

学位論文題名

Analysis of difference in cell adhesiveness
among mesenchymal cells in developing hind
limb bud of *Xenopus laevis*

(アフリカツメガエル後肢芽における細胞接着性の解析)

学位論文内容の要旨

形態形成の研究材料としてよく使われる脊椎動物の肢は、一見、複雑な形態をしているが、先端基部方向にそって輪切りにしてみると、どこの位置でも中心部より骨、筋肉、間充織組織などがほぼ同じように同心円状に配列している。つまり、肢の部位による形態の違いは分化した細胞の種類による違いではなく、それらの配置パターンの差によって作られていることがわかる。形態形成を直接支配する要因として、細胞の接着性が重要な役割をしている例が多数知られており、肢の位置による形態の違いも細胞の接着性によって支配されている可能性が考えられる。本研究ではアフリカツメガエル(*Xenopus*)幼生の後肢芽細胞の *in vitro* 及び *in vivo* における挙動を観察することにより、肢芽の中に位置による細胞の接着性の差の違いを検討し、形態形成における細胞の接着性の役割を解析した。

まず、発生中の肢芽における肢形成予定部域を調べた。肢の発生では、肢先端にある上皮の AER (apical ectodermal ridge) から、FGF (fibroblast growth factor) が出されることによって先端部間充織細胞に分裂が誘導され成長が起こると考えられている。そこでさまざまな stage の肢芽から AER を含む上皮を取り除くことで成長を停止させ、軟骨分化するまで培養をし、できた軟骨のパターンを調べることによって、各 stage の肢芽における肢形成予定部域を調べることができた。その結果、若い stage の肢芽からは基部側の軟骨構造しか形成されなかったが、発生が進むとともにより先端側の構造が形成されるようになった。これは、肢の発生においては基部側から先端側の構造がつけ加えられるようにして形成されることを示している。つまり、肢芽の発生とともに、より先端の部位を形成する細胞が次々と作られることを示している。

次に、位置の違いと対応するような細胞の接着性の違いがあるのかどうか確かめるために、発生中の肢芽の異なる部域に由来する間充織細胞を単離した後、旋回培養をして再集合させた細胞塊を作成し、その細胞塊中での細胞の挙動を調べた。その結果、細胞凝集塊中で最初はランダムに分布していた由来の異なる細胞同士が時間が経つにつれお互いに分離して、同じ部域に由来する細胞同士が集合するという選別現象が観察された。最終的には、2つの集団のうち相対的に先端側部位に由来する細胞が細胞塊中の内側に存在し、より基部側部域に由来する細胞がそれらを取りまくように外周部に配置された。これは、肢芽の先端-基部軸方向において、その由来を示す位置価というものが存在し、その違いにより細胞の接着性が異なり、先端側の位置価を持つ細胞が基部側のものより強い相互接着性を持つことを示している。

先端-基部軸に関して様々な位置に由来する細胞を組み合わせると同様に培養した結果、遠い位置に由来する細胞同士を混ぜ合わせたときに、相対的に強い細胞選別が観察された。この結果から *Xenopus* 肢芽中では先端-基部軸方向に細胞の接着性勾配が存在していることが推測された。

次に、こうした細胞の接着性の勾配が本当に *in vivo* の肢芽内にも存在し、さらにそれが肢のパターン形成に関与しているかどうかを調べるための実験を行った。まず、2種類の由来の異なる間充織細胞を *in vitro* で再集合させて作った凝集塊を、肢芽の様々な位置に移植し、細胞の挙動を観察した。その結果、移植された細胞塊中でも *in vitro* と同様に異なる領域に由来する細胞間での選別が観察されたが、その選別のパターンは移植した場所によって大きく異なっていた。*in vitro* の細胞凝集塊中では、先の位置値を持つ細胞は常に細胞凝集塊中の内側に位置していたが、*in vivo* の実験では凝集塊周囲の宿主の肢芽の細胞と近い位置値を持つ細胞群が凝集塊の周辺部に存在し、宿主の細胞と接するように分布した。これは、細胞の選別が、細胞塊中の細胞同士だけではなく、周りの宿主の細胞との間でも起こった結果と思われる。このことは *in vivo* の肢芽中でも位置値に対応する細胞の接着性の違いが存在し、機能していることを示している。

