

ジャーナルクラブ

2023.6.5

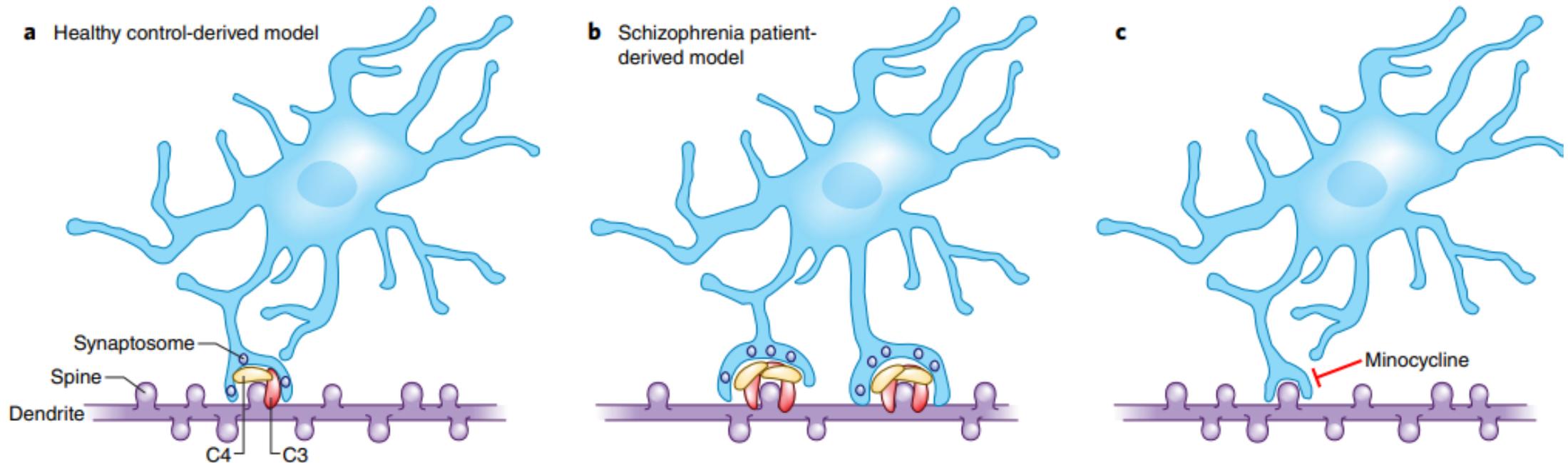
Increased synapse elimination by microglia in schizophrenia patient-derived models of synaptic pruning

Carl M. Sellgren ^{1,2,3*}, Jessica Gracias^{1,2,3}, Bradley Watmuff^{1,2}, Jonathan D. Biag ⁴,
Jessica M. Thanos ^{1,2}, Paul B. Whittredge⁴, Ting Fu^{1,2}, Kathleen Worringer⁴, Hannah E. Brown^{1,2},
Jennifer Wang^{1,2}, Ajamete Kaykas⁴, Rakesh Karmacharya^{1,2,5}, Carleton P. Goold⁴, Steven D. Sheridan^{1,2}
and Roy H. Perlis ^{1,2*}

Synapse density is reduced in postmortem cortical tissue from schizophrenia patients, which is suggestive of increased synapse elimination. Using a reprogrammed in vitro model of microglia-mediated synapse engulfment, we demonstrate increased synapse elimination in patient-derived neural cultures and isolated synaptosomes. This excessive synaptic pruning reflects abnormalities in both microglia-like cells and synaptic structures. Further, we find that schizophrenia risk-associated variants within the human complement component 4 locus are associated with increased neuronal complement deposition and synapse uptake; however, they do not fully explain the observed increase in synapse uptake. Finally, we demonstrate that the antibiotic minocycline reduces microglia-mediated synapse uptake in vitro and its use is associated with a modest decrease in incident schizophrenia risk compared to other antibiotics in a cohort of young adults drawn from electronic health records. These findings point to excessive pruning as a potential target for delaying or preventing the onset of schizophrenia in high-risk individuals.

Intro

- ・ ミクログリアによるシナプス刈り込みも統合失調症(SZ)の発症も青年期、SZ死後脳でシナプスの減少やミクログリアの過剰活性化の所見
→SZ発症にミクログリアによるシナプス過剰刈り込みが関与している可能性
- ・ SZ患者において活性化ミクログリアが補体C4を介してシナプスを傷害し、ミクログリア活性化阻害作用を有するミノサイクリンによってシナプス傷害がレスキューされる

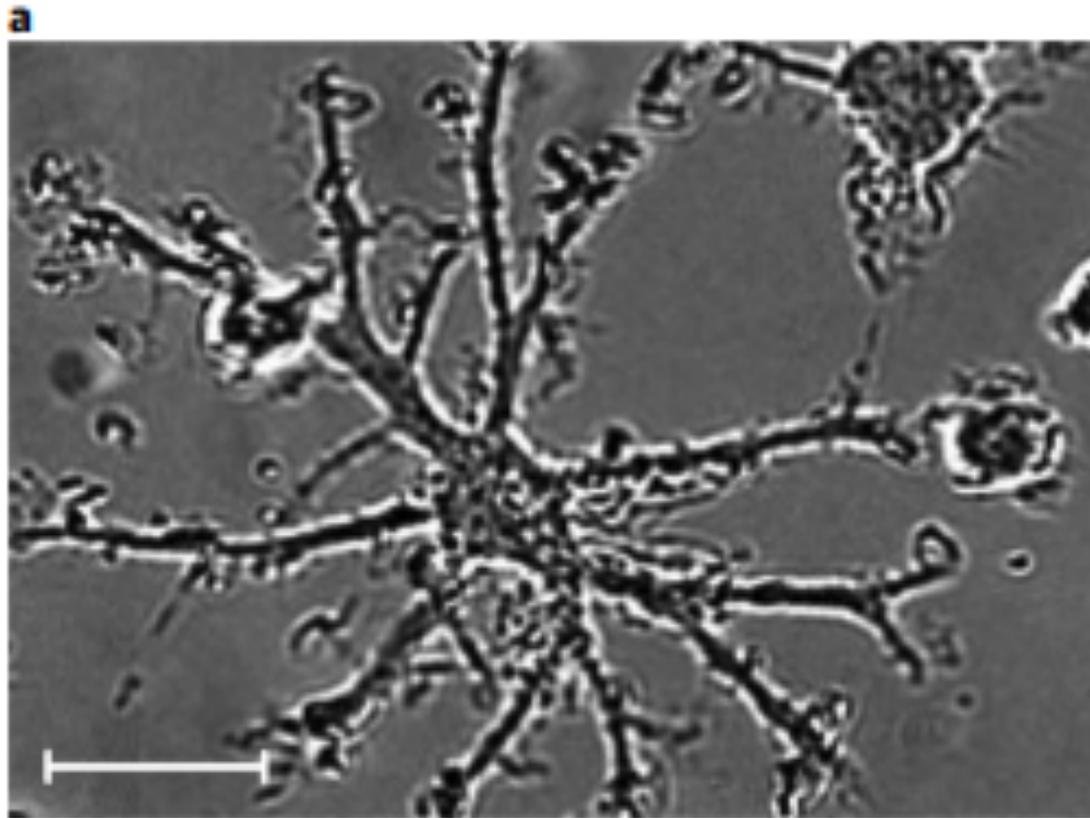


Results

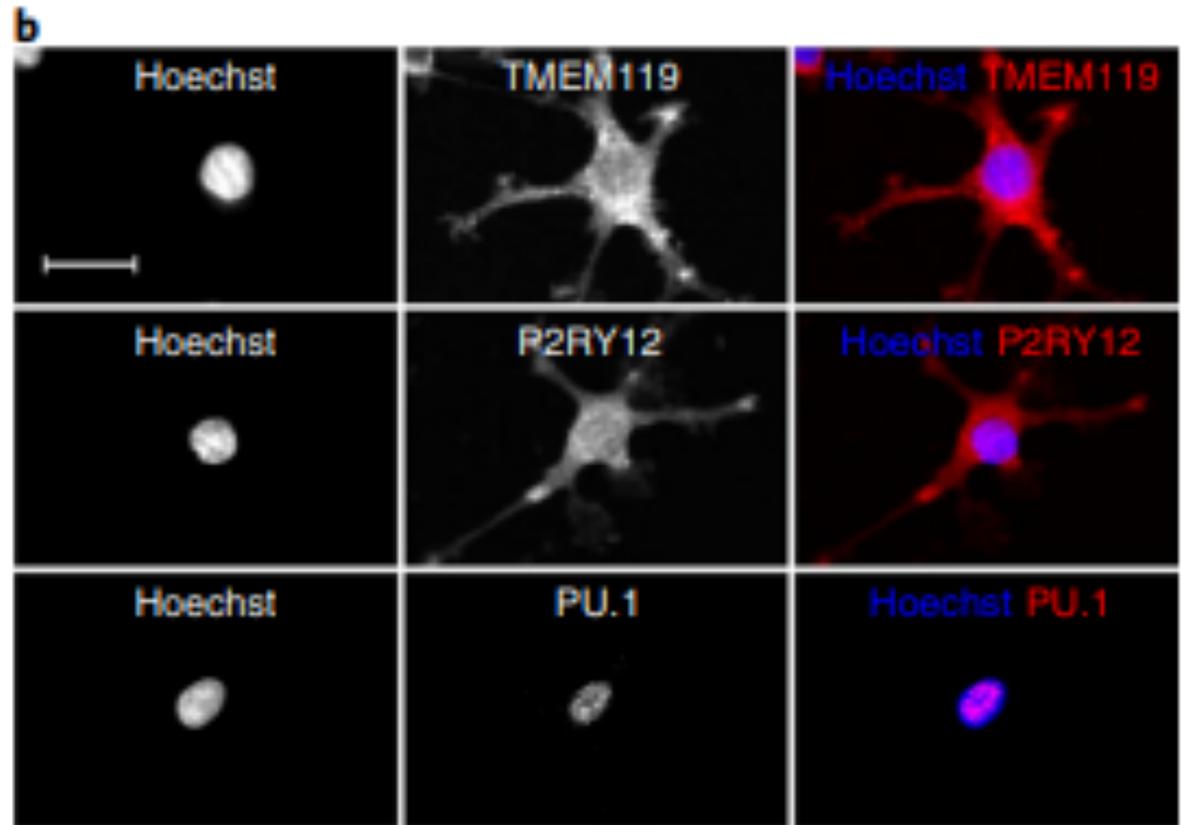
iMG細胞とは

九州大学精神科の加藤隆弘先生が開発 Ohgidani, M. *et al.* : *Sci. Rep.*, 4, 4957 (2014)



