

## 審査の結果の要旨

氏名 ランジャコーンシリパン ダーリン

ヒトの中枢神経系において最も豊富に存在する細胞であるアストロサイトは、エネルギー代謝におけるニューロンのサポートが主な役割であると長年考えられて来た。しかし最近になって、アストロサイトは上記の役割に加えてシナプス形成や伝達制御など、神経回路に積極的に働きかける機能を果たしている事が次々に明らかとなっている。神経回路は多種多様なニューロンが厳密に決められた特定の相手とシナプスを形成する事で構成されていることから、特定のニューロンやシナプスに対して特定の機能を果たすアストロサイトが存在するのかが大きな疑問となるが、この点に関しては現在のところ明らかにされていない。

知覚、思考、言語機能、随意運動などの脳の高次機能を司る領域である大脳新皮質では、性質の異なるニューロンが6層に整然と配列していることが知られている。一方、大脳新皮質内に存在するアストロサイト(プロトプラスミックアストロサイト)は一般的に均一な性質を持つと考えられていた。例外的にI層アストロサイトについては、電気生理学的性質がやや異なり、アストロサイトマーカーGFAPの発現量がより高いとされていたが、他の層のアストロサイトについてはある程度均一だと考えられきた。しかし、大脳新皮質アストロサイトは層ごとに性質の異なるニューロンと密に相互作用していることから、それに対応して層ごとに性質の異なるアストロサイトが存在し、特異的な神経回路の構築に関わっている可能性も考えられる。そこで、本研究はモデル系として大脳新皮質に注目し、層ごとに性質や機能の異なるアストロサイトが存在するかを解明することを目指した。

まず、微小管結合ドメイン融合型GFPをアストロサイトで発現するGlast-EMTB-GFPマウスを用いてアストロサイトの微小管の形態を観察した。その結果、上層(II/III-IV層)アストロサイトは脳表面に対して垂直方向に長く、突起がより複雑な傾向が見られた。一方、下層(V-VI層)アストロサイトは脳表面に対して水平方向に長く、突起の分岐がより少ない傾向が見られた。突起の複雑度をSholl解析で定量的に評価した結果、上層アストロサイトは下層アストロサイトに比べて突起がより複雑である事が明らかになった。さらに、より明瞭な形態を観察するために、CUBIC技術で脳を透明化して三次元イメージングしたところ、同様に上層と下層アストロサイトの形態が異なる結果が得られた。さらに、Glast-CreERT2:Rosa-CAG-LSL-tdTomatoマウスとかけ合わせて、アストロサイト細胞全体を可視化することにより、アストロサイトの配向(脳表面に対して縦長か横長か)やアストロサイトの占有体積が上層と下層で有意に異なるかを定量的に比較した。その結果、占有体積はI層アストロサイトにおいて最も小さく、II/III層アストロサイトで最も大きい傾向が見られた。配向に関しては、上層(特にII/III層)のアストロサイトは角度が $90^\circ$ に近く、脳表面に対してほぼ垂直方向に配向している一方、下層(特にVI層)のアストロサイトは角度が $0^\circ$ に近く、脳表面に対して平行方向に配向していることが示唆された。

続いてアストロサイトの形態の違いをunbiasedに検討するために、すべての層のアストロサイトについて、形態に基づいてclustering解析を行った。そして、unbiasedに分類された各クラスターのアストロサイトが、実際にニューロンによって規定される層構造特異的に分布するのかを調べた。まず、多次元情報を2次元情報として表すtSNE解析を行ったところ、大脳新皮質アストロサイトは大きく2つのクラスターに分類され、さらにII/III層とV-VI層アストロサイトは異なるクラスターに分布する傾向が見られた。また、別の解析方法として階層的clusteringを行った結果、大脳新皮質アストロサイトが大きく4つのクラスター(クラスターA-D)に分類された。興味深いことに、クラスターAには下層アストロサイト、クラスターCには上層アストロ

サイト、クラスターDにはI層アストロサイトが多く含まれている傾向が見られた。以上の結果から、I層アストロサイトと上層アストロサイトと下層アストロサイトは形態に関して大きく異なることが示唆された。これは、「大脳新皮質の層ごとに性質の異なるアストロサイトが存在する」という仮説を支持するものである。

