

学位論文題名

トリ羽毛の形態形成に関する研究

- 羽毛発生初期における細胞外マトリックスの役割 -

学位論文内容の要旨

皮膚付属器官であるトリの羽毛は、その複雑な形態に因る優れた断熱材として利用される一方、形態形成が表皮と真皮の相互作用によって進行するために器官形成の研究モデルとしても多用されている。しかし、近年、幹細胞に対する分化誘導性をはじめとする多様な生物活性が注目されている細胞外マトリックス (ECM) の羽毛発生時の役割に関する研究、特に *in vitro* における詳細な検討はほとんど行われていない。個々の ECM 成分は、器官形成に際し各々に異なる役割を果たすことが明らかにされつつあり、再生医療や細胞工学分野では様々な利用が可能な生体材料として期待されている。そこで本研究では、羽毛の発生初期における ECM の役割解明を目的として、まず *in vivo* での羽毛発生に伴って時間的、空間的に特異な局在を示す ECM を検索し、羽毛発生への密接な関与が示唆された VI 型コラーゲンとフィブロネクチンの具体的役割を、新たに開発した *in vitro* の実験系である再構成ヒフと再構成ゲルヒフを用いて検討し、以下の知見を得た。

1. ニワトリ胚皮膚において VI 型コラーゲンは、表皮プラコード形成段階では表皮と真皮の境界部に局在していたが、羽毛原基が形成されると羽毛形成領域の表皮真皮境界部から拡散して神経細胞接着分子 (NCAM) 陽性の真皮細胞が密集している真皮コンデンセーション領域に存在するようになり、羽毛原基が隆起すると再び皮膚全体の表皮真皮境界部に集中するとともに羽毛原基の頭部側真皮領域にも局在していた。また、羽芽形成以降の VI 型コラーゲンの局在は、NCAM 陽性の真皮細胞が密集した羽芽の尾部側基部に推移したことから、羽毛発生初期の VI 型コラーゲンは、羽毛の形態形成に NCAM と共に密接に関与していることが示唆された。
2. 表皮プラコード形成段階では表皮直下の真皮に存在していたフィブロネクチンは、羽毛原基が形成されると羽毛形成領域の表皮真皮境界部とコンデンセーションに局在するようになり、羽芽形成後には羽芽頭部側のプラコード直下と尾部側基部の真皮領域に偏在し、羽芽が伸長すると羽芽の真皮全体に存在していた。加えて、これらの発生過程を通じて羽毛形成領域の真皮細胞周囲における局在が顕著であったフィブロネクチンは、羽毛発生初期の真皮細胞との直接的な関連性が示唆された。
3. 真皮細胞の ECM 環境を人為的にコントロール可能な *in vitro* の羽毛発生モデルとし

て、皮膚から剥離した表皮層と単離した真皮細胞を用いた再構成ヒフおよび真皮層にコラーゲンをういて作製した再構成ゲルヒフは共に、組織化学的に器官培養皮膚と類似した羽毛を形成した。また、再構成ヒフでは、一旦解除された ECM 環境が生体に近い状態に再構築されており、再構成ゲルヒフのコラーゲンに異なる ECM 成分を混合した場合、ECM 成分毎に形成された羽芽の形態や ECM 環境の再構築様式が異なっていた。従って、新たに開発した両ヒフは、羽毛発生初期の個々の ECM の役割を詳細に検討する有効な手段と判断された。

4. 再構成ヒフにVI型コラーゲンを液相で添加すると、羽芽の伸長が促進された。また、真皮細胞のVI型コラーゲン蓄積量を優先的に低減することを明らかにしたコラーゲン合成阻害剤 EDHB を器官培養皮膚の培地に添加すると、羽芽は伸長せず、羽芽基部の NCAM 陽性細胞も減少したが、液相VI型コラーゲンの培地への添加により、これら EDHB の阻害作用は緩和された。しかし、この添加効果は I 型やIV型コラーゲンでは認められず、VI型コラーゲンが羽芽の伸長促進作用を有していることが明らかとなった。
5. 一方、固相のVI型コラーゲンが再構成ゲルヒフに高濃度で存在した場合、羽芽の伸長は抑制され、抗VI型コラーゲン抗体を再構成ヒフの培地に添加してVI型コラーゲンの作用を阻害すると、羽芽の形状は細長く変化したことから、VI型コラーゲンは、羽芽の形態形成に抑制的にも作用していると考えられた。
6. 上記VI型コラーゲンの促進と抑制の相反する作用機序を明らかにするため、細胞レベルで検討したところ、液相のVI型コラーゲンは真皮細胞の増殖を促進する一方、固相のVI型コラーゲンは細胞移動を阻害した。さらに、VI型コラーゲンは、液相でも固相でも真皮細胞間の接着を促進し、羽毛形成に直接参加する真皮細胞が特異的に発現している NCAM を活性化させた。従って、VI型コラーゲンは真皮細胞の増殖、移動、NCAM 活性を制御することによって羽毛の初期形成を促進と抑制の両面から調節していることが示唆された。
7. 真皮から単離した真皮細胞を抗フィブロネクチン抗体によって免疫染色した結果、細胞膜に沿ったリング状の染色像が得られ、フィブロネクチンが真皮細胞表面に結合していること、および、この細胞表面に結合したフィブロネクチンは、EDTA 処理によって解離し、外因性のフィブロネクチンと再び結合することが明らかになった。
8. フィブロネクチン結合、解離あるいは再結合した真皮細胞を用いた 3 種類の再構成ヒフで羽毛の発生を比較した結果、フィブロネクチンを結合および再結合した細胞を用いた場合、コントロールの器官培養皮膚と同様、羽毛原基は表皮のプラコード領域に限局して形成され、培養日数の経過に伴って伸長した羽芽も形成された。一方、フィブロネクチンを解離した真皮細胞を用いた再構成ヒフでは、コンデンセーションは形成されず、元来表皮に存在していたプラコードも消失し、羽毛原基や羽芽も全く形成されず、羽毛発生初期におけるフィブロネクチンの必要不可欠性が明らかとなった。
9. また、フィブロネクチンを結合および再結合した細胞を再構成ヒフに用いた場合、*in vivo* 同様に羽芽の形成に伴い表皮のプラコードから真皮側にテネインは移動した