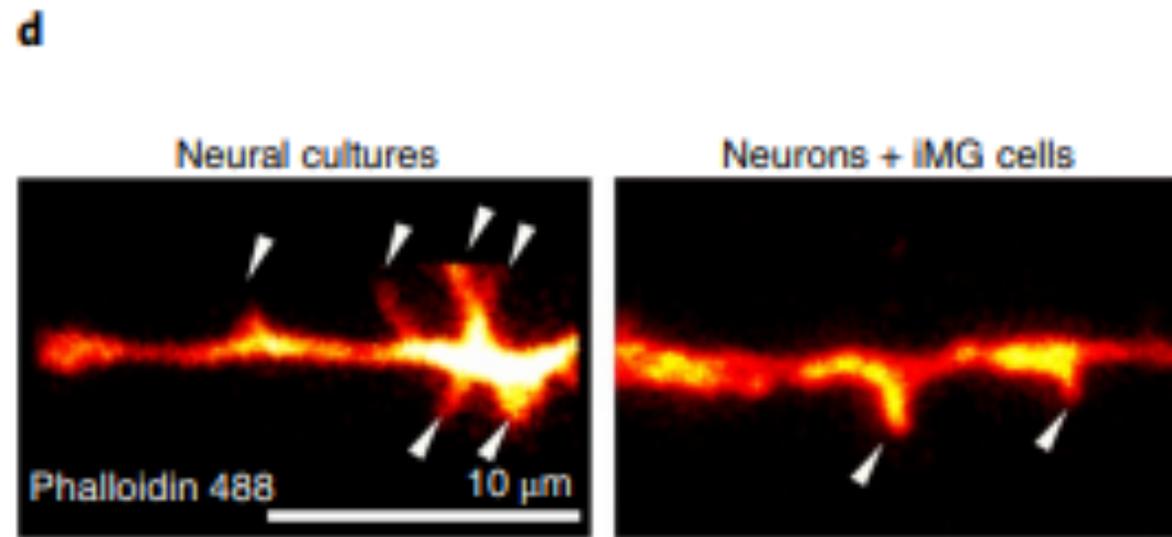
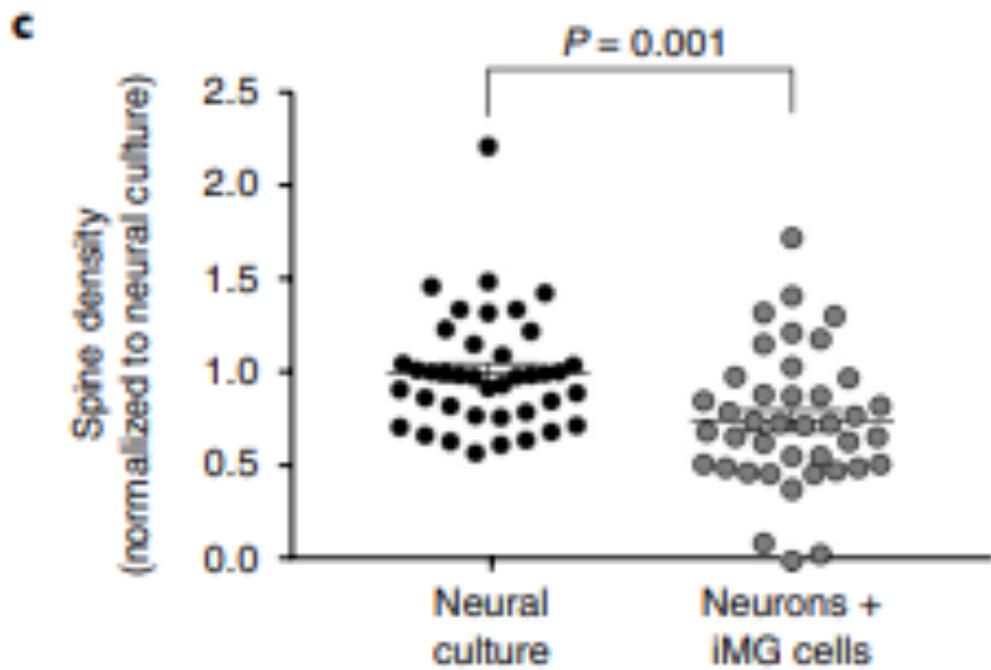


iMG細胞
ラミファイド型様の形態



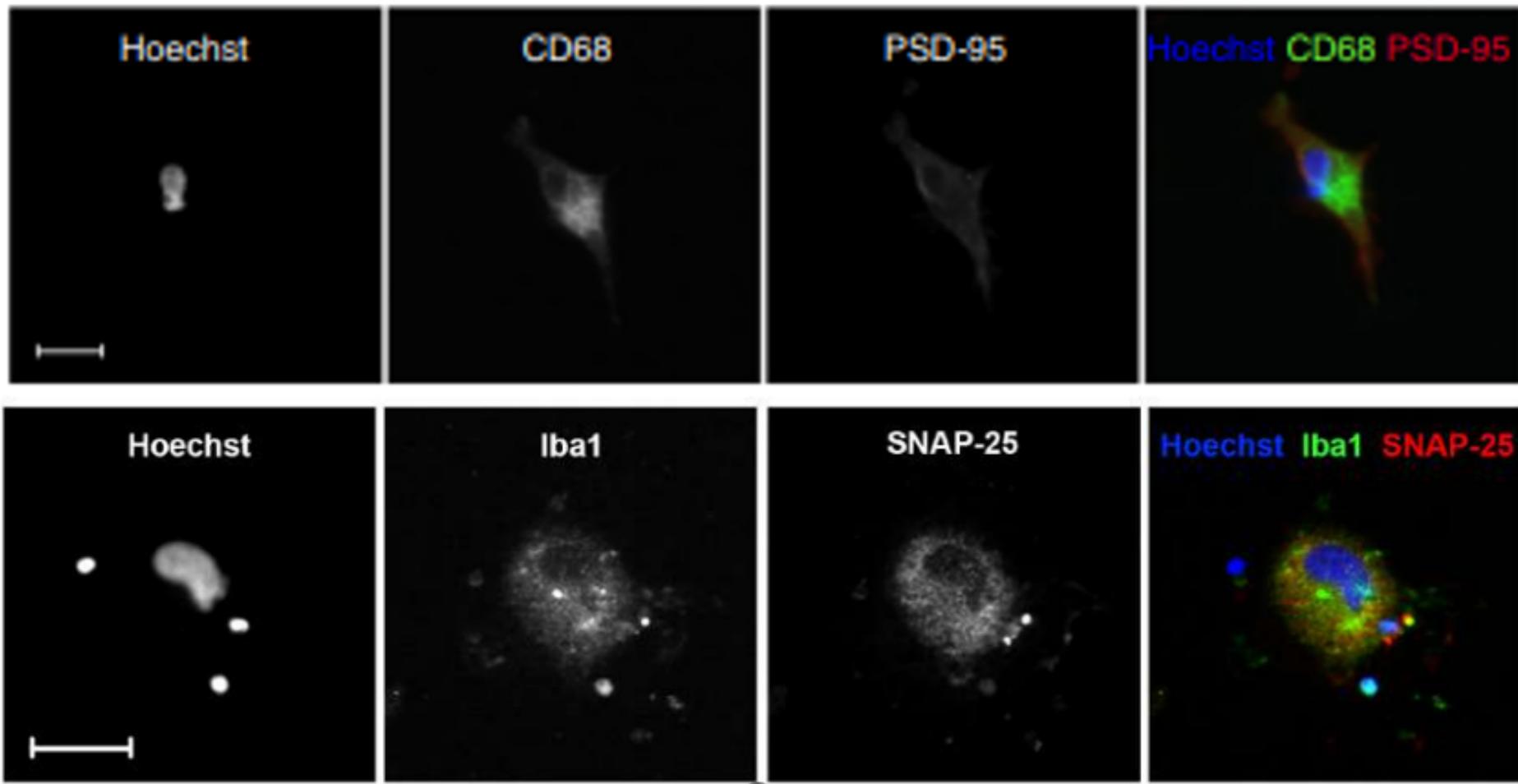
TMEM119、P2RY12、PU.1はミクログリアマーカー
特にTMEM119はマクロファージには発現していない