次に、各層のアストロサイトが遺伝子発現に関しても異なるのかについて検討した。まず、アストロサイト特異的にGFPラベルされるAldh1l1-eGFPマウスの大脳新皮質を取り出し、既に遺伝子発現パターンが異なることが知られていたI層をとり除いて、上層(II/III-IV層)と下層(V-VI層)に切り分け、FACSによってGFP陽性細胞群(アストロサイト)を単離した。そして、各層のGFP陽性アストロサイトにおける遺伝子発現をRNA-seq解析で網羅的に比較した。予備的な結果として上層アストロサイトに高発現した約2000個の遺伝子と、下層アストロサイトに高発現した約800個の遺伝子が得られた。これらの中からさらに、アストロサイトの発現遺伝子データベースやAllen in situ hybridizationデータベースなどの情報を用いて候補遺伝子を絞り、上層と下層のアストロサイトにおける候補遺伝子の発現量を定量PCRで調べた。その結果、Dkk3、Chrdl1、St6galnac5、Glut2、Epha3は上層アストロサイトに高発現している一方、Glyt1、Adcy8、slitrk5は下層アストロサイトに高発現していることが分かった。またEpha3とAdcy8については、in situ hybridizationと組織免疫染色実験によって上層と下層アストロサイトで発現量が異なることが確認された。

さらに、これまで当研究室の研究によってアストロサイト分化に重要であると示されてきた転写因子HMGN1-3とZbtb20にも着目した。上層と下層アストロサイトにおいてこれらの分子の発現パターンを免疫染色で調べたところ、HMGN1-3とZbtb20タンパク質を強く発現しているアストロサイトは上層に偏って分布していることがわかった。以上の結果より、上層と下層アストロサイトは遺伝子発現においても性質が大きく異なることが明らかになった。

これまでに観察された大脳新皮質のアストロサイトの性質の違いが、発生過程でどのように作り出されるのかは非常に興味深い疑問である。大脳新皮質において性質の異なる各層のアストロサイトサブタイプが、神経系前駆細胞から産み出された時点である程度決定しているのか、それとも産み出された後に決定されるのかは分かっていない。「内因性プログラムによって性質の違いが生まれた」もしくは、「外因的なシグナルによって性質の違いが生まれた」という2つの可能性考えられる。特にアストロサイトは、ニューロンの層構造が出来上がった後に分化して配置されるため、ニューロンの層ごとの違いがアストロサイトの違いを誘導した可能性は十分考えられる。そこで、ニューロンの層構造が乱れたreelerマウスを用いて、上層と下層アストロサイトのHMGN1-3とZbtb20の発現パターンを観察した。正常マウスでは、下層アストロサイトに比べて上層アストロサイトにおいてHMGN1-3とZbtb20タンパク質の発現が高いことが観察された。一方、reelerマウスでは、層間におけるHMGN1-3とZbtb20タンパク質の発現パターンの違いが見られなくなった。このことから、外的要因が少なくともアストロサイトでの転写因子発現の層間の違いに影響していることが示唆された。しかし、この層間の違いにニューロンの層構造が必要なのか、それとも、Reelin自体が必要なのかは、今後Reelinの発現を保ったままニューロンの層構造のみを変化させることによって検証していく。

本研究によって、これまでほぼ均一な性質を持つと考えられていた大脳新皮質アストロサイト(プロトプラスミックアストロサイト)の中でも、大脳新皮質上層のアストロサイトと下層のアストロサイトは細胞の形態(突起の複雑さ、細胞の配向、シナプスとの接触部構造)や遺伝子発現が大きく異なる事が示唆された。従って、「大脳新皮質の異なる層に性質の異なるアストロサイトが存在する」という可能性が支持された。こういった「形態的」「分子的」多様性が機能的な多様性に貢献する可能性が考えられる。また、これらのアストロサイトの違いは、ニューロンの層構造や分泌因子など外的要因によって生み出される可能性が示唆された。

#### <評価>

本論文によって、大脳新皮質の異なる層に異なる性質を持つアストロサイトが存在することを初めて見出した。これまで大脳新皮質のアストロサイトは均一な性質を持つと一般的に考えられていたため、形態や遺伝子発現が異なること自身が非常に驚くべき事である。また、大脳新皮質のアストロサイトにおいて層特異的に高発現する分子をサブタイプの指標として同定することに成功しており、研究の先行性・将来性は高い。これらの分子の同定により、それぞれのサブタイプの専門機能（重要性）や分化/成熟メカニズムに迫ることが可能となった。さらに、性質の異なるアストロサイトが層ごとに分布することから、それぞれのアストロサイトが同じ層に存在するニューロンやそのシナプスに対して特定の機能を果たし、各層の機能に貢献しているという概念的に全く新しい可能性が提示する点で極めて重要な知見であると考えられる。

よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。