

論文の内容の要旨

哺乳類神経管閉鎖時の正中線接着部における 組織リモデリングへのアポトーシスの 機能的関与の解明

篠塚 直美

【序論】

生体内では、形態形成や恒常性の維持など、様々な場面においてアポトーシスが観察される。これらのアポトーシスは生体にとって不要な細胞や有害な細胞を単に除去するための機構と考えられてきた。しかしながら近年、アポトーシスが細胞除去に留まらず、周囲の組織の分裂亢進を引き起こすことなどがショウジョウバエの成虫原基やヒドラにおいて報告されている。しかし哺乳類においてアポトーシスの細胞除去に引き続く機能についての報告はまだない。そこで本研究では、アポトーシスが細胞除去とそれに引き続く形態形成にはたす役割を明らかにするため、哺乳類神経管閉鎖時の正中線接着部で起こるアポトーシスに注目した。脊椎動物の脳や脊髄の元となる神経管の形成過程において、神経上皮だけでなく正中線接着部で多量のアポトーシスが起こることが知られている(図1)。このアポトーシスは、左右神経板の接着・融合及びそれに続く表皮からの神経管の分離に必要と考えられてきた。しかしながら、実際にアポトーシスが正中線接着部でどのように働くのかは不明であった。そこで当研究室で確立されたマウス胚神経管閉鎖の生体イメージングシステムを用いて、正中線接着部でのアポトーシスが果たす役割についてその解明に取り組んだ。

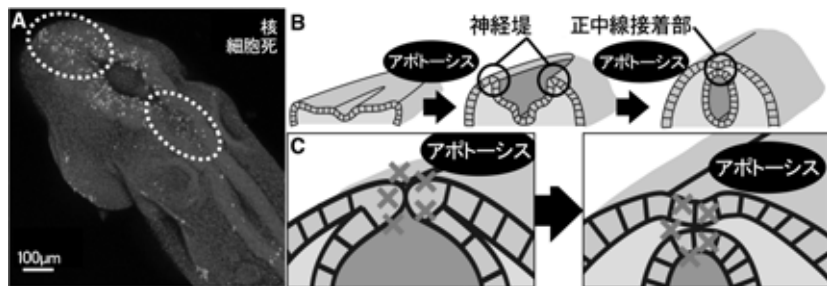


図1 哺乳類神経管閉鎖の正中線接着部と接着部におけるアポトーシス (A)E9.0マウス胚の後脳神経管領域におけるTUNEL染色像。未閉鎖領域のみならず閉鎖完了領域でもTUNELシグナルが観察される(点線の楕円で囲まれた領域)。(B)哺乳類神経管閉鎖の進行する様子のモデル図。(C)正中線接着部の拡大図。神経板が接触・融合する部位でアポトーシスが観察される(×マーク)。

【実験と結果】

① 後脳神経管閉鎖の完了及びそこでのアポトーシスの高解像度イメージング系を確立した。

哺乳類神経管閉鎖完了前後で細胞がどのような挙動を示し、アポトーシスがいかなる影響を与えるのか解明するために、1細胞を判別できる高解像度での生体イメージングを試みた。これまでに当研究室で確立されたマウス胚神経管閉鎖の生体イメージングシステムは、組織の動きや後脳領域を広範囲で観察することに適していたが(Y. Yamaguchi & N. Shinotsuka *et al.*, JCB, 2011)、レンズ性能の限界により個々の細胞の挙動を詳細に観察するのは困難であった。そこで、空間分解能が高かつ作動距離の長い水浸 25 倍レンズを用いこの点の改善を試みた。全身性に核をEGFP で標識したトランスジェニックマウスを用い観察を行なったところ、後脳神経管において前方及び後方から神経管閉鎖が進行し、第2/3菱脳付近で神経孔が閉じ切る過程での単一細胞動態が可視化された。更に断面図を作製し神経管閉鎖の様子を観察したところ、神経堤の接着において表皮が接着した後にその下の神経上皮が接着する様子、さらに神経堤が接着した後に神経管内腔の拡大に伴い蓋板(roof plate)が薄くなって行く様子が観察された(図2A、B)。この時、アポトーシスの特徴である核の凝集や断片化の様子が表皮や神経上皮、間充織で観察された(図2C)。

