

## 論文内容の要旨

### 論文題目

## アポトーシスによるほ乳類脳初期発生動態の制御

氏名 野々村 恵子

[序]

脳は、我々の生命活動や知的活動を支える器官であり、その機能は形態に深く結びついている。脳の形態が正常に形成されるためには、脳を構成する細胞が適切に増殖・分化・移動することが必要である。アポトーシスもこれらの細胞運命と同様に、脳の正常な形態形成にとって必須である。遺伝学的にアポトーシスを抑制した変異マウスでは、脳室が神経上皮に押しつぶされているような形態異常が観察されたことから、脳の形態形成におけるアポトーシスの役割は、神経上皮の細胞数の制限であると考えられてきた。しかしながら変異マウスの脳の形態は野生型と大きく異なるため、細胞数の変化を検討するためには、脳全体のサイズの変化を調べる必要があった。ところが、そのような解析はこれまで行われてこなかった。本研究では、脳の全領域の切片から脳の三次元構造を再構成する手法により、アポトーシスが抑制された変異マウスにおける神経上皮の肥大および他の形態異常についての検討を行うことで、脳の形態形成におけるアポトーシスの役割の解明を目指した。

[方法・結果]

## 1. *Apaf-1* 欠損胚の神経上皮は肥大していない

アポトーシスに必要なカスパーゼ活性化因子である *Apaf-1* の欠損胚では、胎生 10.5 日に脳室の狭小と神経上皮の変形・肥厚が認められる(図 1)。これらの形態異常は、神経上皮の肥大により脳室が圧搾されたものと解釈されてきた。しかし、*Apaf-1* 欠損胚の神経上皮は変形しているので、その肥大を検討するためには実際に面積を測定する必要がある。そこで、*Apaf-1* 欠損胚の神経上皮の面積を、胎生 10.5 日の前脳的全領域の切片において測定し、正常胚(ヘテロ変異体)と比較した。その結果、驚いたことに、*Apaf-1* 欠損胚

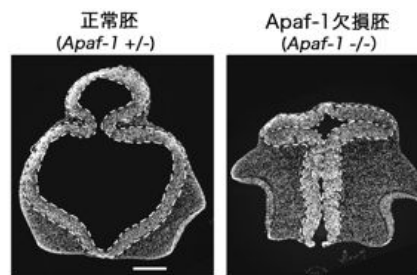


図1. 前脳の間中点における切片像(胎生10.5日)  
(神経上皮を点線で囲ってある)

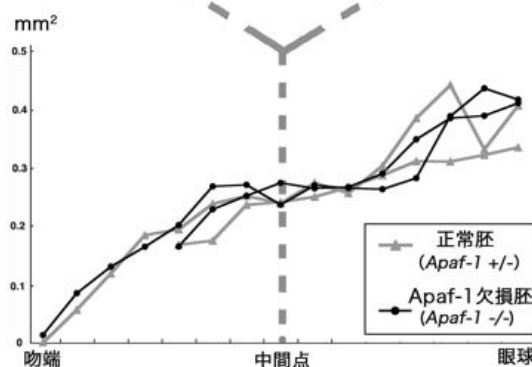


図2. 前脳の各切片における神経上皮の面積(胎生10.5日)

の神経上皮は大きく変形しているにも関わらず、各切片における神経上皮の面積は、正常胚とほとんど差がないことが明らかとなった(図 2)。この傾向は胎生 9.5 日でも同様であった。細胞数の変化について検討するためには、神経上皮の面積に加え細胞密度を測定する必要がある。そこで、*Apaf-1* 欠損胚の神経上皮の細胞密度を、胎生 10.5 日のいくつかの領域において測定し、正常胚と比較したが、変化は認められなかった。これらの結果は、胎生 10.5 日 *Apaf-1* 欠損胚の神経上皮の細胞数は増加しておらず、正常であることを示唆する。

## 2. *Apaf-1* 変異胚では、脳室の拡大が不全である

胎生 10.5 日 *Apaf-1* 欠損胚では、神経上皮は肥大していなかったにも関わらず、脳室は顕著に小さかった。この結果は、脳室の狭小は、肥大した神経上皮に押しつぶされることにより形成されたのではないことを示唆する。*Apaf-1* 欠損胚において脳室の狭小がもたらされる過程を明らかにするために、

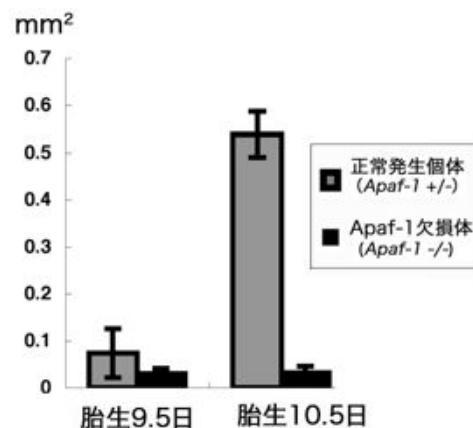


図3. 前脳の間中点の切片における脳室の面積の比較

脳室の面積を、胎生 9.5、10.5 日の前脳的全領域の切片上で測定した。その結果、*Apaf-1* 欠損胚の脳室の面積は、胎生 10.5 日では前脳的全領域において正常胚に比べ顕著に小さかったが、胎生 9.5 日では、正常胚とあまり変わらないことが明らかとなった。さらに、前脳の間接点に位置する切片において、脳室の面積を両遺伝型で比較したところ、胎生 10.5 日では顕著な差があるにも関わらず (各遺伝型  $n=4$ )、胎生 9.5 日では有意な差が認められない (各遺伝型  $n=5$ ) ことが判明した (図 3)。正常胚の脳室は胎生 9.5 日から 10.5 日の間に劇的に拡大していたことから、*Apaf-1* 欠損胚で認められる脳室の狭小は、胎生 9.5 日から 10.5 日の間に脳室が正常に拡大しないことに由来することが明らかとなった。

