝子改変マウス (D89Eマウス) を作製した. このマウスでは, D89Eが成体新生ニューロンのシナプス表面に露出したPSに結合することによって, PS依存的なシナプス貪食が阻害されると考えられる.

5. シナプス刈り込み過程におけるPSの役割

これまでの研究で, マイクログリアが自身の突起を複雑に動かして, 周囲のシナプスを触ったり貪食したりする様子が報告されている^{2,6-10)}. こうしたマイクログリアとシナプスの相互作用におけるPSの関与を調べるために, 2光子イ

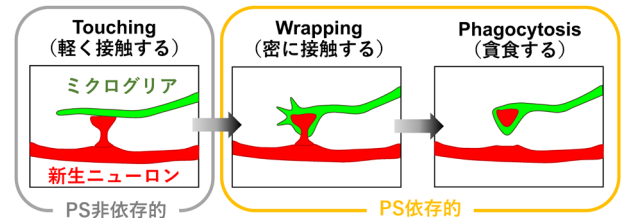


図2 マイクログリアによるスパイン刈り込み過程におけるPSの役割

D89Eマウスでは, コントロールマウスに比べて, WrappingやPhagocytosisの頻度が有意に減少したことから, PSがスパイン上でのマイクログリアの細胞膜の伸展とスパインの貪食に関与していることが示唆された.

メージングによって生きたマウスの脳内のマイクログリアと成体新生ニューロンのシナプス後部構造であるスパインの様子を観察した. コントロールマウスでは, マイクログリアがスパインに軽く接触するTouching, マイクログリアが細胞膜を伸展させてスパインと密に接触するWrapping, マイクログリアがスパインを完全に貪食するPhagocytosisの3種類が観察された. 一方で, D89Eマウスでは, コントロールマウスに比べて, Touchingの頻度は変化しなかったものの, WrappingやPhagocytosisの頻度が有意に減少した. これらの結果から, PSはスパイン上でのマイクログリアの細胞膜の伸展とスパインの貪食に関与していることが示唆された (図2). 死細胞の貪食に関して, PSが貪食細胞の細胞膜を伸展させることが報告されており, 死細胞貪食とスパイン貪食とで共通したメカニズムがあることが明らかとなった.

6. PS依存的なシナプス刈り込みの役割

嗅球の成体新生ニューロンは, 産生後しばらくの間はスパインが盛んに形成されるが, 次第にスパインが刈り込まれ, スパイン密度が減少することがわかっている. こう

したスパイン刈り込みにおけるPSの関与を調べるために、嗅球新生ニューロンのスパイン密度を、コントロールマウスとD89Eマウスで比較した。その結果、コントロールマウスでは過去の報告と同様にスパインの刈り込みがみられたものの、D89Eマウスでは刈り込みが阻害されたことから、PSが成体新生ニューロンのスパイン刈り込みに関与していることが示唆された。さらに、PS依存的なスパイン刈り込みの役割を調べるために、刈り込み後の時期のスパインの様子を観察したところ、D89Eマウスでは、コントロールマウスに比べて、成熟形態のスパイン密度が増加した。このことから、嗅球ではPS依存的なスパイン刈り込みによって、成体新生ニューロンの成熟スパインが過剰にならないように制御されていることが示唆された(図3A)。

また、海馬におけるPS依存的なスパイン刈り込みの役割を調べるために、海馬新生ニューロンのスパインの様子を観察した。その結果、D89Eマウスでは、コントロールマウスに比べて、スパイン全体の密度は増加していたものの、成熟スパインの密度は減少していた。PS依存的なスパイン刈り込みが阻害された結果、未熟なスパインが増加し、スパインの成熟が阻害されたと考えられる。さらに、こうしたスパインの形態的な変化とシナプスの機能に関連があるかを調べるために、海馬新生ニューロンの電気生理学的特徴を解析したところ、D89Eマウスでは、機能的なシナプスの数や強度が減少していた。これらの結果より、海馬におけるPS依存的なスパイン刈り込みは、成体新生ニューロンのスパインの形態的および機能的な成熟に重要であることが示唆された(図3B)。

このように、嗅球と海馬では、PS依存的なスパイン刈り込みが成体新生ニューロンのスパインに異なる影響を与えることが示唆された。しかし、嗅球の成体新生ニューロンは、嗅覚入力を伝える僧帽細胞の働きを抑制する介在ニューロンであり、海馬歯状回の成体新生ニューロンは、梨状皮質からの入力を伝える興奮性の投射ニューロンであるという役割の違いを考慮すると、PS依存的なスパイン刈り込みは、嗅球と海馬のどちらの神経回路においても、情報伝達を促進する方向に働いていると考えられる。