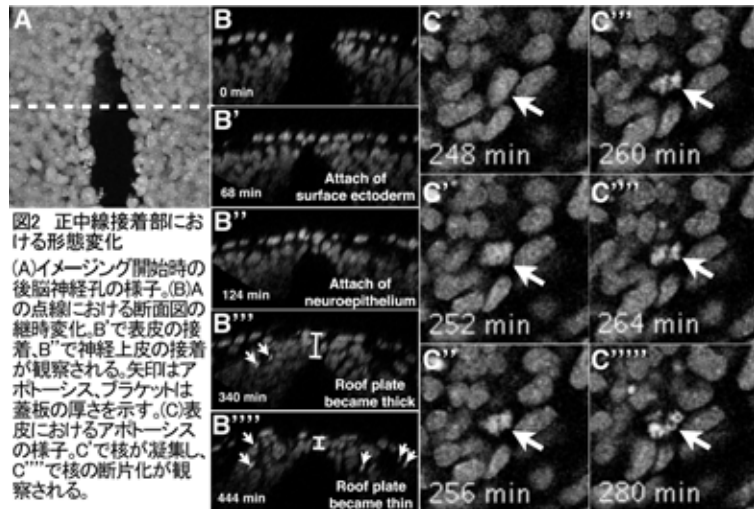


図2 正中線接着部における形態変化
(A)イメージング開始時の後脳神経孔の様子。(B)Aの点線における断面図の経時変化。B'で表皮の接着、B''で神経上皮の接着が観察される。矢印はアポトーシス、プラケットは蓋板の厚さを示す。(C)表皮におけるアポトーシスの様子。C'で核が凝集し、C''で核の断片化が観察される。

② 後脳神経管閉鎖の完了後、正中線上の細胞は神経管閉鎖完了地点から後方へ移動する。

この系を用いて、神経管閉鎖完了前後の神経堤にいる細胞の動きを追跡したところ、興味深い運動が観察された。神経堤の細胞は、前後の隣り合う細胞と位置関係を保存しながら向かい合う神経堤の細胞と接着し、正中線上に位置した。その後、神経孔が消失すると、これら正中線上の細胞は閉鎖完了地点から遠ざかるように後方へと移動する様子が観察された(図3A)。何れもイ

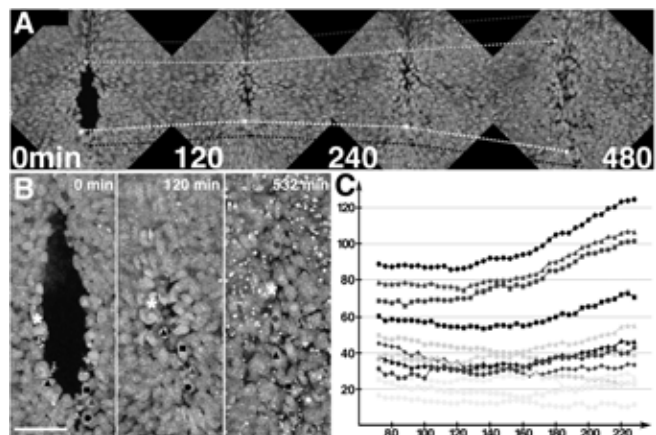


図3 神経堤の細胞は神経管閉鎖完了後、後退運動を示した。
(A)正中線上の細胞の閉鎖完了前後における位置の変化を示す。点線はそれぞれ各時間における同一細胞をつないでいる。(B、C)神経堤の細胞を追跡し、基準の細胞(*)からの距離の時間変化を表した。完了地点から遠い細胞(●等)ほどより遠くへ後退する様子が観察された。x軸:時間(分)、y軸:細胞間距離(μm)、スケールバー:50μm

イメージング時間によらず、神経孔の消失後から後方への移動が開始していたことから、この移動は閉鎖完了を引き金として起きていると推測される。このような細胞の動きは生体イメージングをすることで初めて得られた知見である。以後、こうした細胞の動きを『後退運動』と呼ぶこととする。

