

第一章

序論

後生動物の胚細胞は互いを選別するという細胞選別能を潜在的に有しており、これについて、形態形成の原理を追究するためのモデルとして広く研究されてきた。細胞選別現象は、ホルトフレーターらによる両生類の初期胚を用いた古典的な実験系によって明らかにされた (Townes and Holtfreter, 1955). 彼らは、原腸胚期から神経胚期の異なる胚葉や発生段階の胚細胞を用いて混合培養を行った。胚細胞は、無差別に集合した後、胚葉特異性によって互いを選別し、同じ由来の胚細胞どうしが再集合する。そして、細胞集団が分離するようになり、由来となる胚葉特異的な組織構築が進行する。また、同様の細胞選別現象は、ヒドラ (Gierer et al., 1972; Takaku et al., 2005) やニワトリ胚 (Ide et al., 1994; Yajima et al., 1999; Yajima et al., 2002) など他の動物種でも見られる。胚細胞が解離され単一の細胞となり、再び、秩序立った形を構築するダイナミックな過程は、形態形成や発生の進行のメカニズムを解明するために非常に重要である。

細胞選別をもたらす同種親和性は、主にカルシウム依存的な細胞接着分子、カドヘリンによることが明らかとなっている。カドヘリンは、膜貫通型タンパク質であり、細胞外ドメインで互いを認識して特異的に結合し、その発現により、組織境界の形成や細胞集団の分離が生じている (Takeichi, 1988; Nose et al., 1988). *In vitro* における細胞選別過程において、同種親和性を持つ細胞が再集合した後、クラスターは階層構造を形成し同心円状に配置する (Foty and Steinberg, 2004). これは、細胞の接着力がクラスター表面に生じる表面張力へ反映され、その強弱により配置が決まることから、Differential adhesion hypothesis, DAH (Foty and Steinberg, 2005; Steinberg, 2007) により提唱されている。また、Steinberg らによって実験的にも、接着力の強い細胞によって構成されるクラスターは中央に位置し、接着力の弱い細胞によるクラスターはその周りを囲むように配置することが報告されている (Foty and Steinberg, 2005).

また、別の仮説として、細胞集団の表面張力は細胞皮層の張力に依存し、より強い皮層張力を持つ細胞が中央に位置するという、“Differential interfacial tension

アフリカツメガエル胚の解離再集合塊における細胞選別と組織分化の研究

(Studies on the cell sorting process and tissue differentiation in
the reaggregation of *Xenopus* embryonic cells)

原田 綾乃

Ayano Harata

2013

目次

第一章 序論 1

第二章 原腸胚期から解離・再集合した *Xenopus laevis* 胚細胞の細胞選別

は, 同心円化過程と極性化過程と段階的に進行する

要旨 6
序論 8
材料と方法 10
結果 13
考察 16
付図 21

第三章 *Xenopus laevis* 胚の細胞選別過程には, アクトミオシン系と

TGF- β シグナリングが関与する

要旨 27

序論 29
材料と方法 30
結果 33
考察 36
付図 40

第四章 総合考察 45

謝辞 52
引用文献 53
和文摘要 59
英文摘要 61
学位論文の基礎となる公表論文 63

hypothesis, DITH' が提唱されており (Harris et al., 1976), 最近では, このような細胞の皮層張力と接着力の両方が細胞選別の進行においては, 重要であると報告されている (Green, 2008; Krieg et al., 2008; Manning et al., 2010). 細胞の皮層に張力が生じることによって個々の細胞は収縮力を有するようになり, 筆者は, 本文において細胞の皮層張力と細胞の収縮力を同義として用いている. 閉鎖空間においては, 表面張力を決定する接着力と皮層張力は逆相関するため, 細胞が接着する際, 皮層張力の増加に伴って細胞の接着力が弱まる (Lecuit and Lenne, 2007) ことが知られており, 細胞の収縮力を調節するアクトミオシン系は, カドヘリンの発現に伴ってその局在や発現量が変化すると推測される. しかしながら, 細胞骨格タンパク質の発現と皮層張力の関係についての詳細は, 明らかにされていない.

以上のように, 解離胚細胞における細胞選別過程のダイナミズムについての研究は, 熱力学的な数理解析を含めこれまでに継続的に行われてきたが, 細胞の接着性を担うカドヘリンと細胞の収縮力を調節するアクトミオシン系の関連については未解明な部分が多く残っている. 筆者は, アフリカツメガエル胚の原腸胚初期の動物極側細胞 (animal pole cell, AC) と植物極側細胞 (vegetal pole cell, VC) を用いた解離-再集合系により, 胚細胞間相互作用に注目し, 解離胚細胞の振る舞いについてさらなる理解を試みた.

第二章では, 解離した AC と VC の混合培養を行い, 時間的, 空間的な配置変化を形態学的に解析し, AC と VC の細胞選別過程が二段階からなることを見いだした. 初めは, 無差別に集合し, 再集合塊を形成していたが, やがて AC と VC はそれぞれの由来に従って選別が行われクラスターを形成し, その後 AC クラスタが VC クラスタによって囲まれる同心円状の配置となることが観察された. そして, 二つのクラスターは, 徐々に再配置し, 上下に極性化した配置となることが示された. 筆者は, それぞれの段階を同心円化過程, 極性化過程と名付けた. 本研究における「細胞選別過程」の定義は, クラスタの配置変化過程を示している. このような細胞選別過程で連続的に進行する細胞集団の配置変化については, 過去の先行研究ではほとんど言及されておらず, 本実験系において再集合塊内の胚細胞の振る舞いを明らかにすることは, 細胞選別の動態の解明に繋がることが期待された. また付随発見として AC, VC 再集合塊は, 長期培養下では, AC クラスタに成熟した軟骨組織が構築されており, AC と VC との間で “Nieuwkoop の中胚葉誘導” (Nieuwkoop, 1969) と同等の現象が起こっていることが示唆され, 培養下においても胚細胞間相互作用が正常に作用していることが示された. 以下のように, 細胞選別現象において重要なカドヘリンとアクチンフィラメントの発現変化に注目した. 原腸胚期の *Xenopus laevis* 胚における二種のカドヘリン, すなわ

ち、胚内にユビキタスに発現する母性 (maternal) カドヘリンである C-カドヘリンと、原腸胚期から外胚葉細胞にのみ発現する、胚性 (zygotitc) カドヘリン、E-カドヘリンの発現を調べたところ、本実験系のクラスター形成においても、両カドヘリンの *in vivo* での発現が維持されていることが明らかとなった。さらに、カドヘリン発現の定量的解析の結果、二段階の細胞選別過程を通して、増加傾向が見られたことから、同心円化過程のみならず、その後の再集合塊の形態維持にもカドヘリンが関与していることが示唆された。しかし、極性化過程でクラスターの再配置に伴って見られた、接着力が増加したという事実は、DAH による解釈とは矛盾しており、接着性のみではクラスターの配置変化を説明することは難しいと考えられた。一方、アクチンフィラメントの発現を調べたところ、AC クラスター辺縁で束状にアクチンが集積する様子が同心円化過程で観察され、クラスターの再配置に伴って低下することが示された。これより、AC クラスター辺縁に集積したアクチンの発現変化が、クラスターの再配置を説明する現象と推察された。

以上より、第二章では、*Xenopus laevis* 胚の原腸胚期胚細胞から得た AC と VC を再集合させることで胚細胞間相互作用を再現させることが可能であり、細胞選別過程は、同心円化過程、極性化過程と段階的に進行することが明らかとなった。

そこで、第三章では、このような配置変化が何によって調節されているのかに着目し、クラスターの配置決定と細胞の収縮力の関与、また、AC と VC 間で作用している中胚葉誘導因子である TGF- β シグナルと細胞選別過程の関与について検証した。筆者は、前章で述べたとおり、細胞の収縮力を調節するアクトミオシン系が細胞選別過程における細胞の挙動の変化に関わるのではないかという推論に基づき、まず、ミオシン II の働きを抑制あるいは、促進する実験を同心円化過程、極性化過程のそれぞれにおいて行った。Zebrafish 胚の胚葉細胞を用いた細胞選別解析で、同心円化の進行にはミオシン II を介した収縮力の調節が必要であることが明らかとなっている (Krieg et al., 2008)。まず、同心円化過程において、blebbistatin や Y27632 を用い、ミオシン II に対して抑制的な処理を施すと、クラスターはランダムな配置のままとどまっておき選別の進行が抑制されていることが分かった。一方、RhoA を活性化させることによって、ミオシン II の働きを間接的に促進させる Rac1 に対する阻害剤 NSC23766 を施すと、同心円化の進行が促進されていた。これらは、同心円化過程における収縮力の必要性を示唆しており、すでに報告されている細胞選別の進行と細胞皮層の収縮との関連 (Krieg et al., 2008) を支持する結果であった。また、極性化過程で、ミオシン II に対して同様の処理を施したところ、どの阻害処理においてもクラスターは、再配置を進行しておらず同心円状のままであったことから、極性化過程においても細胞の収縮力は必要な要因であ

り、且つ、適切な収縮力の調節が必要であることが示唆された。二段階のクラスターの配置変化と細胞皮層の収縮力との関連が明らかにできたことは、細胞選別のダイナミズムを明らかにする上で非常に有意義であったと考えている。今後、クラスターを構成する細胞の収縮力と接着力の相関やクラスターに生じる表面張力の実態を詳細に解析する必要があると考える。

AC と VC を再集合させ長期培養を行うと、AC クラスターが中胚葉組織への分化を進行しており、VC から、中胚葉誘導因子である、TGF- β 系シグナル (activin/Nodal/TGF- β) が作用していることが示唆されている (Okabayashi and Asashima, 2003; Furue et al., 2002; Fukui et al., 2003)。細胞選別過程の進行と以上のような胚細胞間相互作用との関与については、明らかになっておらず、その点に注目し解析を行った。TGF- β 系シグナルは細胞の増殖や分化、アポトーシスの制御等に深く関わっている (Schier 2003)。TGF- β やアクチビンのシグナルは、smad2/3 のリン酸化によって伝達されることが分かっているが (Ho et al., 2006)、TGF- β を介した smad 非依存的に細胞骨格系の再構築を促すことも知られている (Pellegrin and Mellor, 2007; Papadimitriou et al., 2011)。また、Zebrafish 胚における細胞選別解析において、TGF- β 系シグナルが細胞皮層張力を低下させるという報告があり (Krieg et al., 2008)、本実験系においても、AC と VC の TGF- β 系シグナルを介した相互作用がクラスターの配置変化に影響していることを期待した。そこで、AC と VC 間で作用している TGF- β 系シグナル経路に、Alk (activin receptor kinase) 4/5/7 を特異的に阻害する SB431542 (Inman et al., 2002; Ho et al., 2006) を用い、細胞選別過程の進行への影響を検証した。その結果、TGF- β 系シグナルはクラスターの同心円化に対して抑制的に作用し、クラスターの極性を誘導する因子であることが考えられた。それは、TGF- β 系シグナルが VC から濃度依存的に AC の細胞の収縮力を引き起こす皮層アクチンに対して抑制的に作用していることが示唆された。しかし、そのような TGF- β 系シグナルとアクトミオシン系との相関を示すアクチンやミオシン II の局在や活性の変化は明らかになっておらず、更なる細胞生物学的解析に加え、力学的な解析の知見も期待される。

本実験系で明らかとなった二段階の細胞選別過程より、クラスターの再配置に伴って見られたカドヘリンの発現増加やアクチンフィラメントの集積は、細胞が徐々に変化し細胞集団の分離へと繋がることを示唆していた。二段階の細胞選別過程は、それぞれ細胞の収縮力が必要な要因であり、中胚葉誘導因子である activin/Nodal/TGF- β シグナルの関与が明らかとなった。クラスターの配置は、空間的に区別されていたが、TGF- β 系シグナルの作用によって進行する連続的な現象であり、さらに組織構築も進行することが明らかとなった。本研究では、経時的、空間的に胚葉細胞の振る舞いの変

化を捉えることにより、形態学的、細胞生物学的に細胞選別過程の進行を詳細に記述することができたと考える。

第二章

原腸胚期から解離・再集合した *Xenopus laevis* 胚細胞の細胞選別は、同心円化過程、極性化過程と段階的に進行する

要旨

筆者は、原腸胚初期の *Xenopus laevis* 胚細胞由来の解離した動物極側細胞 (animal pole cells, AC) と植物極側細胞 (vegetal pole cells, VC) を用い解離再集合系により、細胞間相互作用を時空間的に詳細に記述することで、細胞選別の理解を深めることを試みた。正確な胚葉の由来を知るためには、二細胞期に Dextran rhodamine を注入した胚を用いた。その結果、筆者は、細胞選別過程が二段階に分かれることを見だし、それぞれを“同心円化過程”と“極性化過程”とした。胚細胞が再集合しまもなく、細胞選別が開始され、再集合塊内に、AC 同士、あるいは VC 同士からなるクラスターが形成された。培養 2.5 時間後は、両クラスターは再集合塊内でランダムに配置していたが、5 時間後には、それぞれ大きなクラスターを形成し、AC クラスターが VC クラスターに囲まれ、同心円状に配置していた。そして、7.5 時間から 12 時間後の間に AC と VC クラスターは、上下方向に配置を変化させ極性化し、*in vivo* と類似した胚葉の配置をとった。このような細胞選別過程の免疫組織学的解析では、*in vivo* と同様、AC は、C-、E-カドヘリンの両方を発現、選別過程後も発現を維持しており VC は、C-カドヘリンのみを発現していた。これより、両カドヘリンは、*in vitro* における形態形成に大きく関与していることが示唆された。一方、アクチンフィラメントの局在からは、同心円化が完了するまで、AC クラスター辺縁に強くアクチンの束が集積し、その後は、徐々に低下することが示された。このような皮層アクチンの低下は、クラスターの極性化に関与していることが推測された。さらに、もう一つ重要な発見として、再集合塊を 7 日間培養すると、AC クラスターには成熟した軟骨組織が形成されていたことから、AC と VC 間でも *in vivo* と同等の誘導的相互作用が働くことが示唆された。このように、原腸胚期の *Xenopus laevis* 胚由来である AC と VC は、再集合塊内で同心円化過程、極性化過程を経て、正常な発生過程と同様の軟骨分化へと進行することが明らかとなり、本実験系に

おいては少なくとも7日間の培養条件下で生存可能であり, 胚葉間の相互作用を解析する実験系として有用であることが明らかとなった.

序論

解離された後生動物の細胞は、本来、互いを選別する潜在的な能力を有しており、形態形成の原理を解明するためのモデルとして広く研究されてきた。例えば、解離したヒドラの胚細胞は、再集合し正常な胚を構成することが報告されており (Gierer et al., 1972; Takaku et al., 2005)、解離されたニワトリ胚の枝芽細胞は、互いを選別し (Ide et al., 1994)、遠近の軸を形成することがすでに報告されている (Yajima et al., 1999; Yajima et al., 2002)。

両生類の初期胚においては、異なる胚葉由来の解離細胞が無差別に集合し、正常な組織を再構築することが広く知られている (Townes and Holtfreter, 1955)。その中で、細胞接着分子カドヘリンが *Xenopus laevis* 胚の細胞選別において重要な役割を担っているということは、知られているが (Niessen and Gumbiner, 2002; Marsden and Desimone, 2003)、細胞選別過程全体の動態は、まだ詳しく知られていない。筆者は、原腸胚初期から得た AC と VC の混合培養を行い、二細胞期の胚を Dextran rhodamine により標識し、由来となる胚細胞の追跡を行い、個々の細胞の振舞いに注目した。*Xenopus laevis* 胚は、部位特異性が中期胞胚期以前から生じるようになり、選別の振舞いが発生の進行に伴って顕著となる (Wylie et al., 1987; Turner et al., 1989)。一方、胚葉の細分化は原腸胚初期では、まだ大きく進行しておらず (Winklbauer et al., 1996a; Keller et al., 2000)、解析に用いやすい時期であった。

本研究では、カドヘリンとアクチンの二種類の高分子が *in vitro* 系の再集合塊でどのように発現するのかにも注目した。カドヘリンに関しては、原腸胚期の *Xenopus laevis* 胚において発現することが知られている C-カドヘリンと E-カドヘリン (Choi and Gumbiner, 1989; Choi et al., 1990; Levi et al., 1991a; Levi et al., 1991b) の免疫組織化学的解析を行った。また、*Xenopus laevis* 胚の初期胚では、胞胚期から神経胚期にかけて形態形成運動が起こり、胚葉のダイナミックな再配置が進行する (Keller et al., 2000; Stubbs et al., 2006)。そこで、高い運動能を有していることが推測された AC と VC は、本実験系の後半で見られたクラスターの再配置時に、それぞれの運動能を発揮することを期待し、細胞の形態や細胞移動の制御を行い、カドヘリンの裏打ち膜タンパクでもある細胞骨格タンパク質、アクチンフィラメント (Tao et al., 2007) の発現解析を行った。

解離した AC と VC は、混合培養を行うと、再集合し同心円状に配置し、その後、二つのクラスターは互いに上下に配置を変化させ極性化した。このように、実験結果は、AC

と VC の細胞選別過程が二段階に分かれるということを示した。さらに、長期培養下では、AC クラスターは中胚葉組織へと分化しており、細胞選別過程から始まったこの解離再集合系では、AC と VC 間で “Nieuwkoop の中胚葉誘導” がもたらされていることが示された。C-, E-カドヘリンの発現パターンは、*in vivo* の胚葉特異的な発現パターンと一致し、束状のアクチンの発現は、選別の進行中、AC クラスター辺縁に局在し極性化と共に低下する傾向が見られた。これらの結果は、本研究で用いている解離再集合系が、胚葉体の相互作用を解析する系として有用であることを示唆している。

材料と方法

胚

Xenopus laevis は、雌雄ともに佐藤養殖（千葉，日本）より購入し、胚は人工媒精法によって得た。メスに産卵予定時刻の約 10 時間前に HCG (Gonotropin, Asuka Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan) 800 単位を注射，23°C 下に置いた。雌の下腹部を圧迫して絞り出した未受精卵に精子懸濁液をかけ，受精卵を得た後に，10% Steinberg (1×Steinberg; 58 mM NaCl, 0.67 mM KCl, 0.34 mM Ca(NO₃)₂·4H₂O, 0.83mM MgSO₄·7H₂O, 10 mM HEPES, pH 7.3, 23°C) で飼育した。精子懸濁液は，雄の腹部を切開し摘出した一対の精巣を De Boer 液中 (110 mM NaCl, 1.3 mM KCl, 0.45 mM CaCl₂, 3 mM HEPES, pH 7.3 at 23°C) で細かく切り刻み調製した。胚の発生段階は，Nieuwkoop and Faber (1956) によった。

解離細胞の調製と解離細胞選別解析

原腸胚初期に，未標識胚と標識胚からゼリー層と受精膜を取り除き，動物極側部位と植物極側部位を eye brow knife とタングステンニードルによって切除し，50 µg/µl gentamycin を含んだ Ca²⁺-(and) Mg²⁺-free Modified Barth Saline (1×CMF-MBS; 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 5 mM HEPES, 2.5 mM NaHCO₃, pH 7.8, 23°C) 中で約 1 時間静置し，2~3 回ピペッティングし細胞を解離した。動物極側部位は，解離にくい outer layer を除き，inner layer のみを使用した。5 個体の胚から解離した動物極側細胞 (animal cell, AC) と植物極側細胞 (vegetal cell, VC) を等比 (容量比) になるよう混合し，agar でコートした 4 穴 well (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Denmark) にスポットし，1×MBS 中で 1 時間旋回培養 (70 rpm, 23°C) を行った後に静置培養を (23°C) 開始した。形成された再集合塊は，経時的に実体顕微鏡下で観察を行った後に，2.5, 5, 7.5, 12, 24, 48, 72, 96, 120 時間で MEMFA (0.1 M MOPS (pH 7.4), 2 mM EGTA, 1mM MgSO₄, 3.7% formaldehyde) 固定 (Harland. 1991; Sive et al., 1998) を行った (30 min, 室温)。その後，エタノールに置換し脱水，キシレンによる透徹，パラフィン (Shandon Histoplast, Thermo Scientific, Cheshire, UK) 包埋を行った。再集合塊の長期培養を行う際には，12 時間ごとに 1×MBS で培地交換を行った。