7. PSの露出と疾患との関連

最近の研究により、PS依存的な食食と疾患との関連が注目されている。アルツハイマー病モデルマウスでは、脳内に蓄積するアミロイド β の表面にPSが露出し、TAM受容体を介してミクログリアに食食されること¹⁴⁾や、シナプスでカスパーゼ3が活性化しPSが露出する¹⁵⁾ことで、シナプスの脱落を引き起こすことが示唆されている。PSがアルツハイマー病の複数の病態に関連している点は非常

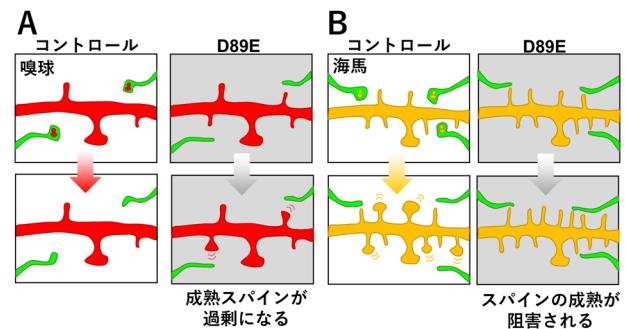


図3 嗅球と海馬におけるPS依存的なスパイン刈り込みの意義 (A)嗅球でのスパイン刈り込みの様子を表した図。嗅球では、D89Eマウスで成熟スパインが増加したことから、PS依存的なスパイン刈り込みによって、成熟スパインが過剰にならないように制御されていることが示唆された。(B)海馬でのスパイン刈り込みの様子を表した図。海馬では、D89Eマウスで成熟スパインが減少したことから、PS依存的なスパイン刈り込みが、スパインの成熟に重要であることが示唆された。

に興味深く、それぞれのメカニズムを解明することができれば、PSをアルツハイマー病の新たな治療標的として応用できる可能性がある。

また、ヒトでも新生児期には脳室下帯や海馬でニューロン新生が生じることがわかっており、成体新生ニューロンは生後の脳発達に重要な役割を果たしていると考えられる。自閉症モデルマウスや自閉症患者の死後脳でミクログリアの形態異常やシナプス密度の増加が報告されている他、シナプス刈り込みの異常がみられるさまざまな遺伝子改変マウスで自閉症様行動がみられている。自閉症とPSとの関連には未解明な点が多く残されており、筆者らが明らかにしたミクログリアによるPS依存的な成体新生ニューロンのシナプス刈り込みとの関連を調べることで、新たな病態の理解につながることを期待される。

8. おわりに

本稿で紹介したように、筆者らの研究によって、成体新生ニューロンのシナプスがミクログリアによってPS依存的に刈り込まれることが明らかとなった。PSは、発達期のシナプス刈り込みにおいてもeat-me signalとして機能することが報告されている⁸⁻¹⁰⁾。生細胞においてアポトーシスを誘導することなく、局所的にPSが露出する現象は非常に興味深い。死細胞では、リン脂質の非対称性維持に関与するスクランブラーゼやフリッパーゼの酵素活性が、カスパーゼやカルシウム濃度依存的に変化することで、PSが細胞膜外側に露出すると考えられているが、シナプス表面におけるPS露出のメカニズムは未解明である。また、死細胞表面に露出したPSを認識するミクログリアの受容体として、MFG-E8を介した $\alpha_v\beta_3$ インテグリン

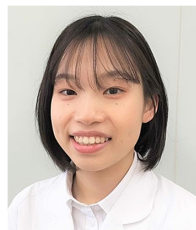
やprotein S/Gas6を介したTAM受容体が知られている。一方で、シナプス表面に露出したPSを認識する受容体としては、TREM2, GPR56, TAM受容体の一種であるMerなどの可能性が示唆されている⁸⁻¹⁰⁾が、PS依存的な成体新生ニューロンのシナプス貪食でも同様の受容体が関与しているかは不明である。また、筆者らの研究では、シナプス入力の強弱とシナプスでのPS露出の関係性が示唆されたが、そのメカニズムについても不明な点が多い。今後こうした点を明らかにしていくことで、PS依存的なシナプス貪食のメカニズムをさらに詳しく解明できると考える。

