

## 学位請求論文の内容の要旨

論文題目 Roles of spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  signals in astrocytes in neurite outgrowth  
和訳 神経突起伸長におけるアストロサイト自発的  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルの役割

金丸和典

東京大学大学院 医学系研究科

機能生物学専攻 医学博士課程

平成14年4月入学

指導教員 飯野正光教授

グリア細胞の一つであるアストロサイトでは、 $\text{Ca}^{2+}$ オシレーションや  $\text{Ca}^{2+}$ ウェーブといったダイナミックな細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化が頻繁に観察される。近年の研究より、このようなアストロサイトの  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルは、近傍のニューロンの発火パターンやシナプス伝達効率を調節すると考えられるようになってきた。さらに、神経活動を阻害した脳スライス標本において、アストロサイトの自発的な  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルが観察されたことから、従来、神経活動に依存して二次的に活動すると捉えられていたアストロサイトが、積極的に神経機能の調節に貢献する可能性が示唆された。このような背景から、アストロサイトの  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルから神経機能の調節に至るまでの経路や因子を解明することは、脳機能の理解に重要であると考えられる。

発生段階において、アストロサイトは神経突起伸長の足場となるだけでなく、神経成長因子やシナプス形成因子を提供し、正常な神経回路網の形成に極めて重要な役割を果たすことが知られている。しかし、このような機能におけるアストロサイトの  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルの役割は未だ解明されていない。 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルは多彩な役割を担っているため、アストロサイトの  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルを介したプロセスが神経成長に貢献することは十分に予想される。そこで本研究では、 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルを恒常的に抑制したアストロサイトを作製し、これと共培養したニューロンの成長を評価することで、神経成長におけるアストロサイトの自発的  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルの機能解明を試みた。

アストロサイトの  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルには、 $\text{IP}_3$  受容体を介する  $\text{Ca}^{2+}$ 放出が重要であると考えられている。そこで、 $\text{IP}_3$  を特異的に脱リン酸化する酵素である  $\text{IP}_3$  5-phosphatase の強制発現により、アストロサイトの  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルの抑制を試みた。この手法により、培養上皮細胞および小脳プルキンエ細胞における  $\text{IP}_3$  受容体を介する  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルが強力に抑制されることは、当研究室の廣瀬らおよび大久保らにより実証されている。レトロウイルスベクターを用い、ラット海馬より得た初代培養アストロサイトに  $\text{IP}_3$  5-phosphatase を発現させた。その結果、自発的な  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルがほぼ完全に抑制された、 $\text{Ca}^{2+}$ シグナル欠損アストロサイトを作製することに成功した (図1)。ウイル

スの感染効率を上げることにより、細胞集団のうち約 90%の細胞に目的遺伝子を導入することができた。このアストロサイトの生存および増殖能力は正常であり、30 日間に及ぶニューロンとの共培養に使用することができた。

次に、 $\text{Ca}^{2+}$ シグナル欠損アストロサイトとニューロンを共培養し、ニューロンの成長を解析した。 $\text{Ca}^{2+}$ シグナル欠損アストロサイトが 100%コンフルエントのシート状になるよう培養した後、胎生 18 日齢のラットから単離

した海馬ニューロンを加えて共培養を行った。約 3 週間培養した後、免疫染色によりニューロンの成長を解析した結果、神経突起の長さ、数および分岐数がコントロールに比べ有意に減少していることがわかった。培養日数 1 日および 10 日間のサンプルにおいても同様の傾向を確認した。また、共培養中の細胞を用いて  $\text{Ca}^{2+}$ イメージングを行った。ニューロンの自発的な発火が観察される条件下においても、そのニューロンの近傍の  $\text{IP}_3$  5-phosphatase 発現アストロサイトでは  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルが見られなかった。これらの結果から、アストロサイトの自発的  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルがニューロンの成長を促進することが示唆された。

