〔別紙２〕

審　査　の　結　果　の　要　旨

氏　名　宇治田　早紀子

【序論】

脳組織は、神経細胞とグリア細胞によって構成されている。グリア細胞の一種であるアストロサイトは、細胞外環境の維持、栄養供給、血流調節など多岐にわたる機能を担う。近年、アストロサイトが活発に細胞内カルシウム濃度の変動（カルシウム活動）を示すことが明らかとなり、アストロサイトの機能的な活動の指標として注目されてきた。

アストロサイトのカルシウム活動は、外部刺激によって誘発されるものと、無刺激下で自発的に生じるものに大別される。過去にカルシウム活動の機能やメカニズムにアプローチした報告ではもっぱら前者が用いられてきたが、その結果についてはいまだ一致した見解に至っていない。その一因として、これらの研究で人為的に誘発された活動が、自発的な活動を再現できていないことが指摘されている。

このような背景から、カルシウム活動の実体に迫るには、自発的なカルシウム活動の理解が必須であると考えた。自発的なカルシウム活動は、多くの脳領域において様々な時空間的スケールで観察されており、多くの場合神経活動に依存しないことが知られている。しかし、その詳細な特性や意義に迫ることができた例はほとんどない。本研究では、アストロサイトの自発的なカルシウム活動を大規模にイメージングし、時系列パターンに着目してそのメカニズムと生理的意義を検討した。

【本論】

1. 自発的なカルシウム振動の発見と時空間的特性の解析

生後 9-12 日齢マウスから海馬急性切片を作製し、CA1 野アストロサイトの自発的なカルシウム活動を、多細胞カルシウムイメージング法を用いて記録した。本手法は、一過的な細胞内カルシウム濃度変化を蛍光強度変化として捉えるものであり、数百もの細胞の活動を同時に記録できる（図１A）。

活動の時系列パターンに着目した結果、大多数のアストロサイトが単発で規則性のないカルシウム活動を示すのに対し、一部のアストロサイトが特徴的な反復性活動パターン（カルシウム振動）を示すことを見出した（図１B）。

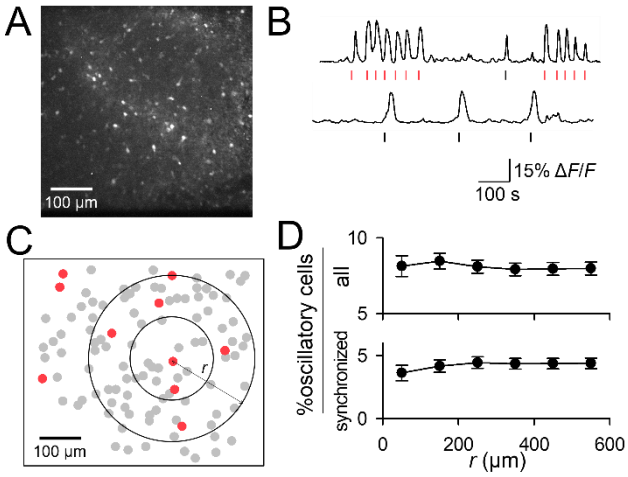

図 1. カルシウム振動の発見と時空間的特性
A. 海馬アストロサイトのカルシウムイメージング像。**B.** 単発の活動を示す細胞（上）とカルシウム振動を示す細胞（下）の例。赤点がカルシウム振動。**C.** カルシウム振動を示す細胞（赤）・示さない細胞　（灰色）のセルマップ。**D.** 上、任意の振動性細胞から一定距離内に存在する振動性細胞の割合（n = 156 cells）。下、任意の振動性細胞から一定距離内に存在する同期した振動性細胞の割合（n = 104 cells）。

