2013年 9月] 781

哺乳類胚発生過程におけるアポトーシス動 態可視化〜神経管閉鎖過程を例として

1. はじめに:プログラム細胞死とアポトーシス

多数の細胞からなる多細胞生物の体を維持するためには、細胞の増殖、分化、維持、そして死が協調して制御される必要がある。この協調の破綻は、さまざまな病態そして最終的には個体死という帰結に至る。「細胞の死」の仕組みを知ることは、ヒトを含む多細胞生命体の生き死にを知る上でも有用と考えられる。

細胞の死は,一つの受精卵が増殖・分化し複雑な体を形 作っていく過程, すなわち発生過程からすでに生じてい る. これらの細胞死は遺伝的なプログラムに従っており, 特定の部位・時期に決まった様式で生じることから、プロ グラム細胞死と呼ばれる1. プログラム細胞死の様式にも 複数あることが古典的な電子顕微鏡観察から知られるが, その主要なものはアポトーシスと呼ばれる様式の細胞死で ある²⁾. アポトーシスは、核の収縮および核 DNA の断片 化,細胞質の断片化によるアポトーシス小体の生成,周辺 細胞による速やかな貪食、等を特徴とする。 アポトーシス の分子機構は, 生化学的解析や遺伝学的解析により過去 20年で大きく理解が進み、主要なアポトーシス実行経路 が解明された. さらに近年、アポトーシス以外の細胞死様 式の分子機構も明らかになりつつある. たとえば、アポ トーシス実行が遺伝的変異や阻害剤等により障害された場 合には、細胞内容物が漏出するネクローシス様の細胞死 (ネクロプトーシスと名付けられた) が生じることがわか り、その実行に関与するシグナル伝達経路も解明されつつ ある3. しかし、こうした多様な細胞死機構の生理的意義 は何なのか、実際の生体内でこうした多様な死細胞がどの ように生じ処理されるのか (死細胞動態) 等々, いまだ重 要な疑問が数多く残されている.以下,本稿では,最近私 たちが報告した, 胚発生期での死細胞動態可視化とその生 理的意義に関する研究を紹介する.

2. 神経管閉鎖過程のアポトーシス

私たちヒトを含む哺乳類の脳中枢神経系は、その発生初期に神経管閉鎖と呼ばれる過程を経る。この過程では、原始外胚葉から形成された神経板(神経上皮)がその正中線で折れ曲がり、さらにその両端(神経端)が頂端部で接触・

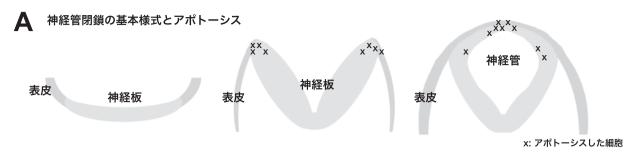
融合して神経管を形成する(図 1A). この基本様式は両生類以上の脊椎動物で共通であるが、哺乳類の神経管閉鎖過程はさらに複数の開始点を持つ. マウス胚の場合、神経端が最初に接触するのは頸部領域(図 1B:①)であり、そこから頭部と尾部の前後両方向に向けて、閉鎖が進行する(矢印). さらに数時間遅れて、前脳-中脳境界部(図 1B:②)および前脳最前端(図 1B:③)も独立に接触する.②から生じた閉鎖は①同様、前後両方向に向けて進行し、③から生じた閉鎖は後方に向けて進行する. これら独立に進行する閉鎖が出会うことで、頭部領域の閉鎖が完了する(図 1B)4.

この非常に動的な形態形成過程である神経管閉鎖は、当 然のことながら, 活発な細胞増殖, ならびに細胞配置・細 胞形態・細胞骨格の再編成等が協調して生じることで達成 される. これらに加え、細胞死、特にアポトーシス、が神 経管閉鎖過程で多数生じることも古くから報告されていた (図 1A). では神経管閉鎖にとってアポトーシスはどのよ うな役割を担うのだろう? 神経端で生じるアポトーシス は、内因性経路(ミトコンドリア経路)依存的アポトーシ スであることが知られる.というのも、これら内因性経路 の遂行に必須な遺伝子 (Caspase-3, Caspase-9, Apaf-1, など)を欠損した変異マウスでは、神経端でのアポトーシ スが消失するからである5.これらのマウスは、ある種の 遺伝的背景では脳実質が頭蓋から突出してしまう外脳症 や、脳室の狭小といった脳形態異常を示す、これらの形態 異常は、当初アポトーシス欠損により脳神経細胞数が過剰 に増加したためと解釈されてきた50.しかし、外脳症は神 経管閉鎖障害によっても生じうる. 実際, アポトーシス欠 損胚の一部では、外脳症のみならず尾部神経管閉鎖異常 (二分脊椎) も生じることが報告されていた。 これらの事 実から、アポトーシスは神経管閉鎖にとって重要であるこ とが示唆されたが、実際にアポトーシス欠損により神経管 閉鎖動態がどのように変化するのかは不明であった.

