

## 論文の内容の要旨

### 論文題目 マウス神経発生後期におけるカスパーゼ活性の 生後脳発達への寄与の解明

氏名 吉田 綾子

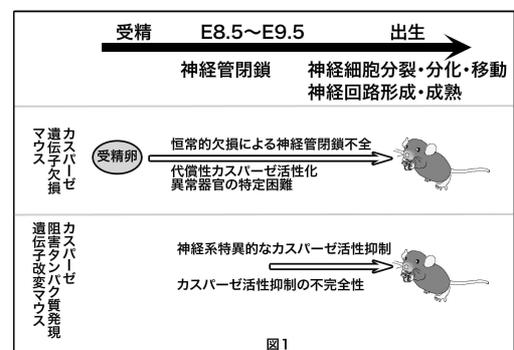
#### 【序】

アポトーシスは、無脊椎動物からほ乳類動物まで、発生中に様々な器官で多く見られる細胞死の主要な様式である。アポトーシス実行因子カスパーゼの活性制御因子 *Apaf-1* や *Caspase-9* 欠損個体はアポトーシス不全になり、神経管閉鎖不全などの重篤な神経発生異常を来す。これらの知見から、アポトーシスは神経管閉鎖以前の神経発生初期に重要な役割を果たすことが示唆されていた。しかし、胎生後期から生後(神経発生後期)にも神経系では多くのアポトーシスが起きるにも関わらず、その意義はこれまで殆ど明らかにされていない。恒常的に全身でカスパーゼが欠損したマウスでは、神経発生後期以降に神経系での異常が見られたとしても、カスパーゼ活性が重要な鍵となる時期や部位の特定が困難であった。また、単一カスパーゼ遺伝子欠損時には、類似機能を持つ他のカスパーゼが補償的に活性化することも報告されており、アポトーシスが十分に阻害されていない可能性がある(図 1)。そこで私は、カスパーゼ阻害タンパク質を神経系特異的かつ神経管閉鎖後の時期特異的に発現させることにより、広範なスペクトラムのカスパーゼを阻害し、カスパーゼ活性の神経発生後期での意義を明らかにすることを目的とした。

#### 【方法と結果】

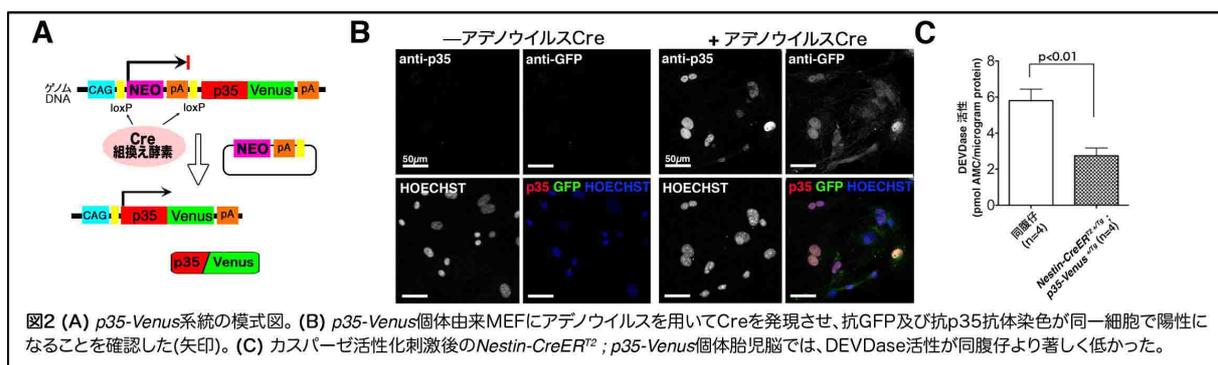
##### < *p35-Venus* マウスを用いた実験系の構築 >

カスパーゼ阻害タンパク質の中枢神経系特異的発現系として、私は当研究室で新たに作



出した *p35-Venus* マウスを用いた (図 2, A)。p35-Venus は、バキュロウイルス由来のカスパーゼ活性阻害因子 p35 タンパク質と蛍光蛋白質 Venus との融合タンパク質である。このマウスでは、p35-Venus 発現制御に *Cre-loxP* システムを利用しており、組換え酵素 Cre が発現した細胞およびその子孫細胞のみで p35-Venus タンパク質が発現する。従って、任意の時期・組織で Cre を発現するマウス系統と *p35-Venus* マウスを掛け合わせるにより、任意の時期・器官で p35-Venus を発現させることができる。さらにその発現部位は Venus の蛍光により容易に可視化される。