Hoechst: ヘキスト染色, DNAを染める



iPS細胞由来のニューロンとiMG細胞を共培養するとスパイン密度が減少→iMG細胞がシナプスを貪食している？

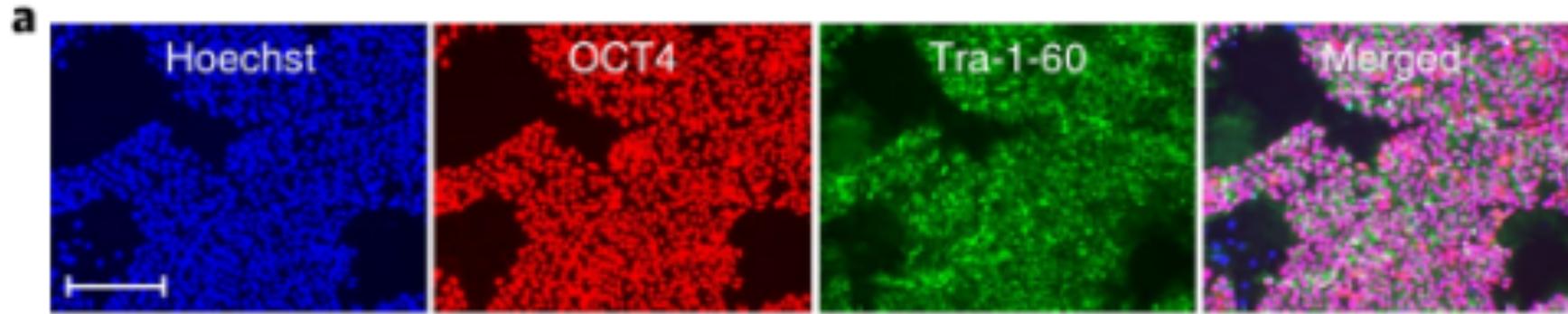
Phalloidin488: F-アクチンを染める



iMG細胞にシナプス後マーカであるPSD-95とシナプス前マーカであるSNAP-25が取り込まれた
 → iMG細胞がシナプスを貪食している！

CD68: マクロファージと活性化ミクログリアに高いレベルで発現するリソソームタンパク質

Iba1: ミクログリアやマクロファージに特異的なカルシウム結合タンパク質



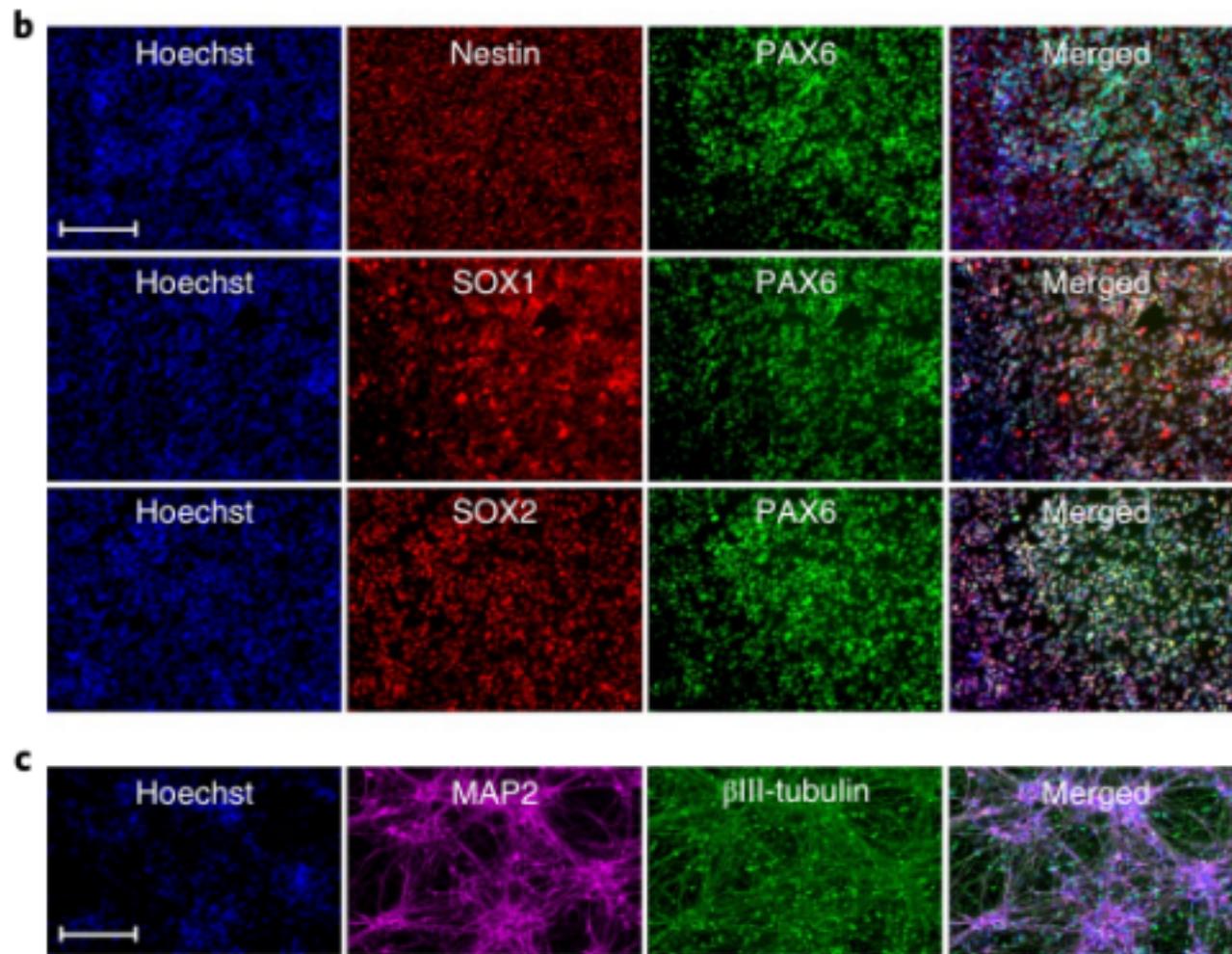
統合失調症(SZ)患者と、年齢をマッチさせた健常者(HC)ドナーの皮膚線維芽細胞からiPS細胞を樹立

OCT4: 山中4因子(Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4)の一つ

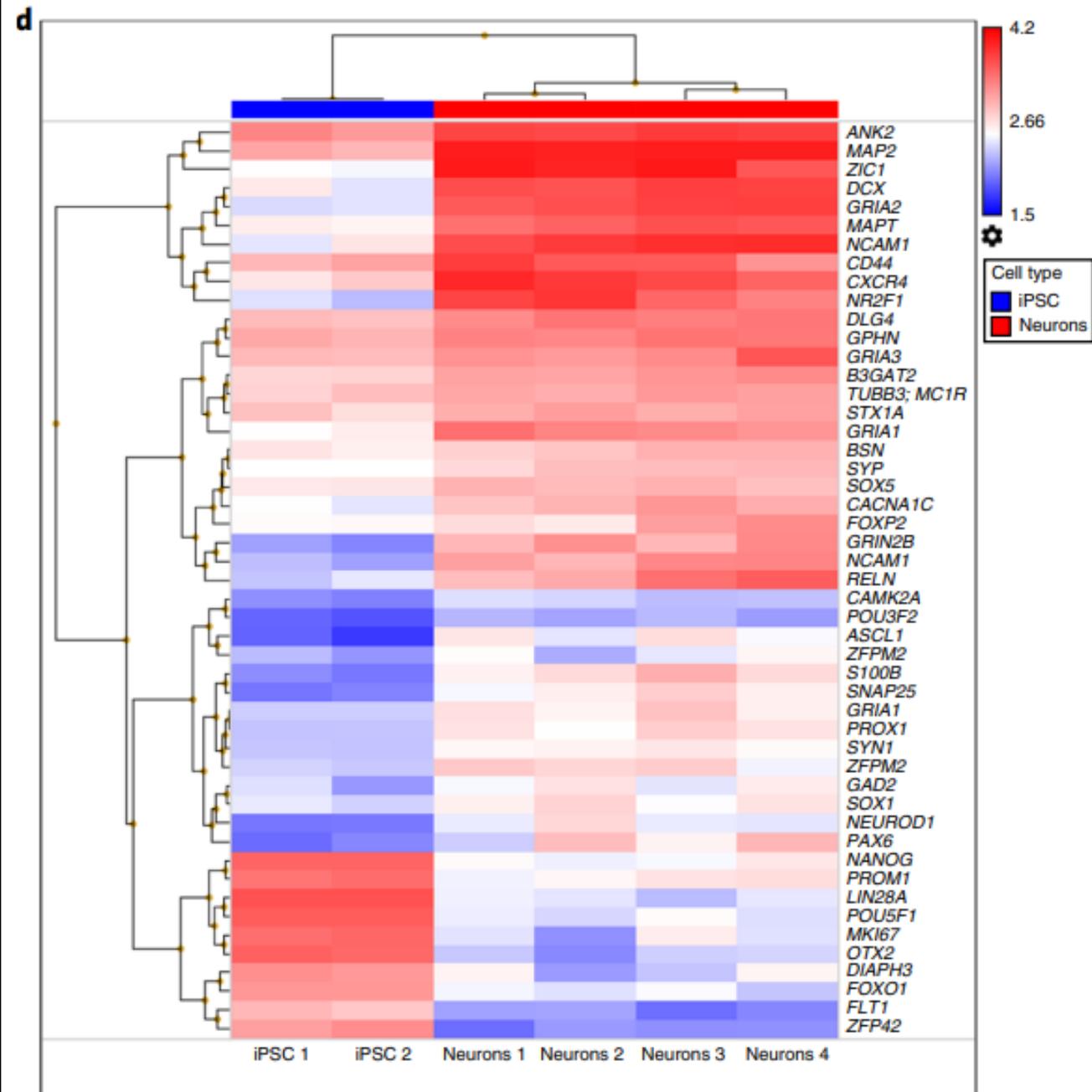
Tra-1-60:

iPS細胞と糖鎖は切っても切れない関係にある。これは、iPS細胞に限らずES細胞にもあてはまる。実際、研究対象の細胞がヒト多能性幹細胞(ES/iPS細胞)であることを確認するために、細胞表面マーカーとして糖鎖を認識する抗体を使用し、中でもTRA-1-60抗体がよく用いられる^{9,10}。

