

氏 名 長谷川 明 子

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第697号

学位授与の日付 平成15年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Cystatin C Regulates Astrocyte Development

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 重本 隆一  
教授 池中 一裕  
教授 川口 泰雄  
教授 渡邊 雅彦 (北海道大学)

## 論文内容の要旨

She studied the effects of cystatin C (CysC) on astrocyte development. CysC is an endogenous inhibitor of cysteine protease, known to be produced by mature astrocytes in the adult brain. Previously, CysC was isolated as a factor regulating astrocyte development through a newly developed expression cloning system using glial fibrillary acidic protein (GFAP)-promoter activity as an indicator. An *in situ* hybridization study showed that the CysC gene started to be expressed in astrocyte progenitor cells at embryonic day 16 (E16) in mouse cortex, when gliogenesis is initiated following the generation of neurons in the cortex.

CysC is a secreted protein, thus it is possible that CysC produced by the astrocyte progenitors acts as an epigenetic factor to promote gliogenesis in the developing cortex in an autocrine/paracrine manner. Recently, it was reported that CysC is a cofactor of basic fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and works to maintain and proliferate the neural stem cells (NSC) as an autocrine/paracrine factor *in vitro* (Taupin et al., 2000). She showed that the protease inhibitory activity, in the conditioned medium (CM) from primary cultured brain cells, increased day by day. She found one anti-CysC antibody that blocked the inhibitory activity of the CM, indicating that the primary cultured cells released CysC into the medium. She also demonstrated that CysC added to the culture medium increased the number and the process length of GFAP positive cells in the primary cultured brain cells. On the other hand, addition of the anti-CysC antibody decreased those. Another cysteine protease inhibitor, E64, increased the process length of GFAP positive cells but did not cause an increase in the number of GFAP positive cells in the primary cultured brain cell. These results showed that CysC can modify astrocyte development in two ways: one is to increase the number of astrocytes, which is independent of its protease inhibitor activity and the other to increase the process length of astrocytes, which is dependent on its protease inhibitor activity.

## 論文の審査結果の要旨

GFAP は成熟したアストロサイトのマーカーとして知られている。最近、熊田らは、GFAP プロモーター-LacZ を発現させたアストロサイト前駆細胞株 HB108-10 を用いて、システインプロテアーゼインヒビターの一つであるシスタチンCが GFAP-プロモーターを活性化する事を明らかにした。この事から脳の発達過程においてシスタチンCがアストロサイト前駆細胞から成熟アストロサイトへの分化成熟を調節する因子であることが予想された。本研究では、シスタチンCが胎児脳のアストロサイト分化成熟過程において担う働きを明らかにする目的で、以下の実験を行った。まず、マウス胎児脳において、シスタチンCの発現領域がアストロサイトの前駆細胞のマーカーである GLAST 発現領域に重なる事、発生が進行した生後0日齢ではGLASTとシスタチンCが同時に発現している領域にGFAPの発現が始まる事などから、マウス胎児大脳皮質においてシスタチンCを発現する細胞はアストロサイトの前駆細胞であることが示唆された。次に胎生14日齢マウス大脳皮質の分散培養液中のシステインプロテアーゼインヒビター活性を測定したところ、培養日数の経過と共に活性が増加していった。さらに、シスタチンC特異的な中和抗体を培養3日目の培養液に添加したところ、インヒビター活性が中和され、培養細胞からはシスタチンCが産生・放出されていることが明らかにされた。次に細胞外に放出されたシスタチンCがアストロサイトの分化成熟を調節する可能性を検証するために、細胞外にシスタチンCを添加したところ、培養1日目ではシスタチンC投与群でGFAP陽性細胞とnestin陽性細胞の数が増加していた。nestin陽性細胞の増加は、近年報告されたシスタチンCの神経幹細胞の増殖作用と一致する結果である。一方、培養3日目においてはシスタチンCの中和抗体によりGFAP陽性細胞数の激減が起きることを見出し、内在性シスタチンCが成熟アストロサイトの数を増やすことが明らかとなった。さらに、中和抗体の効果は他のシステインプロテアーゼインヒビターであるE64の添加によって影響されなかったことから、シスタチンCのGFAP陽性細胞増加作用はインヒビター活性によるものではない事が示唆された。しかしながらシスタチンCやE64の添加は、GFAP陽性細胞の突起を伸展させる作用があり、システインプロテアーゼインヒビター活性にはアストロサイトの成熟作用があると考えられた。

以上の結果は、アストロサイトの分化成熟過程において、シスタチンCが細胞数を増やす効果と成熟を促進する効果を持つことを示したものである。またこれらが異なるメカニズムによる作用であることが示唆された点は興味深い。またこれらの実験は、的確な技術と粘り強い観察に基づいて行われていると認められる。従って委員会は全員一致で本論文が博士の学位論文として相応しいものであると判定した。

学位論文の内容の発表および審査委員4名との間での質疑応答を行った。発表はよくまとまっており、わかりやすいものであった。また、申請者は委員の質問に対して、自ら行った実験の意義や関連分野における所見などを的確に応答した。また、この学位論文が簡潔な英語で書かれていることから、語学力も充分であると考えられた。従って、審査委員全員により申請者は学位授与に相応しい学力があると判定した。