

(様式1)

令和元年度愛媛大学学生による調査・研究プロジェクト（プロジェクトE）研究成果報告書

令和 2年 5月 4日

愛媛大学長殿

プロジェクト代表者氏名	医学部	医学科
	さとうありさ 佐藤 安里紗	
指導教員氏名	所属	医学部
	たなかじゅんや 田中 潤也	

<p>プロジェクト名： 友達ができない性質は遺伝するのか？～分子メカニズムの解明を目指して</p>
<p>調査・研究の概要：</p> <p>1. 問題意識 我々は集団生活を行う上で、“友達”を作る。友達を作ることで、周囲に馴染み、集団生活を円滑に進めようとする。一方で、周囲に上手く溶け込めず、孤立すると、その集団において生き辛さを感じてしまうかもしれない。すぐに友達を作る人となぜか孤立してしまう人との間に何か生物学的な違いが存在するのだろうか。このような疑問から本研究はスタートした。</p> <p>2. 目的 人間と同様に、ウィスターラットも個性や社会性を持つ。そこで、集団の中で孤立するようなラット(Not Friendlyラット)の選抜を行い、このようなラットがどのような行動特性を持つのかを調べるための種々の行動実験、また、Not Friendlyラットの交配・継代を行なった。すると、Radial Maze(RM)という行動実験で8本のアームのうち特定のアームにこだわる、“こだわり行動”を見せるラット(Repetitiveラット)が存在した。この行動特性は我々が数々の行動実験を行なってきた中でも非常に珍しく面白い発見であった。 そこで、このような“こだわり行動”に着目し、社会性の検討をはじめとする様々な行動実験、加えて、脳内の分子レベルでの特性の検討を行い、<u>こだわり行動の意味やこだわり行動を生む分子メカニズムの解明を目指す</u>ことにした。</p> <p>3. 方法 主に、Radial Maze試験、Open Field試験、Direct Contact試験（社会性試験）、明暗箱試験、水迷路試験などの行動実験を行なった。Not Friendlyラットの選抜のためAlone testという行動実験を考案し、Repetitiveラットの選抜にはRadial Maze試験を用いた。また、脳内の分子メカニズムを検討するため、ラットの前頭葉から脳組織を採取し、ウエスタンブロッティング(WB)法やフローサイトメトリー(FACS)を行なった。</p>
<p>研究成果：（800字～900字程度） 60cm四方のフィールドに4匹のラットを放して他の個体とのコミュニケーションを評価するAlone testを用いて、最も孤立時間の長いNot Friendlyなラットを選抜し交配させると、2世代目のラットの中でRadial Maze(RM)とElevated Plus Maze(EPM)で他のラットでは見られないような面白い行動をするものが幾つか見られた。そこでこれらの実験で異なる行動を見せたラットを交配させた。次の3世代目のラットでも同様に行動実験を行なったところ、やはりRMにおいて8本のアームのうち特定のアームに固執して侵入する、“<u>こだわり行動</u>”を見せるラットが存在し、そのようなラットの割合は2世代目と比較して多くなった。さらに、3世代目のラットでは2世代目のラットに比べ侵入するアーム数が減少し、より強い偏りを見せる傾向にあった。継代を行なった中でRMでのこだわり行動は非常に興味深く、この特性に着目して研究を進めていくことにした。 こだわり行動を見せるラット(Repetitive rat)の継代を引き続き行くと、repetitive ratの割合はコントロール家系に比して継代家系で高く、オスで高くなった。この結果からこだわりの性質が継代により濃縮し、ここに遺伝的性質があることが示唆された。repetitive ratの更なる特性について調べるためこだわりの傾向が強いオスで主に、種々の行動実験を行なった。Open Field試験、明暗箱試験において、repetitive ratとコントロール群では、行動量やラットが不安感を覚えるような空間への侵入回数・滞在時間に差はなかった。一方でRMではrepetitive ratは行動量が有意に少なくなり、RMのような特殊な環境下では発作的にこだわり行動が見られる、ということが示唆された。また、Direct Contact試験にて社会性の検討を行なったところ、repetitive ratは社会性が低いという結果となった。そこで、このような行動特性を生むメカニズムについて検討するため分子生物学的実験を行なった。WBによって前頭葉内で情動や報酬に関与しているとされる内側前頭皮質(Prl)と外側眼窩前頭皮質(LO)におけるタンパク発現を調べたところ、repetitive ratでは、シナプスが多く、神経細胞の活動性が高いことが示唆された。また、FACSでは、脳内の免疫担当細胞であり不要なシナプスの貪食を行うマイクログリアが、repetitive ratの前頭葉で小さく、活性も低いと示唆された。</p>
<p>今後の課題：（400字程度） こだわり行動の意味を解明していくことが今後の課題となる。自閉症スペクトラム(ASD)の特徴として、①社会性・コミュニケーション障害②こだわり行動・限局的な興味が挙げられ、その発症に関して遺伝的な要因がある程度考えられ、男子に多いとされている。こだわり行動を見せるrepetitive ratが</p>

社会性に乏しかったこと、こだわりという特性に遺伝的側面が示唆されたこと、オスでの割合が高かったことなどを踏まえ、ASDのモデルになるのではないかと仮説を立てた。仮説の検証のために、ASD研究で多く用いられている社会性評価試験の3-chamber testやASDでは欠如しているとされる心の理論を評価するような行動実験、ASD関連遺伝子の発現の検討などを今後行う予定である。

また、マイクログリアの活性を変化させることでrepetitive ratの行動改善が見られるかを検討し、ASDの新たな治療法を提案する中で、我々の研究が大きなテーマである成熟脳でのマイクログリアの働きを解明する手がかりとなることに期待している。

指導教員からのコメント

友達ができないというという学生らしいテーマの設定であるが、非常に高度かつ独創的な研究手法を駆使して熱心に研究活動を行い、世界に通用する知見が得られた。もう少しの頑張りで、世界の一流誌への論文投稿が可能になるので、そこまでぜひやってほしい。