TRA-1-60抗体は細胞表面タンパク質であるポドカリキシン上の糖鎖修飾(ケラタン硫酸)を認識する。もともとはEC細胞(胚性がん腫細胞、Embryonic Carcinoma cell)の表面抗原を認識する抗体として報告され、その後ヒト多能性幹細胞のマーカーとしても使われるようになった。ヒト多能性幹細胞が未分化性を失い分化すると、その細胞はTRA-1-60抗体では認識されなくなる。

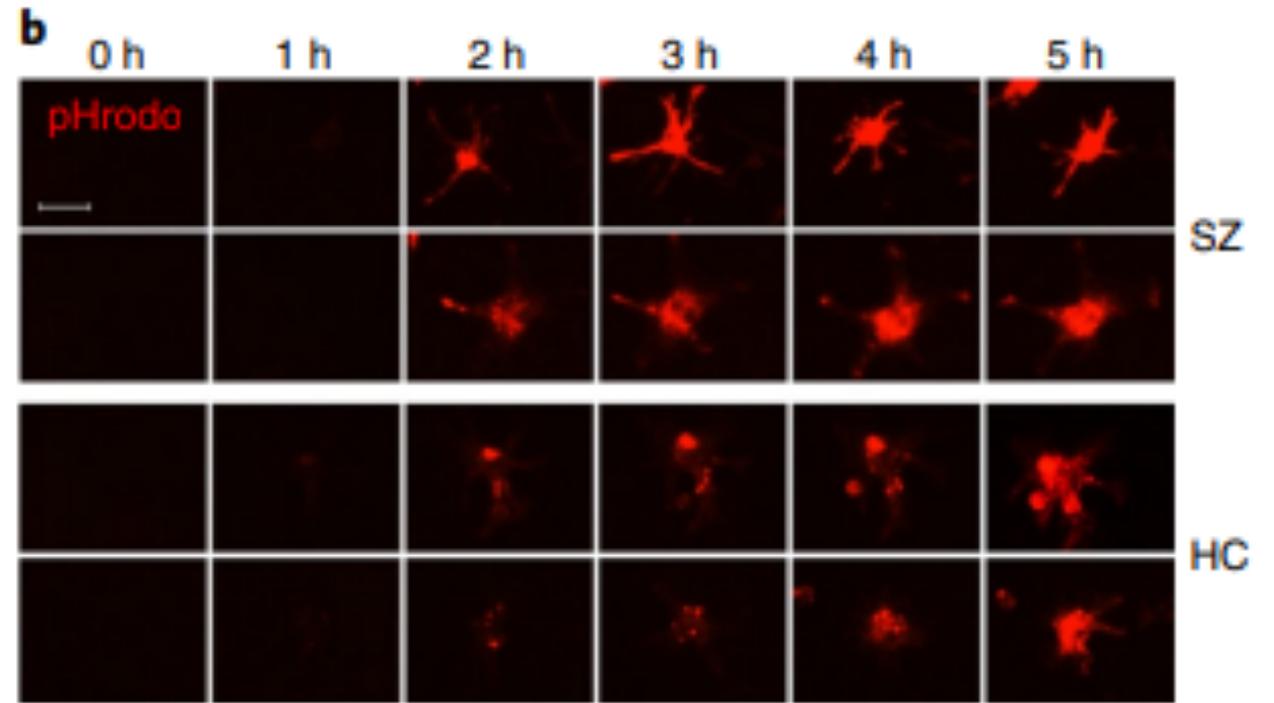
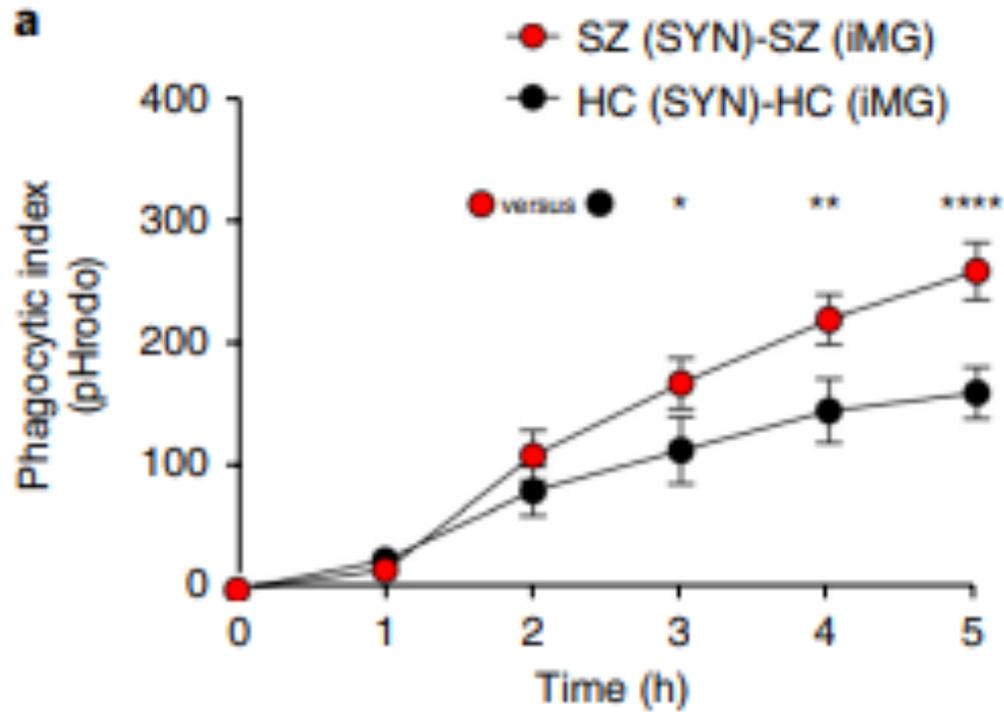


iPS細胞→神経前駆細胞(NPC)→神経細胞に誘導



iPSC(n=2患者)とiPSCニューロン(n=4患者)のmRNA発現量のヒートマップ

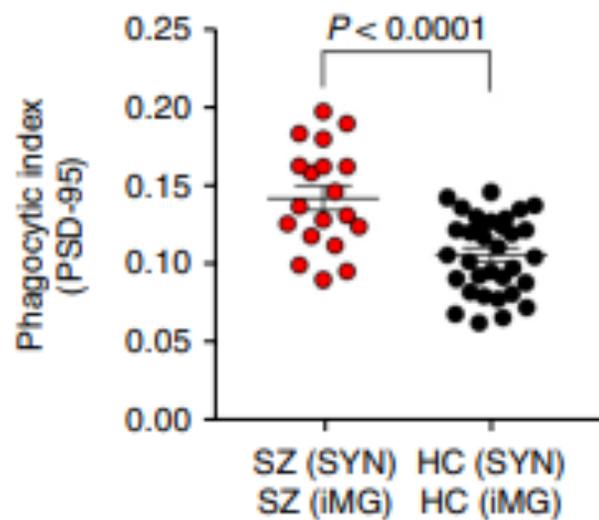
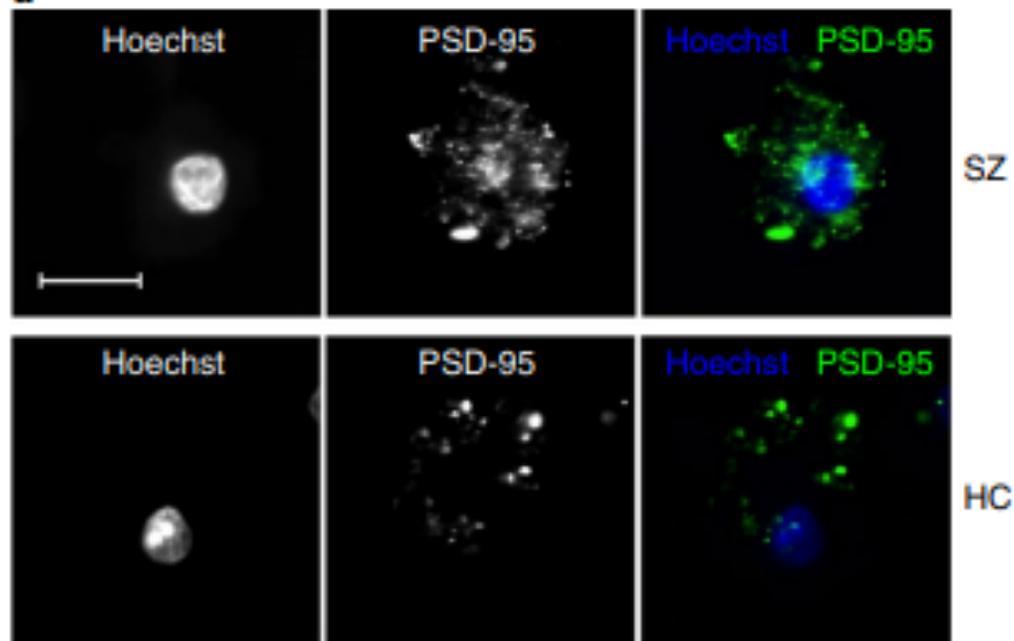
SZ患者由来モデルにおけるシナプス刈り込みの増加