### 3. 脳室の拡大不全の原因として、神経管閉鎖異常が考えられる

それでは、なぜ *Apaf-1* 欠損胚では脳室が拡大しないのだろうか。正常胚では 9.5 日目までに神経管が完全に閉鎖し、それに引き続いて脳室の劇的な拡大が生じる。しかし *Apaf-1* 欠損胚では、胎生 9.5 日以降でも、神経管が閉鎖していない領域が残存していた。この未閉鎖領域から、脳髄液が体外へ

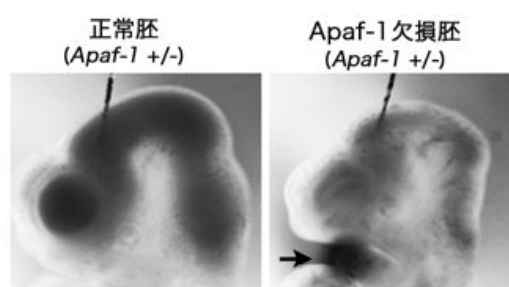


図4. 脳室への色素の注入 (胎生 10.5 日)

へと漏出するために、脳室が拡大しない可能性が考えられた。そこで、*Apaf-1* 欠損胚で実際に脳室内の液体が神経管の未閉鎖領域から体外へ漏出するかを確認するために、胎生 10.5 日の脳室に対し色素の注入を行った。注入された色素は、正常胚では脳室内へ留まったが、*Apaf-1* 欠損胚では神経管未閉鎖領域から体外へと漏出した (図 4)。このことから、*Apaf-1* 欠損胚では、神経管の未閉鎖領域の残存により、脳室内部に液体を貯留できないことが確認された。

### 4. アポトーシスは神経隆起の形態変化を引き起こすことで神経管の閉鎖完了に導く

*Apaf-1* 欠損あるいは *caspase-9* 欠損胚では正常胚で閉鎖が完了する胎生 9.5 日以降にも、神経管に未閉鎖領域が残存する (図 5)。アポトーシスが神経堤において胎生 8.5~9.5 日の閉鎖前後に多量に観察されることから、アポトーシスが神経管の閉鎖過程に関与する可能性が考えられた。アポトーシスの有無が神経管の閉鎖過程にどのように影響するのかを調べるために、組織形態の微細な変化を検出することができる生体イメージングを行った。正常胚では両側の神経堤が速やかに近づくことで神経孔が前後方向に細長くなり閉鎖がスムーズに進んだのに対し、*Apaf-1* 欠損胚では両側の神経堤は近

づかないため神経孔は丸くなり最終的に未閉鎖領域が残った(図. 5B)。また、閉鎖中の神経堤頂端部の組織の厚さは *Apaf-1* 欠損胚の方が正常胚に比べ厚かった(図. 5C)。これらの結果から、神経管の閉鎖過程で認められるアポトーシスは、頂端領域の組織形態の変化をもたらすことで神経管の円滑な閉鎖を可能にしていることが示唆された。

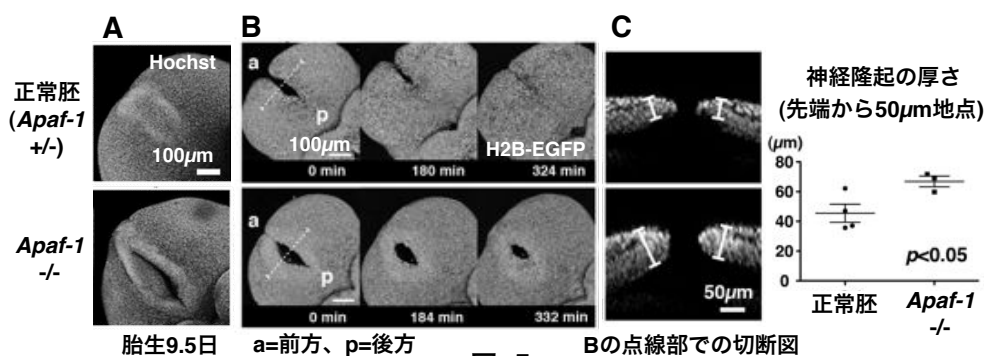


図. 5

#### [まとめと考察]

これまで、アポトーシスシグナル変異マウスでは、脳室が神経上皮に押しつぶされているような形態異常が認められることから、神経上皮が肥大している、あるいは、脳の細胞数が増加していると言われてきた。しかしながら、今回の解析により、神経上皮と脳室の形態異常が認められても、神経上皮は肥大しておらず、同時に、細胞密度にも変化が認められないことから、これらの変異マウスの脳において細胞数が増加している可能性は低いことが判明した。

さらに、*Apaf-1* 欠損胚では胎生 9.5 日から 10.5 日の間に拡大すべき脳室が、ほとんど拡大していないことが明らかとなった。この脳室の拡大不全の原因として、神経管閉鎖異常による脳髄液の脳室内貯留不足が考えられる。この考えは、*Apaf-1* 欠損胚では脳室内に注入した液体が神経管の未閉鎖領域から漏出することと、発生過程の脳室に外科的に穴をあけた場合には、脳室の拡大不全が認められることが知られていることから支持される。

本研究は神経管閉鎖の際の神経堤頂端の組織形態変化もアポトーシスにより調節されていることも示した。神経管閉鎖時に神経堤の形態をすばやく変化させることは、閉鎖にとって重要であると考えられ、細胞を組織から素早く除去するシステムであるアポトーシスにより制御されることは理にかなっている。