Dextran rhodamine 標識による細胞追跡

受精後、ゼリー層を除去し、二細胞期の胚を4% Ficoll in 10%steinbergへ移し、1% Dextran rhodamine (DR, D3312, Molecular Probes, Eugene, USA) 10nl をキャリブレーションし両割球へ動物極側からそれぞれ注入し、原腸胚初期まで発生させる。標識胚細胞と未標識胚細胞から成る再集合塊を異なる時間まで培養し、4% paraformaldehyde in amphibian Ca^{2+} -(and) Mg^{2+} -free CMF-PBS (6.4 g NaCl, 0.2 g KCl, 2.9 g $\text{NaHPO}_3 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g KH_2PO_4 , 200 ml water) の切片 (4 μm)を作成、脱パラフィン処理を行い、DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Polyscience) による核染色を行い、Fluoromount (Diagnostic Biosystems, Pleasanton, USA) で封入し、落射型蛍光顕微鏡 (OLYMPUS BX50, Tokyo, Japan) で観察を行った。

組織学的解析

パラフィン切片(4 μm) を脱パラフィン処理し、アルシアンブルー染色を行った。

免疫蛍光抗体染色

AC, VC の再集合塊の切片 (4 μm) を脱パラフィン処理し、CMF-PBS で3回濯ぎ、1% normal house serum (NHS) in CMF-PBS でブロッキングの後 (RT, 20 min), 一次抗体を滴下し、インキュベートした (4°C, overnight). そののち、CMF-PBS 洗浄し、二次抗体を滴下しインキュベートした (RT, 2 h). CMF-PBS 洗浄し、DAPI により核染色を行った後に、Fluoromount で封入し落射型蛍光顕微鏡で観察を行った。一次抗体は、抗 E-cadherin モノクローナル抗体 (supernatant 5D3, Developmental Study Hybridoma Bank, Iowa, USA, 1/3 dilution), 抗 C-cadherin モノクローナル抗体 (supernatant 6B6, Developmental Study Hybridoma Bank, Iowa, USA, 1/2 dilution), 抗 actin モノクローナル抗体 (MAB1501, Millipore, Billerica, USA, 1:100 dilution); 二次抗体は、Alexa 488 標識 goat anti-mouse IgG2b (A21141; Molecular Probes, Eugene, USA, 1:500 dilution)と Alexa 594 標識 goat anti-mouse IgG₁ (A21125; Molecular Probes, Eugene, USA, 1:1500 dilution) を使用した。クラスター辺縁のアクチンの染色強度は、image J (National Institute of Health, USA) により解析するこ

とで比較した.

ウェスタンブロット解析

胚 (stage 10.5, 12.5, 15, 19, 21), 再集合塊は, extraction buffer (amphibian CMF-PBS, 1%tritonX-100, 20 units/ml aprotinin (BAYER), 1 mM EDTA)に 2 mM DFPを加え, タンパク抽出を行った. 10個体の胚, 20サンプルの再集合塊をホモジェナイズしてタンパク抽出液を得た. 上清はタンパク量をそろえ, 等量の 5% 2-mercaptoethanolを含んだ Laemmli's 2 x sample bufferを加え, 加熱処理し (90°C, 2 min), 8% ポリアクリルアミドゲルで泳動を行った (60 mA, 60 min). ゲルは, セミドライブロットティング装置 (Nihon Eido Co., Ltd., Tokyo, Japan) を利用し, PVDV 膜 (Millipore, Billerica, USA) への転写を行った (100 mA, 3 h). メンブレンは, 1% NHS in PBT でブロッキングを行い (RT, 40 min), 一次抗体を 4°C 中で反応させた. 一次抗体は, 抗 E-cadherin モノクローナル抗体 (supernatant 5D3, Developmental Study Hybridoma Bank, Iowa, 1/10 dilution), 抗 C-cadherin モノクローナル抗体 (supernatant 6B6, Developmental Study Hybridoma Bank, Iowa, 1/10 dilution), 抗 β -チューブリン抗体 (T4026; Sigma, St. Louis, USA, 1:1000 dilution)を使用した. 二次抗体は, HRP 標識 mouse immunoglobulin (P0161; Dako, 1:3000 dilution)を使用し, 室温で 2 時間インキュベートした. 二次抗体は, DAB 反応液 (0.2% 3,3'-Diaminobendine, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4))に 30% H₂O₂を 8 μ l加え検出を行った. バンドの濃さは image J を用いて定量的な比較を行った.

再集合塊の三次元解析

再集合塊の 20 μ m のパラフィン切片を作成し, アクチン抗体染色を行い, 二次抗体として Alexa 488 標識 goat anti-mouse IgG1 (A21121; Molecular Probes, 1:500 dilution) を用いた. 水浸レンズを装着した共焦点レンズ顕微鏡 Leica TCS SP5 (Leica Microsystem, Wetzlar, Germany) を使用して観察した. 全ての写真は, 1024 \times 1024 pixel で撮り, 1.5 μ m stack の光学的スライスを統合し, X 軸方向, Y 軸方向に傾けた.

結果

細胞選別解析における解離胚細胞の空間的配置変化

Townes や Holtfreter らによって発見された「細胞選別能」については、様々な興味深い現象が示されている。そこで筆者は、*Xenopus laevis* 胚の原腸胚初期から得た AC, VC を用い、混合培養における解離胚細胞の振舞いに注目した。

この解離再集合系において、解離胚細胞の配置決定を明らかにするために、dextran rhodamine 標識胚細胞を用い、経時的な細胞選別のパターンを可視化した (図 1)。同じ由来の胚細胞を混合すると (図 1A-F), AC, VC いずれの再集合塊においても細胞はランダムな配置のままであり、選別が標識の有無に影響されないこと、同じ由来の胚細胞は、互いを認識できることを確認した。AC 再集合塊は、時間経過に伴いほぼ球状に近づくのに対し (図 1A-C), VC 再集合塊では、全体的に扁平であり、辺縁で凹凸が目立った (図 1D-F)。空間的な細胞の配置を捉えるため、静置培養の際に、agar に接する面に対し水平 (図 1G-I) または、垂直方向 (図 1J-M) に切片を作成した。培養 2.5 時間では、AC と VC それぞれがクラスターを形成し混在した配置となっていた (図 1G)。次第に、それぞれが自己集合し大きなクラスターとなり、同心円化し、AC クラスターは中央に、VC クラスターがそれを取り囲むように配置し、これより細胞選別の進行が示唆された (図 1H, I)。さらに、興味深いことに、垂直切片では、培養 7.5 時間辺りから AC が上方に、VC が下方に多く位置し (図 1J-L)、培養 12 時間では、二つのクラスターが上下方向に再配置することが明らかとなった (図 1M)。垂直切片を作成することでより明らかとなったクラスターの配置変化を模式化して示した (Fig. 1N-Q)、原腸胚初期の胚葉細胞における細胞選別過程は、同心円化と極性化の二段階に区分されることが示された。

再集合塊内におけるカドヘリンの発現パターン

in vitro 系である本実験系において、細胞間接着分子カドヘリンの発現を免疫組織学的に調べた (図 2)。*Xenopus laevis* 胚では、マターナルなカドヘリンである C-カドヘリンが初期発生段階でユビキタスに発現しており (Choi et al., 1990, Levi et al., 1991a), E-カドヘリンが原腸胚期から外胚葉細胞にのみ発現を開始する (Choi and Gumbiner, 1989)。C-カドヘリンは、培養 2.5 時間では AC の細胞膜に沿って点状に見られ、E-カドヘリンの発現も弱かった (図 2A)。培養 5 時間以降、どちらのカドヘリンも

ACの細胞膜に沿って線状に発現するようになり、特に、培養7.5, 12時間では発現が増加しているように見られた(図2B, C, D)。また、内胚葉性の細胞であるVCでは、C-カドヘリンのみが弱いながらも、胚内の発現と同様に常に検出され、クラスターにおけるカドヘリンの発現パターンの差は明らかだった。再集合塊内のクラスターの境界は図2下段に点線で明示した。そこで、再集合塊における両カドヘリンの発現量をWestern blot法を用いて定量的に解析した(図3)。ACクラスターとVCクラスターを別々に解析することは難しかったため、集合塊全体からの抽出画分での比較になるが、クラスターの極性化に伴ってC-カドヘリン(図3A, B)、E-カドヘリン(図3C, D)の発現が増加しており、再集合塊の形態が時間経過に伴って球状化することと一致していた。さらに、接着力の増加や両カドヘリンの発現が持続していることから、極性化段階における再集合塊の形態維持においても、カドヘリンの発現が重要であることが示唆された。接着性に関しては考察で詳しく述べることとする。

クラスター表面のアクチンフィラメントの発現

クラスターの再配置にとっては、仮足を出している細胞の存在や仮足の方向性が重要な要因であると考え、アクチンフィラメントを含む仮足の有無を調べた(図4)。ACでは、細胞膜直下での発現が認められたが、VCにおける発現は弱かった(図4A-D)。培養2.5時間では、ACクラスターの辺縁に束状の発現が確認でき(図4A, 黄矢じり)、5時間(図4B, 黄矢じり)、7.5時間(図4C, 黄矢じり)と徐々に見られなくなっていた。極性化が完了した培養12時間では、再集合塊全体が密着し、クラスター間の隙間がなくなり、それに伴って、再集合塊の外縁に束状のアクチンが発現するようになった(図4D, 白矢じり)。このように、クラスターの再配列が進行すると考えられる培養5時間から7.5時間では、予想していたような細胞集団の積極的な移動を示唆する仮足やアクチンの発現の局在は確認できず、代わりに、ACクラスター辺縁に見られる束状のアクチンの発現が少なくとも7.5時間まで持続的に見られ、それは徐々に低下していることが示された。この可能性は、ACクラスター辺縁のアクチンフィラメントの染色強度のimage Jによる計測からも確認することができた(図4E)。

次に、どのようにアクチンの束状の発現がACクラスターに局在しているのかを知るために、切片作成時の衝撃による人為的結果を最小限にできる、共焦点レーザー顕微鏡を用い、20 μm 切片におけるアクチンフィラメントの発現を三次元解析した(図5)。1.5 μm stackの光学的スライスを10-15枚統合し(図5A, D, G)、それぞれをX軸方向に

40° (図 5B, E, H), あるいは Y 軸方向 (図 5C, F, I) に 35° 傾けることで, クラスタ表面の Z 軸方向におけるアクチンフィラメントの発現を示した. 静置培養 2.5 時間後では, AC と VC それぞれが形成したクラスタ間に間隙が目立っていたが (図 5A, 白矢じり), 徐々にクラスタは密着し, その隙間は目立たなくなる (図 5, 黄矢じり). クラスタの間隙部分で, AC クラスタ縁に沿ったアクチンフィラメントの集積を確認することができ, 培養 2.5 時間に Z 軸方向の発現が見られ (図 5B, 白矢じり), それ以降も 5 時間, 7.5 時間後では, そのような集積は低下していた (図 5G, H, 白矢じり). このように, アクチンの集積は, AC クラスタを取り囲むように起こり, クラスタの極性化に伴って低下していくことが確認された.

再集合塊内部の形状の経時変化

AC と VC を混合し静置培養を開始すると, 初めは, ランダムな配置で扁平な再集合塊は, 次第に球状化してゆく (図 6A-D). 静置培養開始 12 時間以降では, クラスタの再配置が完了し, 色素を持つ AC が再集合塊の上方に目立ち, *in vivo* の外胚葉と内胚葉の相対的位置関係を再現していると考えられた (図 6E-G). このことは Dextran rhodamine によって標識した AC を用いた 48 時間後の再集合塊は, 両クラスタが上下方向に配置していることから確認された (図 6H). 静置培養開始 96 時間後では, AC クラスタから不透明な組織が現れ (図 6I, 矢じり) 徐々に拡大した (図 6J, 矢じり). この再集合塊を MEMFA 固定し, パラフィン切片を作製, Alcian blue 染色を行った結果, 不透明な組織の実体は成熟した軟骨組織であると思われた (図 6K, 矢印, L).

考察

AC と VC の細胞選別過程は、同心円化過程、極性化過程の二段階からなる

Xenopus laevis 胚の原腸胚初期から得た AC と VC による解離再集合系では、細胞選別過程が同心円化過程、極性化過程の二段階に分けられることが示唆された (図 1). 細胞選別過程前半で、胚細胞は先行研究の知見通り同心円状に配置し、その後、AC, VC クラスターの再配置によって、*in vivo* で見られる極性を持った胚葉の配置を再現した. 再集合塊内に極性化した胚葉体が構築されるのは、約半日の時間を要しており、また、この *in vitro* 系における胚葉体形成の進行は、非常にゆっくりである. 軟骨組織の形成が明らかになる 96 時間後に正常胚は、すでに幼生となり泳ぎ回ることが可能な時期であり、発生の進行の遅延は明らかだが、再集合塊の長期培養の結果、致死に至ることなく、*in vivo* と同様の組織分化が進行している. 胚細胞が、細胞選別と胚発生を分けることによって、潜在的な順応性を持つことは注目すべきことだと考える.

AC クラスターと VC クラスターの再配置に伴ったカドヘリン発現の増加

細胞選別は、ホモフィリックな結合を行う細胞接着分子カドヘリンによって行われており、さらに、このような親和性によって、組織境界の形成や細胞集団の分離が生じているとされる (Takeichi, 1988; Nose et al., 1988). *Xenopus laevis* 胚は、胞胚中期頃から部位特異性が現れ始め、選別能を持ち、発生の進行と共に顕著になり (Wylie et al., 1987; Turner et al., 1989), カドヘリンは、胚葉の特異性を進行させる上で大きな役割を担っていると考えられる. そして、母性 (maternal) カドヘリンである C-カドヘリンが胚全体にユビキタスに発現するのに加え、原腸胚期からは、胚性 (zygotic) カドヘリンである E-カドヘリンが外胚葉細胞にのみ発現を開始する (Choi and Gumbiner, 1989; Choi et al., 1990; Levi et al., 1991a; Levi et al., 1991b). 再集合塊内で、外胚葉由来の AC では両方のカドヘリンを発現しており、内胚葉由来の VC は、C-カドヘリンのみを発現していた.

本研究では、細胞選別の進行のホモフィリックな結合依存性については未検討であるが、同じ由来の胚細胞が再集合しクラスターを形成することで、*in vivo* で見られるような接着パターンの再現を示した (図. 2). また、AC では二種のカドヘリンを強く発現しているため、VC に比べ接着力が強いことが推測され、それが AC クラスターと VC ク

クラスターが選別過程で、混じり合わない要因の一つであると考えられる。クラスターが同心円状の配置となることは、細胞選別が接着性の相対的な強さによって決定され、強い接着性を持つ細胞が中央部を占め、弱い接着性の細胞は、その周囲に位置し、ここでは VC が AC を取り囲むという、Differential Adhesion Hypothesis, DAH (Foty and Steinberg, 2005; Steinberg, 2007)を支持する結果と言える。本実験系では、クラスターが再配置した後も、両方のカドヘリンの発現は持続しており (図. 2), 再集合塊の形態の維持に関わっていることが示唆された。極性化後の AC クラスターは、同心円化完了後に中央に位置する AC クラスターに比べ、カドヘリンの発現の増加を示していた。また、western blot 法による定量的な解析からも、C-カドヘリン、E-カドヘリンどちらもクラスターの再配置に伴って発現量の増加傾向が示された (図. 3)。正常胚の発現については、マターナルな発現を示す C-カドヘリンは、原腸胚期では、増減に大きな変化は見られず、一方、原腸胚期から発現を開始する E-カドヘリンは、発生 の 進 行 に 伴 っ て 増 加 する傾向が見られる (not shown, Nandadasa et al., 2009)。これより、少なくとも、C-カドヘリンの増加は、この培養系に特異的な現象であると考えられた。しかし、クラスターの極性化が何に起因しているかという疑問に答えることは難しかった。Foty らは、二つの細胞集団が並ぶためには、それぞれを構成する細胞が生じる接着エネルギーが等しくなると仮定しており (Foty and Steinberg, 2004)、この説に従うと、クラスターの極性化が進行するにつれて、AC クラスターの接着力減少と VC クラスターの接着力増加が考えられた。しかし、筆者が示したカドヘリンの増加傾向という事実と VC における非常に弱い C-カドヘリンの発現からは、極性化という現象を細胞接着性に関する結果のみで説明することは難しいと思われる。細胞選別は、異なるカドヘリン間で行われたり、ホモフィリックとヘテロフィリックの結合が同等に行われる場合があったりと (Niessen and Gumbiner, 2002)、接着性や細胞集団の強さは、カドヘリンの細胞間結合のみによって完全に決定されておらず、細胞選別を制御する他の要因も考えられる (Lecuit and Lennen, 2007)。

AC クラスターと VC クラスターの再配置は、表面張力の変化によって調節されているのか？

筆者は、クラスターの再配置へのカドヘリンの関与を保留にしたまま、細胞集団の同心円化から極性化へと再配置をもたらす要因を明らかにするために、細胞運動に重要

な要素の一つである細胞骨格タンパク質アクチンの局在を調べた。

Xenopus laevis 胚の原腸形成期に、形態形成運動が細胞集団の活発な再配置によって行われている (Winklbauer et al., 1996). 筆者は、この開始時期に原腸胚細胞を使用しているため、この高い運動能が特に極性化過程で再現されていることを期待した。しかし、免疫組織学的解析からは (図 4)、このような仮説を直接指示する結果は得られなかった。アクチンフィラメントの発現は、極性化過程を含めた細胞選別過程全体を通して低下し続けていたが、我々が使用した光学的な解析手法の解像度が低かったために、仮足が見られなかったことも考えられる。

そして、原腸胚期に中胚葉陥入が進行する際に、細胞集団の足場として豊富に存在する細胞外マトリックスであるフィブロネクチンの発現について調べた (Winklbauer and Keller, 1996). しかし、培養7.5時間までクラスター境界では確認されず、極性化が完了した培養12時間以降に、ACクラスターを囲むような発現が見られ始めた (未発表データ). フィブロネクチンは、クラスターの再配列には直接的には関与せず、むしろACクラスターの分化が進行する際に、組織の境界として現れること (Davidson et al., 2004) が報告されている。細胞移動を示唆するようなアクチンの発現は確認できなかったが、その代わりに、同心円化が完了するまで、ACクラスター辺縁に束状のアクチンフィラメントの集積が観察された (図4). このようなアクチンの集積は、zebrafish胚の胚葉細胞を用いた細胞選別解析で、胚葉の表面張力に依存して、特に表面張力の大きな外胚葉表面に現れるアクチンの集積と形態学的な様相が酷似していた (Schotz et al., 2008; Krieg et al., 2008). そのため、*Xenopus laevis*胚の解離再集合系においても、その同心円化過程では、zebrafish胚の外胚葉と同様に、強い張力を生じている細胞集団で、アクチンが束状に発現することが推測された。細胞集団の表面には、表面積を小さくしようとする力、表面張力が生じており (Lecuit and Lenne, 2007)、両生類の初期胚期ではHoltfreterの示していた、胚葉細胞が持つ“tissue affinity”がそのような組織の表面張力へと反映されている (Townes and Holtfreter, 1955; Davis et al., 1997). 細胞の接着性に依存した表面張力は、細胞選別後の細胞集団の階層性を決定しており、大きな張力を生じているクラスターが弱い張力を生じるクラスターによって囲まれる (Foty and Steinberg, 2004; Foty and Steinberg, 2005). これより、本実験系の同心円化構造では、ACクラスターに大きな張力が生じ、二つのクラスターの表面張力に差が生じていると推測された。

本培養系の後半期 (5 時間以降) における、AC クラスター辺縁で見られた束状のアクチンの減少傾向は、クラスターの極性化に伴う現象として注目に値する。現に、アクチンフィラメントの発現強度を計測しピークを比較すると、極性化に伴ってアクチンの

集積が低下していることが明らかとなった (図 4E). さらに, 共焦点レーザー顕微鏡を用いて, 再集合塊内の立体的な解析を試みると (図 5), AC クラスター辺縁では, アクチンフィラメントの集積が Z 軸に沿って生じており, 皮層アクチンがクラスターを囲むように存在し, 且つ, このような発現が極性化に伴って低下していることも確認された. 束状のアクチンの発現がクラスターに生じる表面張力に依存しているとするならば, AC クラスター辺縁のアクチンの発現低下は, 表面張力の低下を表していることになる. 筆者は今のところ, 同心円状に配置していた二つの, 主に AC クラスターの表面張力が低下しそれに伴い VC クラスターの表面張力も増加し増加し, 差がなくなることによって極性化できると考えている.