SYN(シナプス神経終末)にpHrodoを発現させている

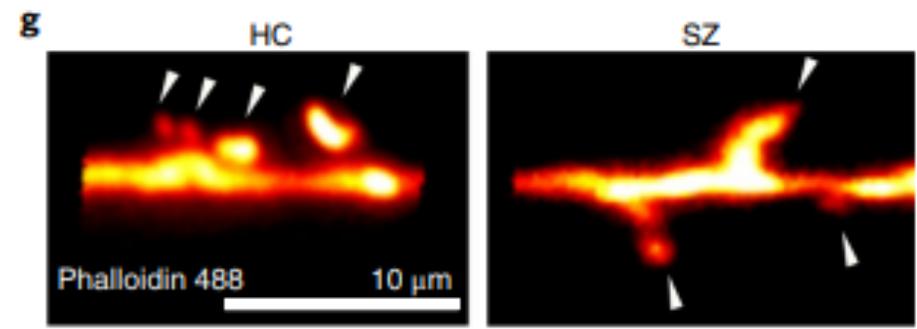
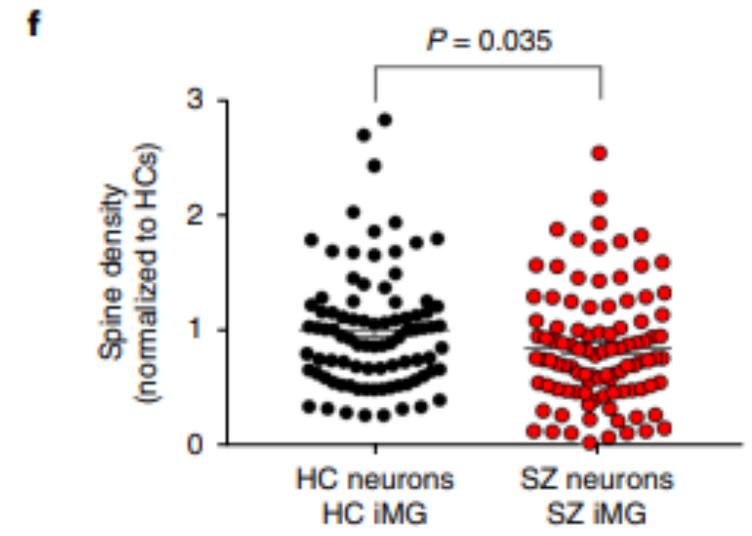
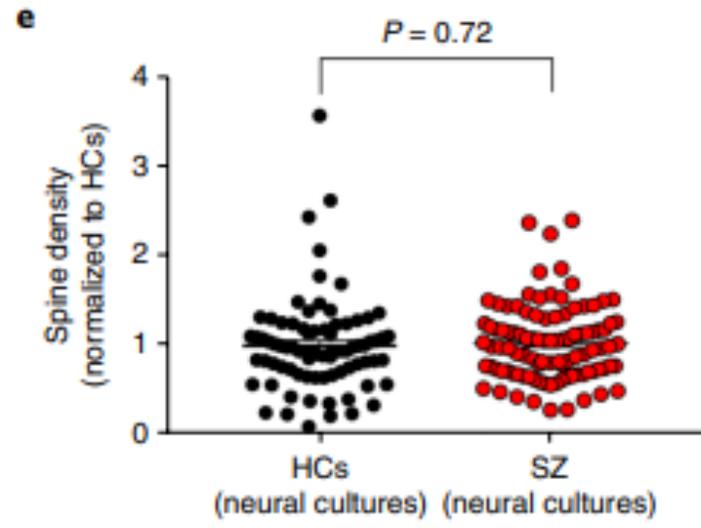
pHrodo: 周囲のpHが酸性化すると赤く蛍光

→貪食されてリソソーム内に取り込まれると赤く蛍光

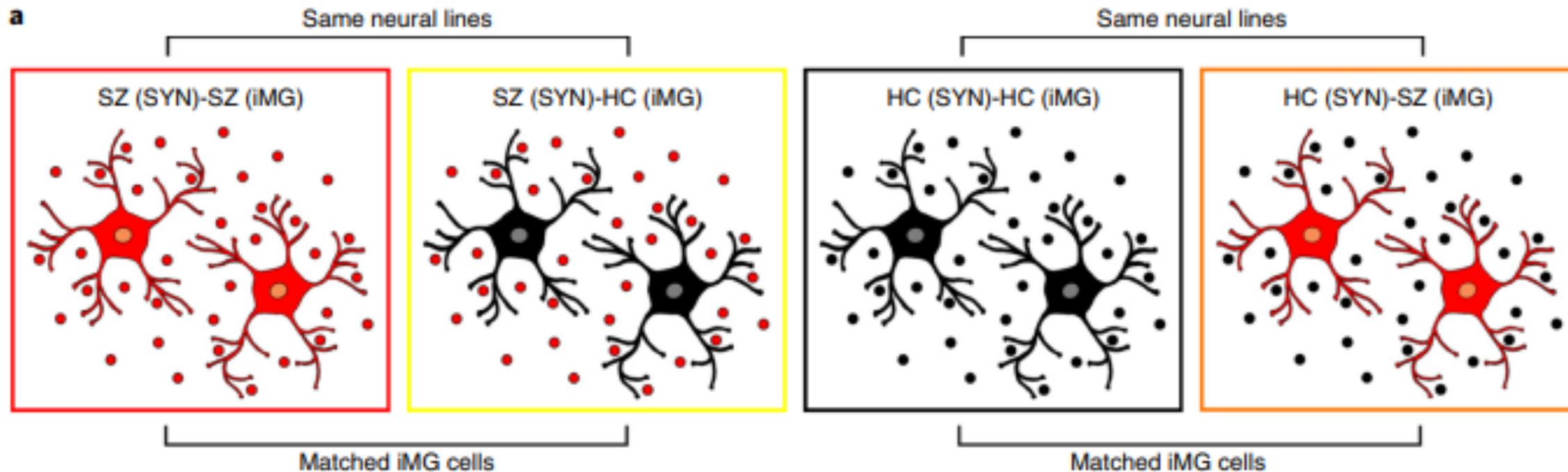
c**d**

SZ患者由来のiMG細胞ではHCのiMG細胞と比較してPSD-95の取り込みが有意に増加

→pHrodoの蛍光増加と合わせて、SZ患者由来のiMG細胞ではHCのiMG細胞と比較してシナプス貪食が有意に増加していると言える

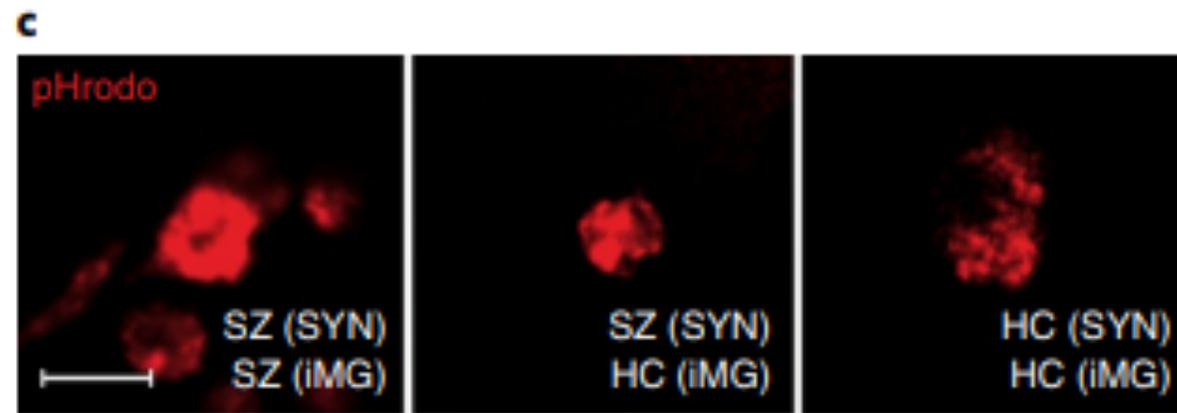
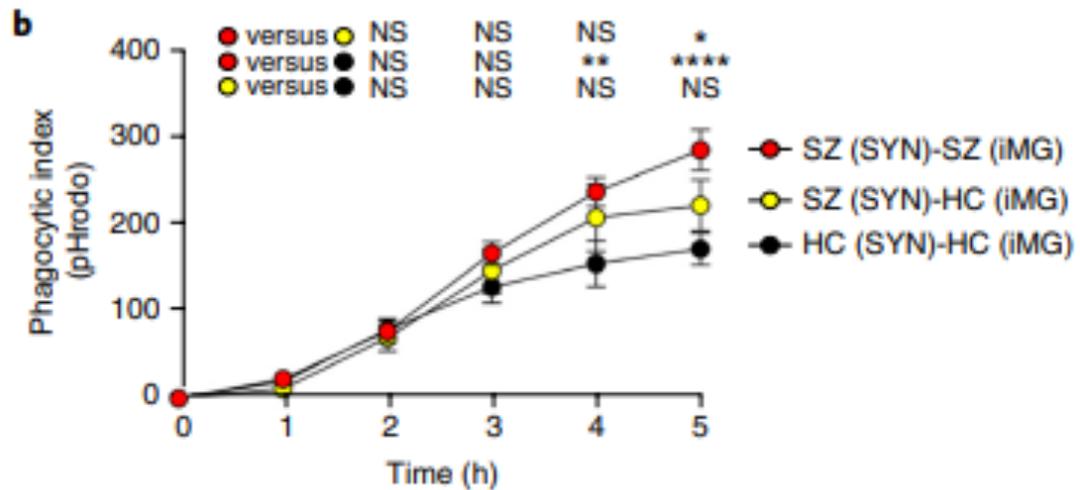


