

〔別紙2〕

審査の結果の要旨

氏名 野々村 恵子

アポトーシスは発生過程初期の脳において神経上皮で散発的に観察されるのに加え、前方神経隆起 (Anterior Neural Ridge; ANR) など特定の領域で特定の時期に大量に観察される。前者のアポトーシスは神経前駆細胞の数を制限することで脳の全体細胞数を調節すると考えられてきたが、ANR で認められる大量のアポトーシスの役割は未だ不明である。ANR は神経板の最も前端に位置し、神経板が神経管へと変化する際に左右の近接・閉鎖というダイナミックな形態変化が起こるとともに、拡散性形態形成因子 (モルフォゲン: 形原) を産生することで広範囲の神経前駆細胞の生存と領域化を制御するオーガナイジングセンターとしての役割を持つ。こうしたオーガナイジングセンターの空間位置あるいはサイズ制御の機構を解明することは、組織化の連続により達成される脳の発生を理解する上で重要である。そこで、本研究では ANR に起こるアポトーシスの役割の解明を目指した。

まず、アポトーシスが ANR 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 ANR の閉鎖過程に関与する可能性が考えられた。実際に、*apaf-1* $-/-$ あるいは *caspase-9* $-/-$ 胚では正常胚で閉鎖が完了する胎生 9.5 日以降にも、ANR に未閉鎖領域が残存することが確認された。アポトーシスの有無が ANR 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 ANR 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* $-/-$ 胚では両側の ANR 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。また、閉鎖中の ANR 頂端部の組織の厚さは *apaf-1* $-/-$ 胚の方が正常胚に比べ厚かった。これらの結果から、ANR 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 ANR の円滑な閉鎖を可能にしていることが示唆された。

それでは、ANR に未閉鎖領域が残存することは、脳全体の形態にどのような影響を及ぼすのだろうか。正常胚では、神経上皮の内腔である脳室は脳脊髄液で満たされており、その圧力により脳室が拡大し神経上皮が正常な形態をとることが示されている。アポトーシス欠損胚では、神経管の未閉鎖領域から脳脊髄液が体外へと漏出することで、脳室の拡大に異常が出る事が予想された。そこで、胎生 9.5、10.5 日胚において頭部連続切片上で脳室断面積を測定したところ、正常胚ではこの間に脳室が劇的に拡大していたのに対し、*apaf-1* $-/-$ 胚ではほとんど拡大せず脳室の狭小が生じることが分かった。これまで、アポトーシス欠損胚に認められる脳室の狭小は、神経上皮の細胞数過剰により引き起こされると考えられてきたが、脳室の狭小が生

じている欠損胚の脳細胞数を定量的形態解析および実際の細胞数のカウントにより調べたところ、正常胚に比べ有意な増加は認められなかった。これらの事実は、アポトーシス欠損マウスでは神経前駆細胞の過剰は生じておらず、神経管閉鎖異常に起因する脳室拡大の不全が脳全体の形態異常の主たる原因であることを示唆する。

また大量のアポトーシスは、ANR の癒合により生じる前脳正中線周辺の広い領域でも観察される。これらの領域は *Fgf8* や *Shh* などの形原を産生し、拡散した形原の濃度勾配に応じて神経上皮細胞を異なる種類の神経前駆細胞へと分化させており、脳の領域化における中心的役割を果たしている。そこで、アポトーシスがこれら領域のオーガナイジングセンターとしての役割に影響する可能性を検討するために、これらの領域で産生される形原の発現パターンをアポトーシス欠損胚と正常胚で比較した。その結果、前脳腹側で発現する *Fgf8* mRNA が胎生 10.5 日のアポトーシス欠損胚で正常胚に比べ後方まで認められた。一方、胎生 9.25 日ではアポトーシス欠損胚、正常胚ともに *Fgf8* mRNA は前脳後方まで発現しており差は認められなかった。これらの結果は、アポトーシスが胎生 9.25-10.5 日の間に *Fgf8* 産生細胞を前脳の後方から除去していることを示唆する。それでは、*Fgf8* 産生領域が脳の後方に残存することは、神経上皮の領域化異常を引き起こすのだろうか。まず、FGF8 タンパク質の分布を調べたところ、*apaf-1*^{-/-}胚では正常胚にくらべ後方の腹側神経上皮に FGF8 タンパク質が拡散していることが確認された。これと一致して、*Fgf8* の増加によって発現が抑制されることが知られる前脳腹側神経前駆細胞マーカー *Nkx2.1* の発現が、胎生 10.5 日 *apaf-1*^{-/-}胚では正常胚に比べ減少していた。以上の結果は、アポトーシスによる *Fgf8* 産生細胞の前脳後方からの除去は、FGF8 タンパク質の拡散を介した神経上皮の正常な領域化に重要であることを示唆する。

アポトーシスは発生において、組織にとって不要な細胞や異常をきたした細胞を除去するのみであり、器官形成への積極的な寄与はないと捉えられることが多い。脳初期発生過程についても、アポトーシスの役割はこれまで、散発的に神経前駆細胞を間引くことでその数を制限することであると考えられてきた。しかしながら本研究で得られた結果から、脳初期発生過程においてアポトーシスは、神経管閉鎖時の組織形態変化や形原産生領域の位置調節という脳の中でも局所で生じる変化を正確に引き起こすことで、脳全体の発生を正常に進めるための原動力として働いていることが示された。特に、形原の産生は多くの発生現象だけでなく、成体神経新生や創傷治癒、腫瘍形成の際にも重要であることから、これらの現象においても産生細胞集団のサイズがアポトーシスにより調節されている可能性が考えられる。本研究の成果は、局所のアポトーシスが拡散性因子産生細胞の除去を介して器官全体の制御を行いうることを示すものであり、他の様々な器官や個体におけるアポトーシスの役割を理解する上でも重要な知見である。以上より、本研究は博士（薬学）の学位に値すると判定した。