

# ニワトリ胚芽形態形成におけるAER直下間充織細胞の役割

著者	原 健二
号	40
学位授与番号	1557
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/38469">http://hdl.handle.net/10097/38469</a>

氏名・（本籍）	はら けん じ 原 健 二
学位の種類	博士（理学）
学位記番号	理博第1557号
学位授与年月日	平成9年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科，専攻	東北大学大学院理学研究科（博士課程）生物学専攻
学位論文題目	ニワトリ胚芽形態形成におけるAER直下間充織細胞の役割
論文審査委員	（主査）教授 井出 宏之 教授 加藤 秀生，助教授 山本 博章

## 論 文 目 次

### 第1章：総合序論

1. 形態形成と上皮-間充織相互作用
2. 四肢の形態形成における上皮-間充織間相互作用
3. 研究目的

### 第2章：材料・方法

### 第3章：AER 直下間充織細胞の肢芽軟骨パターン形成への影響

#### 序論

#### 結果

1. AER-間充織間相互作用の阻害による軟骨パターンへの影響
2. バリア挿入による *Msx1* 遺伝子発現への影響
3. AER 直下間充織の肢芽軟骨パターンへの影響
4. 充織移植による *Msx1* 遺伝子の発現への影響

#### 考察

1. AER-間充織間相互作用の軟骨パターンに及ぼす影響
2. AER 因子は短距離拡散性のシグナルである
3. AER 因子の伝達には *Msx1* を発現している間充織細胞が必要である

### 第4章：間充織による *Fgf-8* の発現維持

#### 序論

#### 結果

1. AER 直下間充織の *Fgf-8* 発現への影響
2. 培養細胞における *Fgf-8* の発現維持
3. FGF-2 の *Fgf-8* 発現への影響

#### 考察

1. 間充織による *Fgf-8* の発現維持
2. 間充織細胞の *Fgf-8* 発現維持活性の維持

### 3. FGF-2 が *Fgf-8* の発現維持因子である可能性

#### 第5章：総合討論

1. AER シグナル伝達と *Msx1* の発現
2. 間充織細胞による *Fgf-8* 発現の維持
3. *Fgf-8* 発現維持因子
4. 進行帯と *Msx1*

#### 第6章：要約

#### 第7章：謝辞

#### 第8章：参考文献

#### 第9章：図表

1. 図
2. 表

## 論文内容要旨

ニワトリ肢芽の形態形成には AER-間充織間の相互作用が不可欠である。AER を除去すると、先端部の軟骨パターンの欠損が生じ、その欠損度合いは施術ステージが早ければ早いほど、より基部側より生じる。このことは、AER-間充織間相互作用が、間充織細胞の軟骨分化のみならず、肢の基部先端部軸方向の軟骨パターン形成にも重要な働きをしていることを示している。本研究では、肢芽形態形成における AER 直下間充織細胞の役割を次の2点から解析した。

