

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 吉田 綾子

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* 欠損個体が神経管閉鎖不全などの重篤な神経発生異常を来すことから、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。そこで本研究は、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。

本研究においてはカスパーゼ阻害タンパク質の中樞神経系特異的発現系として、当研究室で新たに作出した *p35-Venus* マウスを用いた。*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、任意の時期・組織で *Cre* を発現するマウス系統を用いることで、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。本研究では始めに *p35-Venus* マウスの評価を行った。まず、生体内での *p35-Venus* の発現を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^{T2}* を神経幹細胞特異的に発現する *Nestin-CreER^{T2}* 系統マウスから *Nestin-CreER^{T2} ; p35-Venus* マウスを作出した。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^{T2} ; p35-Venus* 胎児でのみ *p35-Venus* の発現が認められた。従って、*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、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^{T2} ; 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 DNA 障害薬剤 *AraC* を投与した。脳から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^{T2} ; 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 ($p < 0.01$)。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。

本研究では次に、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、多くが生後 (P) 1 週間～2 ヶ月で死亡した。このマウスは多くが水頭症の症状を示した。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。*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。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。

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-Cre^{ERT2}; 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。その結果、Tamoxifen を投与された *Nestin-Cre^{ERT2}; p35-Venus* 個体の多くが水頭症を発症した (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-Cre^{ERT2}; p35-Venus* 個体は水頭症を発症しなかった (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。

既存の研究では、神経管閉鎖より前の脳の発生過程においてアポトーシスが重要な役割を果たすことは知られていたが、その後のアポトーシスの意義は殆ど知られていなかった。本研究から、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が初めて示唆された。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。また、ヒトでは、現在のところ水頭症の発症メカニズムの解明はあまり進んでいない。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。以上より、本研究は博士 (薬学) の学位に値すると判定した。