さらに、実際に発生中の肢中で移動を伴う細胞の選別が起こるかどうかを知るために、肢芽の先端-基部軸について異なる領域から取り出した間充織細胞塊を、若い肢芽へ移植した。肢芽が成長した後、組織学的に検索し移植された細胞が宿主の肢芽中のどの領域の形成に参加したかを調べたところ、移植された間充織由来の細胞は、その由来により先端-基部軸で分布する領域が異なっていた。基部由来の細胞を移植したものは基部から先端への広い領域に参加していたが、先端由来の細胞は先端部の形成にのみ参加していた。これは、移植された先端部由来細胞が、宿主の肢芽が先端方向に伸びる過程で、その由来した位置が形成されるまで先端方向へ移動したことを示唆している。この移動は発生中の肢芽中で細胞の接着性の違いによる選別現象と深く関係していると考えられる。

以上の結果は、発生中の肢芽内では移動が可能であるならば、より基部の位置値を持つ細胞は基部の細胞と接着しやすいので基部側に残り、より先端の位置値を持つ細胞は先端方向に移動することを示唆している。特に肢芽先端の progress zone においては細胞の接着がゆるいため、この選別メカニズムにより肢芽の先端-基部軸方向での細胞の並びが補正されている可能性が大きい。

最後に、肢芽における細胞の接着性の違いを支配している分子の実体を明らかにする試みを行った。脊椎動物の肢芽には様々な接着分子が発現していることが知られている。その中で、有力であると思われる N-cadherin を認識する、抗 N-cadherin 抗体(NCD-2)を用い発生中での肢芽の N-cadherin の分布を解析した結果、若い肢芽では、肢芽全体で強く発現していたが、発生が進むとともに、基部側の領域での N-cadherin の発現が見られなくなり、先端-基部の差を反映しているかのようにも見えた。しかし、どの stage においても N-cadherin は筋原細胞で強く発現していたため、N-cadherin だけでは位置値と対応した接着性の違いを説明することは難しいと思われる。

以上に述べた一連の研究により、*Xenopus* 幼生の肢芽には位置値と対応した細胞の接着性の違いがあることが明らかになった。また、細胞の持つ接着性の勾配による肢芽内の細胞選別により、細胞の先端-基部軸での整列が保証され、正しい形の形成をサポートしている可能性が示された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	鈴木	範男
副査	教授	馬渡	駿介
副査	助教授	栃内	新
副査	助教授	若原	正己
副査	助教授	清水	隆

学位論文題名

Analysis of difference in cell adhesiveness among mesenchymal cells in developing hind limb bud of *Xenopus laevis*

(アフリカツメガエル後肢芽における細胞接着性の解析)

近年、発生の進行に伴う形態形成に関する研究が盛んに行われている。形態形成の研究材料としてよく使われる脊椎動物の肢は、一見、複雑な形態をしているが、先端基部方向にそって輪切りにしてみると、どこの位置でも中心部より骨、筋肉、間充織組織などがほぼ同じように同心円状に配列している。つまり、肢の部位による形態の違いは分化した細胞の種類による違いではなく、それらの配置パターンの差によって作られていることがわかる。形態形成を直接支配する要因として、細胞の接着性が重要な役割をしている例が多数知られており、肢の位置による形態の違いも細胞の接着性によって支配されている可能性が考えられる。本研究ではアフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)幼生の後肢芽細胞の *in vitro* 及び *in vivo* における挙動を観察することにより、肢芽の中に位置による細胞の接着性の差の違いを検討し、形態形成における細胞の接着性の役割を解析し、*Xenopus laevis* 幼生の肢芽には位置価と対応した細胞の接着性の違いがあることが明らかにするとともに、細胞の持つ接着性の勾配による肢芽内の細胞選別により、細胞の先端-基部軸での整列が保証され、正しい形の形成をサポートしている可能性を示唆したものである。