#### ① AER 直下間充織の肢芽軟骨パターン形成への影響に関する解析。

まず、AER 直下にバリアを挿入することで部分的に AER-間充織間相互作用を阻害し、軟骨パターンへの影響を解析した。さらに、このような微細手術を行なった肢芽での *Msx1* の発現を解析した。*Msx1* は AER とその直下の間充織細胞に発現する転写調節因子をコードする遺伝子である。肢芽形態形成における *Msx1* の機能は明らかではないが、間充織細胞における発現は AER 依存的事であることから、この遺伝子の発現が間接的に AER 因子の分布を反映していると考えた。解析の結果、アルミ片によって AER-間充織間相互作用を部分的に阻害すると、阻害した領域に限って正常な軟骨パターン形成が阻害された。またこのような肢芽では、バリア直下の間充織細胞に限って *Msx1* の発現が抑制されていた。この結果は、バリア挿入による軟骨パターン形成の阻害は、AER 因子がバリア直下の間充織細胞へ到達していないためであると考えられる。さらに、AER 直下に孔径  $0.4\ \mu\text{m}$  厚みが  $80\ \mu\text{m}$  のフィルターを挿入した場合、フィルター直下の間充織細胞における *Msx1* の発現は抑制され、正常な軟骨パターン形成は抑制された。一方、孔径  $0.4\ \mu\text{m}$  厚みが  $10\ \mu\text{m}$  のフィルターを用いた場合、フィルター直下の間充織細胞には *Msx1* が正常に発現しており、軟骨パターン形成は正常であった。これらの結果は、AER 因子が  $10\ \mu\text{m}$  厚みは通過できるが、厚みが  $80\ \mu\text{m}$  のフィルターは通過できないことを示すものである。さらに、孔径  $0.2\ \mu\text{m}$  厚みが  $10\ \mu\text{m}$  のフィルターを AER 直下に移植した場合には、直下間充織細胞の *Msx1* の発現は維持され、また、正常な肢芽の形態形成を阻害しなかった。ニワトリの繊維芽細胞は、孔径  $0.2\ \mu\text{m}$  のフィルターをはさんで直接接触できないことから、AER 因子の間充織中の伝達には細胞同士の直接の接触を必要としないことが示唆された。

*Msx1* の発現は、歯芽、顎顔面など、その多くが形態形成に上皮-間充織細胞間相互作用を必要とする

組織に共通して見られることから、上皮-間充織間相互作用との関係が注目されている。そこで、AER直下間充織細胞における *Msx1* の発現と AER-間充織間相互作用との関係に注目した。バリアの代わりに様々な間充織片を AER 直下に移植し、移植細胞における *Msx1* の発現と宿主枝芽の軟骨パターン形成への影響を解析した。その結果、AER で *Msx1* を発現できる間充織を移植した場合、宿主枝芽におけるパターン形成は正常だった。この場合、移植片直下の間充織細胞でも *Msx1* の発現が認められた。この結果は、移植片直下の間充織まで AER 因子が到達していると解釈できる。一方、*Msx1* を発現できない移植片は、宿主枝芽の正常な軟骨パターン形成を阻害した。その際、移植片直下の宿主間充織細胞での *Msx1* の発現も著しく抑制されていた。この結果は、AER 因子が移植片直下の間充織まで到達していないと解釈できる。以上の結果をまとめると、AER 因子の間充織中の通過には間充織細胞が *Msx1* を発現していることが重要である可能性が示唆された。

## ② 間充織細胞による *Fgf-8* の発現維持に関する解析。

*Fgf-8* は枝芽では AER に特異的に発現している繊維芽細胞成長因子 (FGF) の一つである。このタンパクは AER を除去した枝芽の正常なパターン形成を補償することから、AER 因子の有力候補であると考えられている。そこで、*Fgf-8* の発現維持に関わる生物学的要因を解析し、機能的な AER の維持機構を検討した。

*Fgf-8* の発現維持における組織間相互作用の関与を解析した。まず、*Fgf-8* の発現は、AER の除去領域に関わらず、残った AER では正常に維持されていることを確認した。このことから、*Fgf-8* の発現が AER の特定領域によって調節されていないことが示唆された。AER 直下にアルミ片を挿入すると、アルミ片によって間充織との接触を阻害された AER に限って *Fgf-8* の発現が消失した。この結果は、*Fgf-8* の発現は AER 直下の間充織によって行われていることを示唆している。そこで次に、枝芽の様々な領域の間充織を AER 直下に移植し、移植片に接した AER における *Fgf-8* の発現を解析した。その結果、AER 直下の間充織のみならず、枝芽の表皮直下の間充織には *Fgf-8* の発現維持作用が認められた。一方、枝芽の中心部、すなわち将来軟骨に分化する領域の間充織には維持作用は認められなかった。