3. 神経管閉鎖動態にアポトーシス欠損が与える影響

上述の疑問に答えるためには、遺伝子欠損による最終的な帰結(神経管閉鎖異常)を見るだけでは不十分で、神経管閉鎖の動的なプロセスにどのような違いが生じるのかを観察しなければならないと考えられた。そこで私たちは、マウス胚頭部神経管閉鎖過程のライブイメージング観察系を立ち上げ、アポトーシス欠損胚(Apaf-1 ホモ変異体または Caspase-3 ホモ変異体)と野生型胚との神経管閉鎖ダイナミクスを解析した。その結果、アポトーシス欠損胚で

〔生化学 第85巻 第9号



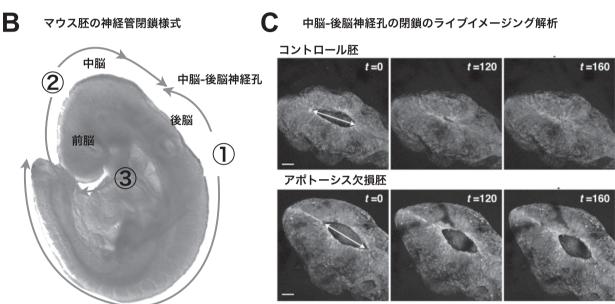


図1 神経管閉鎖過程におけるアポトーシス

- (A) 神経管閉鎖の基本様式とアポトーシス. (B) マウス胚の神経管閉鎖様式 (本文参照). (C) 中脳-後脳神経孔 (白矢
- 印) 閉鎖のライブイメージング. アポトーシス欠損胚で閉鎖が遅延する. t は時間 (分).

は、頸部から発した閉鎖と前脳-中脳境界部から発した閉鎖とが出会う中脳-後脳神経孔(図 1C)の神経管閉鎖速度が顕著に低下することが明らかになったⁿ. さらにライブイメージング観察から、この閉鎖速度の低下に先立つ時期の胚では、神経端領域の形態変化が円滑に進行しない様子が観察された. このように、内因性ミトコンドリア経路依存的アポトーシス実行因子欠損により、神経管閉鎖動態が顕著に変化することが明らかになった.

4. 頭部神経管閉鎖の発生時間枠モデル

ではこれらの頭部神経管閉鎖動態の変化が、外脳症などの神経管閉鎖障害につながるのだろうか.上述したように、哺乳類胚の神経管閉鎖は複数の領域から開始し、それらが出会うことで頭部から尾部まで一本の閉鎖した管を形

成する. 興味深いことに、アポトーシス変異体で閉鎖不全を生じる中脳-後脳領域は、頸部から発した閉鎖と前脳-中脳境界部から発した閉鎖とが最後に出会う部位、すなわち閉鎖の完了により形成される領域である. アポトーシス欠損により神経管閉鎖速度が低下したことから、閉鎖完了までにかかる時間もアポトーシス欠損胚では長くなると予想される. 実際、神経管閉鎖期の胚を解剖直後に固定し、その神経管閉鎖の進行度合いを体節数により発生ステージを合わせて詳細に評価したところ、アポトーシス欠損胚では中脳-後脳領域の神経管閉鎖の進行が顕著に遅れることも確認された".

こうしたアポトーシス欠損による神経管閉鎖の遅延が神経管閉鎖障害につながるのかは先の報告では検証できてないが、その検証のために私たちは以下のような「発生時間

2013年 9月] 783

枠モデル」を考えている^{4.7}. 頭部神経管閉鎖完了と時期を同じくして生じる現象として,脳室の拡大が知られる. これは,神経上皮および表皮の活発な増殖と細胞再配置と,神経管閉鎖完了による脳脊髄液の貯留により生じると考えられている. 脳室拡大は閉鎖運動とは方向性が逆になるため,神経管閉鎖運動に対しては拮抗的に働くはずである. したがって,もし神経管閉鎖がこの脳室拡大の開始時期までに完了しないと,神経管閉鎖運動は阻害され,結果としてもはや閉鎖を完了することができない,というのが発生時間枠モデルである. このモデルの具体的検証には,神経管閉鎖前後の脳室周囲の神経上皮細胞や表皮細胞の動き,力のかかり方の変化等の計測や,その人為的操作が必要である.