イメージングデータより後退運動は閉鎖完了地点から遠い細胞程大きいように感じられた。そこで、細胞の位置と後退運動との相関を調べた。閉鎖完了地点に存在し神経管閉鎖完了前後で殆ど移動しない細胞を基準の細胞とし、基準の細胞から神経堤上の各細胞までの距離の時間変化を測定した。また、得られた各細胞の距離の時間変化から、神経堤の細胞同士が最も近接する時間を神経管閉鎖が完了した時間と定義した。以上を用いて、各細胞の移動度を閉鎖完了時と一定時間後の2点間における短時間移動距離として算出し、これを閉鎖完了から一定時間前での各細胞の基準の細胞からの位置に対してプロットした。この結果、閉鎖完了地点に近い細胞は殆ど移動せず、閉鎖完了地点から遠い細胞程大きな移動度を示す傾向が得られた(図3B、C、図5A)。

③ 後脳神経管閉鎖完了後に起こる後方運動は、カスパーゼ阻害下で抑制される。

ではアポトーシス阻害下において、神経管閉鎖完了後に起こる後退運動はどのように変化するのか？汎カスパーゼ阻害剤であるzVAD-fmkを用いてカスパーゼ活性及びアポトーシスを抑制し、生体イメージングを行った結果、正常胚でみられた後退運動が抑制される傾向が観察された(図4)。

そこで前述と同様、細胞の移動度について細胞を追跡し、詳細に調べた。その結果、アポトーシス抑制下では神経管閉鎖完了地点からの各細胞の位置によらず、移動度が小さく抑えられることが明らかとなった(図5A)。同様に、各細胞の基準の細胞からの距離の時間変化を2次関数で近似し、その係数を比較することで細胞移動の程度を評価したところ、正常胚に比べてzVAD-fmk処理胚では細胞の移動が有意に低下することが明らかとなった(図5B)。以上の結果から、神経管閉鎖完了後の後退運動は、アポトーシスあるいはカスパーゼ活性化依存的に起きている可能性が示唆された。

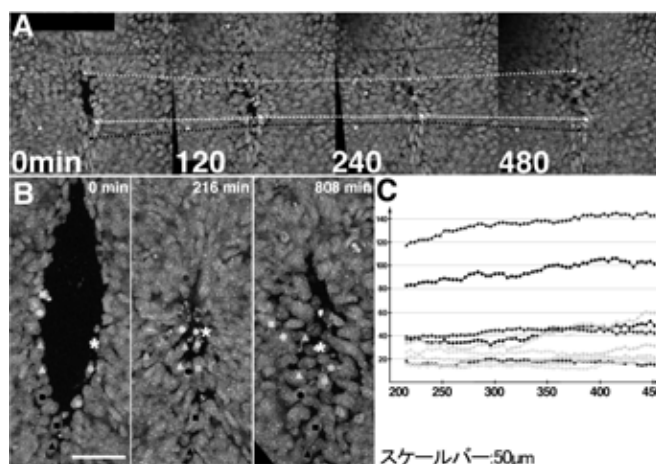


図4 アポトーシス阻害下で閉鎖完了後の後退運動は抑制された。(A)200 μ MzVAD-fmk下でイメージングした際の正中線上の細胞の閉鎖完了前後における位置の変化を示す。点線はそれぞれ各時間における同一細胞をつなぐ。(B、C)神経堤の細胞の、基準の細胞(*)からの距離を測定し時間変化を表した。完了地点から遠い細胞(▲等)も殆ど移動していない。x軸時間(分)、y軸細胞間距離(μ m)

④ 後脳神経管閉鎖完了後に起こる後退運動は、MMP阻害下で抑制される。

では、なぜアポトーシス阻害下で細胞の後退運動が抑制されるのか。ここで私達はマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)に着目した。細胞外基質分解酵素であるMMPは、マウス口蓋形成時のアポトーシスにより活性化が誘導されると考えられている。また神経冠細胞では細胞外基質の分解により細胞遊走性を高めることが知られている。そこで、後退運動に対するMMPの関与を明らかにするため、汎MMP阻害剤であるGM6001を用いて生体イメージングを行ったところ、神経管閉鎖完了後の後退運動が抑制される傾向が見られた。そこで先と同様に、神経堤の細胞を追跡