研究の動機・目的

我々は集団生活を行う上で、“友達”を作る。友達を作ることで、周囲に馴染み、集団生活を円滑に進めようとする。一方で、周囲に上手く溶け込めず、孤立すると、その集団において生き辛さを感じてしまうかもしれない。すぐに友達を作る人となぜか孤立してしまう人との間に何か生物学的な違いが存在するのだろうか。このような疑問から本研究はスタートした。

ウィスターラットは、頭が良く、高度な社会性を持つ。私たちがこのラットの飼育・繁殖を行ってきた中で、ラットには家族ごとにカラーがあり、兄弟内でも人間や外の環境に興味津々で覗き込んでくる個体から、ケージの端で一人ポツンと佇んでいる子まで様々であることに気がついた。同じ系統のラットの中でも、このようにラットごとに個性があるのである。そこで、ラットの個性や行動特性の裏にある脳内の細胞活性や細胞間の関わりなどを検討することにした。



研究の過程

本研究は当初、ラットごとに異なる個性、特に周囲から孤立し、友達ができない性質について着目しており、同性間のコミュニケーションに注目することからスタートした。友達ができない(Not Friendly)ラットの選抜を行い、この様なラットがどのような行動特性を持つのかを調べるための種々の行動実験、また、Not Friendlyな個体の交配、継代を行なった。行動実験、継代を進めていくと、Radial maze(RM)という試験で、8本のアームのうち特定のアームにこだわる、“こだわり行動”を見せる(Repetitive)ラットが存在した。この行動特性は、私たちがこれまで数々の行動実験を行ってきた中でも非常に珍しく、面白いものだと感じた。

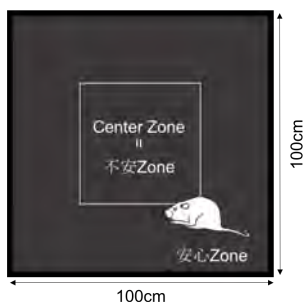
そこで、このような“こだわり行動”に着目し (Repetitive Ratの選抜を行って)、社会性の検討をはじめとする様々な行動実験、加えて、脳内の分子レベルでの特性の検討を行い、こだわり行動の意味やこだわり行動を生む分子メカニズムの解明を目指すことにした。

研究の方法・評価方法

行動実験

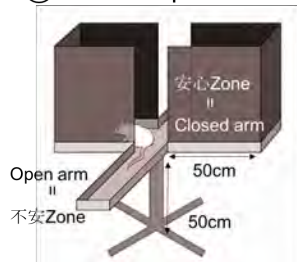
本研究では学童期の社会性行動焦点を当てるため、5-6 週齢のウィスターラットを用い、下記の行動実験を行う。行動の解析には、行動解析ソフト EthoVisionXT を用いた。

① Open-field test



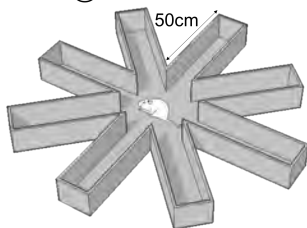
① Open-field test (OFT): 100cm x 100cm の新奇環境下にラットを放し、1min の馴化（場に慣れさせる処置）の後 5min 行動を観察。活動性と不安感の評価を行う。

② Elevated plus maze



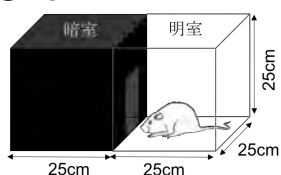
② Elevated plus maze (EPM): 10min で各アームの滞在時間・侵入頻度を計測。ラットの壁のある場所を好む性質から、不安感の評価する。

③ Radial maze



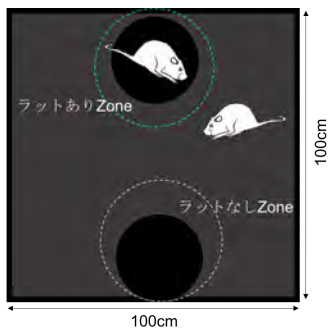
③ Radial maze (RM): 10min の行動を計測しアーム滞在時間の偏り(固執性)を、分散値(variance)で評価する。

④ Light and Dark box test



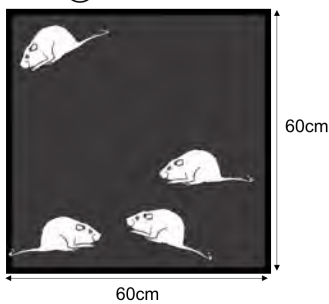
④ Light and Dark box test (LD box): 5min で各室の侵入時間・頻度を計測。薄暗い環境を好む性質から、不安感・慎重さを評価する。

⑤ Social interaction test



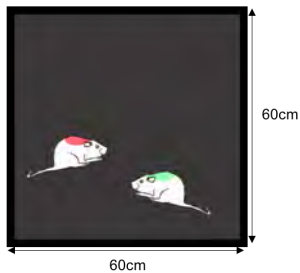
⑤ Social interaction test (SIT):フィールド内にラットを 1min の馴化の後 5min 行動を観察。透明なアクリルの筒を 2 つ field に置き、片方に同年齢のオスラットを入れ、片方は空にしておく。筒には、直径 5mm ほどの穴を多数開けてあり、匂いや音は感じ取れる。それぞれの筒周辺に近づいた時間を Rat zone/Empty zone の割合で、社会性を評価する。

⑥ Alone test



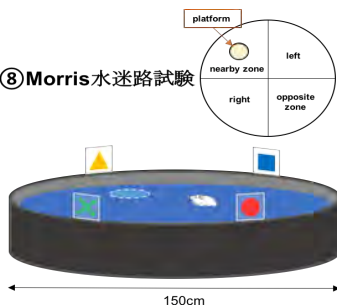
⑥ Alone test (AT): 4 匹を同じフィールド内に放し、3min の馴化の後 7min で、他のラットとコミュニケーションをとっていない時間をそれぞれのラットで計測。ラット同士の直接的なコミュニケーションを評価する。