DAH では, 組織の表面張力は, 細胞の接着性に比例すると言われている一方で, 個々の細胞の界面張力が組織の表面張力の制御に関わるという differential interfacial tension hypothesis, DITH (Harris, et al., 1976) も提唱されており, 近年では, 組織の表面張力の決定には, 細胞の接着性と皮層張力のバランスが重要であることが報告されている (Lecuit and Lenne, 2007; Krieg et al., 2008; Manning et al., 2010). 関連した情報の統合をする上でも細胞の接着性と表面張力の相関関係について, さらに詳細な解析が必要である.

極性化はさておき, 再集合塊全体像に注目してみると, クラスターの極性化が完了すると, 再集合塊全体は密着し, クラスター間の間隙がほとんど見られなくなり, 再集合塊の外縁でアクチンの集積が目立つようになった (図4D). これは, 再配置完了後の再集合塊は, 集合塊の表面で高い張力を生じるようになり, ACクラスターで見られたような束状のアクチンの発現が生じているのかもしれない.

細胞選別過程は, AC と VC の誘導的相互作用を介した組織分化へと続くことが可能である

Xenopus laevis 胚の胞胚期から原腸胚期に得た解離胚細胞を用いた細胞選別解析では, 主に, *in vivo*において胚葉の決定因子の関与あるいは, 外因誘導因子による影響が調べられてきた (Turner et al., 1989; Kuroda et al., 1999). 本研究では, これらの先行研究と同じ発生段階の胚を用いて解析を行ない, 細胞選別過程の詳細な時間的記述として, 再集合塊を7日間の長期培養を行った. 静置培養開始12時間後までに極性化が完了し, ACクラスターは, 非常にゆっくりと *in vivo*と同様の軟骨組織へと分化していた (図. 6). 両生類の初期胚から胚葉細胞を解離し混合培養を行うと, 再集合した胚葉

細胞は選別を行い、その結果、由来となった胚葉に特徴的な組織を構築することが知られている (Townes and Holtfreter, 1955). ACは、胞胚期から原腸胚初期にかけて blastocoelic roof (アニマルキャップ) とよばれる予定外胚葉域に含まれており、多分化能を有している. アニマルキャップは、中胚葉誘導活性を有するTGF- β ファミリーのアクチビンAによって処理を行うと、濃度依存的に中胚葉や内胚葉の組織へと分化することが知られている (Okabayashi and Asashima, 2003) 100ng/mlのアクチビンで処理を行うと、軟骨組織へ分化することが報告されており (Furue et al., 2002; Fukui et al., 2003). 以上の先行研究による知見を合わせて考えて、本研究での原腸胚期のAC, VC解離-再集合系においても、ACとVC間のTGF- β シグナルが相互作用を仲介し中胚葉組織である軟骨組織へ分化することが推察された.

結論として、*Xenopus laevis*胚の原腸胚初期のACとVCを混合した細胞選別の過程は、同心円化と極性化に二分できるされることが示された. そこでは、胚葉で見られるカドヘリンの発現パターンが示され、また、特にACクラスター辺縁で見られる束状のアクチンフィラメントの集積とその低下がクラスターの極性化に伴って示された. 後者は、クラスターの配置決定を説明する上で重要な変化であると考えられた. さらに、長期培養下では、ACクラスターは、相互的誘導作用が働くことによって、分化が進行し、軟骨組織が形成されることが明らかとなった. このように、本研究で用いたACとVCの解離-再集合系では、*in vitro*においても*in vivo*で見られるようなカドヘリンの発現や細胞集団の配置決定、組織構築等、胚細胞間の相互作用を再現し得ることが示された.

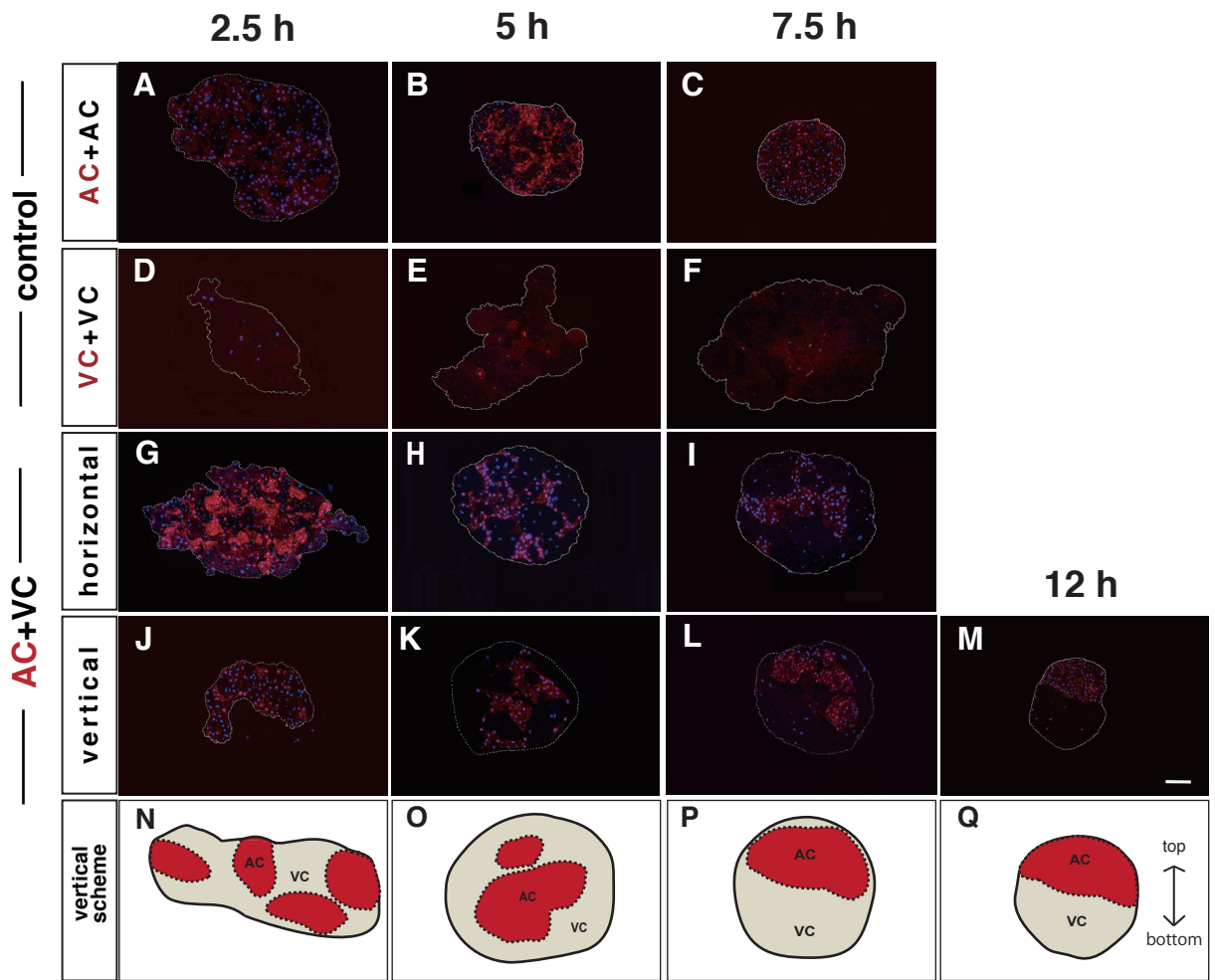


図1 細胞選別過程における細胞の再配置

解離胚細胞は、二細胞期にデキストランローダミンで標識し用いた。静置培養開始2.5時間後 (A, D, G, J), 5時間後 (B, E, H, K), 7.5時間後 (C, F, I, L), 12時間後 (M). 核は、DAPI (青) によって標識した。DR 標識細胞 (DR+), 赤) は、未標識細胞 (DR-), 暗) と識別している。DR (+)AC+DR(-)AC (A-C), DR(+)VC+DR(-)VC (D-F) は、同じ由来の細胞のため、ランダムな配置のままである。一方、DR(+)AC+DR(-)VC; 水平切片 (G, H, I) では、AC クラスターが次第に中央へと配置し、VC クラスターがそれを取り囲んでおり、垂直切片 (J, K, L, M) では、AC クラスターと VC クラスターが徐々に上下に再配置していることが分かった。点線：再集合塊辺縁。スケールバー：100 μ m. 垂直切片で見られたクラスターの配置変化を模式化した (N-Q). それぞれの図の上下は、再集合塊の上部 (top)-下部 (down) と一致している。点線：AC クラスター (赤) 辺縁。実線：再集合塊辺縁。VC クラスター (白)。

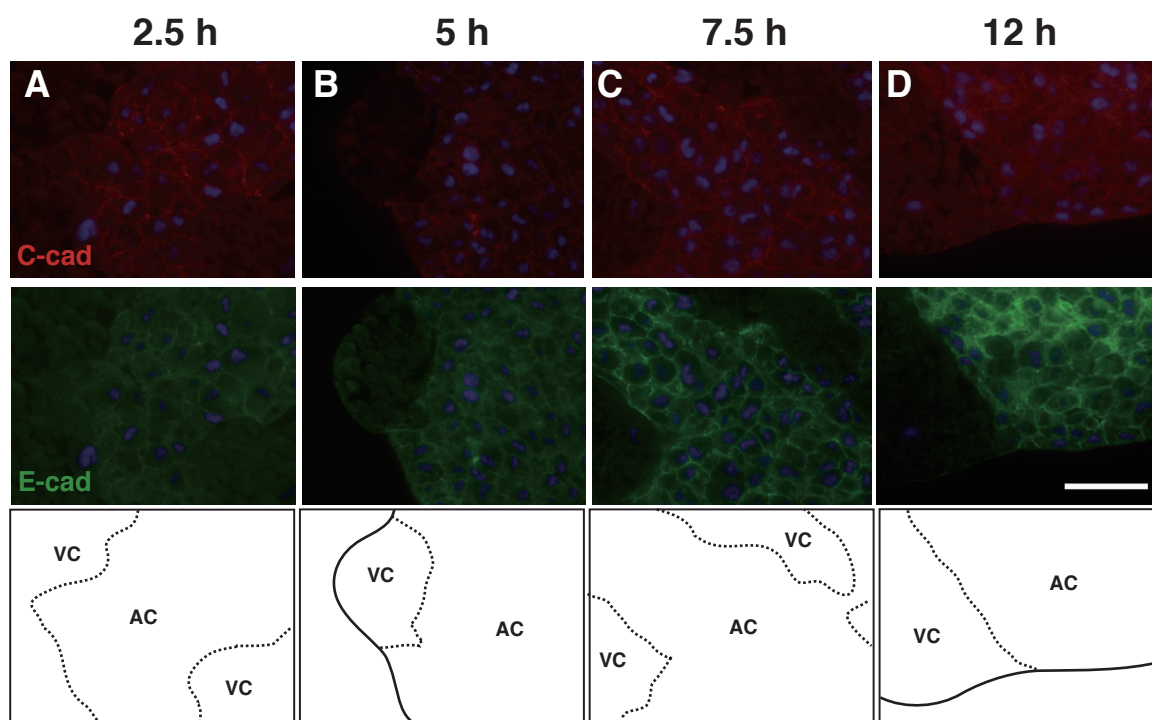


図2 AC, VC 再集合塊における C-カドヘリン, E-カドヘリンの発現パターン

静置培養開始 2.5 時間後 (A), 5 時間後 (B), 7.5 時間後 (C), 12 時間後 (D) における抗 C-カドヘリン (上段, 赤) と E-カドヘリン (中段, 緑) 抗体の免疫組織化学的解析結果. 2.5 時間後では, C-カドヘリンは AC に点状に発現しており (A), E-カドヘリンの発現は非常に弱い. 5 時間以降では, AC クラスタで, どちらのカドヘリンも線状に発現し, 特に, 12 時間後の E-カドヘリンの発現が増加していた (B, C, D). しかし, VC では C-カドヘリンのみが非常に弱く発現していた. DAPI (青). 点線: 再集合塊辺縁. スケールバー (50 μ m). C-, E-カドヘリンと同視野の AC, VC クラスタの配置を図示した (下段). AC クラスタ (AC). VC クラスタ (VC). 点線: クラスタの境界. 実線: クラスタ辺縁.

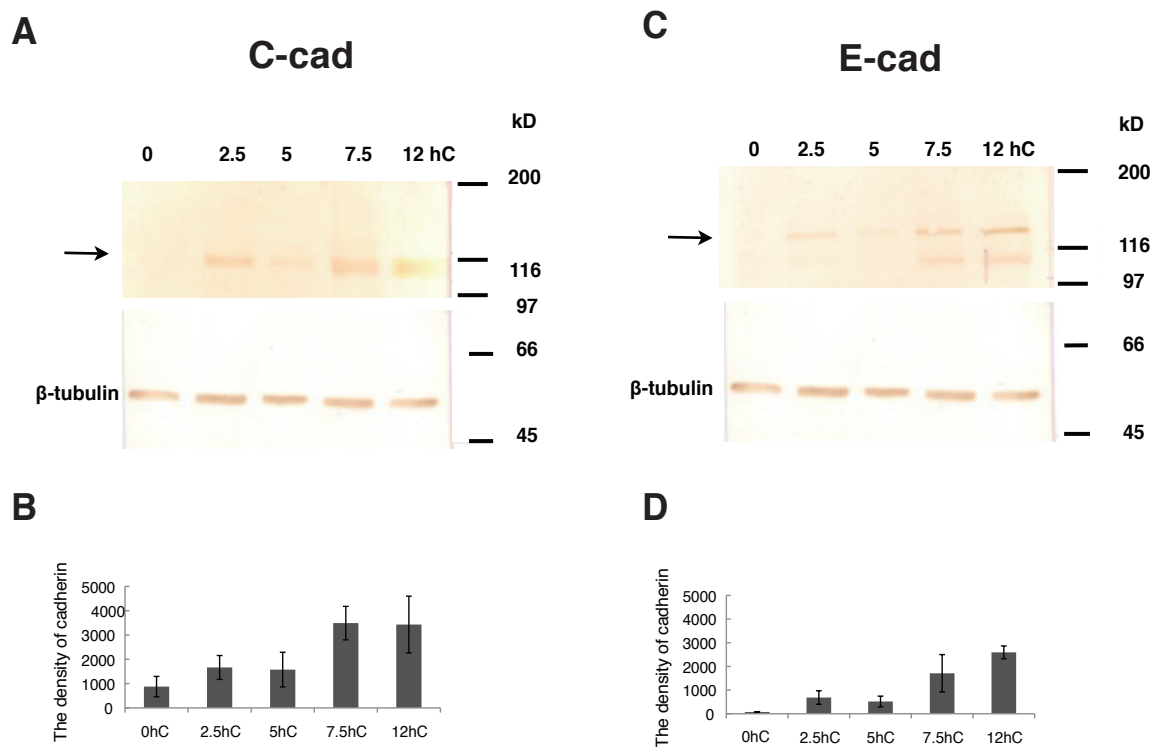


図 3 細胞選別過程におけるカドヘリンの定量的解析

再集合塊の C-, E-カドヘリンの western blot 法による定量的解析結果 (A-D). C-カドヘリン (A) は, 120kD (矢印), E-カドヘリン (C) は, 140kD (矢印) にバンドが見られ, どちらも時間経過に伴って濃くなり, 発現量の増加が示された (B, D). インターナルスタンダードとして, 抗 β -チューブリン抗体 (55kD) を使用. n=4.