SZとHCのニューロンでは、ベースラインのスパイン密度に差は見られなかったが、iMGとの共培養ではSZ群でスパイン密度の低下が見られた

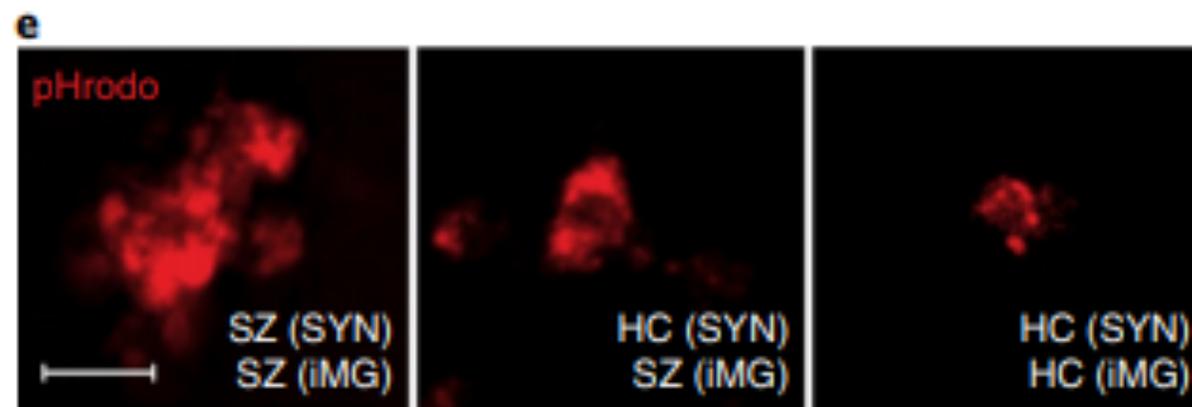
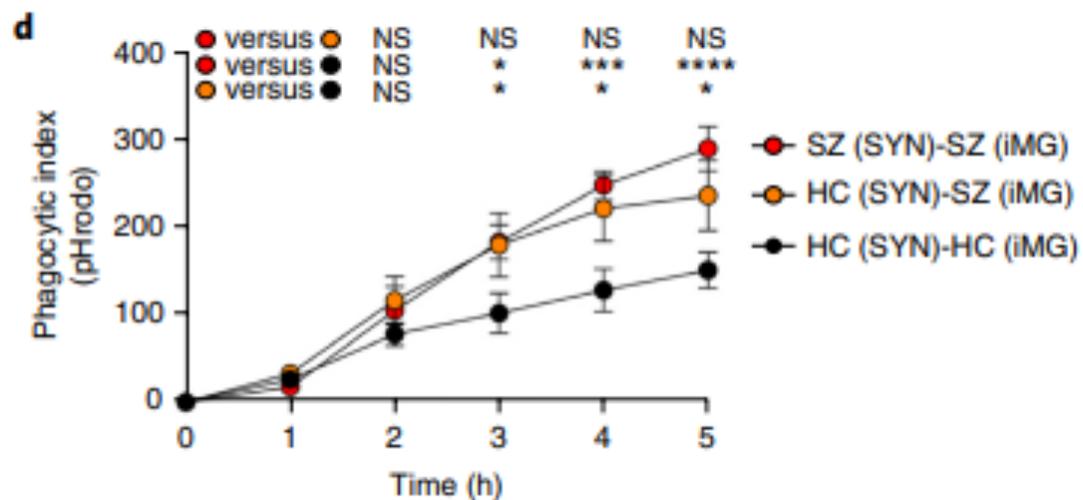


これまではSZ由来とHC由来のSYN, iMG細胞をマッチさせて実験していたが

シナプス刈り込みへのSYNとiMG細胞の個々の寄与を明らかにするためにSZ由来とHC由来を交差させて実験



シナプス刈り込みの増加には、ニューロン因子とミクログリア因子の両方が寄与している



補体は3つの経路によって活性化され、作用する。

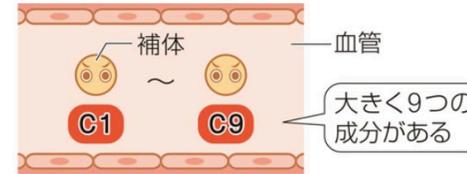
種々の免疫反応を引き起こす血清蛋白 補体とは

補体とは

- 補体は、主に肝臓で産生される血清蛋白であり、大きく9つの成分がある。
- 細胞膜上の補体受容体などをあわせた約30種類の蛋白により、補体系を形成する。
- 抗体とともに働く作用（古典経路（次項））をもつことから、「抗体を補うもの」として補体と名づけられた。

補体の役割

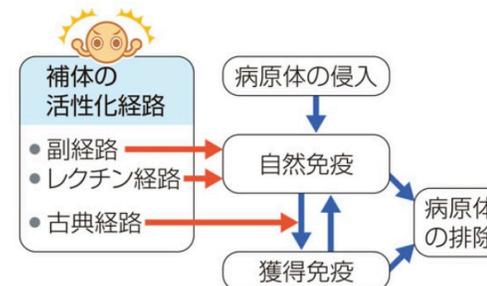
- 病原体の侵入を契機に活性化され、炎症の促進や病原体の排除など生体防御に重要な作用を発揮する。



3つの活性化経路 補体の活性化経路

- 補体の活性化は、病原体の侵入を契機として直ちに働く副経路、レクチン経路と、抗原抗体反応が起きた後に働く古典経路の3つの経路によって生じる（p.27）。
- 副経路・レクチン経路は自然免疫の一部であるが、古典経路は自然免疫のみならず獲得免疫にも関与する。