⑦ Direct Contact Test (DCT)



⑦ Direct Contact Test(DCT): 2 匹を同じフィールド内に放し、1min の馴化の後 5min 間、2 匹のラット同士の直接的なコミュニケーションを評価する。試行中のラット間の距離やお互いが離れて過ごしていた時間などの指標を計測する。

⑧ Morris 水迷路試験



⑧ Morris 水迷路試験: プール周囲の 4 箇所異なる形のキューを配置し、キューと platform の位置関係を覚えさせる training を行なったのち、platform 対側の opposite zone よりラットを泳がせ、platform にたどり着くまでの時間などの指標でラットの空間認知学習能力を評価する。

分子細胞生物学的実験

・ウェスタンブロッティング法

3%SDS を含む Laemmli の緩衝液でサンプルを調整し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動をする。分離したタンパクをニトロセルロースメンブレンに転写し、一次・二次抗体処理をして発色し、バンドの濃さを定量し、タンパク量の比較を行う。

・フローサイトメトリー

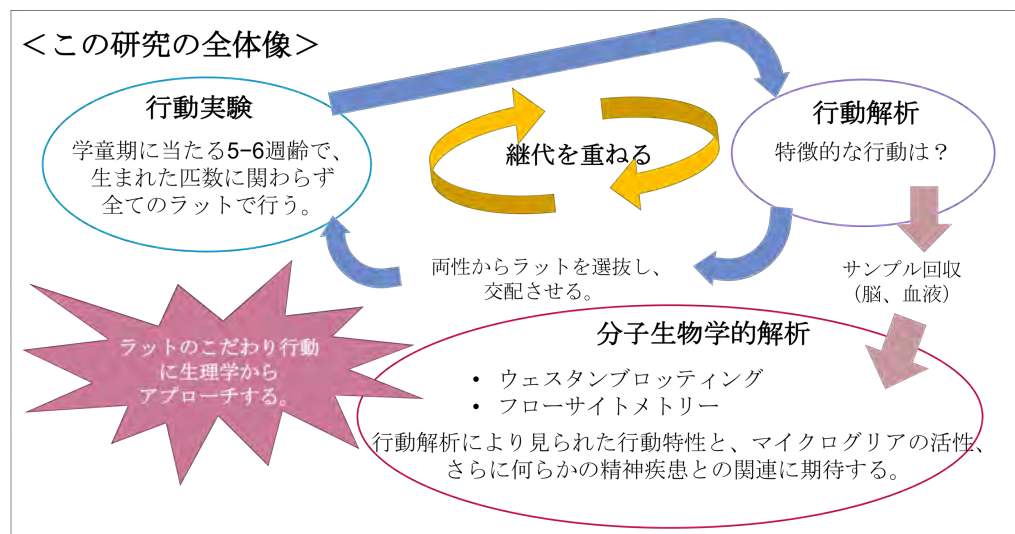
ラット前頭葉組織を1細胞まで酵素反応により分散、マイクログリアの細胞膜表面抗原である CD11b と CD45 に対する蛍光標識抗体を結合させ、蛍光により細胞の性格や特性を検出する。死細胞の除外を行なったのち、CD11b 陽性、CD45 中程度陽性である、マイクログリア分画を抽出する。

Repetitive rat の選抜方法

行動の偏りの程度を8本のアームのうち各アームに滞在した合計時間の分散値 (variance) で評価する。(分散値が大きいほど偏りが大きいことを、分散値が小さいほどそれぞれのアームに均等に進入したことを表す。)

分散値が大きくても、程度の差はあれ、多数のアームに進入していることもあるので、RM 試行時の track 画像から侵入アーム数を確認する。

以上の評価で、①主な侵入アーム数が3本以内 ②分散値(variance)が8000以上 (*侵入アーム数が3本以内の場合、分散値はほぼ必ず10000以上になる) の2条件を満たしている個体を Repetitive rat とする。



研究成果

本研究の導入部 —継代の遂行とそこで見つけた“こだわり行動”—

<1世代目の選抜>

まず1世代目の選抜を行なった。ここでは、Alone test(Figure 1)を用い、同じフィールド内にラットを放して、最も他者とのコミュニケーションに乏しい NotFriendly なラットを両性から選抜し、交配させた(2カップル)。



Figure1

<2世代目の行動解析・選抜>

上で選抜したカップルから生まれたラットの行動を解析した。種々の行動実験を行なった結果、EPM と RM において面白い結果が得られた。不安様行動の検出に使用される EPM では、一般的なウイスターラットでは落下の危険性のない壁のある closed arm に留まり、壁がなく落下の危険性がある open arm にはほとんど侵入しないのに対し、選抜した2世代目のラットでは、open arm に躊躇なく侵入する個体の数が顕著に多く見られた。また、固執性・常同行動を評価する RM では、フィールド内にラットを放すと、探索行動として8本のアームにほぼ均等に侵入するのが通常であるのに対し、2世代目では、3本から4本と限られたアームにのみ侵入するラットが存在した(Figure 2)。