文 献

- 1) Kurematsu, C., Sawada, M., Ohmuraya, M., Tanaka, M., Kuboyama, K., Ogino, T., Matsumoto, M., Oishi, H., Inada, H., Ishido, Y., et al. (2022) Synaptic pruning of murine adult-born neurons by microglia depends on phosphatidylserine. *J. Exp. Med.*, **219**, e20202304.
- 2) Stevens, B., Allen, N.J., Vazquez, L.E., Howell, G.R., Christopherson, K.S., Nouri, N., Micheva, K.D., Mehalow, A.K., Huberman, A.D., Stafford, B., et al. (2007) The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell*, **131**, 1164–1178.
- 3) 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. (2016) Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science*, **352**, 712–716.
- 4) Nguyen, P.T., Dorman, L.C., Pan, S., Vainchtein, I.D., Han, R.T., Nakao-Inoue, H., Taloma, S.E., Barron, J.J., Molofsky, A.V., Kheirbek, M.A., et al. (2020) Microglial remodeling of the extracellular matrix promotes synapse plasticity. *Cell*, **182**, 388–403. e15.
- 5) Matsumoto, M., Sawada, M., García-Gonzalez, D., Herranz-Pérez, V., Ogino, T., Bang Nguyen, H., Quynh Thai, T., Narita, K., Kumamoto, N., Ugawa, S., et al. (2019) Dynamic changes in ultrastructure of the primary cilium in migrating neuroblasts in the postnatal brain. *J. Neurosci.*, **39**, 9967–9988.
- 6) Weinhard, L., Bartolomei, G.D., Bolasco, G., Machado, P., Schieber, N.L., Neniskyte, U., Exiga, M., Vadisiute, A., Raggioli, A., Schertel, A., et al. (2018) Microglia remodel synapses by presynaptic trogocytosis and spine head filopodia induction. *Nat. Commun.*, **9**, 1228.
- 7) Morizawa, Y.M., Matsumoto, M., Nakashima, Y., Endo, N., Aida, T., Ishikane, H., Beppu, K., Moritoh, S., Inada, H., Osumi, N., et al. (2022) Synaptic pruning through glial synapse engulfment upon motor learning. *Nat. Neurosci.*, **25**, 1458–1469.
- 8) Scott-Hewitt, N., Perrucci, F., Morini, R., Erreni, M., Mahoney, M., Witkowska, A., Carey, A., Faggiani, E., Schuetz, L.T., Mason, S., et al. (2020) Local externalization of phosphatidylserine mediates developmental synaptic pruning by microglia. *EMBO J.*, **39**, e105380.
- 9) Li, T., Chiou, B., Gilman, C.K., Luo, R., Koshi, T., Yu, D., Oak, H.C., Giera, S., Johnson-Venkatesh, E., Muthukumar, A.K., et al. (2020) A splicing isoform of GPR56 mediates microglial synaptic refinement via phosphatidylserine binding. *EMBO J.*, **39**, e104136.
- 10) Park, J., Choi, Y., Jung, E., Lee, S.H., Sohn, J.W., & Chungm, W.S. (2021) Microglial MERTK eliminates phosphatidylserine-displaying inhibitory post-synapses. *EMBO J.*, **40**, e107121.
- 11) Kuboyama, K., Inoue, T., Hashimoto-dani, Y., Itoh, T., Suzuki, T., Tetsuzawa, A., Ohtsuka, Y., Kinoshita, R., Takara, R., Miyazawa, T., et al. (2020) Traceable stimulus-dependent rapid molecular changes in dendritic spines in the brain. *Sci. Rep.*, **10**, 15266.
- 12) Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K., Shinohara, A., Iwamatsu, A., & Nagata, S. (2002) Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature*, **417**, 182–187.
- 13) Asano, K., Miwa, M., Miwa, K., Hanayama, R., Nagase, H., Nagata, S., & Tanaka, M. (2004) Masking of phosphatidylserine inhibits apoptotic cell engulfment and induces autoantibody production in mice. *J. Exp. Med.*, **200**, 459–467.
- 14) Huang, Y., Happonen, K.E., Burrola, P.G., O'Connor, C., Hah, N., Huang, L., Nimmerjahn, A., & Lemke, G. (2021) Microglia use TAM receptors to detect and engulf amyloid β plaques. *Nat. Immunol.*, **22**, 586–594.
- 15) D'Amelio, M., Cavallucci, V., Middei, S., Marchetti, C., Pacioni, S., Ferri, A., Diamantini, A., De Zio, D., Carrara, P., Battistini, L., et al. (2011) Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.*, **14**, 69–76.

著者寸描

●樽松 千紘 (くれまつ ちひろ)



名古屋市立大学医学部6年。

■略歴 1999年愛知県生まれ。幼少期は愛媛県で過ごす。2023年現在、名古屋市立大学医学部6年。

■研究テーマと抱負 ニューロン新生領域におけるミクログリアによる死細胞の貪食やシナプス刈り込みについて研究しています。今回の研究に関連して、ホスファチジルセリンの病態への関与にも興味があります。未熟者ですが、今後も研究に精進したいと思います。

■趣味 テニス, 料理。

●澤本 和延 (さわもと かずのぶ)



名古屋市立大学大学院医学研究科脳神経科学研究所教授。博士(医学)。

■略歴 1967年北海道に生る。90年明大農学部卒。96年東大院・博士課程修了。筑波大助手、阪大助手、UCSFポスドク、慶大講師・助教授を経て、2007年より現職。生理研と豊橋技科大の客員教授を兼任。

■研究テーマと抱負 生後脳のニューロン新生のメカニズム・意義の解明と、脳疾患の治療への応用。

■ウェブサイト <https://k-sawamoto.com/>