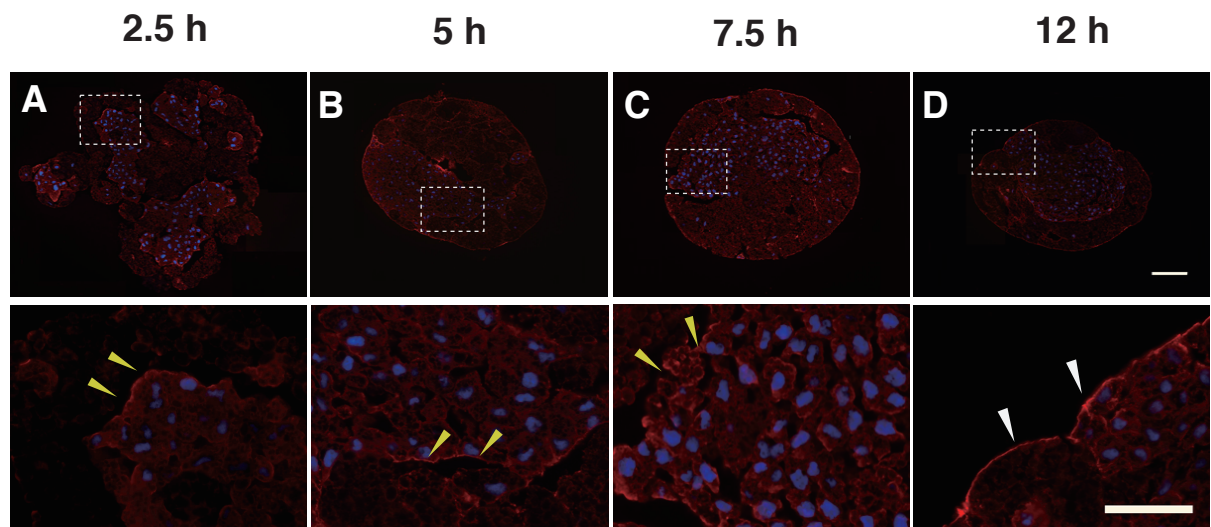


図4 再集合塊におけるアクチンフィラメントの発現の比較

ACとVCの再集合塊の静置培養開始2.5時間(A)、5時間(B)、7.5時間(C)、12時間(D)における抗アクチン抗体による免疫組織化学的解析の結果。上段は、再集合塊の全体像、下段は、それぞれの拡大部を示している。ACクラスター辺縁に集積しているアクチンフィラメントの発現をpixel intensityによって半定量化することで比較した(E)。2.5時間後では、ACクラスター辺縁に束状の発現が見られており(A、黄矢じり)、5時間後ではそれが途切れた発現となり(B、黄矢じり)、7.5時間後では、ほとんど見られない(C、黄矢じり)。12時間後では、再集合塊の外縁に束状のアクチン発現(D、白矢じり)が見られるようになる。actin(赤)、DAPI(青)。スケールバー：100 μm (全体図)；50 μm (拡大図)。Asteriskは、統計的な有意差を示す。*、 $p < 0.003$ 。**、 $p < 0.03$ 。vertical bars: standard deviation (S. D.)。n=12。

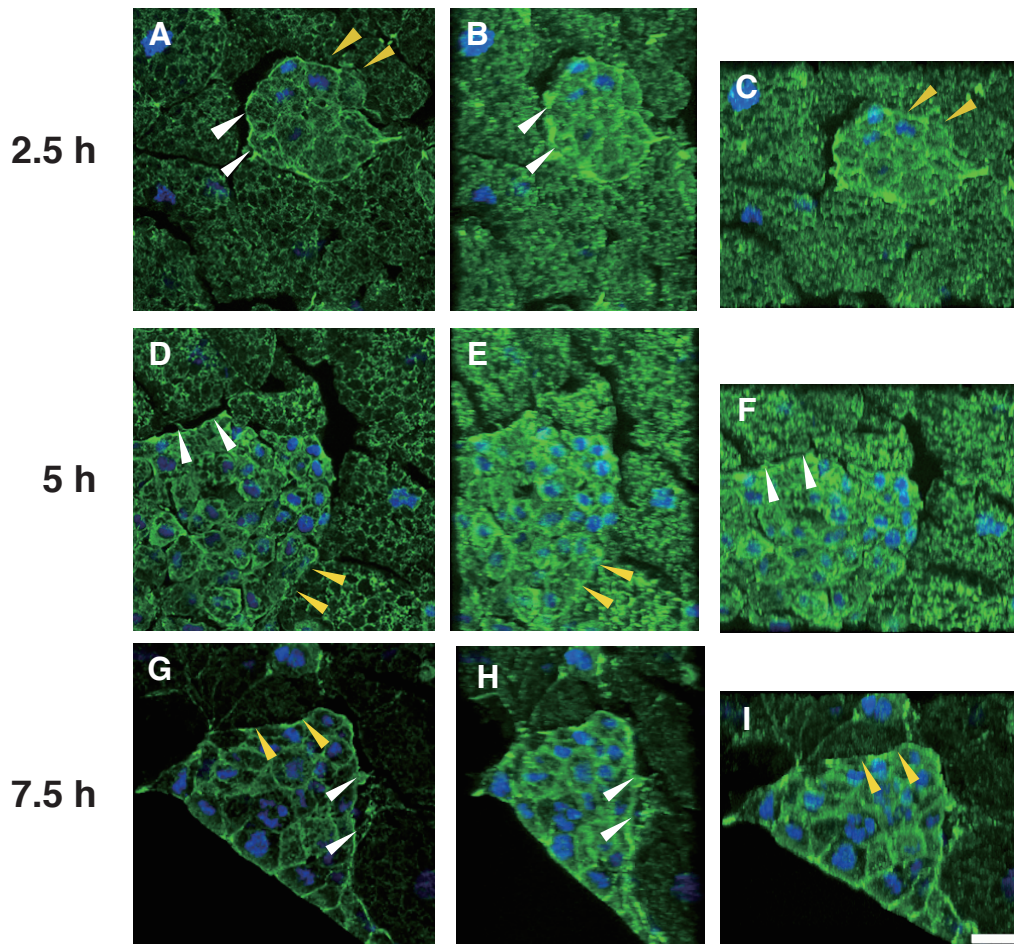


図5 AC クラスターを取り囲む皮層アクチンの発現

AC, VC 再集合塊の抗アクチン抗体染色による共焦点レーザー顕微鏡解析. 静置培養開始 2.5 (A-C), 5 (D-F), 7.5 (G-I) 時間後. それぞれ, $20\ \mu\text{m}$ 切片. クラスター間に隙間がある部分で, AC クラスターを取り囲むようなアクチンフィラメントは, Z 軸に沿っても発現が確認できたが, 7.5 時間後には, 途切れるような発現となっていた (白矢じり). クラスターが接触している部分では, アクチンの集積は見られない (黄矢じり). $1.5\ \mu\text{m}$ optical slice を統合し X 軸方向に 40° , Y 軸方向に 35° 傾けた. actin (緑). DAPI (青). スケールバー: $25\ \mu\text{m}$.

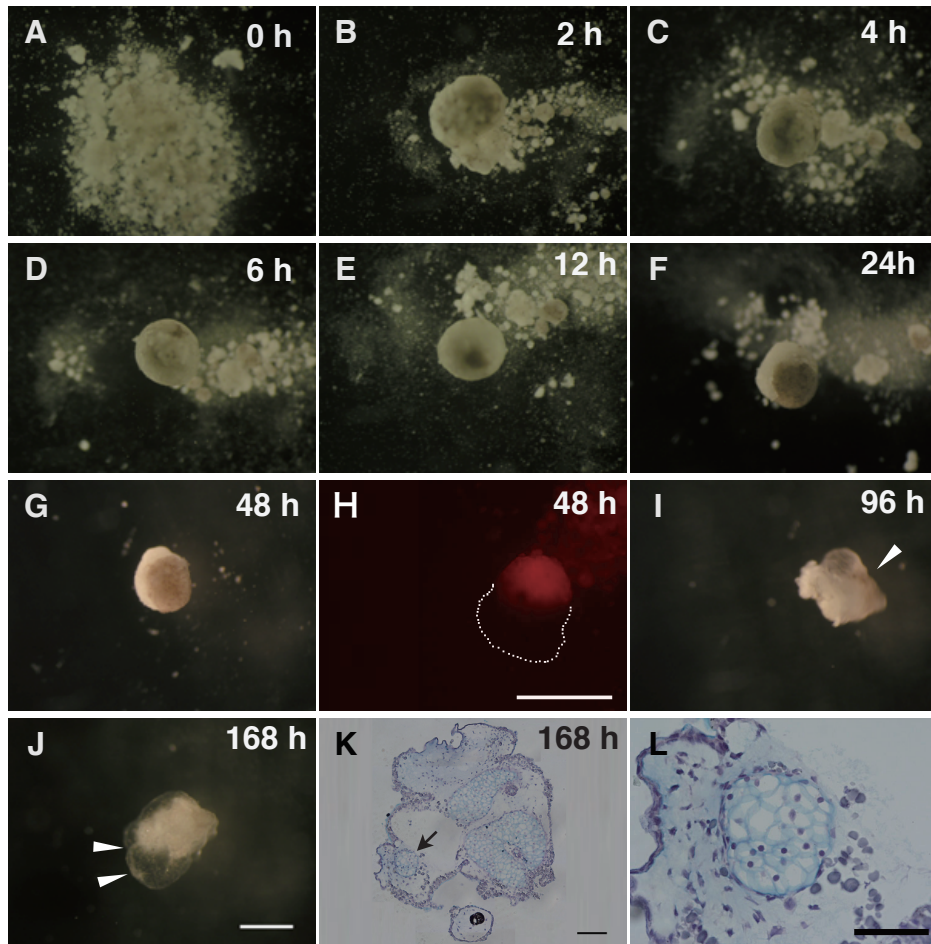


図6 AC と VC 再集合塊の再構築過程の経時的観察

静置培養開始0時間 (A), 2時間 (B), 4時間 (C), 6時間 (D), 12時間 (E), 24時間 (F), 48時間 (G), DR (+)AC+DR(-)VC 再集合塊, 48時間 (H), 96時間 (I), 168時間 (J). 静置培養開始168時間後の再集合塊の組織切片を Alcian blue 染色 (K), K の矢印部分を拡大 (L). 解離胚細胞は, 再集合塊を形成し, 12時間以降では黒い色素を持った AC が上方に目立つ. DR(+) 再集合塊より, AC クラスタと VC クラスタが並置していることが分かる (H). 96時間では AC 部分で不透明な組織が見られるようになり, 肥大化する (I, J, 矢じり). Alcian blue 染色より, 軟骨組織の形成を確認 (K, L). 点線: VC クラスタ外縁, スケールバー: 500 μm (H, J), 100 μm (K), 50 μm (L).

第三章

Xenopus laevis 胚の細胞選別には、アクトミオシン系と TGF- β シグナルが関与する

要旨

筆者は、これまでに、*Xenopus laevis* 胚の原腸胚初期の動物極側細胞 (animal cell, AC) と植物極側細胞 (vegetal cell, VC) を用いた再構築系において、細胞選別過程が同心円化と極性化の二段階からなることを明らかにした。その成果を踏まえ、ここでは、本研究では、細胞選別過程でこのような空間的な相互関係がどのようにして決定されているのかということに着目した。まず、細胞の収縮力の必要性を明らかにするために、細胞皮層を収縮するミオシン II に対して抑制的あるいは促進的な処理を二段階のそれぞれに対して行った。同心円化過程における Y27632 や blebbistatin の阻害は、クラスターがランダムに配置したままとなり、選別の進行は抑制された。その一方で、Rac1 阻害剤である NSC23766 を用いると、RhoA の活性化を介したミオシン II のリン酸化の活性化により、AC クラスターの融合が促され、選別の進行が促進された。これらの結果より、細胞の収縮力が細胞選別の進行に必要であることが示唆された。さらに、このような処理を極性化過程で行うと、どれも同心円状のままであり、収縮力の適度な調節が極性化過程にとって不可欠であることが示唆された。次に、筆者は、細胞選別過程における activin/nodal/TGF- β シグナルの影響を調べた。Alk (activin receptor kinase) の特異的阻害をもたらす SB431542 を同心円化過程で処理すると、AC クラスターの融合が促進され、その一方、極性化段階の阻害では、再配置は進行しておらず同心円状のままであった。これより、activin/nodal/TGF- β シグナルは、同心円化の進行に対して抑制的に作用し、さらにクラスターの極性化を引き起こす重要な因子であることが示唆された。以上をまとめると、細胞皮層を構築しているアクトミオシン系は、細胞選別過程のクラスターの配置決定において重要であることが明らかとなった。さらに、本解離再集合系で進行する、二段階からなる細胞選別過程と引き続いて起こる軟骨形成までの、

一連の現象には，各段階に特有の activin/nodal/TGF- β シグナルの関与があることが明らかとなった．

序論

第二章に述べたように、筆者は、*Xenopus laevis* 胚の原腸胚期の動物極側細胞 (animal cell, AC) と植物極側細胞 (vegetal cell, VC) を用いた解離再集合系で、細胞選別過程が時間経過に伴って、二段階に分かれることを明らかにした。第一段階として、部位的由来の異なる AC と VC は、それぞれ別のクラスターを形成し、両クラスターはやがて同心円状に配置する。その後、二つのクラスターは上下方向に再配置し、*vivo* で見られるような極性化した配置を再現した。本研究では、それぞれのステップを同心円化過程、極性化過程とし、以降こうしたクラスターの再配置が起こる機能の解析を試みた。本研究では、どのようにしてクラスターの配置変化がもたらされているのかに注目した。細胞選別に関してすでに知られているスキームに基づく、このような細胞集団の再配置は、クラスターの表面張力の変化によってもたらされていると推測される。本実験系と似た実験系による *zerafish* 胚の胚葉細胞を用いた最近の報告では細胞皮層に収縮をもたらすミオシン II に対して阻害処理を施すと、細胞選別の進行は抑制されたとある。これは、細胞選別の進行は、細胞の接着性だけでなく、皮層張力にも依存するというを示唆している (Krieg et al., 2008)。そこで、細胞皮層の収縮に対する抑制剤として Y27632 や blebbistatin を用い、収縮の間接的な活性化剤として Rac1 の阻害剤である NSC23766 を用いた。その結果、この AC と VC を用いた細胞選別過程においては、細胞の収縮力の調節が同心円化過程、極性化過程のいずれにおいても関与することが明らかとなった。

また、再集合塊の長期培養下では、AC クラスターが成熟した軟骨組織へと分化することが分かり、VC からの中胚葉誘導因子の関与が示唆された (第二章; Harata et al., 2013a)。そこで、クラスターの再配置に中胚葉誘導因子である activin/nodal/TGF- β シグナルが関与しているか否かを調べた。SB431542 (Alk 阻害剤) を施すことにより、TGF- β 系シグナル経路の化学阻害を行い、その結果、activin/nodal/TGF- β シグナルは、同心円化過程では選別の進行に対して抑制的に作用し、極性化過程では、クラスターの再配置を引き起こす重要な因子であることが明らかとなった。

材料と方法

胚・再集合塊形成

Xenopus laevis は、雌雄ともに佐藤養殖（千葉，日本）より購入し，胚は人工媒精法によって得た．原腸胚初期に，未標識胚と標識胚からゼリー層と受精膜を取り除き，動物極側部位と植物極側部位を eye brow knife とタングステンニードルによって切除し，50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ gentamycin を含んだ Ca^{2+} -and Mg^{2+} -free Modified Barth Saline (1 \times CMF-MBS; 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 5 mM HEPES, 2.5 mM NaHCO_3 , pH 7.8, 23 $^\circ$ C) 中で約 1 時間静置し，2~3 回ピペッティングし細胞を解離した．動物極側部位は，解離しにくい outer layer は除き，inner layer のみを使用した．5 個体の胚から解離した動物極側細胞 (animal pole cell, AC) と植物極側細胞 (vegetal pole cell, VC) を等比 (容量比) になるよう混合し，agar でコートした 4 穴 well (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Denmark) にスポットし，1 \times MBS 中で 1 時間巡回培養 (70 rpm, 23 $^\circ$ C) を行った後に静置培養を (23 $^\circ$ C) 開始した．形成された再集合塊は，経時的に実体顕微鏡下で観察を行った後に，5, 12, 24, 48, 72, 96, 120 時間で MEMFA (0.1 M MOPS (pH 7.4), 2 mM EGTA, 1mM MgSO_4 , 3.7% formaldehyde) 固定 (Harland, 1991; Sive et al., 1998) を行った (30 min, 室温)．その後，エタノールに置換し脱水，キシレンによる透徹，パラフィン (Shandon Histoplast, Thermo Scientific, Cheshire, UK) 包埋を行った．再集合塊の長期培養を行う際には，12 時間ごとに 1 \times MBS でメディアウムチェンジを行った．

薬剤阻害実験

Y27632 (wako Pure Chemical Industries, Co., Ltd., Osaka, Japan) (滅菌水に 1 mM stock で溶解) や blebbistatin (203390, Calbiochem, Darmstadt, Germany) (1 mM stock を DMSO に溶解) は，それぞれを最終濃度，5 μM と 10 μM となるように調製し，NSC23766 (553502, Calbiochem, Darmstadt, Germany) (10 mM stock を DMSO に溶解) は，25 μM ，SB431542 (S4317, Sigma, 20 mM stock in DMSO) (20 mM stock を DMSO に溶解) は，50 μM となるように調製して用いた．これら阻害剤実験は，1 \times MBS 中で行われており，全てにおいて，DMSO の濃度は，1% (v/v) を上回っていない．

組織学的解析

パラフィン切片(4 μm) を脱パラシ、ヘマトキシリン・エオシン染色, アルシアンブルー染色を行った.

免疫組織化学的解析

パラフィン切片を用いた. 抗 type II collagen あるいは抗アクチン染色では, 脱パラフィン処理後, 抗原性の賦括化のために, 10 mM クエン酸緩衝液中で, 95°C, 40 分の熱処理を行った. それから, CMF-amphibian PBS (6.4 g NaCl, 0.2 g KCl, 2.9 g NaHPO₃.12H₂O, 0.2 g KH₂PO₄, and 200 ml water) で洗浄し, 1% normal house serum (NHS) in CMF-PBS でブロッキング (RT, 20 min) の後, 一次抗体として type II collagen モノクローナル抗体 (F-57, 第一ファインケミカル, Toyama, Japan, 1:200 dilution) あるいはアクチンモノクローナル抗体 (MAB1501; Millipore, Billerica, USA, 1:100 dilution) を滴下し, インキュベートした (4°C, overnight). 抗フィブロネクチンと抗リン酸化ミオシン軽鎖 (pMLC) 染色では, 脱パラフィン処理後, 抗原性の賦活化処理のために, 2N HCl (37°C, 20 min) 処理の後に, 0.05% trypsin in PBS (-) 処理 (37°C, 3 min) を行った. それから, 1% normal house serum (NHS) in PBS (-) でブロッキング後 (4°C, 20 min), anti fibronectin モノクローナル抗体 4H2 (clone 4H2, a generous gift from Desimone DW, 1: 100) と anti pMLC ポリクローナル抗体 (ab2480, abcam, Cambridge, UK, 1:1000 dilution) を滴下し. インキュベートした (4°C, overnight). 二次抗体 Alexa 594 標識 goat anti-mouse IgG₁ (A21125; Molecular Probes, Eugene, USA, 1:1500 dilution) と Alexa 488 標識 goat anti-rabbit IgG (A21206; Molecular Probes, 1:500) を滴下しインキュベートした (RT, 2 h). 過剰二次抗体を PBS (-) で洗浄した後に, DAPI により核染色を行い, Fluoromount(Diagnostic Biosystems, Pleasanton, USA) で封入し落射型蛍光顕微鏡 (OLYMPUS BX50, Tokyo, Japan) で観察を行った.

