

審査の結果の要旨

氏名 篠塚 直美

アポトーシスは生体内において、形態形成や恒常性の維持など、様々な場面において観察される。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。脊椎動物の脳や脊髄の元となる組織である神経管はその形成過程において神経上皮や正中線接着部など、様々な部位で多量のアポトーシスが起ることが知られている。特に、神経管閉鎖完了後の正中線接着部で観察されるアポトーシスは、観察される部位の特異性から、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という、一連の組織リモデリング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。そこで本研究では、修士課程において確立し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細胞除去とそれに引き続く形態形成に果たす役割について、その解明に取り組んだ。

まず、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行った。これまでに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、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、空間分解能が高くかつ作動距離の長い水浸25倍レンズを用いこの点を克服した。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うことで、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。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。

つぎに、生体イメージングシステムを用いて、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。その結果、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。何れも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考えられた。そこで、今回初めて観察された細胞の動きを、『後退運動』と名付けた。後退運動による

細胞の移動距離について定量的な評価を行うため、神経管閉鎖完了前の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。

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。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。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。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。

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。この点を明らかにするため、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。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。

神経管閉鎖過程のアポトーシスに限らず、組織の形態形成過程では度々アポトーシスが観察されるが、その生理的意義は未だ不明な点が多い。しかしながら、本研究で得られた結果から、神経管閉鎖完了後の正中線接着部において、アポトーシスが組織のリモデリングに寄与しうる可能性が示唆された。また、その働きに **MMP** の活性の関与が示唆された。このことから、アポトーシスが細胞を除去するのみならず、他の分子と協調しながら組織の円滑な形態形成に寄与する可能性が示唆された。口蓋や腹膜、眼杯などもその形成過程で組織融合やそこでのアポトーシスが観察される事から、これらの現象でも同様にアポトーシスが寄与している可能性が考えられる。このことから本研究は、様々な形態形成過程におけるアポトーシスの役割を理解する上で重要な知見であると考えられる。

以上より、本研究は博士（薬学）の学位に値すると判定した。