このカルシウム振動が細胞間相互作用に基づく可能性を検証するために、時空間的特性を解析した。カルシウム振動を示す細胞の空間分布は、細胞間距離に依存しなかった（図１C, D 上）。また、同時にカルシウム振動を示した細胞の空間分布も、同様に細胞間距離に依存しなかった（図１D 下）。このことは、カルシウム振動を示す細胞がクラスターなどの特徴的な空間分布を示さないこと、カルシウム振動の細胞間伝播や同期が見られないことを意味する。よって、カルシウム振動は単一細胞レベルの現象であり、その生成における細胞間相互作用の影響は小さいと考えられる。

2. カルシウム振動のパターン形成は、cAMP–カルシウム相互作用に依存する

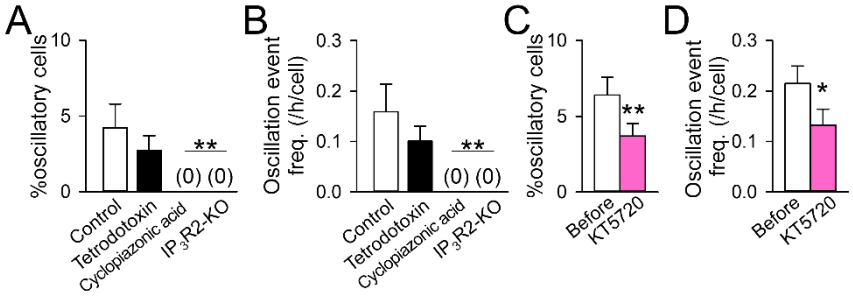

図 2. カルシウム振動の薬理学的特性
A, B. TTX 存在下、CPA 存在下、および IP_3R2-KO マウスから作成したスライスにおけるカルシウム振動を示した細胞の割合（A） とカルシウム振動の出現頻度（B）。$^{**}P < 0.01$ *versus* control, Dunnett's test after one-way ANOVA; $n = 5$ slices. **C, D.** KT5720 存在下におけるカルシウム振動を示した細胞の割合（C）とカルシウム振動の出現頻度（D）。$^{**}P < 0.01$, $^{*}P < 0.05$ *versus* before, paired *t*-test; $n = 6$ slices.

カルシウム振動のメカニズムを調べるため、薬理学的検討を行った。

まず、カルシウム振動は、電位依存性ナトリウムチャネル阻害薬 Tetrodotoxin（TTX; 1 μM）の影響を受けず（図２A,B）、神経活動に依存しないことを確認した。

次に、小胞体 Ca^{2+}/ATP アーゼ阻害薬 Cyclopiazonic acid（CPA; 20 μM）存在下、およびアストロサイト特異的に IP_3 受容体 2 型を欠損したマウス（IP_3R2-KO）から作成したスライスでは、カルシウム振動は完全に消失した（図２A,B）。このことから、カルシウム振動は細胞内カルシウムストアに依存すると考えられる。

細胞内カルシウムストアに基づいた反復性のカルシウム上昇にはいくつかのメカニズムが報告されている。このうち、cAMP とカルシウムの相互作用によるパターン形成に着目した。cAMP シグナル経路の下流に存在する protein kinase A（PKA）の阻害薬 KT5720（30 nM） の処置によって、カルシウム振動は有意に減少した（図２C,D）。この時、単発の活動の頻度は変化しなかったため、PKA はカルシウム振動の形成に特異的に関与することが推察される。

また、カルシウム振動の誘発における cAMP 経路の十分性を検討するため、アデニル酸シクラーゼ活性化薬 Forskolin（50 μM）を処置した。これにより、長期に持続するカルシウム振動が誘導された（図３A,B）。この効果は、Gs-GPCR である β アドレナリン受容体の作動薬 Isoproterenol（10 μM）によっても再現された（図３B）。Forskolin によるカルシウム振動の増加は、KT5720 によって有意に抑制され、IP_3R2-KO マウスにおいて完全に消失した（図３C）。これらは、先に述べた結果と一致する。また、KT5720 は、Forskolin 誘発性カルシウム振動の持続を有意に短縮した（図３D）。