抗体の特異性確認

背筋は、*X. laevis* 幼生 (stage 57) の脊索や脊椎を含んだ胴部から採り出した。背筋

部から内臓部を除き、皮膚と腹膜を除いた。脊椎骨から神経を抜き取り、細かく刻んだ。そして、Sodium dodecyl sulfate (SDS) サンプルバッファー {0.5 M Tris (pH 6.8), 2% SDS, 5% β -Mercaptoethanol, 10% Glycerol, 0.1% Bromophenol blue} を加えよく攪拌し 95°C で 3min 加温した。X. laevis 幼生 (stage 46) は、幼生全体を 10 匹用い、サンプルバッファーを加え同様に攪拌、加温した。その後、遠心 (20°C, 12000 rpm, 5 min) を行い、上清を回収した。これらは、Bradford 法によりタンパク量をそろえ、7%, 10% ポリアクリルアミド電気泳動を行った (30 mA/枚, 60 min)。その後、PVDF 膜 (Millipore, Billerica, USA) にタンク式転写装置 (Mini trans blot cell, Bio-Rad Laboratories, Inc. 米国カリフォルニア州) を使用し転写した (70 mA, 1.5 h)。メンブレンは、1.3% casein in PBS でブロッキングを行い (RT, 10 min)、抗 pMLC ポリクローナル抗体 (ab2480, abcam, Cambridge, UK, 1:200 dilution) および抗 collagen type II モノクローナル抗体 (F-57, 第一ファインケミカル, Toyama, Japan, 1:100 dilution) を 4°C 中で一晩反応させた。二次抗体は、HRP 標識 mouse immunoglobulin (P0161; Dako, Glostrup, Danmark, 1:1000 dilution) と HRP 標識 rabbit immunoglobulin (Dako, Glostrup, Danmark, 1:1000 dilution) を使用し、室温で 2 時間インキュベートした。二次抗体は、DAB 反応液 (0.2% 3,3'-Diaminobenzidine, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)) に 30% H₂O₂ を 8 μ l 加え検出を行った。

結果

AC と VC による細胞選別過程のクラスターの配置決定における細胞の収縮力の必要性

細胞選別過程における細胞皮層の収縮力とクラスターの配置決定への関与を、Y27632 や blebbistatin, NSC23766 などによるミオシン II に対する処理を行うことで検証した。これらは、どれも可逆的な阻害剤であるため、共培養を控えた AC, VC の片方のクラスターのみ阻害処理を施すことは原理的に難しいため、本実験系では再集合塊全体への阻害処理を行った。まず、同心円化過程が進行する最初の 5 時間のみに、これらの阻害処理を施した。培養後、再集合塊のパラフィン切片を作製し、ミオシン II の阻害効果を評価するために、抗リン酸化ミオシン軽鎖抗体 (anti-phosphate myosin light chain, pMLC) を用いて、免疫組織染色を行った (図 7A)。未処理 (コントロール) の場合を含めどの条件下でも、VC では pMLC の発現がほとんど確認されなかったが、AC では細胞膜に沿った発現が確認されたことから、以降の実験では AC における発現を比較した (図 7B)。ROCK 阻害剤の Y27632 (10 μ M) 存在下では、細胞膜に沿った発現は有意に低下したが、ミオシン ATP ase 阻害剤の blebbistatin (5 μ M) 存在下では、コントロールと比べて有意な差は見られず (図 7f, B)。本実験系では、Y27632 によりミオシン軽鎖のリン酸化が特異的に阻害されることが示された (図 7d, B)。そして、Y27632 や blebbistatin 処理の再集合塊では、小さなクラスターがランダムに配置しており (図 7c, e)、同心円化の進行が妨げられていた。それらとは対照的に、RhoA の活性化を期待して行った Rac1 阻害剤の NSC23766 (25 μ M) 処理では、ミオシン軽鎖のリン酸化が有意に増加しており (図 7h, B)、クラスターの同心円化の進行も促進した (図 7g)。AC クラスターの融合が促進されることで、大きなクラスターが形成され、クラスターの形態もより球状に近づいていた。これらの結果は、pMLC によって調節されている細胞皮層の収縮が、細胞選別過程の前半である同心円化過程の進行にとって必要な要因であることを強く示唆している。

次に、収縮力のクラスターの極性化への関与を調べるため培養 5 時間から 12 時間に、同心円化過程と同じ阻害処理を行った (図 8A)。細胞膜に沿った MLC のリン酸化をピクセル強度のピークの平均値により比較したところ、blebbistatin 処理やコントロールと比べて、Y27632 存在下では有意に低下しており、ミオシン軽鎖のリン酸化が阻害されていることが示された (図 8b, d, f, B)。そして、NSC23766 存在下では、細胞接着面

でのミオシンIIのリン酸化がわずかに高まっていた(図8h, B). 極性化過程でこれらの阻害処理を行うと、クラスターの極性化が見られなくなり、連続切片によりクラスターの配置を調べたところ、どの阻害処理においても、同心円状のままであることが示された(図8c, e, g). このような配置の典型的なパターンを図8Aに示した(左図). 阻害処理の評価のため用いた抗pMLC抗体では、western blot解析を行うと、およそ19 kDaのバンドとして見られ、抗体の特異性が確認できた(図8C). 以上の結果より、細胞の収縮力は、細胞選別過程全体を通して必要とされる要因であり、極性化過程においては、特に、収縮力が強すぎても弱すぎても進行しないことが示唆された.

VC と AC の誘導的相互作用による AC クラスターの分化

筆者は、AC と VC の再集合塊を長期培養すると、AC クラスターの分化が進行し、軟骨組織が構築される結果を示した(第二章). その組織構分化の進行を明らかにするために、極性化した再集合塊の長期培養による形態学的解析を行った(図9). AC クラスターと VC クラスターは、培養12時間までに極性化が完了し(図9E), その後も配置が維持され(図9E, G, D), 培養24時間までは、形態学的に目立った変化は認められなかった(図9E, F, G, H). 培養48時間後には、AC クラスター内に未分化凝集塊が現れ(図9I, J), 培養96時間後に、AC クラスターに組織様構造が構築され、アルシアンブルー染色した結果、軟骨組織の形成が確認できた(図9K, L). その一方で、AC の単独培養においては、培養96時間では不整形表皮が形成されており(図9A-D), 混合培養で見られたような軟骨組織の形成は確認されなかった.

AC クラスターの分化の進行をより詳しく知るために、間充織マーカーであるフィブロネクチンと type II collagen の発現を可視化し(図10), 一定視野(500 × 375 ピクセル)内の発現強度を数値化して比較した(図10C). フィブロネクチン(FN)は、培養12時間頃から AC クラスター辺縁で非常に弱い発現が確認でき(データ省略), 培養24時間には、AC クラスターと VC クラスターの境界にはっきりと発現していた. さらに、培養48時間では AC クラスター内での有意な発現の増加がみられ、72時間から96時間では逆に有意に低下していた(図10A, C, 左図)これは、AC の分化が進行していることを示唆していた. そして、培養96時間でフィブロネクチンの発現低下と対照的に、collagen type II (col 2) の発現が上昇し始め、やがて軟骨組織の形成が確認された(図10B, C, 右図). ここで用いた抗 col 2 抗体は、およそ130kDaの位置にバンドが検出されたことから、アフリカツメガエルでも col 2 を特異的に認識していると思われる(図10D). 使用した抗 FN 抗体に関しては、アフリカツメガエル由来の抗体であるため

特異性を示すものとした。以上の結果から、AC、VC間の誘導的相互作用が働き、ACの分化が進行し、未分化な間充織細胞を経て、軟骨組織を形成することが明らかとなった。

クラスターの再配置への TGF- β シグナリングの影響

アニマルキャップを TGF- β ファミリーの一つであるアクチビンによって処理すると、濃度依存的に中胚葉組織や内胚葉組織が誘導され、さらに、100 ng/ml では、軟骨組織が誘導されることが報告されている (Fukui et al., 2003; Furue et al., 2002)。従って、AC と VC 間でも activin/nodal/TGF- β シグナル等の中胚葉誘導因子が作用し、組織分化を進行させていることが予想された。

そこで、我々は、AC と VC の細胞選別過程を通して、クラスターの配置決定に中胚葉誘導因子が関与するか否かを調べた。activin/nodal/TGF- β シグナル経路を介した胚細胞間相互作用を抑制するために、アクチビン受容体である Alk (activin receptor-like) の特異的な阻害剤 SB431542 で処理した。

まず、同心円化過程で阻害処理を施すと、AC クラスターの融合が促され (図 11A, 左図)、同心円化の進行を促進されていたことより、TGF- β 系シグナルは同心円化には抑制的に働くことが示唆された。次に、同様の阻害処理を極性化過程で行うと、クラスターは同心円状のままであり (図 11B, 左図)、TGF- β 系シグナルはクラスターの極性化を引き起こすために重要な因子であることが明らかとなった。以上のように Alk 阻害の結果は、AC と VC の細胞選別過程全体を通して、activin/nodal/TGF- β シグナルがクラスターの配置決定に関与することを強く示唆した。

考察

細胞の収縮は、クラスターの配置決定に関与する

筆者は、*Xenopus* 胚の原腸胚初期から解離した動物極側細胞 (animal cell, AC) と植物極側細胞 (vegetal cell, VC) の細胞選別過程が、同心円化と極性化の二段階に分けられることを見いだした。さらに、同心円化過程において AC クラスターの辺縁では皮層アクチンが集積し、クラスターの極性化に伴って低下した (第二章)。束状のアクチンがクラスター特異的な表面張力に依存して発現し、クラスターの極性化に伴って減少する可能性が示唆された。従って、本研究では、まず、アクトミオシン系に依存する細胞の収縮力が細胞選別過程におけるクラスターの配置決定に関与する可能性に着目した。

細胞集団の選択的な配置決定は、表面張力の差によって決定されることが知られており (Davis et al., 1997; Foty and Steinberg, 2004)、最近の研究では、細胞の接着性や収縮力が細胞集団の表面張力を調節するために重要であることが報告されている (Krieg et al., 2008; Manning et al., 2010)。そこで、我々は、アクトミオシン系によって生じている細胞の収縮力 (Lecuit and Lenne, 2007) を阻害するために、ミオシン II の阻害剤投与を行った。Rho キナーゼに対する阻害剤、Y27632 やミオシン II の ATPase 阻害剤である blebbistatin は、細胞皮層の収縮性を抑制するために用いた (Kovacs et al., 2004; Shewan et al., 2005)。また、ミオシン軽鎖のリン酸化を間接的に活性化する Rac1 阻害剤である NSC23766 を用いた (Chauhan et al., 2011)。

同心円化過程で Y27632 や blebbistatin により処理すると、小さなクラスターがランダムに配置した状態となっており、細胞選別の進行は抑制されていた。それとは対照的に、同時期の NSC23766 処理では、ミオシン軽鎖のリン酸化が活性化され、AC クラスターの融合が促進しており、細胞選別の進行が促されていた。これらの結果は、ゼブラフィッシュ胚の胚葉細胞において、ミオシン ATPase 阻害や Rho キナーゼ活性阻害を行うことにより同心円化の進行が抑制され、クラスターの配置がランダムになっていたという報告と一致しており (Krieg et al., 2008)、*Xenopus laevis* 胚の細胞選別の進行においても、細胞の収縮力は重要であることが明らかとなった。そして興味深いことに、極性化過程で同様の阻害を行うと、全ての阻害処理においてクラスターの極性化は行われず、同心円状のままであった。これは、クラスターの極性化においても、収縮力は必要な要素であり、さらに、AC、VC どちらの収縮力も極性化の進行には重要であるこ

とが示された。以上の結果から、AC と VC の収縮力の変化より AC クラスター、VC クラスターの表面張力の低下や増加が生じ、クラスターの極性化が進行することが示唆された。

細胞の接着性は、細胞選別の進行において重要な要因の一つである (Takeichi, 1988; Nose et al., 1988)。そして、表面張力を決定する接着力と皮層張力は逆相関のため、細胞が接着する際、皮層張力の増加に伴って細胞の接着力が弱まるという報告もある (Lecuit and Lenne, 2007)。本実験系では、C-, E-カドヘリンの発現量増加と AC クラスター辺縁の束状のアクチンの発現低下が確認されており、このような AC クラスターで見られる皮層アクチンの低下がクラスターの配置変化に直接的に関わっている可能性があるかと推察している (第二章) が、二段階で見られるクラスターの再配置を説明する手がかりはまだ得られていない。細胞選別過程におけるクラスターの表面張力の実際の測定やそれと接着力や収縮力の相関関係に関する詳細な解析がさらに必要である。

Activin/Nodal シグナリングがクラスターの極性化を引き起こす

本研究において、AC と VC の細胞選別過程の後、長期培養を行うと AC クラスター内では、植物局側からの誘導因子によって (Nieuwkoop, 1969; Agiue et al., 2000)、VC 依存的な中胚葉誘導の兆候である軟骨組織への分化が進行した (図 9. 10)。TGF- β スーパーファミリーの一つであるアクチビンは、*Xenopus laevis* 胚において、中胚葉誘導活性を持つことが知られており、多分化能を持つアニマルキャップは、アクチビンによって濃度依存的に中胚葉や内胚葉組織へと誘導される (Okabayashi and Asashima, 2003)。そして、実際に 100 ng/ml のアクチビン A では、下顎の軟骨組織の形成が誘導され、アクチビン A が頭蓋部の軟骨組織分化のカスケードを制御することが示されている (Furue et al., 2002; Fukui et al., 2003)。さらに、AC, VC 再集合塊では、フィブロネクチンの発現が AC クラスターで徐々に増加した (図 10)。このことは、TGF- β シグナルがヒトの上皮細胞において、フィブロネクチンやビンキュリンのような中胚葉マーカーの発現誘導をもたらす、上皮間充織転換を促進するという報告に符合する (Lindley and Briegel, 2010)。

上述の事実を合わせ考えると、本実験系の細胞選別過程において、中胚葉誘導因子が働いている可能性が高いことが推察される。しかしながら、activin/nodal/TGF- β シグナルが実際に、細胞選別過程で作用しているか否かについては、これまで実験的な検証がなされていない。そこで、筆者は、この疑問を明らかにするために、Alk (activin

receptor kinase) 4/5/7 を特異的に阻害する SB43154 によって (Inman et al., 2002; Ho et al., 2006), 同心円化過程, 極性化過程, それぞれで再集合塊に対して, TGF- β シグナル経路の化学的阻害を行った. 阻害処理は, 同心円化過程, 極性化過程のどちらでも行った. Activin/Nodal TGF- β リガンドは, タイプ I とタイプ II の二つのセリン/ スレオニンキナーゼ受容体から成る複合体に結合し, その下流の Smad2 や Smad3 をリン酸化することでシグナルを開始する (Ho et al., 2006). Alk4 は, 胞胚期の動物極側の細胞で既に発現しており, その頃, VC では, TGF- β シグナルファミリーである Vg1 や nodal-related protein, Derriere 等が発現し, それらの相互作用により, 外, 中, 内胚葉の三胚葉化が進行するようになる (Takahashi et al., 2000; Chen et al., 2005; Birsoy et al., 2006; Luxardi et al., 2010). したがって, 細胞選別の進行に TGF- β 系のシグナルが関与していれば, SB43154 の入った培養液では, 何らかの影響が出るに違いない. そこで, Alk に対する阻害処理を行った結果, 同心円化過程では, AC クラスターの融合が促進され, 細胞選別の進行は促されていた. その一方で, 極性化過程における阻害処理では, 二つのクラスターの再配置は進行せず同心円状のままであった. このような結果は, activin/nodal/TGF- β シグナルは, クラスターの同心円化に対して抑制的に作用し, さらに極性化過程では, クラスターの再配置をもたらす因子であることが明らかとなった. Krieg らは, Zebrafish 胚の細胞選別解析で, enveloping layer (ELC) と yolk syncytial layer (YSL) (卵黄合胞体層) の組み合わせでは極性化が見られ, *in vivo* の配置が再現されることを示しており, このような現象は, ELC に含まれる nodal/TGF- β シグナルによってもたらされると報告している (Krieg et al., 2008). 本実験系における Alk に対する阻害実験の結果は, activin/nodal/TGF- β シグナルが解離再集合塊の細胞集団の極性化を導く因子であるという Krieg らの報告を支持していた. 筆者は, Alk 阻害処理が細胞の収縮力に影響を及ぼしていると予想し, 阻害処理後のアクチンフィラメント (図 11) や pMLC (SB43154 阻害実験については未発表データ) の発現変化を調べたが, 未処理に対して有意な差を検出できず activin/nodal/TGF- β シグナルとアクトミオシン系の直接的な関与は明らかにできなかった. AC クラスター辺縁で見られた皮層アクチンの集積低下より, AC クラスターの表面張力低下, AC の収縮力の変化が極性化の進行に伴って生じていることが推測され, これらは, VC からの activin/nodal/TGF- β シグナルが解離再集合塊内で濃度依存的に AC に対して作用した結果であると推測している. 中胚葉誘導因子である activin/nodal/TGF- β シグナルが皮層アクチンに対して抑制的に作用することで細胞の収縮力や接着力を変化させクラスターの配置変化へと影響することが考えられた.

今後, 上述したような接着力と収縮力の関係や中胚葉誘導因子による接着力および収

縮力の制御は、さらに、追究されるべき課題と考えている。 *Xenopus* 胚のアニマルキャップを *activin* で処理すると C-カドヘリンの低下が誘導され、さらに *in vivo* における原腸胚形成期中胚葉陥入部位では、 *activin/nodal* TGF- β signal によって C-カドヘリンが低下することが分かっている (Ogata et al., 2007)。しかし、AC, VC 再集合塊で見られた接着力の増加 (第二章) はこれらとは矛盾する結果であった。 *zebrafish* 胚の外胚葉細胞では、 *activin/nodal/TGF- β* シグナルによって皮層張力の低下が報告されており、我々の実験結果からも細胞皮層の収縮力低下が予想された。その一方で、TGF- β signal は、Rho タンパクを活性化し、 *actin* の再構成を制御することがよく知られているが (Pellegrin and Mellor, 2007; Papadimitriou et al., 2011)、これらは、TGF- β シグナルが接着力や皮層張力に対してバイモーダルに働く経路が存在する可能性や BMP や FGF のような異なったタイプのシグナルによって制御される可能性も示唆した (Lee et al., 2011)。AC と VC の細胞選別過程全体を通して、細胞皮層張力の強弱のパターンやクラスター表面に生じている張力、そして、それらを制御する中胚葉誘導因子との関連を時間的、空間的にさらに詳しく解析することで、細胞選別過程におけるクラスターの配置決定のメカニズムの解明が期待される。

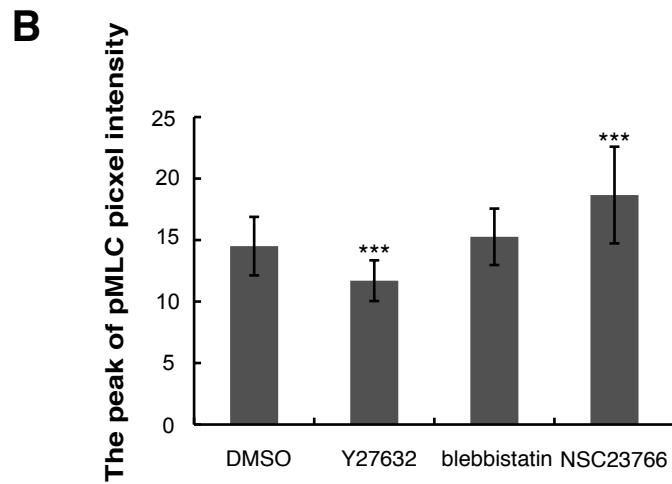
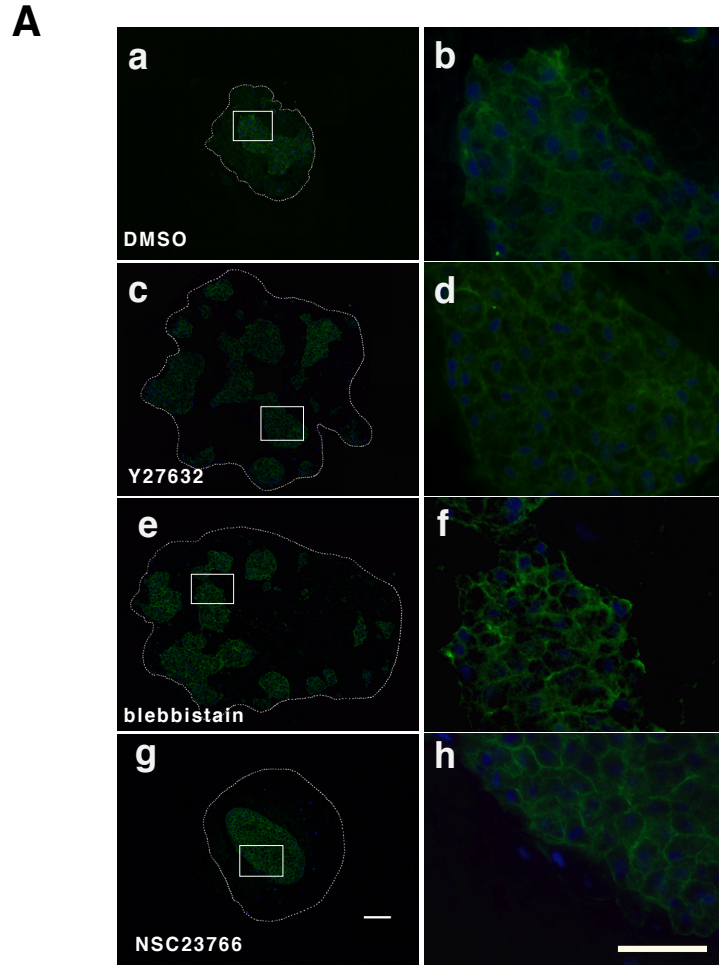
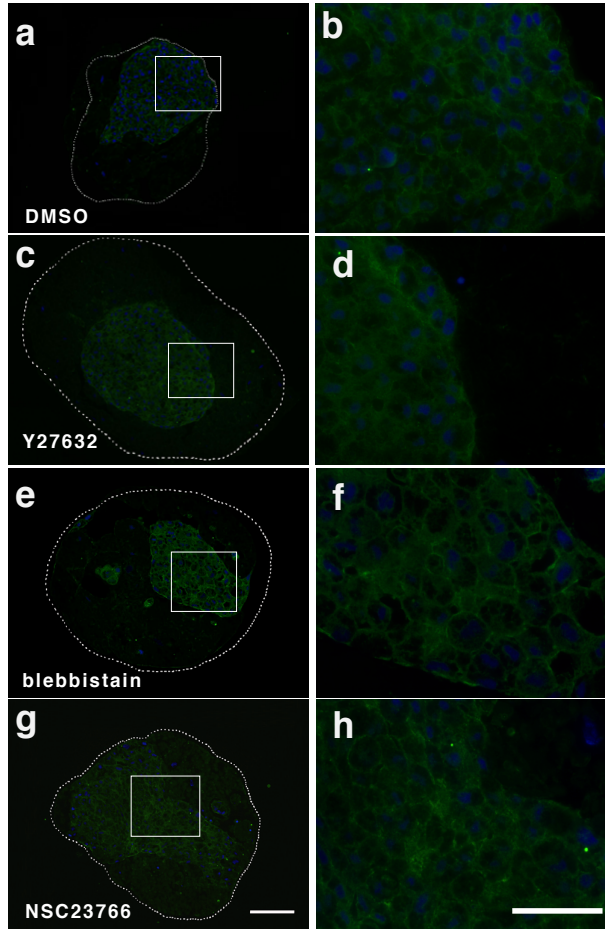