FGF-2 及び FGF-4 は、FGF-8 同様、AER を除去した枝芽の正常なパターン形成を補償できる。もし、これら増殖因子が AER の作用を完全に模倣できるのであれば、AER 直下の間充織細胞は FGF の存在する培養条件下でその性質を維持できることが予想される。そこで、FGF が存在する条件下で培養した AER 直下間充織細胞が *Fgf-8* の発現を維持できるか解析した。FGF を加えない場合、AER 直下間充織細胞は培養40時間後には *Fgf-8* の発現維持作用を失った。一方、FGF-2 及び FGF-4 を添加した培養条件では、培養40時間後でも間充織細胞に *Fgf-8* の発現維持活性が認められた。以上の結果は、FGF によって間充織細胞の AER 維持に関わる作用が維持されることが示唆された。

FGF-2 は、AER と上皮直下の間充織細胞に分布し、FGF-2 レセプターのひとつ FGFR-2 は、AER を含む上皮細胞に存在するなどの事実から、FGF-2 が AER に直接作用し *Fgf-8* の発現を維持している可能性が考えられる。そこで、ビーズにしみ込ませた FGF-2 を AER 直下に移植し、ビーズに接した AER における *Fgf-8* の発現を解析した。その結果、FGF-2 は AER における *Fgf-8* の発現を維持できなかった。この結果は、AER 直下間充織が FGF-2 によって直接 AER における *Fgf-8* の発現を維持している可能性を否定する。

## 論文審査の結果の要旨

四肢の原基である肢芽のパターン形成は AER（外胚葉性頂堤）とその直下の間充織との相互作用によって進行してゆく。本研究は、AER 直下の間充織の役割を (1) AER 因子の伝達、(2) AER 維持因子の伝達の 2 つの面から解析したものである。

AER 因子の間充織への伝達を阻害するために、AER の直下にバリアを挿入し、直下間充織での *Msx1* 遺伝子発現への影響、軟骨パターンへの影響を解析した。アルミ片や孔径  $0.4\ \mu\text{m}$ 、厚さが  $80\ \mu\text{m}$  のフィルターを挿入した場合は、間充織における *Msx1* の発現は抑制され、正常な軟骨パターン形成も阻害された。一方、孔径  $0.4\ \mu\text{m}$ 、厚さが  $10\ \mu\text{m}$  のフィルターや孔径  $0.2\ \mu\text{m}$ 、厚さ  $10\ \mu\text{m}$  のフィルターを用いた場合には、フィルター直下の間充織細胞で *Msx1* が正常に発現しており、軟骨パターン形成も正常であった。これらの結果から、AER と間充織との直接の接触は伝達に必要なく、AER 因子は  $10\ \mu\text{m}$  の厚さは通過できることが示唆された。また、さまざまな肢芽領域由来の間充織片を AER 直下に移植し、移植された組織における *Msx1* の発現と宿主肢芽の軟骨パターン形成への影響を解析した。その結果、AER 直下で *Msx1* を発現できる間充織を移植した場合のみ、宿主肢芽におけるパターン形成は正常であった。つまり AER 因子が間充織中を通過するためには間充織細胞が *Msx1* を発現していることが重要であることが示唆された。

次に AER 因子のひとつである *Fgf-8* の発現を維持するための間充織からの作用を解析した。*Fgf-8* の発現は AER 直下にアルミ片を挿入すると消失し、この発現は AER 直下の間充織によって維持されていることが示唆された。そこで、肢芽のさまざまな領域の間充織を AER 直下に移植し、移植片に接した AER における *Fgf-8* の発現を解析した。その結果、AER 直下の間充織だけでなく、肢芽の表皮直下の間充織にも *Fgf-8* の発現を維持する作用が認められた。また、この作用の維持のためには FGF-2、FGF-4 の間充織への作用が有効であることも示された。FGF-2 や FGF-4 が間充織に作用し、その結果、間充織から AER 維持因子が分泌されるものと考えられる。

これらの結果は、四肢形成時の細胞間相互作用に関する新知見であり、一層の発展が期待されているこの分野の基礎として重要な知見である。

本研究は著者が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、原健二提出の論文は、博士（理学）の学位論文として合格と認める。