肢の発生では、肢先端にある上皮の AER (apical ectodermal ridge) から、FGF (fibroblast growth factor) が出されることによって先端部間充織細胞に分裂が誘導され成長が起こると考えられているので、本研究では、さまざまな stage の肢芽から AER を含む上皮を取り除き成長を停止させ、軟骨分化するまで培養をし、できた軟骨のパターン及び各 stage の肢芽における肢形成予定部域を調べ、若い stage の肢芽からは基部側の軟骨構造しか形成されないが、発生が進むとより先端側の構造が形成されることを明らかにした。このことは、肢の発生においては基部側から先端側の構造がつけ加えられるようにして形成されることすなわち、肢芽の発生とともに、より先端の部位を形成する細胞が次々と作られることを示している。

本研究では、次に、位置の違いと対応するような細胞の接着性の違いがあるかどうか確かめるために、発生中の肢芽の異なる部域に由来する間充織細胞を単離した後、旋回培養をして再集合させた細胞塊を作成し、その細胞塊中での細胞の挙動を調べ、細胞凝集塊中で最初はランダムに分布していた由来の異なる細胞同士が時間経過とともに互いに分離し、同じ部域に由来する細胞同士が集合し、最終的には、2つの集団のうち相対的に先端側部位に由来する細胞が細胞塊中の内側に存在し、より基部側部域に由来する細胞がそれらを取りまくように外周部に配置されるという選別現象を見出した。このことは、肢芽の先端-基部軸方向において、その由来を示す位置価というものが存在し、その違いにより細胞の接着性が異なり、先端側の位置価を持つ細胞が基部側のものより強い相互接着性を持つことを示している。

また、先端-基部軸に関して様々な位置に由来する細胞を組み合わせると同様に培養すると、遠い位置に由来する細胞同士を混ぜ合わせたときに強い細胞選別がおこることを見出した。さらに、2種類の由来の異なる間充織細胞を *in vitro* で再集合させて作った凝集塊を、肢芽の様々な位置に移植すると、移植された細胞塊中でも *in vitro* と同様に異なる部域に由来する細胞間での選別が起こるが、その選別のパターンは移植した場所によって大きく異なること、すなわち *in vitro* の細胞凝集塊中では、先の位置価を持つ細胞は常に細胞凝集塊中の内側に位置するが、*in vivo* の実験では凝集塊周囲の宿主の肢芽の細胞と近い位置価を持つ細胞群が凝集塊の周辺部に存在し、宿主の細胞と接するように分布することが見出された。これは、細胞の選別が、細胞塊中の細胞同士だけではなく、周りの宿主の細胞との間でも起こった結果と考えられ、*in vivo* の肢芽中でも位置価に対応する細胞の接着性の違いが存在し、機能していることを示している。

さらに、肢芽の先端-基部軸について異なる部域から取り出した間充織細胞塊を、若い肢芽へ移植すると、肢芽の成長後、移植された間充織由来の細胞は、その由来により先端-基部軸で分布する領域が異なり、基部由来の細胞を移植したものでは基部から先端への広い領域に、先端由来の細胞は先端部の形成にのみに関与することを見出した。これは、移植された先端部由来細胞が、宿主の肢芽が先端方向に伸びる過程で、その由来した位置が形成されるまで先端方向へ移動したことを示唆しており、この移動は発生中の肢芽中で細胞の接着性の違いによる選別現象と深く関係しているものと考えられる。

以上の結果は、発生中の肢芽内では移動が可能であるならば、より基部の位置価を持つ細胞は基部の細胞と接着しやすいので基部側に残り、より先端の位置価を持つ細胞は先端方向に移動すること、特に、肢芽先端の progress zone においては細胞の接着がゆるいため、この選別メカニズムにより肢芽の先端-基部軸方向での細胞の並びが補正されている可能性が大きいことを示したもので、発生過程における細胞分化の研究に大きな貢献をするものである。

よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。