5. 死細胞動態の違いのライブイメージング

私たちの研究室では、アポトーシス時に生じる実行型カ スパーゼの活性化を生細胞で可視化できるプローブ SCAT3 (Sensor for Caspase-3 Activation based on FRET) を 開発し、哺乳類培養細胞やショウジョウバエ蛹胚における アポトーシス動態を明らかにしてきた 8^{-11} (図 1). 一方, SCAT3 を発現するトランスジェニックマウスは、通常の トランスジェニックマウス作製法では永らく作出できず, 哺乳類組織におけるアポトーシス動態はこれまで観察され ていなかった. 私たちは近年, インシュレーター配列を用 いることで、SCAT3を全身で恒常的に発現するトランス ジェニックマウスの樹立に成功した. これらのマウスと上 述の神経管閉鎖過程のライブイメージング解析を組み合わ せることで、神経管閉鎖過程におけるアポトーシス細胞動 態のライブイメージングを行った". その結果, この過程 におけるアポトーシス細胞の振る舞いには、少なくとも2 種類あることが判明した (図 2B).

一つめは、培養細胞系で観察されるような、細胞質の断片化を伴う典型的なアポトーシス細胞(ここでは C-type と呼ぶ)である。C-type は主に神経端付近の表皮領域で見られ、実行型カスパーゼ活性化により断片化した細胞質(アポトーシス小体)は速やかに消失する。おそらく、周辺細胞により速やかに貪食されると考えられる。一方、これとは異なる振る舞いとして、上皮層から飛び出たアポトーシス細胞が断片化を伴わずに丸くなり、そのまま周囲に留まる様子が観察され、長いものでは 3 時間以上留まっていた(これらを D-type と呼ぶ)。

興味深いことに、これら D-type と C-type は生じる部位 が異なっていた. D-type は閉鎖前の神経端の神経上皮側 で非常に多く観察されたのに対し、C-type は主に閉鎖した 正中線付近や表皮付近で観察された. さらにこれらの細胞 は、カスパーゼ活性化動態も異なっていた、SCAT3は励 起. 蛍光波長の異なる二つの蛍光タンパク質、ECFPと Venus が実行型カスパーゼ-3/7 の切断配列(DEVD)を含 むリンカーで結合された蛍光タンパク質であり、 未切断時 には ECFP 励起により ECFP から Venus へと FRET (蛍光 共鳴エネルギー転移)が生じている8.カスパーゼ活性化 によりリンカーが切断されると、FRETが解消する. この FRET 解消の程度を, ECFP 励起した際の Venus と ECFP の蛍光強度比(Venus/ECFP比)を取り測定することで、 カスパーゼ活性化の度合いを単一細胞レベルで計測でき る. 実際にこれらの細胞でカスパーゼ活性化のタイムコー スを測定したところ, C-type はカスパーゼ活性化から SCAT3 の完全切断に至る (Venus/ECFP 比が低下しプラ トーに達する点)までが平均8分程度で30分以内には細 胞が断片化し消失したのに対し、D-type では SCAT3 の完 全切断までが平均16分程度でありその後数時間は細胞塊 が残存した、このように、カスパーゼ活性化の程度と死細

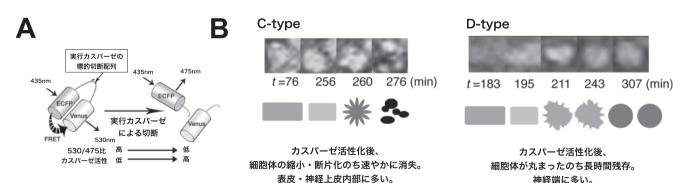


図 2 アポトーシス実行因子カスパーゼの活性化をリアルタイムで検出するプローブ SCAT3 (A) SCAT3 の模式図. (B) 2 種類のアポトーシス細胞.

胞の動態には相関があった. すなわち, 実行型カスパーゼ の基質がより速く切断される C-type では細胞の断片化が 生じたのに対し, 遅い D-type では細胞が丸くなり長時間 残存したのである.

残念ながらこうした違いがどのように生じるのかは現時点では解明できていない。ただ興味深いことに、活性化型の実行カスパーゼの免疫染色の結果、活性化カスパーゼ-3は C-type、D-type どちらの細胞でも検出されたのに対し、活性化カスパーゼ-7は D-type のみで検出された。活性化カスパーゼ-7と活性化カスパーゼ-3の単位時間当たりの基質切断能は異なることが報告されている120。実際に、SCAT3の切断能を in vitro cleavage assay により比較したところ、活性化カスパーゼ-7の方が活性化カスパーゼ-3よりも SCAT3 切断能が低いことがわかった。これらの結果は、D-type と C-type のカスパーゼ活性化動態の違いおよび D-type が断片化せず丸い死骸として留まるのには、カスパーゼ-7活性化能の違いが寄与する可能性があることを示唆している.