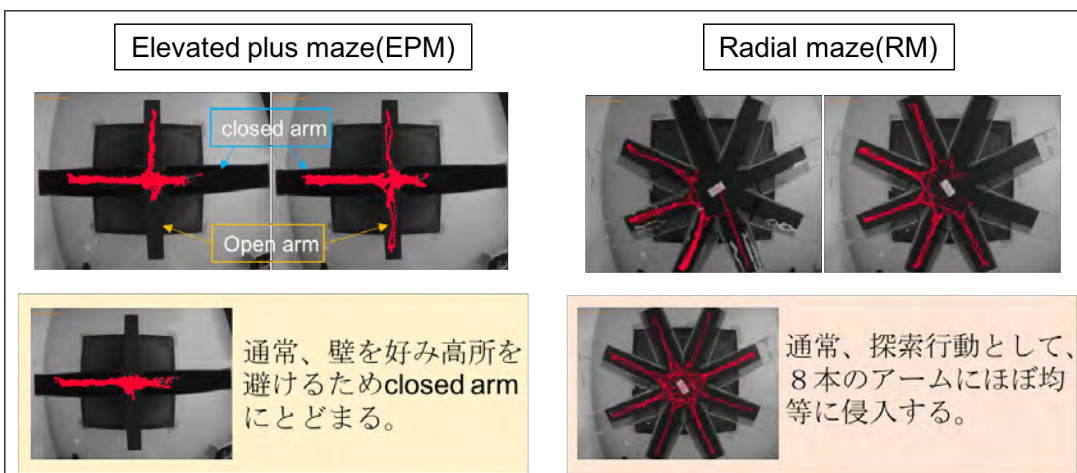


Figure2

1回の選抜と交配でここまで特異な行動が見られたのは驚きであった。そこで、この2つ

の試験で特異な行動を見せたラットを両性から選抜し、交配させた(4カップル)。

<3世代目の行動解析>

上で選抜したカップルから生まれたラットの行動を解析した。種々の行動実験を行なったところ、2世代目と同じ様に RM で侵入するアームに偏りを見せる(こだわり行動を見せる)ラット(Repetitive rat)が存在した。面白いことに、親に当たる2世代目のラットでは侵入するアーム数が3-4本であったのに対し、その子供である3世代目のラットでは、1-2本にのみ侵入する様なラットが見られた。この様に、特定のアームに固執するラットの割合が増加したと同時に、その固執する度合いもさらに強くなった(Figure 3)。



Figure3

これほど RM で顕著な偏りを見せたことは、驚くべき結果であり非常に興味深いものであった。そこで、本研究では、この“こだわり行動”に注目して実験を進めていくこととした。

本研究の主題 —こだわり行動を生むメカニズム及びこだわり行動の意味の探求—

<継代の成果>

継代を進めることで、RM での偏りの程度、頻度が高まった。また、継代を続けた家系のオスでの Repetitive rat の発生頻度はコントロールの家系のものと比して高く、Repetitive な性質が継代によって濃縮すること、この性質には遺伝的要素があることが示唆された。

		repetitive rat	割合
継代家系	male ♂	40/122 匹	≒ 33%
	female ♀	8/66 匹	≒ 12%
コントロール家系	male ♂	3/36 匹	≒ 8%
	female ♀	まだ十分数の試行が行えていない。	

(表1)

<Open Field 試験(OFT)>

OFT において、行動量・センターゾーンへの侵入回数・滞在時間に性差は認められなかった(figure4)。また、オスの repetitive rat と non-repetitive rat でも各指標に有意な差は認められず、repetitive rat がとりわけ不安感が強い訳ではないことが示唆された (figure5)。

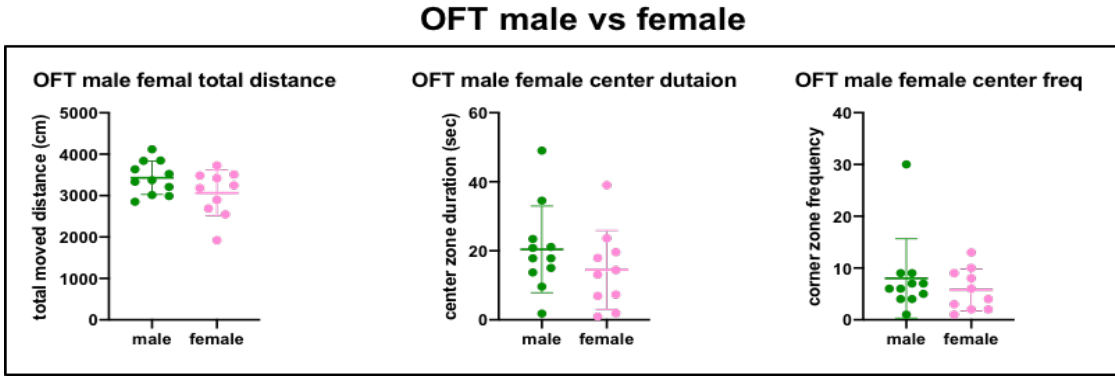


Figure4

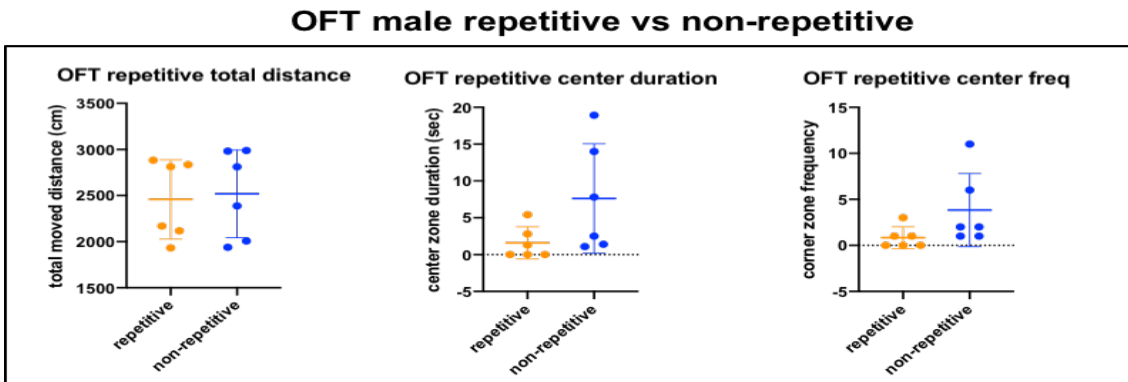


Figure5

<Light&Dark Box 試験>

Light&Dark Box 試験においても、明室滞在時間・滞在回数に、オスの repetitive rat と non-repetitive rat に有意差はなく、不安感や恐怖心が repetitive rat で強い訳でないことが分かった(figure6)。