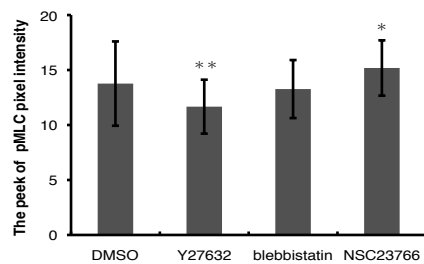
図7 同心円化の進行には，細胞の収縮力が必要である

静置培養開始時から培養5時間(5 hC)まで，再集合塊を10 μ M Y27632 (c, d)，と5 μ M blebbistatin (e, f) と25 μ M NSC23766 (g, h) で阻害処理を行い，再集合塊のほぼ中央部を抗pMLCによる免疫染色により阻害効果を調べ (A)，細胞膜におけるpMLCの発現の蛍光強度のピークを比較した (B)．拡大写真 (b, d, f, h) は，全体写真内 (a, c, e, g) の四角で囲まれた部分を示した．それぞれ，再集合塊のほぼ中央の切片を示しており，controlやNSC23766によって処理した再集合塊の形態は球状だが，Y27632やblebbistatin存在下では，扁平な集合塊であった．Y27632やblebbistatin処理では，クラスターがランダムに配置し，選別は進行しておらず，NSC23766処理では，クラスターの融合が促されていた．pMLCの発現は，コントロールであるDMSO処理 (a, b) と比べて，Y27632処理で有意に低下し，NSC23766処理では増加していた．***: $p < 0.001$ (t検定), vertical bars: standard deviation (S.D.), $n=12$ (2視野 \times 6サンプル)．全体図，スケールバー: 100 μ m. 拡大図，スケールバー: 50 μ m. 点線: 再集合塊辺縁. pMLC (緑), DAPI (青)．

A



B



C

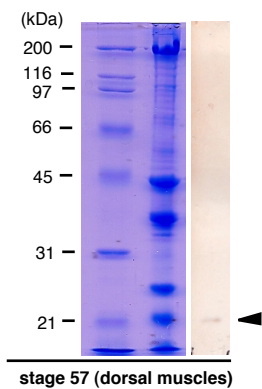


図8 クラスターの極性化は，細胞の皮層張力によって調節される

培養5時間から培養12時間まで，再集合塊を10 μ M Y27632 (c, d)と5 μ M blebbistatin (e, f), 25 μ M NSC23766による阻害処理を行い，その影響を図7と同様に抗pMLC染色を行い(A)，pMLC発現の蛍光強度を半定量化した(B)．どの阻害処理でも，同心円状の配置となっており，pMLCの発現は，コントロールであるDMSO処理(a, b)と比較すると，Y27632処理では有意に低下し，NSC23766では増加していた．Western blot法により，抗pMLC抗体の特異性を確認した(C)．Immuno blot結果(右)．pMLCは，約19 kDaの位置にバンドが見られた(矢じり)．SDS-PAGE結果(左)．抗pMLC抗体は，pMLCを特異的に認識していることが確認された．**， $p < 0.01$ ，*， $p < 0.05$ ，(t検定)，vertical bars (S.D.)， $n=16$ (2視野 \times 8サンプル)．全体図(a, c, e, g)，スケールバー：100 μ m．拡大図(b, d, f, h)，スケールバー：50 μ m．点線：再集合塊辺縁．pMLC(緑)．DAPI(青)．

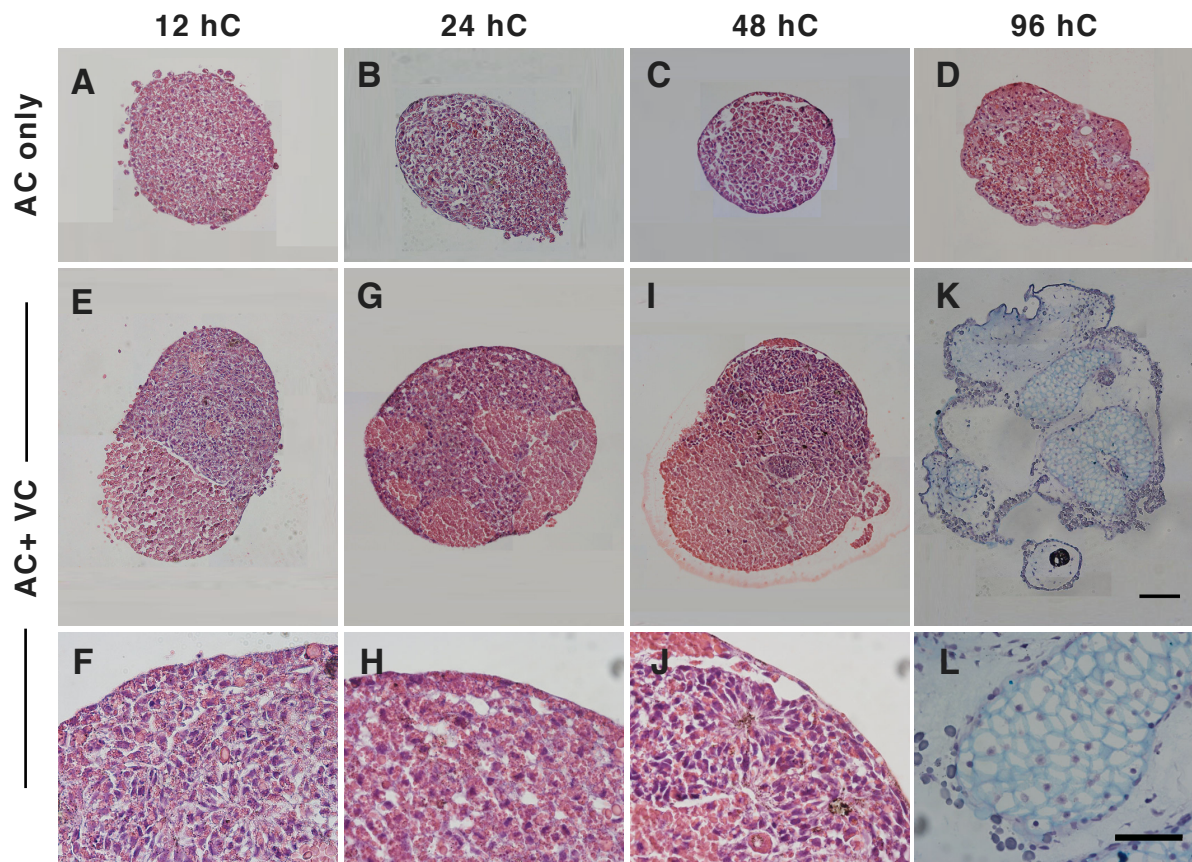


図9 長期培養におけるACクラスターの分化

再集合塊は、静置培養下で長期培養を行った (AC+VC 混合培養, AC 単独培養). 培養 12 時間 (A, E, F), 24 時間 (B, G, H), 48 時間 (C, I, J), 96 時間 (D, K, L). HE 染色 (A-J), Alcian blue 染色 (K, L). AC の単独培養 (A-D) では 96 時間後 (D) に artificial epidermis の形成が見られた. AC と VC の混合培養 (E-J) では, クラスターの極性化した配置は, 変化していなかった. 48 時間後から AC クラスター内に間充細胞の凝集塊が見られるようになり (I, J), 96 時間後では, 軟骨組織が alcian blue によって染色された (K, L). E の拡大図 (F); G の拡大図 (H); I の拡大図 (J); K の拡大図 (L). スケールバー: 100 μ m (H); 50 μ m (L).

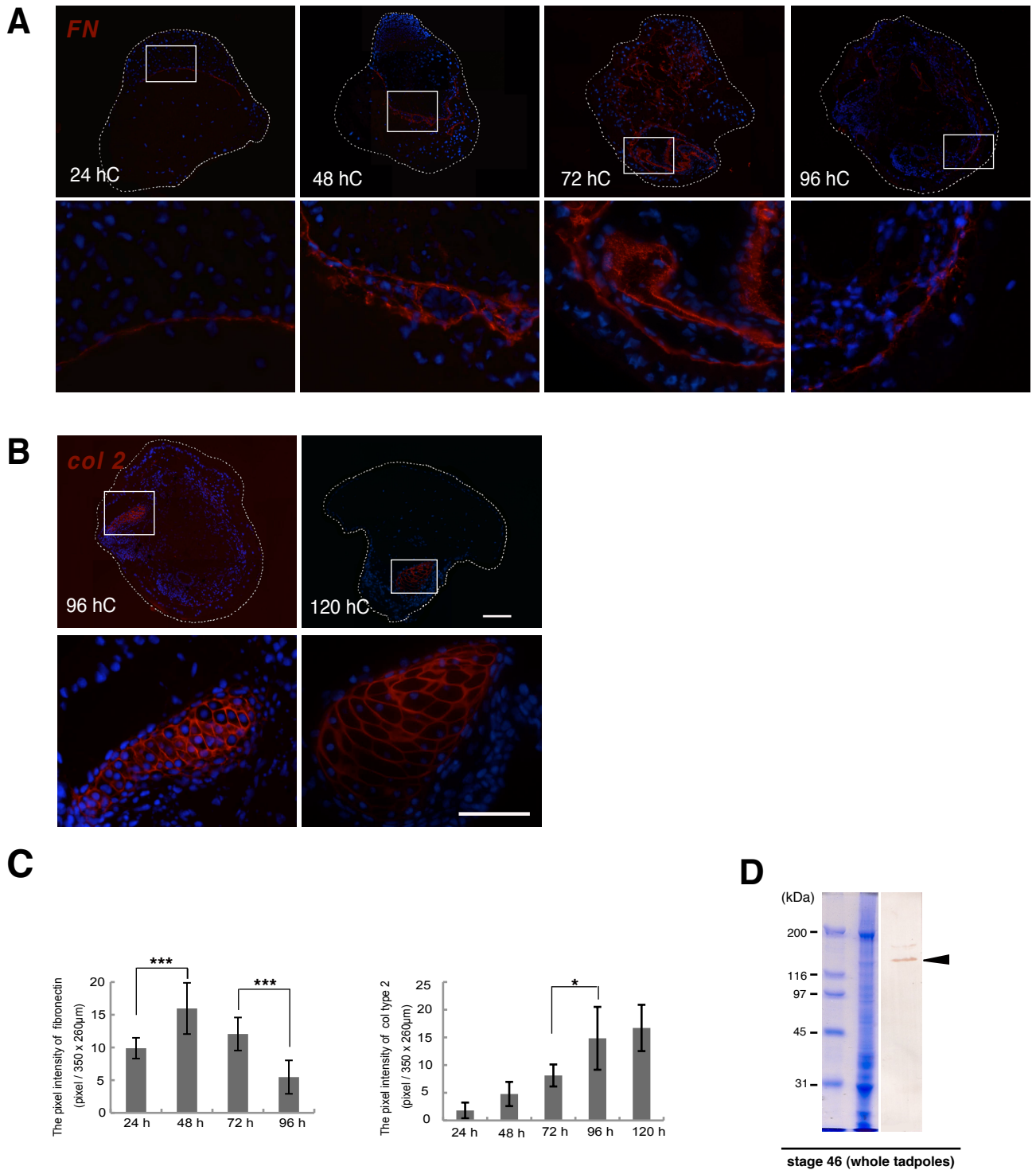


図 10 長期培養下での AC クラスターにおけるフィブロネクチンと type II collagen の発現パターン

培養 24, 48, 72, 96 時間の再集合塊におけるフィブロネクチン (FN) の発現 (A), 培養 96, 120 時間の type II collagen (col II) の発現 (B). 全体写真内 (上段) の四角で囲まれた部分を拡大写真として示した (下段). FN と col2 の蛍光強度を 500×375 ピクセル内で測定し, 数値化した (C). 経時的な発現変化による蛍光強度の増減をそれぞれの時間帯において比較した. FN は, 培養 24 時間に AC クラスターと VC クラスターの境界に弱い発現が見られていたが, 培養 48 時間では, AC クラスター内における発現が有意に増加していた. 培養 72 時間から 96 時間では, その発現が有意に低下していた. col II の発現が 96 時間以降で確認され, 72 時間と比べ, 有意に増加していた. *, $p < 0.05$ ***, $p < 0.001$ (t 検定), vertical bars (S.D.), $n=12$ (2 視野 \times 6 サンプル). 抗 col 抗体の特異性を tadpole (stage 46) 全体を用いて western blot 解析により確認した (D). Immuno blot 結果 (右図), SDS-PAGE (左図). Col2 は, 約 130 kDa の位置にバンドが見られた (矢じり). 抗 Col type2 抗体は, type II col を特異的に認識していることが確認された. 全体図 (上段), スケールバー: $100 \mu\text{m}$. 拡大図 (下段), スケールバー: $50 \mu\text{m}$. Fibronectin (A, 赤), collagen type II (B, 赤), DAPI (青). 点線; 再集合塊辺縁.

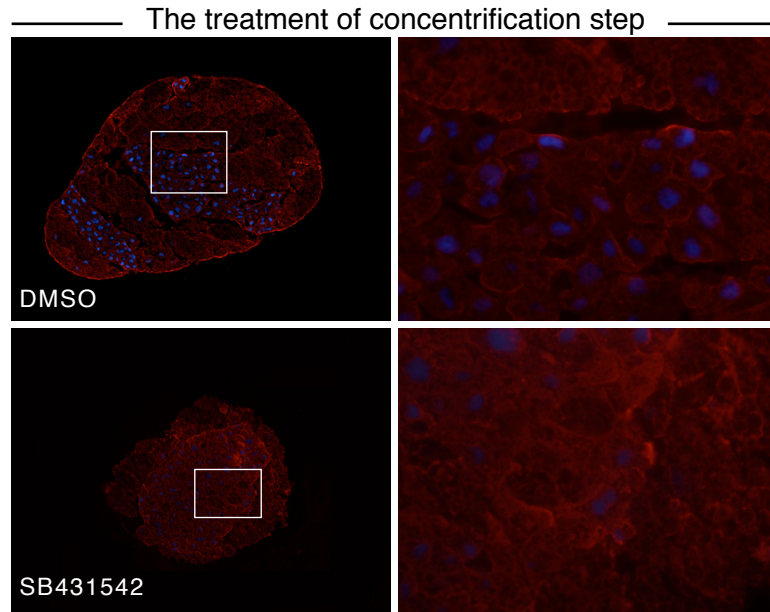
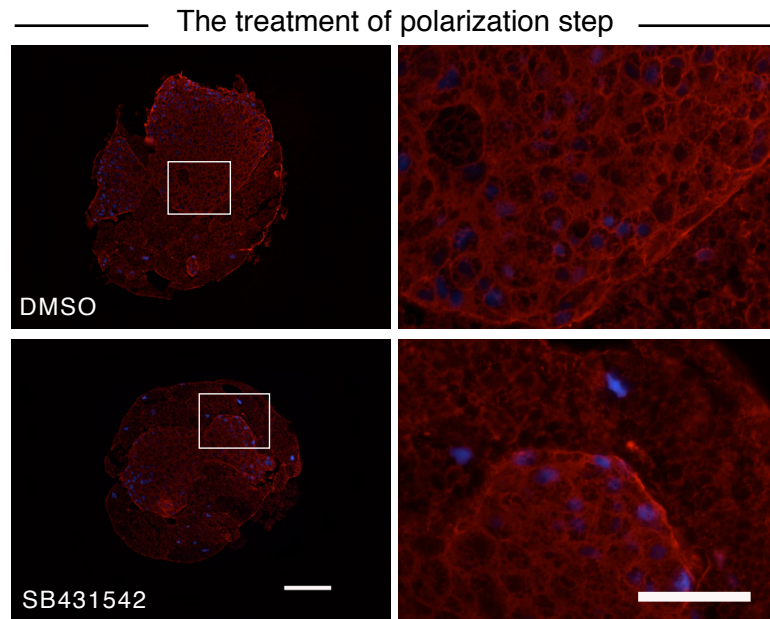
A**B**

図 11 TGF- β signal のクラスターの配置決定への関与

静置培養開始時から 5 時間後まで (A), 5 時間後から 12 時間後まで (B), 再集合塊を 50 μ M SB431542 阻害処理を行い, 抗アクチン抗体染色を行った. 全体図 (左), 拡大図 (右). 培養 5 時間までの阻害では, DMSO 処理と比べて, 選別の進行が促進されていた (A). 5-12 時間後に阻害処理を施すと, クラスターの極性化は起こっていなかった (B). 全体図 (左図), スケールバー: 100 μ m. 拡大図 (右図), スケールバー: 50 μ m. 点線: 再集合塊辺縁. actin (赤), DAPI (青).