上記の現象を詳細に検証するため、培養中の細胞を長時間に渡って観察できる顕微鏡システムを構築し、緑色蛍光タンパク質 (GFP) の発現により可視化した神経突起の伸長をリアルタイムで観察した。その結果、正常アストロサイト上と比較して、 $\text{Ca}^{2+}$ シグナル欠損アストロサイト上では、神経突起伸長の速度が有意に減少することが明らかとなった。さらに興味深いことに、 $\text{Ca}^{2+}$ シグナル欠損アストロサイトと正常アストロサイトが混在する培養条件下において、正常アストロサイト上を通過し、その先にある  $\text{Ca}^{2+}$ シグナル欠損アストロサイトに向かって伸長する神経突起先端をイメージングしたところ、 $\text{Ca}^{2+}$ シグナル欠損アストロサイトに接触した直後から、伸長速度の著しい減少が観察された。これらの結果から、神経突起伸長は  $\text{Ca}^{2+}$ シグナル欠損アストロサイトにより抑制されることが確認された。さらに、この作用にはアストロサイトと神経突起先端の接触が必要であることが示唆された。このように、 $\text{Ca}^{2+}$ シグナル欠損アストロサイトでは、正常アストロサイトに比べてニューロンの成長を促進する作

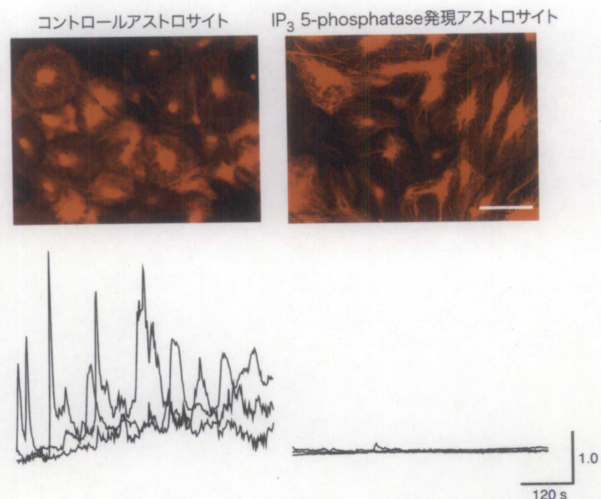


図1.  $\text{IP}_3$  5-phosphataseの発現によるアストロサイト自発的 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルの抑制

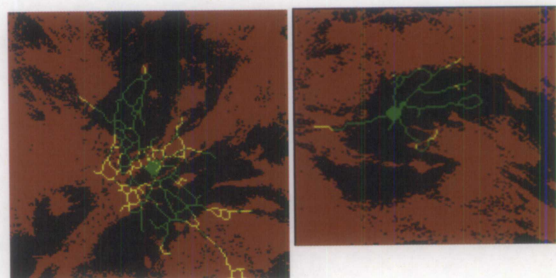


図2. 二次元分布解析  
 緑: ニューロン、赤:  $\text{Ca}^{2+}$ シグナル欠損アストロサイト、黒: 正常アストロサイト

用が減少していると考えられる。これを検証するため、 $\text{Ca}^{2+}$ シグナル欠損アストロサイトと神経突起の二次元分布を解析した。その結果、神経突起が  $\text{Ca}^{2+}$ シグナル欠損アストロサイトを避けて分布する傾向が見られ（図2）、神経成長の足場としてのアストロサイトの機能に  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルが重要であることが示唆された。

さらに、小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$ ポンプを特異的かつ不可逆的に阻害する薬物で処理することにより、 $\text{Ca}^{2+}$ シグナル欠損アストロサイトを作製することができた。このアストロサイトを用いた共培養においても、 $\text{IP}_3$  5-phosphatase の発現により作製した  $\text{Ca}^{2+}$ シグナル欠損アストロサイトと同様に、ニューロンの成長が有意に抑制された。

本研究は、アストロサイトにおいて頻繁に見られる自発的な  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルが、神経突起伸長の足場としてのアストロサイトの機能を高め、神経突起伸長を促進することを明らかにした。この作用を仲介する、アストロサイトの  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルに制御される神経成長因子を同定することは、極めて興味深いテーマである。神経突起伸長の制御には多種類の因子が関与する可能性があるが、本研究で作製した  $\text{Ca}^{2+}$ シグナル欠損アストロサイトを用い、正常アストロサイトとの遺伝子発現の比較を行うことにより、そのような因子の大規模なスクリーニングが可能であると期待される。