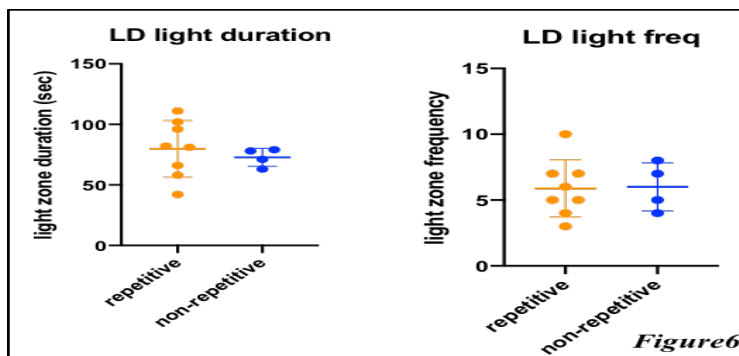


Figure6

<RM 試験(RM)>

RM 試験において、オスで行動量(total distance)と侵入アームへの偏りを表す分散値(variance)を比較したところ、repetitive rat では行動量が有意に少なかった (variance に関しては、この値を用いて repetitive と non-repetitive を分類しているため参照データ)(figure7)。OFT において、repetitive と non-repetitive で行動量に差が見られなかったのに対して、RM では有意差が見られたことは興味深い。OFT の何も障害のないフィールド下と比較して、RM という特殊な環境下では発作的にこだわり行動が出現し、行動量の低下につながったのではないかと考える。また、repetitive rat において、オスとメスで total distance と variance を比較したところ、オスで total distance が有意に少なく、variance も有意に高かった(figure8)。これは、<継代の成果>(表1)で repetitive rat の割合がオスで高い、と述べたことに加え、こだわりの程度がオスで高いことを示唆している。

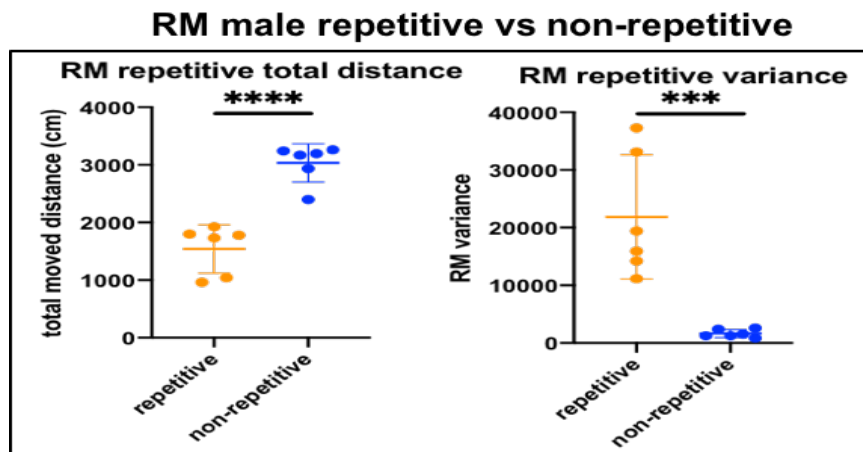


Figure7

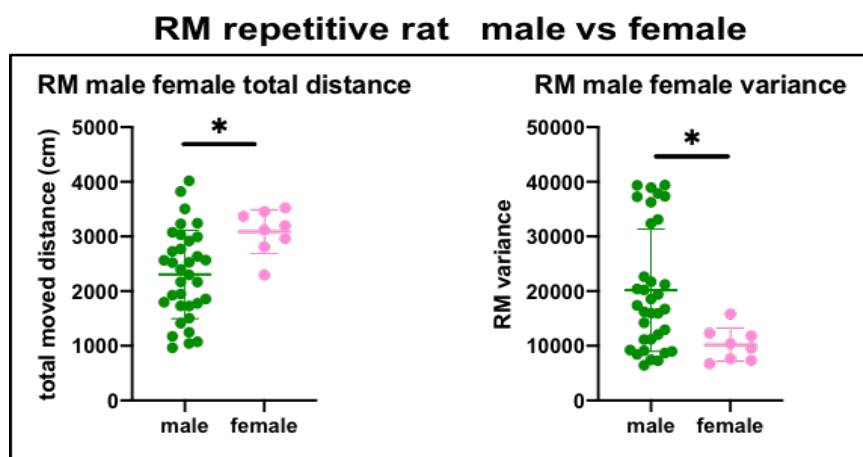


Figure8

RM でこだわり行動を見せる頻度・程度が共にオスで高いことが分かったため、以下の行動実験はオスで比較検討を行うこととした。

<Direct Contact 試験(DCT)>

repetitive rat の社会性を検討するために DCT を行い、ラット同士の直接的なコミュニケーションを評価した。60cm * 60cm のフィールドにおけるトライアル中の個体間の距離 (isolation distance) は repetitive rat で大きい傾向があり、30cm 以上離れていた時間 (isolated duration) は repetitive rat で有意に長かった (Figure9)。これらのことから、repetitive rat は他者との距離感が遠く、他個体から離れて存在する時間が長いという性質があり、社会性が低い可能性が示唆された。