第四章 総合考察

1. 段階を経て進行する *Xenopus laevis* 胚細胞の細胞選別過程

本研究では、第二章で述べたように、原腸胚期の *Xenopus laevis* 胚から得た動物極側細胞 (animal pole cells, AC) と植物極側細胞 (vegetal pole cells, VC) を用いた解離-再集合系において、細胞選別過程が二段階からなることを見いだした。混合培養を開始すると、AC と VC は再集合し、互いに選別を経て、それぞれクラスターを形成し、AC クラスターが中央に、VC クラスターがその周りを囲むという同心円状の配置となった。その後、二つのクラスターは、徐々に AC クラスターが上方、VC クラスターが下方へと配置を変化させ、*in vivo* で見られる極性化した胚葉の配置を再現しており、筆者は、それぞれの段階を同心円化過程、極性化過程とした。AC と VC の細胞選別過程におけるこれら二つのステップのようなクラスターの再配置については今まで議論されてきておらず、非常に興味深い現象であり、以上のようなクラスターの配置決定を調べることは、細胞選別現象のダイナミズムに関する詳しい理解が得られると期待できる。

AC と VC の細胞選別過程後、長期培養を行うと、AC クラスターは、分化が進行し、培養 96 時間では成熟した軟骨組織の構築が見られた (第二章)。両生類の初期胚は、解離し混合培養を行うと選別後、由来となった胚葉に特徴的な組織を構築することが知られている (Townes and Holtfreter, 1955)。本実験系においても、再集合塊内では、選別を終えた解離胚細胞は、正常発生に比べ遅延が目立つが、致死に至ることなく、分化が進行し成熟した軟骨組織を形成した。これは、用いている AC と VC が正常発生を進行する胚に比べ部分的であったが、組織分化能を十分に有していたと考えられる。多分化能を有する予定外胚葉域の胚細胞は、中胚葉誘導因子である TGF- β ファミリーのアクチビン A 処理を行うと、濃度依存的に中胚葉や内胚葉の組織へ分化することが知られている (Okabayashi and Asashima, 2003)。本研究で用いた AC は、原腸胚初期の動物極側細胞であり、予定外胚葉域の胚細胞に含まれている。多分化能を有する AC が VC からの中胚葉誘導因子により、分化を進行させているということが示唆される結果であった (第三章)。一度解離された胚細胞だが再集合塊内では、胚細胞間の誘導的相互作用が働いており、胚葉細胞や胚葉体の相互作用を解析する系として非常に有用であることが示された。

2. 細胞選別の進行におけるカドヘリンの発現の必要性

細胞選別は、同種親和性（ホモフィリックな結合）を担う細胞接着分子カドヘリンが主体的に仲介する細胞接着の仕組みあるいは能力であり、生体内でも細胞集団の分離や組織の境界の形成に携わると考えられている (Takeichi, 1988; Nose et al., 1988). アフリカツメガエル胚細胞の細胞選別においてもカドヘリンが重要な役割を担っており (Niessen and Gumbiner, 2002; Marsden and Desimone, 2003), 細胞間の相互認識機構として重要である. 母性カドヘリンである C-カドヘリンが胚全体でユビキタスに発現し, さらに, 原腸胚期からは外胚葉のみで, E-カドヘリンの発現が開始する (Choi and Gumbiner, 1989; Choi et al., 1990; Levi et al., 1991a; Levi et al., 1991b). 本研究では, 細胞選別におけるカドヘリンの結合依存性については未確認だが, *in vitro* 培養下において同じ由来の胚細胞がクラスターを再構成し, *in vivo* と同様, 外胚葉由来の AC には C-カドヘリンと E-カドヘリン, 内胚葉由来の VC には C-カドヘリンの非常に弱い発現が確認できた (第二章). 両カドヘリンは, AC と VC が選別によりクラスターを形成し同心円状に配置した後も発現を持続しており, *in vivo* と同様, 形態の維持において重要な役割を担っていることが明らかとなった. 細胞選別進行時のカドヘリン結合依存性については, 解離後の単一細胞におけるカドヘリンの発現の確認, あるいはそれぞれのカドヘリンに対するノックダウン実験等を行い, 選別の程度の比較をすることにより, カドヘリン依存的な細胞選別の進行か否かの検証が必要である.

細胞選別においては, ホモフィリックなカドヘリンを発現している細胞同士がクラスターを構成し, 階層性を生じ, 条件にもよるが多くの場合同心円状となる. 胚葉細胞の細胞選別過程では, このような階層構造はそれぞれの胚葉の辺縁に生じる表面張力の差異を反映しているという報告があり, 大きな張力を有するクラスターが中央に位置し, 小さな張力を生じているクラスターによって囲まれる (Davis et al., 1997). このようなクラスターの配置決定に関しては, 細胞結合エネルギーによって説明される熱力学的な仮説, Differential adhesion hypothesis, DAH が提唱されている (Steinberg, 2007). 実際, L-cell への強制発現系より, カドヘリンの発現量がクラスターの表面張力に比例し, 接着力の強いクラスターが接着力の弱いクラスターによって囲まれることが実験的に示されている (Foty and Steinberg, 2005). AC クラスタと VC クラスタの同心円化は, AC が C-カドヘリン, E-カドヘリンを共に強く発現していることから, 接着力の強い AC が中央に位置すると推測され, DAH に一致すると考えられる. それでは, AC クラスタと VC クラスタの極性化は, カドヘリンの発現によってどのように説明されるだろうか. Steinberg らは, DAH に基づいて, クラスタの接

着エネルギーが等しくなることで、二つのクラスターの並置が可能であると仮定している。これより、ACクラスターとVCクラスターの極性化は、ACの接着力の低下とVCの接着力増加によって引き起こされていることが推測された。しかし、本実験系では、ACにのみ発現するE-カドヘリンの発現量増加とVCにおける非常に弱いC-カドヘリンの発現より、クラスターの極性化をカドヘリンの発現で示された細胞の接着力のみで説明することは難しいと結論づけられた。以上のような接着性の変化は、非常に興味深い点であるが、現在のところ、本実験系では、ACクラスターとVCクラスターを分離して、カドヘリンの発現量を測定することが難しいため、クラスター別の経時的な変化が不明瞭なままである。また、初めに細胞間の認識機構として機能するカドヘリンは、第三章で述べたように本実験系の細胞選別過程において *activin/Nodal/TGF- β* シグナルの作用により、収縮力の変化に伴い接着力も変化していることが示唆されたため、同心円化後の局在変化も興味深い課題の一つであり、細胞内の分布における詳細な解析が重要と考えている。

3. クラスターの配置変化に伴ったアクチンの発現

クラスターの配置変化を引き起こす一要因として、更に、細胞骨格タンパク質であるアクチンフィラメントの発現に注目した(第二章)。原腸胚期のアフリカツメガエル胚は、細胞集団の活発な再配置による形態形成運動が進行する時期であり(Winklbauer et al., 1996b; Keller et al., 2000)、胚細胞は高い運動能を有している。AC, VC再集合塊においても高い運動能が再現されることで、クラスターの再配置が進行することを期待し、細胞集団の移動に注目しアクチンフィラメントの局在を調べた。移動を示唆する細胞の仮足やアクチンフィラメントの局在は確認されなかったが、その代わりに、ACクラスター辺縁で束状のアクチンフィラメントの集積が確認された。同心円化過程では、ACクラスター辺縁に束状にアクチンが集積し、極性化過程では、それが徐々に低下していた。これは、共焦点レーザー顕微鏡による三次元的解析からも確認できた。筆者は、Zebrafish胚の胚葉細胞を用いた細胞選別解析についての先行研究(Schotz et al., 2008; Krieg et al., 2008)の中で示された、束状のアクチンの集積が胚葉の表面張力に依存することと、同時に、特に表面張力の大きな外胚葉表面に現れるアクチンの集積の形態学的な様相が本研究のクラスター辺縁のアクチンの集積と酷似していることを重視し、*Xenopus laevis*胚の解離再集合系においてもアクチンの集積がクラスターの表面張力に依存して生じると推測した。本研究の重要な推論の一つとして、こうしたアクチ

ンの集積の低下は、クラスターの再配置を説明する現象ではないかと考えた。つまり、同心円化過程で束状のアクチンの集積が見られる AC クラスターは、高い表面張力を生じており、クラスターの極性化に伴って見られたアクチンの集積低下は、AC クラスターの表面張力の低下が考えられ、VC クラスターとの表面張力に差がなくなることで極性化という安定した配置をとることが推測される。

また、ヒドラの解離-再集合系で内・外胚葉性上皮細胞の細胞選別や二層構造形成の進行には、内胚葉性上皮細胞の高い運動性が重要であるという報告がある (Takaku et al., 2005)。内胚葉性上皮細胞のクラスター辺縁には、選別後、同心円状に配置する際に、束状のアクチンフィラメントが集積し、さらに、その単離細胞は、仮足様の構造を伸縮させ、高い運動性を示すことが確認されている。以上のように、他の動物細胞で知られている、選別過程で見られたアクチンフィラメントの集積は、クラスターを構成する細胞の収縮力や運動性の結果として生じることが報告されているが、その相関関係については未だ明らかになっていない。

AC, VC 再集合塊において、クラスターの表面張力が選別過程に伴って変化していると仮定すると、同心円化過程で VC クラスターよりも大きな表面張力を有していた AC クラスターは、極性化の進行と共に、低下することが推察された。クラスターに生じる表面張力は、近年、細胞の接着力と収縮力の総和によって決まると考えられており (Krieg et al., 2008; Manning et al., 2010)、クラスターの配置変化が進行している細胞の接着性や収縮力は共に変化していることが推測される。また、細胞の接着力と皮層張力に関して、両者は、閉鎖的空間においては逆相関であるため、細胞が接着する際に、皮層張力の増加に伴って細胞の接着力が弱まると言われている (Lecuite and Lennue, 2007)。本実験系では、C-, E-カドヘリンの発現量増加と AC クラスター辺縁の束状のアクチンの発現低下が確認されており、AC クラスターで見られる皮層アクチンの低下がクラスターの配置変化を説明できると考えたが (第二章)、未だ、クラスターの再配置を解釈するに十分な証拠を得られておらず、推測の域を出ていない。カドヘリンの発現変化に伴ったアクチンの局在、また異なるクラスター間、あるいは再集合塊辺縁における皮層アクチンの発現など、アクチンの局在変化を調べるのが重要であると考えている。そして、細胞の接着性と収縮力、細胞集団の表面張力との相関関係における詳細な解析が期待される。

4. 細胞の収縮力は細胞選別過程のクラスターの配置決定を制御する

細胞選別過程の進行においては、細胞接着分子カドヘリンの発現だけでなく、細胞の収縮力も重要であることが報告されている (Krieg et al., 2008; Manning et al., 2010). そこで、筆者は、クラスターの配置変化を引き起こす要因としてアクトミオシン系によって生じている細胞の収縮力 (Lecuit and Lenne, 2007) に着目し、ミオシンIIに対する阻害実験を試みた。ミオシンIIに対する阻害処理は、非筋ミオシンIIの ATPase 活性に対する阻害剤、blebistatin と ROCK の阻害剤である Y27632 を用いた (Kovacs et al., 2004; Shewan et al., 2005). 同心円化過程では、二種の阻害剤とも、同心円化の進行を抑制していた。さらに、ミオシン軽鎖のリン酸化を間接的に活性化し、ミオシンIIの働きを間接的に促進させる Rac1 の阻害剤、NSC23766 処理を施すと (Chauhan et al., 2011), 同心円化の進行は促進されていた。これらの結果は、クラスターの同心円化に収縮力が必要であることを示唆しており、zebrafish 胚の細胞選別解析による報告とも一致していた (Krieg et al., 2008). そして、極性化過程では、同様の阻害処理を行った場合、クラスターの再配置は進行しておらず、同心円状のままであったことより、収縮力がクラスターの極性化にも必要であり、AC と VC どちらの収縮力の変化もクラスターの極性化には重要であることが示された。また、アクトミオシン系を介した収縮力の調節は、ミオシンIIのリン酸化経路特異的ではないことも明らかとなった。本研究で用いたミオシンIIに対する阻害剤は、可逆的な阻害剤であるため、クラスター別の阻害処理による解析を行っておらず、クラスターの再配置には、主にどちらの細胞の収縮力が寄与するかは分かっていない。そのため、それぞれのクラスター特異的に収縮力の阻害を行うことで、細胞選別過程における胚細胞の動態をより明らかにできると考えている。ACクラスターとVCクラスターの極性化の進行については、卵黄顆粒を多く含む密度の大きいVCが時間の経過と共に、重力によって配置が下がった結果であると考えられたが、以上のようなアクトミオシン系に対する阻害処理によりクラスターは同心円状のままであったことから、極性化をもたらす要因としての可能性は低いと結論づけられた。しかし、これに関しては、無重力環境における培養することにより、重力がクラスターの配置変化に与える影響を調べることは重要である。

5. Activin/Nodal TGF- β シグナルと胚細胞における細胞選別過程の関与

細胞の収縮力は、細胞選別の段階的な進行をもたらす要因の一つであるという結果が得られた (第三章)。しかし、このような収縮力の調節因子は、まだ明らかになってい

ない。本実験系では、AC と VC 再集合塊の長期培養を行うと、VC からの中胚葉誘導因子により AC クラスターの分化が進行し、軟骨組織が構築されることが明らかとなった(第二章, 第三章)。この中胚葉誘導因子として作用する *activin/Nodal/TGF- β* シグナルが細胞選別過程の進行に關与するか否かに着目し解析を試みた。同心円化過程, 極性化過程, それぞれにおいて TGF- β シグナル経路の化学的阻害を行うために, Alk (*activin receptor kinase*) 4/5/7 に対する特異的阻害を行った。Alk4 は, 胞胚期の動物極側の細胞で既に発現しており, その頃, VC では, TGF- β シグナルファミリーである *Vg1* や *nodal-related protein*, *Derriere* 等が発現し, *in vivo* では, それらの相互作用により, 外, 中, 内胚葉の三胚葉化が進行するようになる (Chen et al., 2005; Birsoy et al., 2006; Ramis et al., 2007)。細胞選別過程の進行中に *activin/Nodal/TGF- β* シグナルが AC と VC 間で作用していれば, 何らかの影響が出ることが考えられた。同心円化過程で処理を施すと, AC クラスターの融合が促され, 同心円化が促進していた。そして, 極性化過程では, クラスターの再配置は進行しておらず, 同心円状のままであった。これより, *activin/Nodal/TGF- β* シグナルは, 同心円化に対しては抑制的に作用し, 極性化過程においては, クラスターの再配置を誘導することが明らかとなった。クラスターの極性化は, AC クラスターのアクチンの集積低下より, AC クラスターの表面張力低下, ひいては AC クラスターを構成している細胞の収縮力の低下によって引き起こされると推測している。このことの裏付けとして, 細胞皮層の経時的な変化を捉えるため, アクチンフィラメント (第二章) やリン酸化ミオシン軽鎖 (データ省略) の発現を細胞選別の進行に伴い経時的に比較したが, 有意な差は検出できなかった。また, Alk 阻害処理により, 細胞の収縮力が増加することでクラスターの配置に影響を及ぼしていると考え, 阻害処理後の細胞皮層におけるリン酸化ミオシン軽鎖の発現を調べたが, これもまた有意な差を検出できず, *activin/Nodal/TGF- β* シグナルがアクトミオシン系の調節を直接行っているか否かについては明らかにできなかった。

筆者は, AC と VC の細胞選別過程の進行を以下のように推測している。同心円化過程では, AC と VC はそれぞれのホモフィリックな接着性により選別を行い, クラスターを形成する。そして, カドヘリンの細胞内領域とアクチンが相互作用することにより, 皮層アクチンが再構築されていると考えられる。さらに, 極性化過程では, VC からの *activin/Nodal/TGF- β* シグナル等の細胞外シグナルが AC に影響することで接着力の増加や収縮力の低下が生じる。クラスターの配置変化に伴った収縮力の変化は, ミオシン II に対する阻害処理から示されたように, AC の変化に伴い VC の変化も重要であった。*activin/Nodal/TGF- β* シグナルは, 組織分化過程だけでなく, 細胞選別過程においても濃度依存的に作用し, 皮層アクチンに対して抑制的に働くことが示唆された。

activin/Nodal/TGF- β シグナルの影響が段階的に異なることで細胞が徐々に変化し細胞集団の分離へつながることが示唆された

6. 終わりに

細胞選別における細胞間の認識機構についての基本的知見は、近年、細胞に細胞接着分子を強制発現させた *in vitro* の系による解析に委ねられることが多い。一方で、Holtfreter らによって発見された、細胞選別研究の原点である、解離された胚細胞が互いを選別し、ホモフィリックな細胞同士再集合し、組織構築を進めるという一連の現象の解明も重要であり *in vivo* を含めた解析による進展がある。本研究では、経時的、空間的な胚細胞の振る舞いの変化を捉えることにより、形態学的、細胞生物学的に細胞選別過程の進行をより詳細に記述することができたと考えている。筆者は、原腸胚期の *Xenopus laevis* 胚由来の AC と VC による細胞選別過程が、二段階のクラスターの配置変化を経て進行し、これは細胞の収縮力によって制御され、さらに、中胚葉誘導因子である activin/Nodal/TGF- β シグナルが関与するという興味深い結果を得ることができた。activin/Nodal/TGF- β シグナルによって、クラスターの配置決定が制御されていることが示唆されたが、細胞の接着性や収縮力との直接的な関連、あるいは、AC クラスター表面に集積するアクチンフィラメントの発現との関与は、明らかにすることはできておらず、TGF- β シグナル経路によって制御される細胞選別の進行に着目したさらなる解析が俟たれる。また、近年、*Xenopus laevis* 胚の原腸胚期においては、胚葉の分離が異なるのはカドヘリンの発現のみによるものでなく、胚葉間に発現する Eph/ephrin や protocadherin, PAPC の発現が重要であるということも報告されており (Rohani, N. et al., 2011), 細胞選別現象のメカニズムを細胞接着分子や細胞皮層の収縮性を担う分子に関する細胞生物学的解析に加え、SCFS (single cell force spectroscopy) や AFM (atomic force microscope) 等を用いた力学的な解析を行うことで、*in vivo* の胚葉構築の解明へと繋がることが期待される。

謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるに当たり、多くのご支援とご指導を賜りました、指導教官である島根大学生物資源科学部 猪原 節之介 名誉教授に深く感謝致します。時に応じて厳しくご指導下さり、研究の奥深さや研究に真摯に向き合うことの大切さをご指導頂きましたこと心よりお礼申し上げます。島根大学生物資源科学部 松崎 貴 教授には、論文共著者としてだけでなく、日頃の研生活において多くの有意義なご助言と議論を賜りましたことに厚く感謝申し上げます。そして、島根大学生物資源科学部 尾崎 浩一 教授、西川 彰男 准教授には、論文共著者としてご協力、ご指導頂きましたこと深く感謝申し上げます。また、本学位論文作成に当たり審査委員として多くのご助言を頂きました、鳥取大学大学院連合農学研究科 東 政明 教授、山口大学農学部 右田 たい子 教授には深く感謝致します。

最後に、形態形成グループの学生諸氏には、研究活動の様々な面で支えて頂きましたことに御礼申し上げます。

引用文献

- Asashima M, Nakano H, Uchiyama H, Sugino H, Nakamura T, Eto Y, Ejima D, Nishimatsu S, Ueno N, Kinoshita K. 1991. Presence of activin (erythroid differentiation factor) in unfertilized eggs and blastulae of *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(15):6511-6514.
- Agius E, Oelgeschlager M, Wessely O, Kemp C, De Robertis EM. 2000. Endodermal nodal-related signals and mesodermal induction in *Xenopus*. *Development* 127, 1173-1183.
- Birsoy B, Kofron M, Schaible K, Wylie C, Heasman J. 2006. Vg 1 is an essential signaling molecule in *Xenopus* development. *Development* 133(1):15-20.
- Chauhan BK, Lou M, Zheng Y, Lang RA. Balanced Rac1 and RhoA activities regulate cell shape and drive invagination morphogenesis in epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(45):18289-18294.
- Chen Y, Whitaker LL, Ramsdell AF. 2005. Developmental analysis of activin-like kinase receptor-4 (ALK4) expression in *Xenopus laevis*. *Dev Dyn* 232(2):393-398.
- Choi YS, Gumbiner B. 1989. Expression of cell adhesion molecule E-cadherin in *Xenopus* embryos begins at gastrulation and predominates in the ectoderm. *J Cell Biol* 108(6):2449-2458.
- Choi YS, Sehgal R, McCrea P, Gumbiner B. 1990. A cadherin-like protein in eggs and cleaving embryos of *Xenopus laevis* is expressed in oocytes in response to progesterone. *J Cell Biol* 110(5):1575-1582.
- Davidson LA, Keller R, DeSimone DW. 2004. Assembly and remodeling of the fibrillar fibronectin extracellular matrix during gastrulation and neurulation in *Xenopus laevis*. *Dev Dyn* 231(4):888-895.
- Davis GS, Phillips HM, Steinberg MS. 1997. Germ-layer surface tensions and "tissue affinities" in *Rana pipiens* gastrulae: quantitative measurements. *Dev Biol* 192(2):630-644.