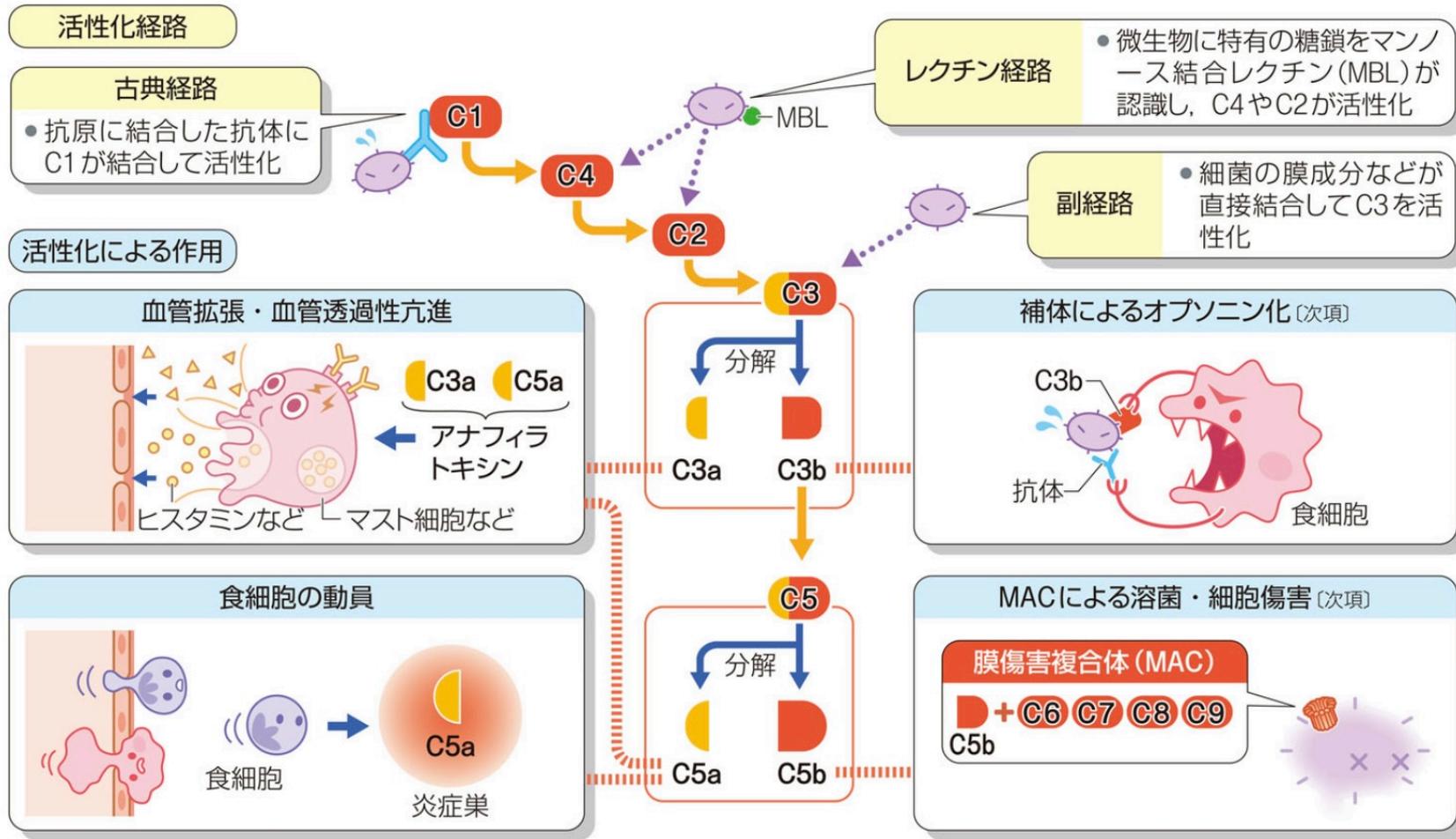
生体防御機構と補体の活性化経路



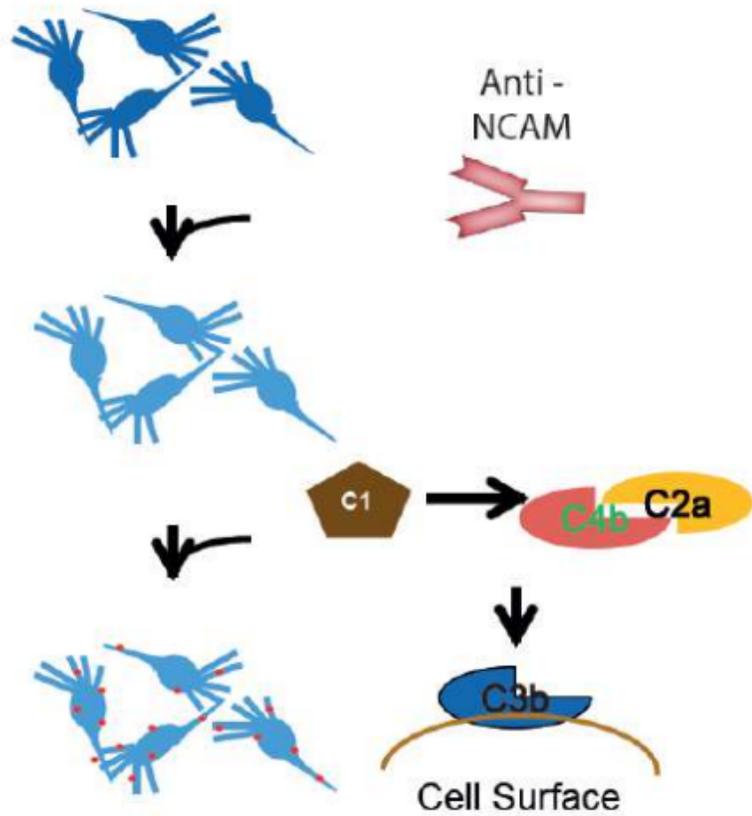
カスケード反応により病原体排除に働く 補体の活性化反応と作用



- 補体は通常、不活性の状態では血漿中に存在している。
- 異物の侵入などにより最初の補体成分が活性化されると、1つの成分がaとbの2つの断片に分解され、さらに次の成分を活性化するようなカスケード反応が起こる。



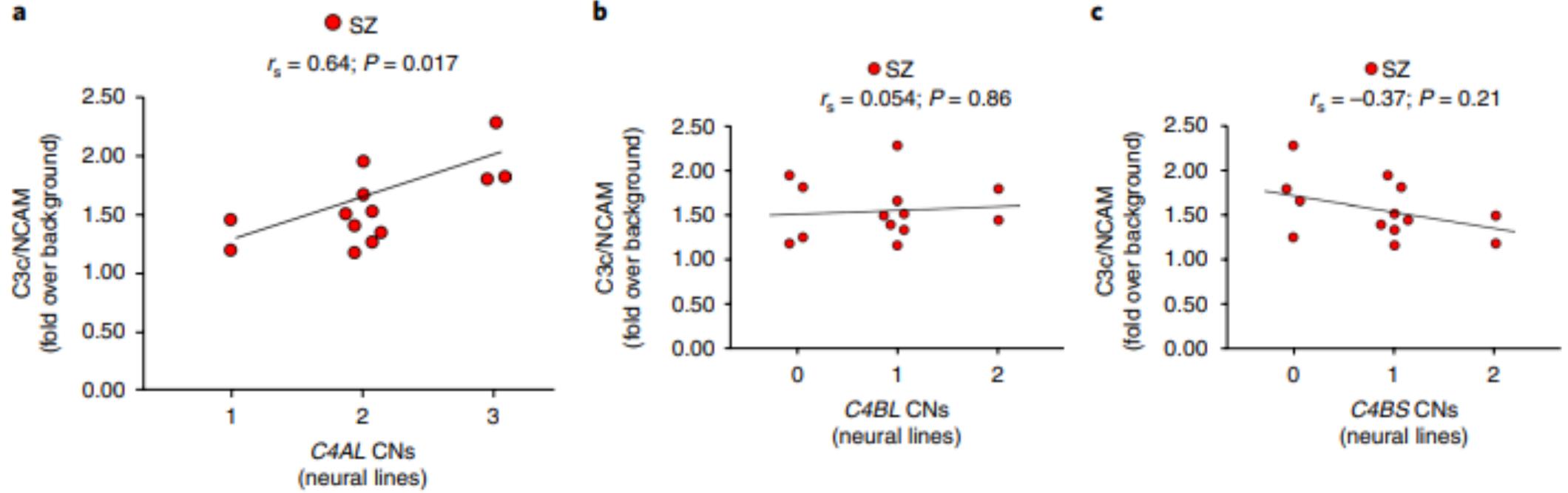
Supplementary Figure 11



C4A発現の程度に比例してSZ発症リスクが上昇することが先行研究でしめされている

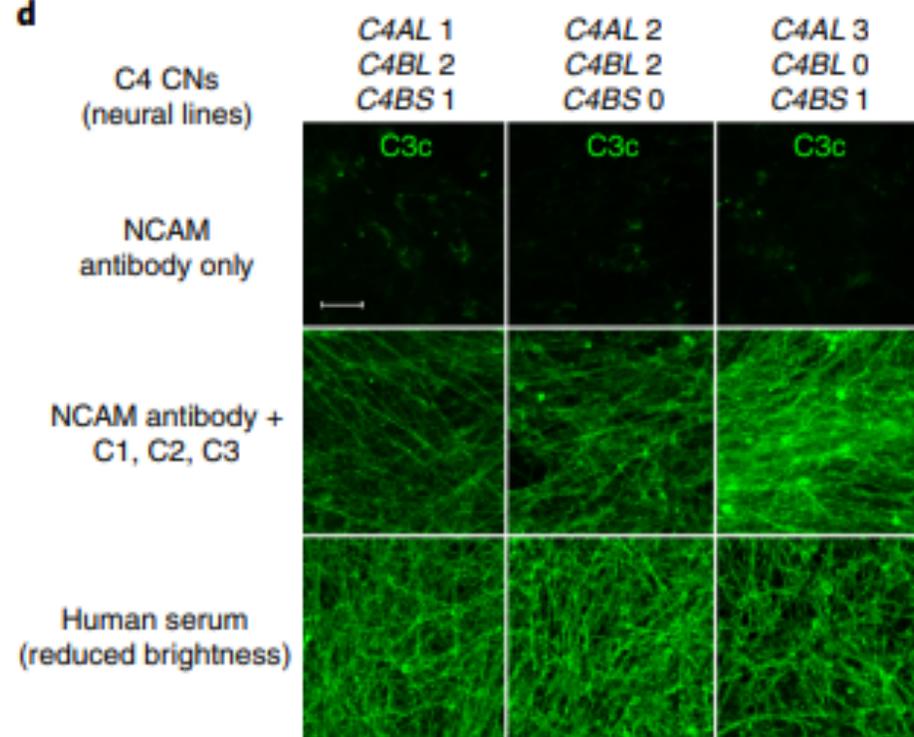
抗NCA M抗体で処理し、補体活性化を感作した。抗体処理後、上流の補体成分であるC1、C2、C3を補充