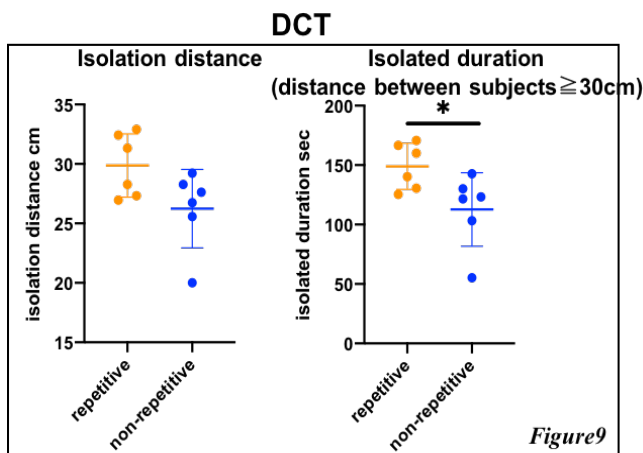


Figure9

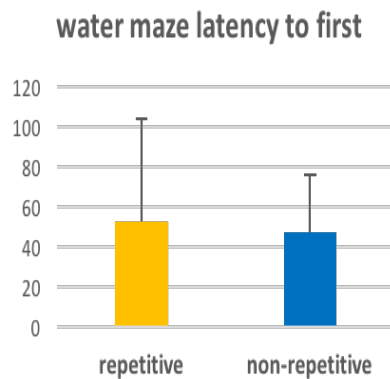


Figure 10

<Morris 水迷路試験(WM)>

WM において、repetitive rat の空間認知学習能力を検討したところ、水面下に隠れたプラットフォームをプール周囲の目印を頼りに探し、到達するまでの時間 (latency to first) は repetitive rat と non-repetitive rat に差は見られなかった (Figure10)。このことは、repetitive rat は“頭が悪い”訳ではなく、空間認知学習能力が低いために RM で“道に迷っていた”訳ではないことを示唆している。

以上の行動実験から、repetitive rat の行動学的な性質を検討したが、以下では、このような行動や性質を生む分子メカニズムについて検討するため、分子生物学的な実験を試みた。今回はこだわりが顕著であったオスに絞って、サンプルを採取した。

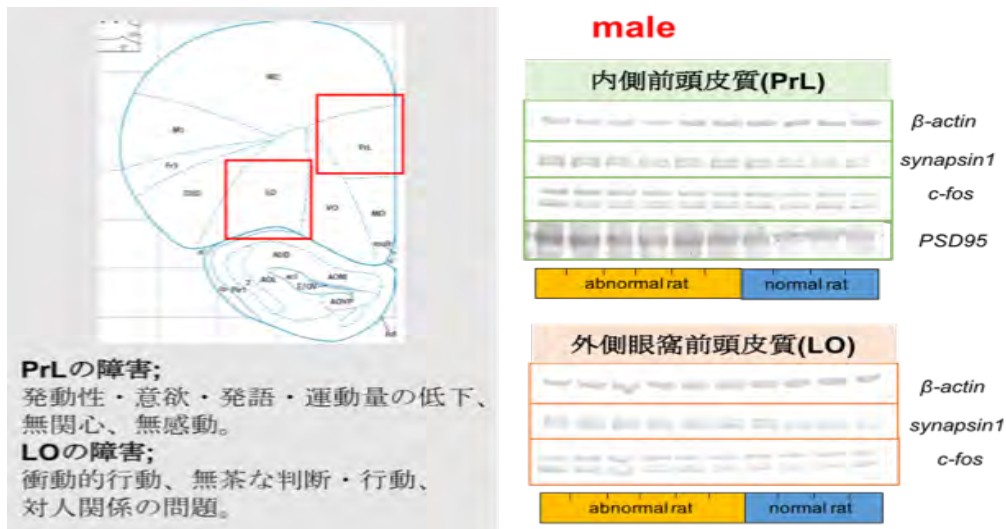
<Western Blotting>

扁桃体や線条体との連絡があり、情動や報酬と関わる行動と関連が強いとされ、また常同行動にも関与するとされている内側前頭皮質 (PrL) (※ヒトの前帯状回 (ACC) に相当) と外側眼窩前頭皮質 (LO) より、脳組織を採取し、各タンパクの発現量を検討した。

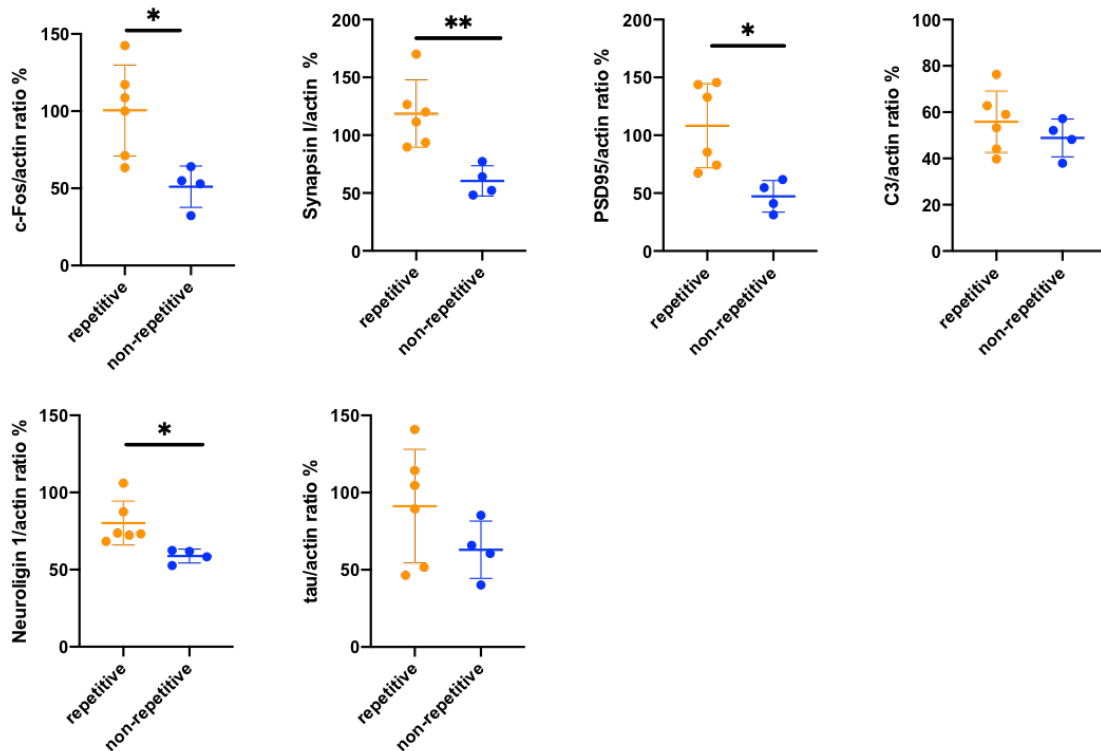
PrL では脳内の最初期遺伝子であり、神経細胞の活動性のマーカーである c-Fos の発現が repetitive rat で有意に高く、神経終末シナプス小胞結合タンパクの Synapsin1、興奮性シナ

