

機関番号：12601
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21770229
 研究課題名（和文） マウス器官形成過程における細胞死動態のライブイメージングとその生理的意義の解明
 研究課題名（英文） A live-imaging analysis of cell death dynamics and its physiological significance during mouse development
 研究代表者
 山口 良文（YAMAGUCHI YOSHIFUMI）
 東京大学・大学院薬学系研究科・助教
 研究者番号：10447443

研究成果の概要（和文）：われわれヒトを含む多細胞生体の構築・維持過程では、細胞増殖・細胞分化に加えて多数の細胞死が観察される。しかし、実際の生体内で細胞死がどのように生じどんな影響を周囲に与えるのかは、未だ不明な点が多い。そこで本研究では、細胞死の主要形態であるアポトーシスが生じる過程を生きたまま観察できる新規トランスジェニックマウスを用い、ほ乳類頭部神経管閉鎖過程で大量に生じるアポトーシスの動態観察および生理的意義の解明を試みた。その結果、アポトーシスは頭部神経管閉鎖過程の円滑な進行に必須であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Cell death is an inevitable event for multicellular organisms, but its dynamics and physiological significance in vivo remain to be elucidated. To reveal the dynamics and physiological significance of apoptosis during the neural tube closure, wherein massive apoptosis occurs, we performed a simultaneous live-imaging analysis them by using a novel transgenic mice expressing a genetically-encoded fluorescent reporter for caspase activation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：細胞死

1. 研究開始当初の背景

アポトーシス(細胞死)は、細胞社会の細胞数を一定に保ち秩序を維持する点で、細胞増殖と同等に重要である。近年、細胞死は単なる細胞数の制御だけでなく、形態形成や恒常性維持に積極的に関わりうる事が明らかになってきた。しかし、具体的にどのような影響を与えるのかについては、未だ理解が進んでいないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、神経管閉鎖過程におけるアポトーシスの役割を明らかにすることを試みた。アポトーシス欠損により神経管閉鎖異常が生じることは知られていたが、なぜそうした異常が生じるのかは不明であったからである。具体的には、アポトーシスの有無が神経管閉鎖のどの過程にどのような違いを及ぼすのか明らかにする

ことを試みた。

3. 研究の方法

我々が開発した細胞死動態のライブイメージングが可能なトランスジェニックマウス (SCAT3 Tg マウス) を用いて、頭部神経管閉鎖過程とアポトーシスのタイムラプス同時観察を行った。

4. 研究成果

<得られた成果>

(1) まず、頭部神経管閉鎖動態観察のため、ライブイメージング観察系を立ち上げた。高速スキャナーを備えた共焦点顕微鏡を用いることで、子宮から取り出したマウス胚の頭部神経管閉鎖動態のライブイメージングに成功した。

(2) このライブイメージング観察系を用いて、頭部神経管形成過程に見られる頭部神経板のせり上がり (elevation)、神経端・神経板の曲折 (flipping and bending) といった形態変化期の観察を行った。その結果、これらの形態変化に先立ち、アポトーシス細胞が生じてくることが明らかになった。

(3) これらの過程におけるアポトーシスの有無が形態変化に及ぼす影響を調べるために、遺伝学的手法および薬理学的手法によりカスパーゼを阻害した。その結果、アポトーシス細胞の出現は顕著に抑制され、それと一致して、頭部神経管閉鎖過程の初期における頭部神経端の曲折運動が顕著に阻害されることが明らかになった。(3) 同様に、頭部神経管閉鎖の後期過程における効果をより定量的に調べた。そのために、中脳-後脳神経孔の閉鎖速度をライブイメージングデータから定量した。その結果、カスパーゼ阻害により神経管閉鎖速度の低下が生じることがわかった。

(4) 以上一連の結果から、カスパーゼ活性化を伴うアポトーシスによる細胞の除去は、頭部神経管閉鎖過程を円滑に進行させる効果を持つと推察された。

<研究のインパクト・今後の展望>

本研究成果は、神経管閉鎖運動時における細胞死の役割の解明に大きく貢献するものと考えられる。これまで、ショウジョウバエやほ乳類培養細胞系においては、死細胞が上皮細胞の形態形成に影響を及ぼすという報告があった。本研究では、ほ乳類頭部神経管閉鎖という非常に複雑かつ動的な過程において、細胞死の有無が神経管閉鎖のダイナミクスに影響しうることをライブイメージングにより初めて明らかにした点で、ほ乳類頭部神経管閉鎖の理解を大きく進

めるものといえる。本研究成果は海外で行われた国際学会の口演発表にも選ばれ、世界的にも注目を浴びている。また、こうしたダイナミクスから神経管閉鎖を理解することは、ヒト先天奇形の多数を占める神経管閉鎖異常の要因理解の一助となることが期待される。今後は、本研究成果を基盤に、頭部神経管閉鎖のダイナミクス制御にアポトーシスがどのように関わるのか、組織・細胞レベルの解像度をもった詳細な解析を行ない明らかにしていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

“Simultaneous expression of different transgenes in neurons and glia by combining in utero electroporation with the Tol2 transposon-mediated gene transfer system.”
Yoshida A*, Yamaguchi Y *, Nonomura K, Kawakami K, Takahashi Y, Miura M.
* Genes Cells. 15(5), pp501-12. 2010. (査読有) These authors equally contributed to this work.