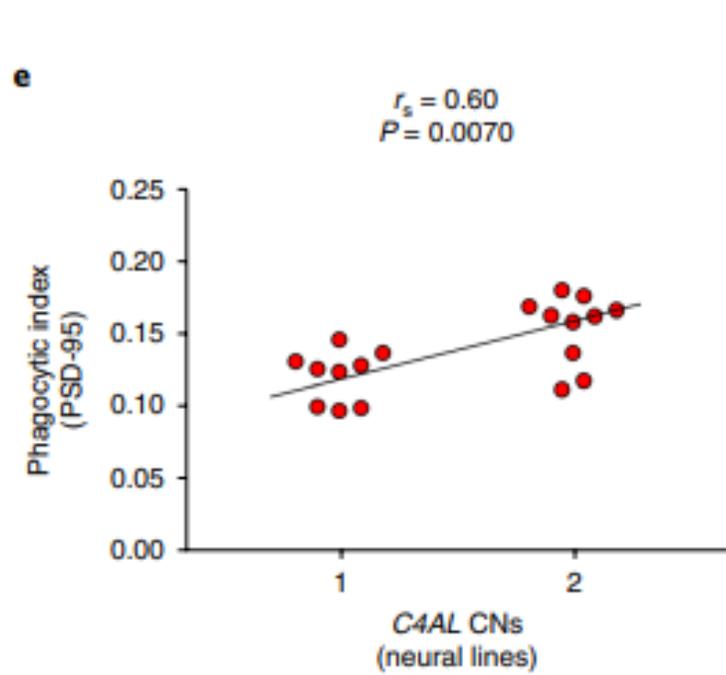
Complement (C3) deposition assay



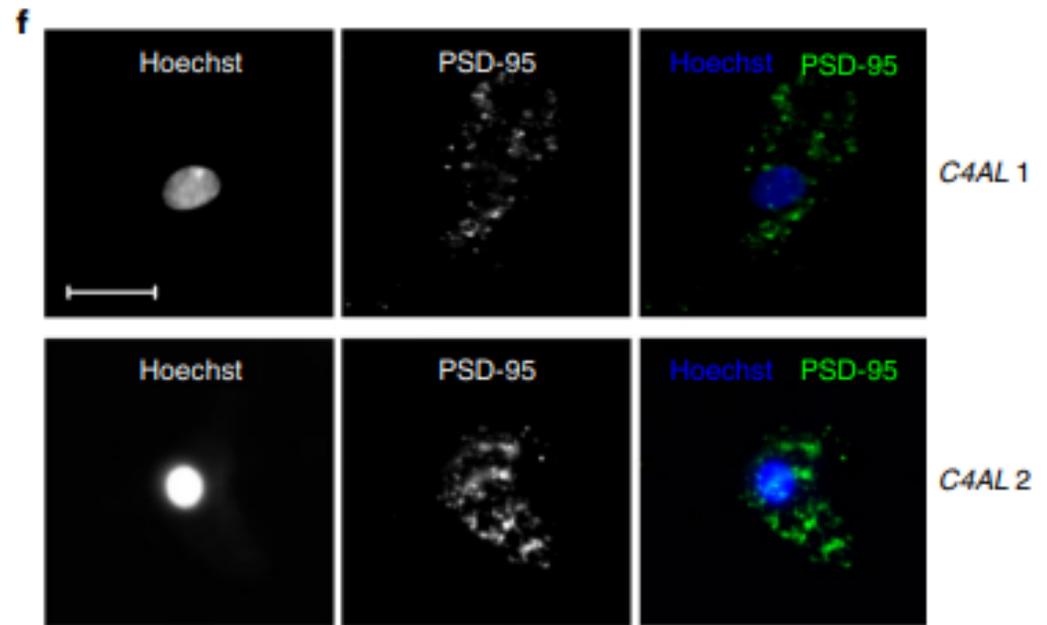
C4ALが多いほど、ニューロンへの補体沈着が増加する

d





SYN engulfment assay



C4ALコピー数が多いほど、iMG細胞へのPSD-95の取り込みが増加

・ 覚せい剤投与による行動異常およびドパミン神経系の障害，PCP 誘発認知機能障害 モデルにおいてミノサイクリンは治療効果を示すことを報告した

Fujita Y, Ishima T, Kunitachi S, et al (2008) Phencyclidine — induced cognitive deficits in mice are improved by subsequent subchronic administration of the antibiotic drug minocycline. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychi*

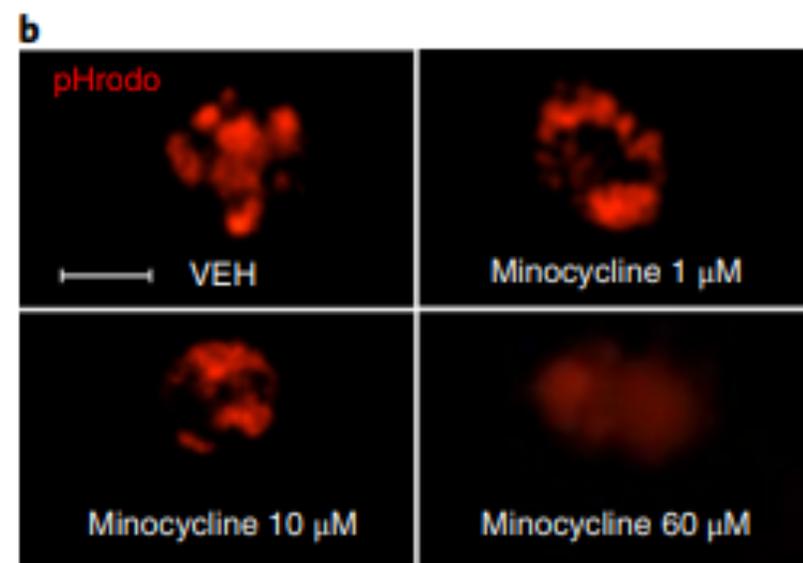
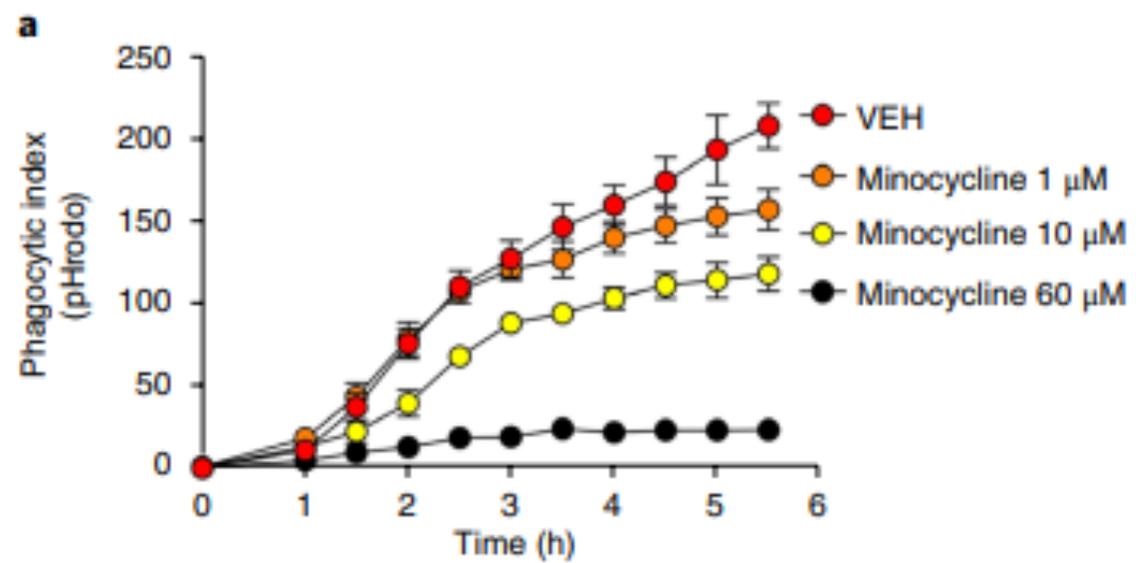
Zhang L, Kitaichi K, Fujimoto Y, et al (2006) Protective effects of minocycline on behavioral changes and neurotoxicity in mice after administration of methamphetamine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 30 : 1381— 139

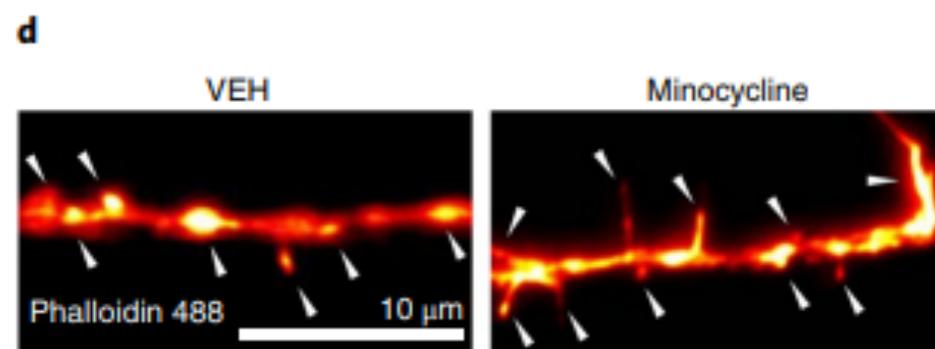
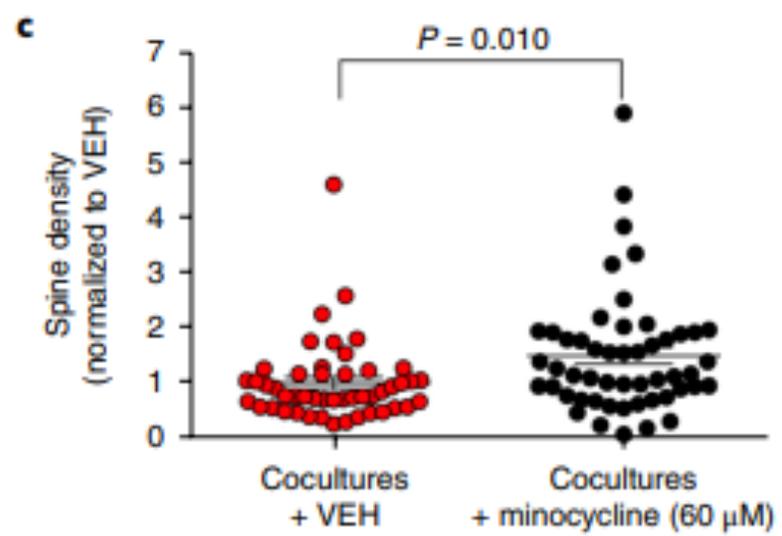
・ 島根大学の宮岡らは，22 例の抗精神病薬服用中の統合失調症患者でオープン・スタディーを実施したところ，ミノサイクリンに抗精神病作用があることを報告した

Miyaoka T, Yasukawa R, Yasuda H, et al (2008) Minocycline as adjunctive therapy for schizophrenia. *Clin Neuropharmacol*, 31 : 287— 292.

・ Levkovitz らは，初期の統合失調症患者（54 例）に非定型抗精神病薬との併用として，ミノサイクリンのプラセボ対照二重盲検試験を行ったところ，ミノサイクリン（1 日 200 mg）を投与した群では，プラセボ投与群と比較して，陰性症状の改善作用だけでなく，認知機能障害（特に，実行機能）の改善作用が認められた

Levkovitz Y, Mendlovich S, Riwkes S, et al (2010) A double— blind, randomized study of minocycline for the treatment of negative and cognitive symptoms in early— phase schizophrenia. *J Clin Psychiatry*, 71 : 138— 149.





e