プス後部存在する PSD95、Neuroigin1 の発現も有意に高かった。また、LO でも Synapsin1 の発現が repetitive rat で有意に高かった。(Figure11) (repetitive rat: n=8, non-repetitive rat: n=4)

以上の結果から、repetitive rat ではシナプス、特に興奮性シナプスが多く、また活動性も上がっていることが示唆された。過剰なシナプスにより、行動の異常が見られる可能性があると考え、成熟脳でシナプスの貪食を行うマイクログリアについて repetitive rat で検討することにした(Aono, H. et al 2017, Choudhury, M.E. et al 2019)。



PrL



LO

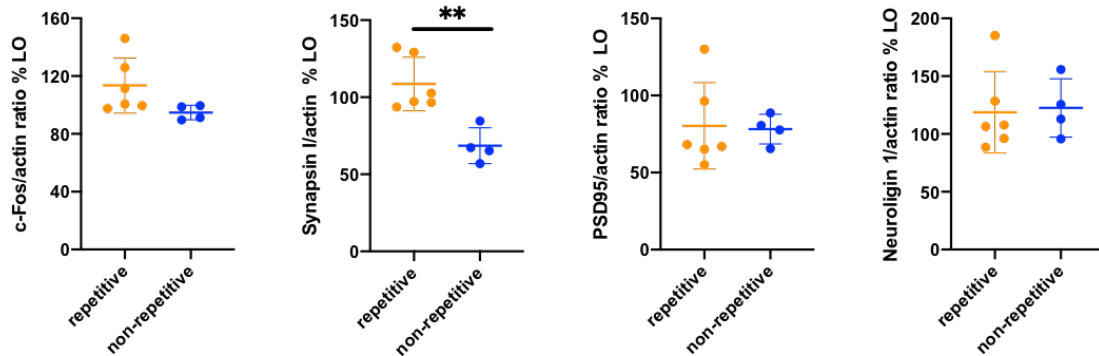
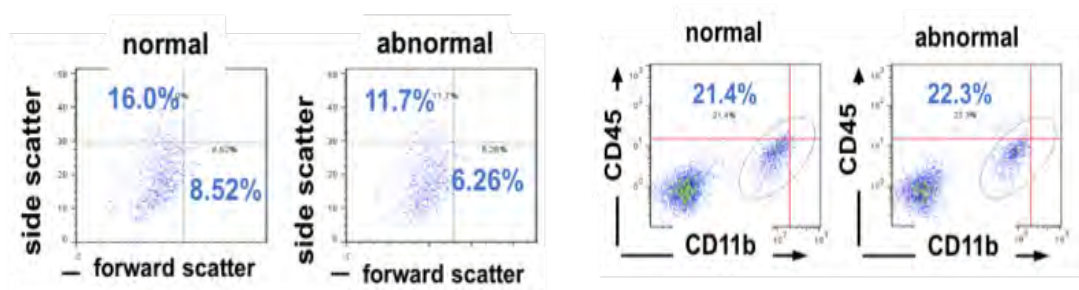


Figure 11

<FACS>

ラット前頭葉組織の細胞を1細胞単位までに分散し、マイクログリアに着目してフローサイトメトリー分析を行った。マイクログリアの活性化の指標となる CD45 および CD11b の MFI は repetitive rat で低かった。また、レーザー光を照射時の、前方散乱光(forward scatter:FS)と側方散乱光(side scatter :SS)はそれぞれ、細胞の大きさと内部構造の複雑性を表す指標として用いられるが、FS、SS の高いマイクログリアの割合は、repetitive rat で低かった。(Figure12)



FACS

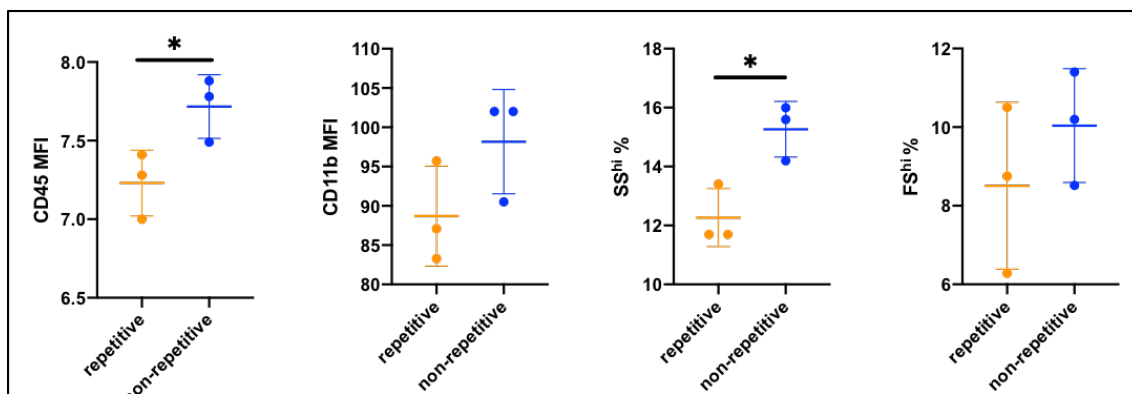


Figure 12

repetitive rat ではマイクログリアの活性が低いことが示唆されたが、今後、マイクログリアの貪食活性などについても検討し、シナプス量とマイクログリアの関係性やマイクログリアのシナプス貪食の機序についての新たな知見をもたらしたい。そして、神経細胞—マイクログリアの関係性の中でいかにこだわり行動という、目に見える形としての特徴が現れるのか、メカニズムの検討を進めていきたい。