[学会発表] (計 17 件)

1. Yamaguchi, Y., Shinotsuka, N., Nonomura, K., Miura, M.: Live-imaging analysis of apoptosis and caspase activation during neural tube closure. CDB Symposium, Frontiers in Organogenesis. 2010. 3. 23-25. Kobe, Japan.
2. Yamaguchi, Y., Shinotsuka, N., Nonomura, K., Miura, M.: Live-imaging analysis of apoptosis and caspase activation reveals that apoptosis is a facilitator of the neural tube closure. Society for Developmental Biology 69th Annual Meeting, 2010. 8. 5-9. Albuquerque, USA
3. Nonomura, K., Yamaguchi, Y., Yoshida, H., Miura, M.: Apoptosis is dispensable for the control of cell number during early brain morphogenesis. Society for Developmental Biology 69th Annual Meeting, 2010. 8. 5-9. Albuquerque, USA
4. Yoshida A., Yamaguchi Y., Nonomura K., Kawakami K., Takahashi Y., Miura M., : The combination of in utero

- electroporation technique and the *To12* transposon system: an effective and convenient method to introduce transgenes in mammalian CNS. Gordon Research Conferences, Neural Development, 2010. 8. 15-20, Salve Regina Univ., USA
5. Yamaguchi, Y., Shinotsuka, N., Nonomura, K., Takemoto, K., Miura, M.: Live-imaging analysis of apoptosis and caspase activation reveals that apoptosis is a facilitator of the neural tube closure. 16th International conference of the International Society of Differentiation. 2010. 11.15018, Nara, Japan
 6. Shinotsuka, N., Yamaguchi, Y., Takemoto, K., Miura, M.: Time-lapse imaging analysis of caspase function during neural tube closure. 第4回神経発生討論会 2010. 3. 19-20 岡崎
 7. Shinotsuka, N., Yamaguchi, Y., Nonomura, K., Takemoto, K., Miura, M.: Live-imaging analysis of apoptosis and caspase activation during neural tube closure by using SCAT3 transgenic mice. 第43回日本発生物学会大会 2010. 6. 20-23 京都
 8. Nonomura, K., Yamaguchi, Y., Yoshida, H., Miura, M.: Apoptosis contributes to normal brain development not by restricting cell number but by regulating multiple morphogenetic events. 第43回日本発生物学会大会 2010. 6. 20-23, 京都
 9. Shinotsuka, N., Yamaguchi, Y., Nonomura, K., Takemoto, K., Kuida, K., Yoshida, H., Miura, M. Analyzing the contribution of apoptosis and caspase activation during neural tube closure by using time-lapse imaging. The 16th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience 2010.12. 1-2, 東京
 10. Yamaguchi, Y., Shinotsuka, N., Nonomura, K., Miura, M.: Live-imaging analysis of apoptosis and caspase activation in developing mouse brain. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, Cell Death. 2009. 10.6-10. New York, USA
 11. Nonomura, K., Yamaguchi, Y., Yoshida, H., Miura, M.: Caspase-mediated apoptosis is dispensable for the control of cell number in the early developing brain. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, Cell Death. 2009. 10.6-10. New York, USA
 12. Yamaguchi, Y., Shinotsuka N., Nonomura, K., Miura, M.: Live-imaging analysis of apoptosis and caspase activation in morphogenesis. The 4th International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest. 2009. 11.29-12.3. Okinawa, Japan
 13. Nonomura, K., Yamaguchi, Y., Yoshida, H., Miura, M.: Quantitative morphological analysis of mice deficient for apoptosis signaling to reveal the relationship between the change in cell number and the brain malformations. 第3回神経発生討論会 2009. 3. 12-13. 岡崎
 14. Nonomura, K., Yamaguchi, Y., Yoshida, H., Miura, M.: Is apoptosis required for the regulation of cell number in the early developing brain? -Quantitative analysis of morphological abnormalities in the brain of mice deficient for apoptosis signaling 第42回日本発生物学会大会 2009. 5. 28-31 新潟
 15. Yoshida, A., Yamaguchi, Y., Nonomura, K., Kawakami, K., Takahashi, Y., Miura, M.: Utilization of the *To12* transposon system for investigating glial development; cell-type specific expression of transgene in glia by *in utero* electroporation. 第3回神経発生討論会、2009. 3. 12-13. 岡崎
 16. Yoshida, A., Yamaguchi, Y., Nonomura, K., Kawakami, K., Takahashi, Y., Miura, M.: Targeted expression of transgene in glial cells by the combination of the *To12* transposon system and *in utero* electroporation 第32回日本神経科学学会大会 2009. 9. 16-18. 名古屋
 17. Shinotsuka, N., Yamaguchi, Y., Takemoto, K., Miura, M.: Live-imaging analysis of apoptosis *in vivo* by using transgenic mice

expressing a genetically encoded reporter for caspase activation. 第32回日本分子生物学会、2009. 12. 9-12. 横浜

〔図書〕 (計1件)

「なんのために細胞は死ぬのか？神経系発生発達期におけるプログラム細胞死の意義」山口良文
実験医学増刊・細胞死研究総集編(三浦正幸編・羊土社)pp93-100. 2010. (査読無)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等 特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 良文 (YAMAGUCHI YOSHIFUMI)
東京大学・大学院薬学系研究科・助教
研究者番号：10447443

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし