

(様式第 1 3 号)

学 位 論 文 要 旨

氏名: 原田 綾乃

題目: 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)

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。C-カドヘリン、E-カドヘリンが、由来となった胚葉に *in vivo* で発現するのと同様に発現し、クラスターを形成していることが確認された。そして、選別終了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 クラスターの分化が進行していることが示され、96 時間後には成熟した軟骨組織が形成されていた。AC と VC 間における誘導的相互作用が正常に機能しており、胚葉細胞や胚葉間の相互作用を解析するのに非常に有用な系であ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 に対して抑制的、あるいは促進的な処理を行った。ミオシン II の働きを抑制するために、Y27632 や blebbistatin を、活性化するために Rac1 阻害剤である NSC223766 をそれぞれ、同心円化過程、極性化過程において施した。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ており、細胞選別の進行が抑制されていた。一方、NSC223766 処理では、AC クラスターの融合が促され、細胞選別の進行は促進されていた。これらの結果より、

Xenopus laevis 胚の同心円化の進行において、細胞皮層の収縮は必要な要因であることが示唆された。次に、以上のような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、クラスターは再配置を進行せず、同心円上のままであったことから、細胞の収縮の調節は極性化過程においても、必要な要因であることが示唆された。

AC と VC 再集合塊の長期培養を行うと、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ている。そこで、本研究では、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の関与に着目し、*activin receptor kinase* (Alk) を阻害することでその影響を調べた。Alk 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 signal は、同心円化過程では、選別の進行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促進する重要な因子となることが示唆された。

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* における組織構築を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、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、クラスターの表面張力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明らかにすることができると期待している。