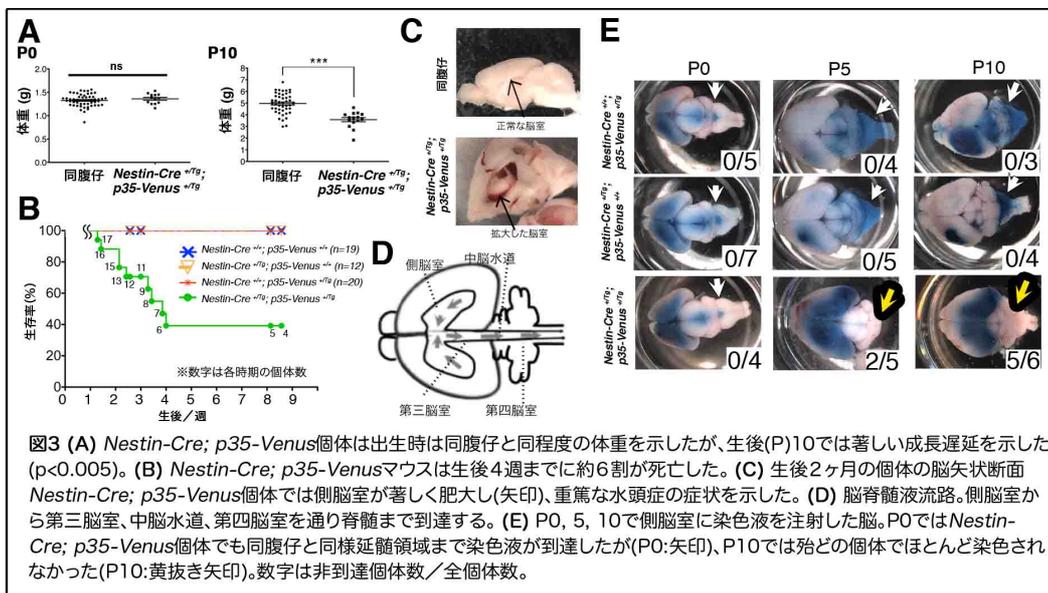
まず私は *p35-Venus* マウスの評価を行った。*p35-Venus* 個体から作成した胎児繊維芽細胞 (MEF) に Cre 発現型アデノウイルスを感染させたところ、Cre タンパク質存在下でのみ、p35-Venus の発現が認められた (図 2, B)。また、生体内での p35-Venus の発現は以下のような方法で確認した。Cre の組換え活性を Tamoxifen により誘導できる *CreER<sup>T2</sup>* を神経幹細胞特異的に発現する *Nestin-CreER<sup>T2</sup>* 系統マウスから *Nestin-CreER<sup>T2</sup>; p35-Venus* マウスを作成した。その雄個体と交配した野生型雌個体の妊娠期胎生 (E)10.5 日に Tamoxifen を投与して胎児脳での p35-Venus 発現を解析したところ、*Nestin-CreER<sup>T2</sup>; p35-Venus* 胎児でのみ p35-Venus の発現が認められた。これらの結果から、p35-Venus を Cre 依存的に発現するマウス系統が作出出来たことが確認された。次に、生体内での p35-Venus の発現が本当にカスパーゼ活性を抑制するかを調べるため、DNA 障害性薬剤である AraC を用いて、神経幹細胞にアポトーシスを誘導した際の脳でのカスパーゼ活性を測定した。既述の実験と同様に、*Nestin-CreER<sup>T2</sup>; p35-Venus* 雄個体と交配した野生型雌個体の胎児に E10.5 から p35-Venus を発現させ、E14.5 で AraC を投与した。6 時間後に脳を摘出してタンパク質を抽出し、蛍光カスパーゼ基質と反応させてカスパーゼ活性を測定した。その結果、同腹仔の脳に比べて *Nestin-CreER<sup>T2</sup>; p35-Venus* 個体の脳ではカスパーゼ活性が有意に抑制されていた (図 2, C:  $p < 0.01$ )。従って、p35-Venus 発現により生体内のカスパーゼ活性が抑制できることが示唆された。



### < 神経発生後期のカスパーゼ活性は脳の生後発達に重要である >

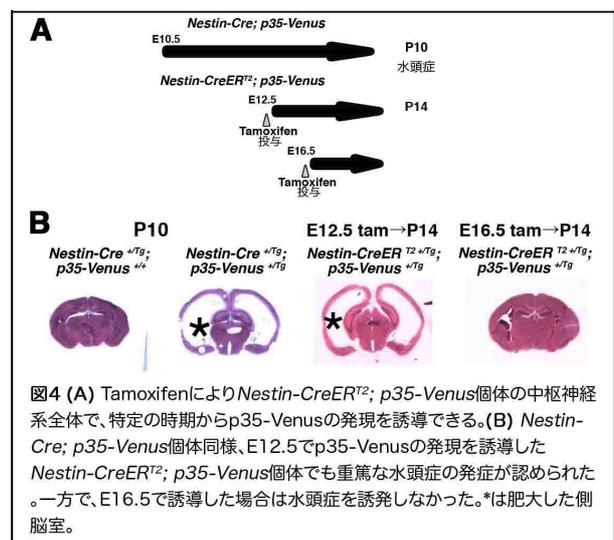
次に私は、カスパーゼが神経管閉鎖以降の正常な神経発生にどのような役割を果たすのかを明らかにするため、神経発生後期以降に脳全体で p35-Venus を発現するマウス系統 (*Nestin-Cre; p35-Venus*) を解析した。*Nestin-Cre; p35-Venus* 個体はほぼメンデル比に従