考察・今後の展望 —自閉症スペクトラム (ASD)モデルとしての可能性—

こだわり行動に着目して、研究を進めていく上で、このこだわり行動が一体何を意味しているのが課題となる。自閉症スペクトラム(ASD)において、①社会性・コミュニケーション障害 ②限定的で反復的なこだわり行動・限定的な興味、の2点が大きな特徴であるが、我々がこだわり行動と呼ぶ、RM での反復常同行動は ASD や強迫神経症(OCD)などの精神疾患で見られる②の症状に類似しているのではないかと考えた(Mark H. Lewis et al 2007)。①の社会性については、DCT の結果より repetitive rat は社会性が低く、他者とのコミュニケーションに非積極的であることが示唆されており (Figure9)、repetitive rat が ASD のモデルと成る可能性に期待している。

今後は、さらなる社会性の評価として、一方は空の筒、もう一方はラットの入った筒、の2種類の筒の置かれたフィールドにラットを放し、どちらの筒の方により好んで行くかを見る、three-chamber test を行うことを予定している。この three-chamber test については、実験用のフィールドを自分たちで自作したので、その出来栄を確認するのも含め、休校明けの実験をととても楽しみにしている。また、ASD では心の理論と呼ばれる、他者の状況や感情を類推し理解する能力や、他者に同情したりする能力に障害が認められるとされるが、麻酔で仮死状態にしたラットが横たわっているフィールドに別のラットを放し、repetitive rat がどのような行動を示すのか、検討する予定である。

自作した3-chamber用field



repetitive rat の ASD モデルとしての可能性、我々の研究の展開について以下で更に検討する。ASD の発症に関しては遺伝的要因や母体の感染などの環境要因など様々な説が提唱されているが、スペクトラム症という名の通り、症状の程度や出方には多様性があり、定まっていない。しかし、遺伝的要因が占める割合も大きいことが報告されており、発症頻度を男女で比較すると、男子での発症が多い傾向にある。我々の実験における repetitive rat の割合が継世家系で高く repetitive な性質の遺伝的側面が示唆されたこと(表 1)、オスで高かったこと(表 1, Figure 8)などは、ヒトにおける ASD の傾向と一致している。ASD 関連のゲノム異常の報告は多数あり、中でも神経細胞やグリア細胞と関係のあるものが多い(Luis et al 2016)。repetitive rat の ASD モデルとしての妥当性を評価するためにも、脳サンプルの PCR などで ASD 関連遺伝子についての検討を行う予定である。

ASD の発症要因には種々のものがあり、遺伝的要因や環境要因などが報告されている、と述べたが、いずれにせよ表現型の一つとしてシナプス異常が注目されており、シナプスの過剰形成または欠乏することで神経回路としての機能障害を生じることが分かってきている。発達期の脳内では過剰なシナプスをマイクログリアが刈り込む(synapse pruning)ことで機能的な神経回路の構築が行われるが、ASD ではマイクログリアによる刈り込みが正常に行われず、シナプス異常につながると考えられている(Wake, H et al. 2013)。実際、マイクログリア特異的なフラクタルカイン受容体である CX3CR1KO マウスでは社会性の欠如や常同行動などの自閉症的行動が見られたという(Zhan, Y. et al 2104)。このようにマイクログリアと ASD の関係性は濃厚である。

先述の通り、ASD などの精神疾患では発達期での刈り込み不全が発症に関係すると考えられており、この時期におけるシナプス貪食に焦点が当てられがちだが、成熟後のシナプス貪食についての研究は少ない。我々の研究室の先行研究により、マイクログリアによるシナプス貪食が成熟後も行われており、パーキンソン病モデルにおいてマイクログリアが視床下核からの興奮性シナプスを貪食し代償的に働いていることや、入眠時にシナプス貪食を行い概日リズムを持つことなどが分かってきている(Aono, H. et al 2017, Choudhury, M.E. et al 2019)。我々の研究でも、マイクログリアの成熟後の脳内での働きを解明することはテーマの一つである。

repetitive rat でのシナプスの過剰とマイクログリアの活性低下が示唆されている(Figure 11 Figure 12)が、このテーマの一環として、マイクログリアの活性を変化させることでこだわり行動や社会性の低下に改善が見られるのかを今後検討したい。具体的には、選択的ノルアドレナリン $\beta 2$ 受容体のアゴニストであるクレンブテロールでマイクログリアを活性化、または選択的 $\beta 2$ アンタゴニストである ICI118551 でマイクログリアを不活性化させるなどの薬剤介入実験などを考えている。このような薬剤介入により、マイクログリア

を活性化させ、行動改善などが見られた場合、成熟後の脳内に後天的にアプローチすることで、神経回路の構築を変えるのではなく、その時点での神経伝達の活性を調節することで症状を軽減できることになる。ASD などの精神疾患に新たな治療法をもたらすことができることに加え、脳内でのマイクログリアの働きを解明する一つの手がかりになる、という点で我々の研究の意義はとても大きいと考えている。

参考文献

1. Aono, H. et al. Microglia may compensate for dopaminergic neuron loss in experimental Parkinsonism through selective elimination of glutamatergic synapses from the subthalamic nucleus. *Glia* 65. 1833–1847 (2017).
2. Choudhury, M.E. et al. Phagocytic elimination of synapses by microglia during sleep. *Glia* 68, 44-59 (2019).
3. Luis de la Torre-Ubieta et al. Advancing the understanding of autism disease mechanisms through genetics. *Nature Med* 22(4), 345-359 (2016)
4. Mark H. Lewis et al. Animal models of restricted repetitive behavior in autism. *Behav Brain Res.* 176(1): 66–74(2007)
5. Wake et al. Microglia: actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. *Trends Neurosci* 36(4), 209-217 (2013)
6. Zhan, Y. et al. Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nat. Neurosci.* 17, 400–406 (2014).