

## 審査の結果の要旨

金丸 和典

本研究では、神経成長におけるアストロサイトの自発的  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルの役割を明らかにするため、 $\text{Ca}^{2+}$  シグナルを恒常的に抑制したアストロサイトを作製し、これと共培養した神経細胞の成長を評価した。

1.  $\text{IP}_3$  を特異的に脱リン酸化する酵素である  $\text{IP}_3$  5-phosphatase のレトロウイルスを用いた強制発現、および小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプ阻害剤であるタブシガルジン処理により、 $\text{Ca}^{2+}$  シグナル欠損アストロサイトの細胞集団を作製することに成功した。
2.  $\text{Ca}^{2+}$  シグナル欠損アストロサイトと共培養した神経細胞の成長を解析した結果、神経突起の長さ、数および分岐数の減少を確認した。
3. 共培養中の細胞を用いて  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを行い、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。
4. 2と3の結果より、アストロサイトの自発的な  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルが神経成長を促進することが示唆された。
5. 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) により可視化した神経突起先端の伸長速度を解析した結果、 $\text{Ca}^{2+}$  シグナル欠損アストロサイト上で速度が減少することが確認された。
6.  $\text{Ca}^{2+}$  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条件下で、正常アストロサイト上では神経突起伸長速度の減少が見られないことから、 $\text{Ca}^{2+}$  シグナル欠損アストロサイトによる神経突起伸長速度の抑制には、アストロサイトと神経突起先端が接触する必要があることが示唆された。
7.  $\text{Ca}^{2+}$  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させた培養条件において神経突起の二次元分布を解析した結果、神経突起が  $\text{Ca}^{2+}$  シグナル欠損アストロサイトを避け、正常アストロサイト上に分布する傾向が見られ、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。

以上、本論文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。さらに、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機能比較を行うことにより、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やその経路を同定することが可能であると期待される。このように、本研究はアストロサイトと神経細胞の機能的共役のメカニズムを解明するための重要な手がかりを与えると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。