って出生したが、生後に同腹仔に比べて著しく低体重を示し(図 3, A)、多くが生後(P) 1 週間~2ヶ月で死亡した(図 3, B)。そこで、*Nestin-Cre; p35-Venus* 個体の脳を観察したところ、その多くが水頭症の症状を示した(図 3, C)。水頭症は脳の発生・発達障害の一つで、脳内の空洞部位(脳室)を満たす脳脊髄液が何らかの理由で滞留し、亢進した脳圧により脳室拡大と様々な部位の萎縮が引き起こされた状態である(図 3, D)。*Nestin-Cre; p35-Venus* 個体での水頭症の発症時期を特定するため、新生児個体の側脳室に注入した染色液が延髄領域まで到達するかを調べた(図 3, E)。その結果、P0 では *Nestin-Cre; p35-Venus* マウスでもコントロール個体と同様、脳の後部まで染色液が到達していたが、P10 では多くの *Nestin-Cre; p35-Venus* 個体で到達しなかった。従って、*Nestin-Cre; p35-Venus* マウスでは、生後 0 日から 10 日の間に脳脊髄液の攪乱が生じ、これが重篤な水頭症を誘発することが示唆された。



### < E12.5 以降の神経系での p35-Venus 発現が水頭症を引き起こす >

*Apaf-1* の変異体や、*Caspase-9* 欠損個体のうち、何らかの理由で胎生致死を免れた個体(サバイバー)の一部は生後水頭症を発症することが知られている。しかし、この水頭症の原因が神経管閉鎖異常に起因するか否かは不明である。*Nestin-Cre* 系統は E9.5 から Cre 組換え酵素を発現し、神経管閉鎖終了前には殆ど組み換えが起きないと考えられたが、実際には *Nestin-Cre; p35-Venus* マウスでも、神経管閉鎖終了直前に一部の細胞で p35-Venus を発現していた。従って、*Nestin-Cre; p35-Venus* マウスの水頭症発症の原因が、中枢神経発生のど



の時期の p35-Venus の発現であるかは不明であった。そこで、神経管閉鎖終了後十分時間が経過した E12.5 から中枢神経系で p35-Venus 発現を誘導し、水頭症を発症するか否かを調べた。このため、*Nestin-CreER<sup>T2</sup>; p35-Venus* 雄個体と交配した野生型雌個体に E12.5 で Tamoxifen を投与し、生後の水頭症発症率を調べた(図 4, A)。その結果、Tamoxifen を投与された *Nestin-CreER<sup>T2</sup>; p35-Venus* 個体の多くが水頭症を発症した(図 4, B: n=5/6)。従って、*Nestin-Cre; p35-Venus* 個体が水頭症になる原因は神経管閉鎖の異常ではないことが示唆された。一方、E16.5 で Tamoxifen を投与した場合は *Nestin-CreER<sup>T2</sup>; p35-Venus* 個体は水頭症を発症しなかった(図 4, B: n=0/5)。ゆえに、E12.5 から E16.5 の間に神経幹細胞から産まれる細胞での p35-Venus 発現が水頭症を誘発することが示唆された。

### 【まとめと考察】

本研究において私は、まず p35-Venus により生体内でのカスパーゼ活性が抑制され得ることを示した。次に、神経発生後期に神経系全体で p35-Venus を発現する *Nestin-Cre; p35-Venus* マウスは、その多くが出生後数日のうちに脳脊髄液の流れが攪乱され、重篤な水頭症を発症することを明らかにした。更に、この水頭症の発症には、E12.5 以降に神経幹細胞から生じる細胞でのカスパーゼ抑制が関与することも明らかにした。これらの結果は、脳の正常な生後発達には、神経管閉鎖後の脳神経細胞系譜でのカスパーゼ活性が重要であることを示唆している。故に、既に知られていた神経管閉鎖における機能とは別に、カスパーゼ活性には、神経系細胞の分裂・分化や回路形成といった中枢神経系の発生過程、あるいは脳全体の恒常性の維持等に重要な役割を果たす可能性がある。

本研究において、これまでの結果からは、どの細胞種の p35-Venus 発現が水頭症を誘発するかまでは明らかに出来ていない。しかし、*Nestin-CreER<sup>T2</sup>; p35-Venus* マウスや *CAG-CreER<sup>T2</sup>; p35-Venus* マウスを用いて p35-Venus 発現時期を操作すれば、カスパーゼ活性の抑制が水頭症を引き起こす臨界期を明らかに出来ると考えられる。臨界期から、水頭症の原因となる細胞種を推察することが可能である。今後、この細胞種特異的 Cre 系統や、子宮内電気穿孔法等を利用して特定の領域/細胞種に p35-Venus を発現させることで、神経発生後期の p35-Venus 発現が水頭症を誘発する原因を明らかにすることが出来ると考えられる。

ヒトでは、現在のところ水頭症の発症メカニズムは殆どわかっていない。本研究で得られたアポトーシス及びカスパーゼ活性制御が水頭症発症に関与するという知見は、水頭症の予防や新たな治療法の手がかりとなることが期待される。