死細胞は成体組織ではマクロファージや好中球といった 貪食能の高い貪食細胞により除去される.一方,神経管閉 鎖期など胚発生過程初期では,これらの貪食細胞はまだ存 在していない.今回観察された C-type のような死細胞の 断片化は,貪食細胞が存在しないまたはアクセスできない 組織で,周辺細胞に貪食されやすくなるために有利である と推察される.というのも,今回 D-type のような大きな ままの死骸は残存が観察されたが,これはプロフェッショ ナル貪食細胞でない周辺細胞では除去できなかったためと も考えうるからである.このように,同じアポトーシスで も,その様式によって周辺組織への影響が異なる可能性が 示唆される.

同様に、内因性経路依存的アポトーシスを欠損した胚では、非アポトーシス性細胞死が生じることが過去の報告により示されているが、今回の私たちの結果は、神経管閉鎖運動の円滑な進行というアポトーシスがもたらす効果は、たとえ非アポトーシス性細胞死が生じたとしても補填することはできないことを示唆している。実際、ショウジョウバエ胚や哺乳類上皮培養細胞系では、アポトーシス細胞が周辺細胞の細胞骨格収縮に影響を与えることが示されており13.140、同様のメカニズムが働いている可能性もある。

6. おわりに

以上見てきたように、C-type、D-type のようなアポトーシス細胞動態の違いや、アポトーシスと非アポトーシス性

細胞死間での細胞死様式の違いが、神経管閉鎖運動に大きな影響を与えることが示された.これらの細胞死様式の違いが周辺細胞の動態や組織構築に具体的にどのように影響を与えうるのかは非常に興味深く、今後解明すべき課題である.また、発生過程だけでなく、恒常性維持過程や病態発症過程における細胞死動態やその生理的意義についてもいまだ不明な点は多い.それらの問題に対しても、ここで紹介したようなアポトーシス動態可視化法が有効な手法となると期待される.

- 1) Miura, M. (2011) Dev. Growth Differ., 53, 125-136.
- 2) Clarke, P.G. (1990) Anat. Embryol., 181, 195-213.
- Degterev, A. & Yuan, J. (2008) Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 9, 378–390.
- 4) Yamaguchi, Y. & Miura, M. (2012) *Cell. Mol. Life Sci.*, doi: 10.1007/s00018-012-1227-7.
- Kuan, C.Y., Roth, K.A., Flavell, R.A., & Rakic, P. (2000) Trends Neurosci., 23, 291–297.
- Honarpour, N., Gilbert, S.L., Lahn, B.T., Wang, X., & Herz, J. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 9683–9687.
- Yamaguchi, Y., Shinotsuka, N., Nonomura, K., Takemoto, K., Kuida, K., Yoshida, H., & Miura, M. (2011) J. Cell Biol., 195, 1047–1060.
- 8) Takemoto, K., Nagai, T., Miyawaki, A., & Miura, M. (2003) J. Cell Biol., 160, 235–243.
- Takemoto, K., Kuranaga, E., Tonoki, A., Nagai, T., Miyawaki, A., & Miura, M. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104, 13367–13372.
- Kuranaga, E., Matsunuma, T., Kanuka, H., Takemoto, K., Koto, A., Kimura, K., & Miura, M. (2011) *Development*, 138, 1493-1499
- Nakajima, Y., Kuranaga, E., Sugimura, K., Miyawaki, A., & Miura, M. (2011) Mol. Cell. Biol., 31, 2499–2512.
- Walsh, J.G., Cullen, S.P., Sheridan, C., Luthi, A.U., Gerner, C., & Martin, S.J. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105, 12815–12819.
- Rosenblatt, J., Raff, M.C., & Cramer, L.P. (2001) Curr. Biol., 11, 1847–1857.
- 14) Toyama, Y., Peralta, X.G., Wells, A.R., Kiehart, D.P., & Edwards, G.S. (2008) Science, 321, 1683–1686.

山口 良文

(東京大学大学院薬学系研究科遺伝学教室)

Live-imaging of apoptosis during mammalian neural tube closure

Yoshifumi Yamaguchi (Department of Genetics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, 7–3–1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113–0033, Japan)