し移動の程度を正常胚及びzVAD-fmk 胚と比較した。その結果、MMP 阻害時もアポトーシス阻害時と同様、有意に細胞の動きが低下することが明らかとなった(図5B)。以上の結果から、神経管閉鎖完了後の細胞の後退運動に対して MMP の活性化の寄与が示唆された。

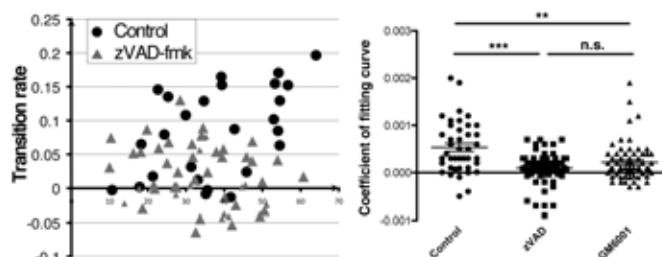


図5 アポトーシス及びMMP阻害下で後退運動は抑制された (A)正常胚とzVAD-fmk処理胚の各細胞の移動度 $L_{96}-L_{99}/T$ を示す。Control n=2, zVAD: n=3, x軸 L_{96} (μm), y軸:移動度($\mu\text{m}/\text{min}$) (B)細胞間距離の時間変化を二次関数で近似したときの、 X^2 の係数を、3群間で比較した。

【まとめと考察】

本研究から、神経管閉鎖完了後のマウス胚において、神経堤の細胞が閉鎖完了地点から後方へと移動することが明らかとなった。また、この後退運動は、アポトーシス又は MMP の活性化の阻害により抑制されることが確認された。このことから、後退運動へのアポトーシス及び MMP の関与が示唆された。

では両者はどのように後退運動に寄与しているのか？哺乳類口蓋形成では、左右口蓋の接触部でおこるアポトーシスが不要な細胞の除去のみでなく基底膜の分解酵素である MMP の活性化誘導を担い、組織の円滑な接着・融合に寄与することが報告されている。このことから、神経管閉鎖時にも同様のメカニズムが働いているのではないかと考えられる。実際、定量 PCR やマイクロアレイにより E9.0 日胚での MMP の発現を調べたところ、基底膜構成因子である IV 型コラーゲンを主な基質とする MMP2、9 が発現していることが確認された。また、組織免疫染色により、特定の細胞種で MMP2、9 の発現誘導能が示されている twist の発現が、神経管閉鎖完了前の神経堤や閉鎖後の蓋板で確認されている。以上の事実から、MMP を介したアポトーシスの後退運動への寄与が考えられる。

では正中線接着部でのアポトーシスと後退運動の生理的意義は何か？1つの可能性は、神経管閉鎖後の正中線における組織リモデリングとその後の脳室拡大の円滑な進行への寄与である。というのも、イメージングデータから後退運動に伴い表皮細胞の核が扁平に拡大する様子や神経管閉鎖後、神経管の管腔が拡大する様子が観察されている。またアポトーシス減少を示す *apaf-1* 変異体では、神経管閉鎖が完了したにも関わらず脳室が拡大しない個体が観察されている。さらに正常発生における正中線接着部では、左右の神経堤の表皮と神経上皮はそれぞれ接着するが、この時、リモデリングされる基底膜は MMP の基質の1つである。以上の事実から、神経管閉鎖後のアポトーシス及び後方運動の組織リモデリングと脳室拡大への寄与が予想される。以上を解明することで、アポトーシスが関わる形態形成における組織リモデリングの分子機構解明が期待される。

参考文献

Yamaguchi Y, Shinotsuka N, Nonomura K, Takemoto K, Kuida K, Yoshida H, Miura M, J Cell Biol, 195:1047-60, 2011