が、フィブロネクチンを解離した場合には、テネイシンは真皮側に移動せずに表皮表層に存続していた。さらに、表皮のプラコードがフィブロネクチンとの結合性を示したことから、真皮細胞表面のフィブロネクチンは、羽毛発生初期における表皮と真皮の結合も含めた相互作用を仲介していることが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 中 村 富美男
副 査 教 授 服 部 昭 仁
副 査 助 教 授 竹之内 一 昭
副 査 助 教 授 西 邑 隆 徳

学 位 論 文 題 名

トリ羽毛の形態形成に関する研究

－羽毛発生初期における細胞外マトリックスの役割－

本論文は、6章からなり、図33、文献127を含む総頁数120の和文論文であり、他に参考論文3編が付されている。

複雑な形態に因り優れた断熱材として利用されているトリ羽毛の形態形成は、様々な因子が関与する表皮と真皮の相互作用によって進行することが明らかにされつつある。しかし近年、発生細胞生物学や再生医学の分野において多様な生物活性が注目されている細胞外マトリックス（ECM）の羽毛発生時の役割、特に個々のECM構成成分の具体的な役割はほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、羽毛の発生初期におけるECMの役割解明を目的として、*in vivo*での実験結果から羽毛発生への密接な関与が示唆されたVI型コラーゲンとフィブロネクチンの具体的な役割を新たに開発した*in vitro*の実験系を用いて検討し、以下の知見を得ている。

1. 真皮細胞のECM環境が操作可能な*in vitro*の羽毛発生モデルとして、ニワトリ胚皮膚から剥離した表皮層と単離した真皮細胞を用いた再構成皮膚および真皮層にコラーゲンゲルを用いた再構成ゲル皮膚を作成した。両モデルは共に器官培養皮膚と類似した羽芽を形成し、再構成皮膚では生体に近いECM環境が新たに構築され、再構成ゲル皮膚では混合したECM成分毎に形成された羽芽の形態やECM成分の分布が異なっていたことから、両モデルは羽毛発生初期の個々のECMの役割検討に有効と判断された。
2. 液相VI型コラーゲンの再構成皮膚培地への添加により羽芽の伸長は促進された。また、器官培養皮膚の羽芽の伸長および羽芽基部における神経細胞接着分子（NCAM）の出現は共にコラーゲン合成阻害剤によって抑制されたが、液相VI型コラーゲンの添加に

より回復した。しかし、I型やIV型コラーゲンはこの回復作用を示さず、VI型コラーゲンの羽芽伸長促進作用が明らかとなった。

3. 一方、固相のVI型コラーゲン濃度が高い再構成ゲル皮膚では羽芽の伸長が抑制され、抗VI型コラーゲン抗体を添加した再構成皮膚の羽芽は細長く変形したことから、VI型コラーゲンは羽芽の形態形成に抑制的にも作用していると考えられた。
4. 上記VI型コラーゲンの促進と抑制の相反する作用を細胞レベルで検討した結果、液相のVI型コラーゲンは真皮細胞の増殖を促進する一方、固相のVI型コラーゲンは細胞移動を阻害した。さらに、VI型コラーゲンは、液相でも固相でも真皮細胞間の接着を促進し、羽毛形成に直接参加する真皮細胞が特異的に発現している NCAM を活性化させた。従って、VI型コラーゲンは真皮細胞の増殖、移動、NCAM 活性を制御することによって羽毛の初期形成を促進と抑制の両面から調節していることが示唆された。
5. 単離した真皮細胞の細胞膜外面に沿った免疫染色像から、フィブロネクチンは真皮細胞表面に結合していること、EDTA 処理によってこの細胞表面のフィブロネクチンは解離すること、および外因性フィブロネクチンと真皮細胞は再結合することが明らかになった。
6. フィブロネクチン結合、解離あるいは再結合した真皮細胞を用いた3種類の再構成皮膚における羽毛の発生を比較した結果、フィブロネクチンを結合および再結合した細胞を用いた場合、器官培養皮膚と同様に羽毛原基は表皮のプラコード領域に局限して形成され、培養日数の経過に伴って伸長した羽芽も形成された。しかし、フィブロネクチンを解離した真皮細胞を用いた場合、真皮密集化領域は出現せず、元来表皮に存在していたプラコードも消失し、羽毛原基や羽芽も形成されず、羽毛発生初期におけるフィブロネクチンの必要不可欠性が明らかとなった。
7. また、フィブロネクチンを結合した真皮細胞を用いた再構成皮膚では、*in vivo* 同様に羽芽の形成に伴い表皮のプラコードから真皮側にテネイシンは移動したが、フィブロネクチンを解離した場合にはテネイシンは真皮側に移動せずに表皮表層に存続していた。さらに、表皮のプラコードがフィブロネクチンとの結合性を示したことから、羽毛発生初期における表皮と真皮の結合も含めた相互作用におけるフィブロネクチンの仲介機能が明らかとなった。

以上のように、本論文は新たに開発した皮膚モデルを用いて、VI型コラーゲンとフィブロネクチンが羽毛発生初期に果している具体的役割を明らかにすると共に、様々な利用が期待されている ECM の生物活性に関する新知見を得ている。

よって審査員一同は、小林 謙が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。