- DeSimone DW, Dzamba B, Davidson LA. 2007. Using *Xenopus* embryos to investigate integrin function. *Methods Enzymol* 426:403-414.
- Foty RA, Pflieger CM, Forgacs G, Steinberg MS. 1996. Surface tensions of embryonic tissues predict their mutual envelopment behavior. *Development* 122(5):1611-1620.
- Foty RA, Steinberg MS. 2004. Cadherin-mediated cell-cell adhesion and tissue segregation in relation to malignancy. *Int J Dev Biol* 48(5-6):397-409.
- Foty RA, Steinberg MS. 2005. The differential adhesion hypothesis: a direct evaluation. *Dev Biol* 278(1):255-263.
- Fukui Y, Furue M, Myoishi Y, Sato JD, Okamoto T, Asashima M. 2003. Long-term culture of *Xenopus* presumptive ectoderm in a nutrient-supplemented culture medium. *Dev Growth Differ* 45(5-6):499-506.
- Furue M, Myoishi Y, Fukui Y, Ariizumi T, Okamoto T, Asashima M. 2002. Activin A induces craniofacial cartilage from undifferentiated *Xenopus* ectoderm in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(24):15474-15479.
- Gierer A, Berking S, Bode H, David CN, Flick K, Hansmann G, Schaller H, Trenkner E. 1972. Regeneration of hydra from reaggregated cells. *Nat New Biol* 239(91):98-101.
- Green JB. 2008. Sophistications of cell sorting. *Nat Cell Biol* 10(4):375-377.
- Harland RM. 1991. In situ hybridization: An improved whole mount method for *Xenopus* embryos. *Methods Cell Biol* 36:685-695.
- Harris AK. 1976. Is Cell sorting caused by differences in the work of intercellular adhesion? A critique of the Steinberg hypothesis. *J Theor Biol* 61(2):267-285.
- Ho DM, Chan J, Bayliss P, Whitman M. 2006. Inhibitor-resistant type I receptors reveal specific requirements for TGF-beta signaling in vivo. *Dev Biol* 295(2):730-742.
- Ide H, Wada N, Uchiyama K. 1994. Sorting out of cells from different parts and stages of the chick limb bud. *Dev Biol* 162(1):71-76.
- Inman GJ, Nicolas FJ, Callahan JF, Harling JD, Gaster LM, Reith AD, Laping NJ, Hill CS. 2002. SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol* 62(1):65-74.

- Keller R, Davidson L, Edlund A, Elul T, Ezin M, Shook D, Skoglund P. 2000. Mechanisms of convergence and extension by cell intercalation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355(1399):897-922.
- Kovacs M, Toth J, Hetenyi C, Malnasi-Csizmadia A, Sellers JR. 2004. Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *J Biol Chem* 279(34):35557-35563.
- Krieg M, Arboleda-Estudillo Y, Puech PH, Kafer J, Graner F, Muller DJ, Heisenberg CP. 2008. Tensile forces govern germ-layer organization in zebrafish. *Nat Cell Biol* 10(4):429-436.
- Kuroda H, Sakumoto H, Kinoshita K, Asashima M. 1999. Changes in the adhesive properties of dissociated and reaggregated *Xenopus laevis* embryo cells. *Dev Growth Differ* 41(3):283-291.
- Lecuit T, Lenne PF. 2007. Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(8):633-644.
- Lee SY, Lim SK, Cha SW, Yoon J, Lee SH, Lee HS, Park JB, Lee JY, Kim SC, Kim J. 2011. Inhibition of FGF signaling converts dorsal mesoderm to ventral mesoderm in early *Xenopus* embryos. *Differentiation* 82(2):99-107.
- Levi G, Ginsberg D, Girault JM, Sabanay I, Thiery JP, Geiger B. 1991. EP-cadherin in muscles and epithelia of *Xenopus laevis* embryos. *Development* 113(4):1335-1344.
- Levi G, Gumbiner B, Thiery JP. 1991. The distribution of E-cadherin during *Xenopus laevis* development. *Development* 111(1):159-169.
- Lindley LE, Briegel KJ. 2010. Molecular characterization of TGFbeta-induced epithelial-mesenchymal transition in normal finite lifespan human mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 399(4):659-664.
- Luxardi G, Marchal L, Thome V, Kodjabachian L. 2010. Distinct *Xenopus* Nodal ligands sequentially induce mesendoderm and control gastrulation movements in parallel to the Wnt/PCP pathway. *Development* 137(3):417-426.
- Manning ML, Foty RA, Steinberg MS, Schoetz EM. 2010. Coaction of intercellular adhesion and cortical tension specifies tissue surface tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(28):12517-12522.

- Marsden M and Desimone DW. 2003. Integrin-ECM interactions regulate cadherin-dependent cell adhesion and are required for convergent extension in *Xenopus*. *Curr Biol* 13(14):1182-1191.
- Nandadasa S, Tao Q, Menon NR, Heasman J, Wylie C. 2009. N- and E-cadherins in *Xenopus* are specifically required in the neural and non-neural ectoderm, respectively, for F-actin assembly and morphogenetic movements. *Development* 136(8):1327-1338.
- Nieuwkoop, P.D., Faber, J. 1956. Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
- Nieuwkoop, P.D. 1969. The formation of the mesoderm in *Urodelean* amphibians. I. Induction by the endoderm. *Roux' Arch. f. Entw. Mech.*, 162, 34-373.
- Niessen CM, Gumbiner BM. 2002. Cadherin-mediated cell sorting not determined by binding or adhesion specificity. *J Cell Biol* 156(2):389-399.
- Ninomiya H, Winklbauer R. 2008. Epithelial coating controls mesenchymal shape change through tissue-positioning effects and reduction of surface-minimizing tension. *Nat Cell Biol* 10(1):61-69.
- Nose A, Nagafuchi A, Takeichi M. 1988. Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems. *Cell* 54(7):933-1001.
- Ogata S, Morokuma J, Hayata T, Kollé G, Niehrs C, Ueno N, Cho KW. 2007. TGF-beta signaling-mediated morphogenesis: modulation of cell adhesion via cadherin endocytosis. *Genes Dev* 21(14):1817-1831.
- Okabayashi K, Asashima M. 2003. Tissue generation from amphibian animal caps. *Curr Opin Genet Dev* 13(5):502-507.
- Papadimitriou E, Kardassis D, Moustakas A, Stournaras C. TGFbeta-induced early activation of the small GTPase RhoA is Smad2/3-independent and involves Src and the guanine nucleotide exchange factor Vav2. *Cell Physiol Biochem* 28(2):229-238.
- Pellegrin S, Mellor H. 2007. Actin stress fibres. *J Cell Sci* 120(Pt 20):3491-3499.
- Ramis JM, Collart C, Smith JC. 2007. Xnrs and activin regulate distinct genes during *Xenopus* development: activin regulates cell division. *PLoS One* 2(2):e213.

↵

- Rohani, N., Canty, L., Luu, O., Fagotto, F. and Winklbauer, R. 2011. EphrinB/EphB signaling controls embryonic germ layer separation by contact-induced cell detachment. *PLoS Biol.* 9, e1000597
- Schier AF. 2003. Nodal signaling in vertebrate development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:589-621.
- Schotz EM, Burdine RD, Julicher F, Steinberg MS, Heisenberg CP, Foty RA. 2008. Quantitative differences in tissue surface tension influence zebrafish germ layer positioning. *HFSP J* 2(1):42-56.
- Shewan AM, Maddugoda M, Kraemer A, Stehbens SJ, Verma S, Kovacs EM, Yap AS. 2005. Myosin 2 is a key Rho kinase target necessary for the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts. *Mol Biol Cell* 16(10):4531-4542.
- Sive HL, Grainger RM, Harland RM. 1998. Early development of *Xenopus laevis*: A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Steinberg MS. 2007. Differential adhesion in morphogenesis: a modern view. *Curr Opin Genet Dev* 17(4):281-286.
- Stubbs JL, Davidson L, Keller R, Kintner C. 2006. Radial intercalation of ciliated cells during *Xenopus* skin development. *Development* 133(13):2507-2515.
- Takahashi S, Yokota C, Takano K, Tanegashima K, Onuma Y, Goto J, Asashima M. 2000. Two novel nodal-related genes initiate early inductive events in *Xenopus* Nieuwkoop center. *Development* 127(24):5319-5329.
- Takaku Y, Hariyama T, Fujisawa T. 2005. Motility of endodermal epithelial cells plays a major role in reorganizing the two epithelial layers in *Hydra*. *Mech Dev* 122(1):109-122.
- Takeichi M. 1988. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* 102(4):639-655.
- Tao Q, Nandadasa S, McCrea PD, Heasman J, Wylie C. 2007. G-protein-coupled signals control cortical actin assembly by controlling cadherin expression in the early *Xenopus* embryo. *Development* 134(14):2651-2661.
- Townes, P.L. and Holtfreter, J. 1955. Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells. *J. Exptl. Zool*, 128, 53-120.
- Turner A, Snape AM, Wylie CC, Heasman J. 1989. Regional identity is established before gastrulation in the *Xenopus* embryo. *J Exp Zool* 251(2):245-252.

- Winklbauer R, Keller RE. 1996. Fibronectin, mesoderm migration, and gastrulation in *Xenopus*. *Dev Biol* 177(2):413-426.
- Winklbauer R, Nagel M, Selchow A, Wacker S. 1996. Mesoderm migration in the *Xenopus* gastrula. *Int J Dev Biol* 40(1):305-311.
- Wylie CC, Snape A, Heasman J, Smith JC. 1987. Vegetal pole cells and commitment to form endoderm in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 119(2):496-502.
- Xu SW, Liu S, Eastwood M, Sonnylal S, Denton CP, Abraham DJ, Leask A. 2009. Rac inhibition reverses the phenotype of fibrotic fibroblasts. *PLoS One* 4(10):e7438.
- Yajima H, Hara K, Ide H, Tamura K. 2002. Cell adhesiveness and affinity for limb pattern formation. *Int J Dev Biol* 46(7):897-904.
- Yajima H, Yoneitamura S, Watanabe N, Tamura K, Ide H. 1999. Role of N-cadherin in the sorting-out of mesenchymal cells and in the positional identity along the proximodistal axis of the chick limb bud. *Dev Dyn* 216(3):274-284.
- Zhong Y, Briehner WM, Gumbiner BM. 1999. Analysis of C-cadherin regulation during tissue morphogenesis with an activating antibody. *J Cell Biol* 144(2):351-359.

和文摘要

両生類の胚細胞は、一度解離されても、再集合し、組織親和性により細胞選別を経た後、組織の再構築を進行させることが知られている。しかし、細胞選別過程の詳細なダイナミズムは、未だ未解明な点が多い。そこで、本研究では、原腸胚期の *Xenopus laevis* 胚由来の動物極側細胞 (animal cell, AC) と植物極側細胞 (vegetal cell, VC) を用いた解離再集合系によって、異なる胚葉細胞の空間的、時間的な振る舞いを詳細に記述し、細胞選別過程のさらなる理解を試みた。

解離した AC と VC を混合し、静置培養を行うと、再集合塊が形成された。静置培養開始 2.5 時間後には、再集合塊内で AC と VC がそれぞれ小さなクラスターを形成し、ランダムに配置、5 時間後には、それぞれが大きなクラスターとなり AC クラスターが中央に、VC クラスターがその周りを取り囲むという同心円上の配置をとっていた。さらに興味深いことに、7.5 時間後には、AC クラスターが再集合塊の上方、VC クラスターが下方へと配置を変化させており、12 時間後では、再配置が完了し、*in vivo* で見られるような極性化した胚葉の配置が再現されていた。以上のように、AC と VC の細胞選別過程は、二つの過程から成ることが明らかとなり、それぞれを同心円化過程、極性化過程とした。

二段階の細胞選別過程を通して、細胞接着分子カドヘリンとその裏打ちタンパクであるアクチンフィラメントの発現に着目し、免疫組織化学的解析を行った。AC と VC における C-カドヘリンと E-カドヘリンの発現は、由来となった胚葉細胞の *in vivo* での発現と同様のパターンを示し、ホモフィリックな接着性を持つ細胞どうし、クラスターを形成していることが確認された。そして、同心円化後もカドヘリンの発現が持続していたことから、カドヘリンは *in vitro* の形態維持においても重要な役割を担っていることが示唆された。さらに、アクチンフィラメントの発現は、同心円化過程では、AC クラスターの辺縁で束状に集積しており、その後は、徐々に低下している様子が観察された。このようなアクチンフィラメントの発現変化は、クラスターの極性化を説明する現象であることが推察された。さらに、AC, VC 再集合塊の長期培養を行うと、AC における形態変化や中胚葉マーカーであるフィブロネクチンの発現増加等から AC クラスターの分化が進行していることが示され、96 時間後では成熟した軟骨組織が形成されており、AC と VC 間における誘導的相互作用が機能していることが明らかとなった。

続いて、クラスターの配置変化が何に起因するか注目し、細胞選別の進行と細胞皮層の収縮力の関与を調べるため、ミオシン II の働きを抑制する、Y27632 または blebbistatin を、逆に活性化するために Rac1 阻害剤である NRC223766 を、それぞれ、同心円化過程、極性化過程において添加した。同心円化過程で Y27632 や blebbistatin 処理を施すと、AC と VC はそれぞれ小さなクラスターがランダムに配置したままでとどまっており、同心円化の進行が抑制されていた。一方、NRC223766 処理では、AC クラスターの融合が早まり、同心円化が促進されていた。これらの結果より、*Xenopus laevis* 胚の同心円化の進行において、細胞皮層の収縮力は必要な要因であることが示唆された。次に、同様の阻害処理を極性化過程で行った。その結果、どの阻害処理においても、クラスターの再配置は進行せず、同心円上のままであったことから、適切な細胞の収縮が極性化過程において必要な要因であることが示唆された。

AC と VC 再集合塊を 7 日間培養すると、VC からの誘導的相互作用により AC は、正常な軟骨組織へと分化することが明らかとなった。そこで、VC からの中胚葉誘導因子である activin/nodal/TGF- β シグナルと細胞選別過程全体の関与に着目し、Alk (activin receptor kinase) を阻害することでその影響を調べた。Alk4/5/7 に対して特異的な阻害をもたらす SB431542 を二つの段階でそれぞれ処理すると、activin/nodal/TGF- β シグナルは、同心円化過程では、同心円化に対して抑制的に作用するが、極性化過程では、クラスターの再配置を引き起こす重要な因子となることを明らかにした。

本研究より、*Xenopus laevis* 胚の原腸胚期胚細胞を用いた細胞選別過程は、異なる胚細胞間の相互作用により、段階を経て進行し、*in vivo* と同様の組織構築を部分的に再現することが可能であり、胚葉間相互作用を解析する系として非常に有用であることが明らかとなった。さらに、クラスターの配置決定には、細胞の収縮性が大きく関与することが示唆され、異なる胚細胞間の誘導因子は、その収縮力を調節し、細胞集団の配置決定や分離の維持へと影響することが考えられた。しかし、本研究では、細胞の接着性や収縮力とクラスターの表面張力あるいは、中胚葉誘導因子との相関が明らかになっていない。今後の残された課題として、細胞接着分子や細胞骨格タンパク質の局在変化を細胞生物学的に更に詳しく解析していくことは、非常に重要であると考えている。また、これらを制御する中胚葉誘導因子との関与の解析に加え、細胞皮層張力、クラスターの張力変化等、力学的な解析も進めることによって、*Xenopus laevis* 胚の細胞選別現象をより詳細に明らかにできるものと考えている。

英文摘要

Dissociated amphibian embryonic cells were known to reaggregate and be sorted out by the tissue affinity, and to restore the tissue structures. However, little is known about the detailed dynamism of the cell sorting process. Here, the author attempted to understand the cell sorting process by preparing animal pole cells, AC, and vegetal pole cells, VC, from early *Xenopus* gastrula and then exploring temporal and spatial behaviors of such embryonic cells in the reaggregation culture system.

The dissociated AC and VC, which had been intermingled, first reassembled indiscriminately in the static culture. Shortly, each of AC and VC formed small clusters. The two kinds of clusters were located at random within the aggregate for the first 2.5 in hour culture (2.5 hC), then self-assembled into large clusters, resulting in concentric arrangement by 5 hC, that is, the AC cluster was enveloped by the VC cluster. Interestingly, the AC and VC clusters were gradually rearranged up and down by 7.5 hC, into a polarized overall arrangement just like embryonic layers *in vivo* by 12 hC. Thus it was found that the whole process of cell sorting of the AC and VC could be roughly divided into two steps, concentrification and polarization.

In this study, the author focused on the expression of cell adhesion molecules, cadherin, and cytoskeletal proteins, actin filaments, and obtained the results showing that the expression patterns of the C- and E-cadherins were consistent with those *in vivo*, in terms of the specificity of expressing germ layers, and homophilic adhesion at the cell membrane led to reassemble. Further, the accumulation of actin filaments was observed at the edge of the AC clusters during the concentrification step, and the expression was reduced during the polarization step. The accumulation of actin filaments would account for the polarization of the clusters, as is consistent with a series of current hypothesis. Another important finding was that AC clusters were able to generate the mature cartilage when the reaggregation culture was prolonged up to 96 hC. Taken together, the present experimental system allows the AC and VC to be viable for 7 days and grow into

mature cartilage tissues. The system will be useful for analyzing the interaction of embryonic cells.

The second aim of the study was to address to the question of what brought about the rearrangement of the clusters. Concretely, to analyze the involvement of cell contractility in the progression of the cell sorting, the author used a Rho kinase inhibitor, Y27632, and a specific inhibitor of the myosin II ATPase activity, blebbistatin, as the cell contraction inhibitors, Rac1 inhibitor, NSC23766, as indirect activator. The reaggregations treated with Y27632 or blebbistatin during the concentrification step showed that small clusters remained at random, suggesting the prevention of the cell sorting. Meanwhile, NSC23766 treatment during the same step showed that the fusion of AC clusters and the progress of cell sorting were promoted. These results suggested that cell contraction was a key factor for the progression of cell sorting of *Xenopus* embryonic cells. On the other hand, the treatment with any of these three drugs during the polarization step showed the clusters did not polarize, and kept the concentric array, indicating that appropriate cell contraction would also be required for the polarization step.

Considering the possibility that the above-stated potential ability of AC clusters to be differentiated into mature cartilage tissues would be due to an inductive interaction between AC and VC in a long-term culture, the author examined the involvement of activin/nodal/TGF- β signaling in the cell sorting process, using specific inhibitor, SB431542, of Alk (activin receptor kinase) during each of the two steps of cell sorting. The experimental results suggested that activin/nodal TGF- β signals acted repressively during the concentrification step but enhanced the rearrangement of the AC and VC clusters during the polarization step.

In conclusion, the present experimental system allowed the dissociated early *Xenopus* gastrula embryonic cells to progress the cell sorting in a stepwise fashion, and finally form an embryo-like body in term of the overall polarity. The dynamism analyses revealed that cell contraction would be responsible for the arrangement decision of the AC and VC clusters. Some inductive factors, probably such as activin/nodal/TGF- β signals, would participate in modulation of the cell contraction, affecting the arrangement of clusters and the maintenance of the segregation.

学位論文の基礎となる公表論文

Harata A, Matsuzaki T, Ozaki K and Ihara S (2013a)

The cell sorting of process of *Xenopus* gastrula cells progression in stepwise fashion involving concentration and polarization.

CellBio. 【第二章】

Harata A, Nishikawa A, Matsuzaki T, Ihara S (2013b)

The cell sorting process of *Xenopus* gastrula cells involves actomyosin system and TGF- β signaling.

In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal. 2013 Mar;49(3):220-9. 【第三章】