以上の結果から、カルシウム振動の形成と持続には、細胞内カルシウムストアと cAMP–PKA 経路が関与することが分かった。

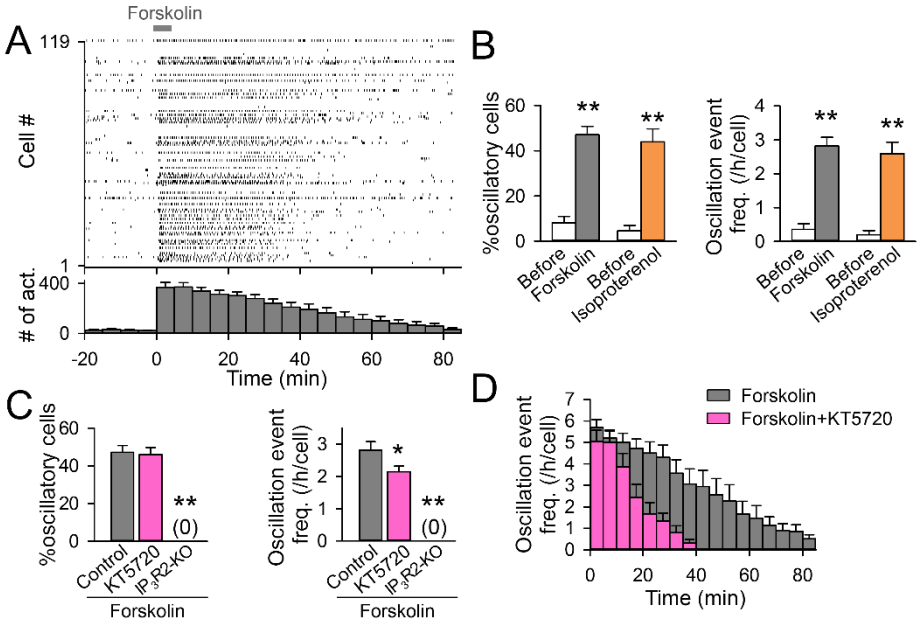

図 3. cAMP 経路の活性化によるカルシウム振動の誘発
A. 上、Forskolin 処置下におけるカルシウム活動のラスタープロット。下、総活動数のヒストグラム。**B.** Forskolin および Isoproterenol 処置下におけるカルシウム振動を示した細胞の割合（左）およびカルシウム振動の出現頻度（右）。$^{**}P < 0.01$, $^{*}P < 0.05$ *versus* before, paired *t*-test; $n = 5$ slices. **C.** KT5720 存在下および IP_3R2-KO マウスより作成したスライスにおける、Forskolin の影響。左、カルシウム振動を示した細胞の割合。右、カルシウム振動の出現頻度。$^{**}P < 0.01$, $^{*}P < 0.05$ *versus* control, Dunnett's test after one-way ANOVA; $n = 5$-6 slices. **D.** KT5720 存在下・非存在下におけるカルシウム振動出現頻度のヒストグラム。

3. カルシウム振動はアストロサイトの形態変化に関与する

cAMP とカルシウムは、それぞれ培養アストロサイトの形態に関与することが知られている。そこで、両シグナル経路を動員するカルシウム振動が、形態変化に関与する可能性を検討した。活動パターンをイメージングした後、細胞骨格の一種である GFAP の免疫染色によって細胞形態を可視化した（図４A）。

その結果、Forskolin によってカルシウム振動を示した細胞は、そうでない細胞と比べ、太い突起構造が見られた（図４B）。

脳疾患や脳傷害の際に、アストロサイトは活性化し、様々な炎症性反応を仲介する。活性化したアストロサイトは、細胞体や突起の肥大化を特徴とする。上記で観察された形態変化は、この肥大化に類似すると考えられる。そこで、形態変化を引き起こす病態時における、カルシウム振動の変化を観察した。代表的な in vitro 疾患モデルである Oxygen - Glucose Deprivation（OGD）、あるいは Mg^{2+}-free 溶液の処置によって、カルシウム振動は有意に増加した（図４C-E）。OGD は無酸素無糖状態によって虚血を模倣し、Mg^{2+}-free 溶液は神経活動の過興奮を誘導することでてんかん様活動状態を模倣するモデルである。これらの結果から、カルシウム振動が病態時におけるアストロサイトの形態変化に関与する可能性が考えられる。

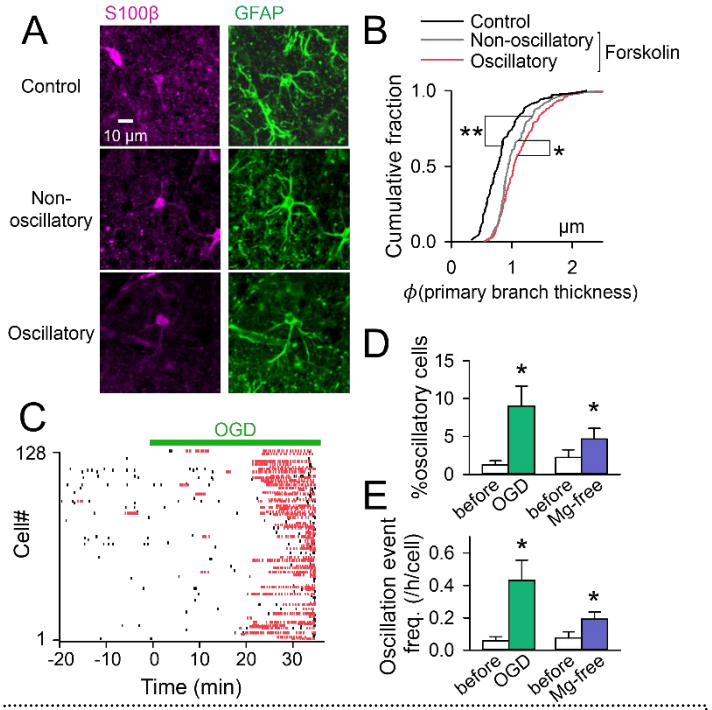

図 4. カルシウム振動のアストロサイト形態変化への関与と病態モデルにおける増加
A. コントロールおよび Forskolin 処置下においてカルシウム振動を示した・示さなかった細胞の代表的な免疫染色像。**B.** カルシウム振動を示した・示さなかった細胞の、主突起の太さの累積度数分布。$^{**}P < 0.01$, $^{*}P < 0.05$, Kolmogorov-Smirnov test; n = 70 branches from 11 cells (*control*), 111 branches from 13 cells (*non-oscillatory*), and 163 branches from 19 cells (*oscillatory*). **C.** OGD 処置下のカルシウム活動のラスタープロット。赤点はカルシウム振動。**D, E.** OGD および Mg^{2+}-free 溶液処置下でカルシウム振動を示した細胞の割合（D）およびカルシウム振動の出現頻度（E）。$^{*}P < 0.05$ *versus* before, paired *t*-test; n = 5-7 slices.

【総括】

本研究では、アストロサイトの自発的なカルシウム活動を大規模にイメージングし、時系列パターンに着目することで、自発活動のメカニズムおよび生理的意義の一端に迫ることに成功した。アストロサイトの自発的な活動のうち、カルシウム振動が cAMP–カルシウム相互作用に依存することを明らかとし、病態時におけるアストロサイトの活性化に関与する可能性を示唆した。なお、カルシウム振動は、その時空間的なスパースネスから、大規模イメージングによってはじめて詳細な解析が可能となった現象であるといえる。

従来の研究は、自発的なカルシウム活動を均一なものとして扱ってきた。これに対し、本研究はカルシウム活動をパターン化して捉え、意義を見出した初めての知見である。本研究で記述したような、シグナル経路の複雑な相互作用によって生み出される活動パターンが、アストロサイトの多様な機能の実現に重要な役割を持つ可能性が考えられる。今後、カルシウム活動の実体を解明するにあたり、新たな視点を提供することが期待される。

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。