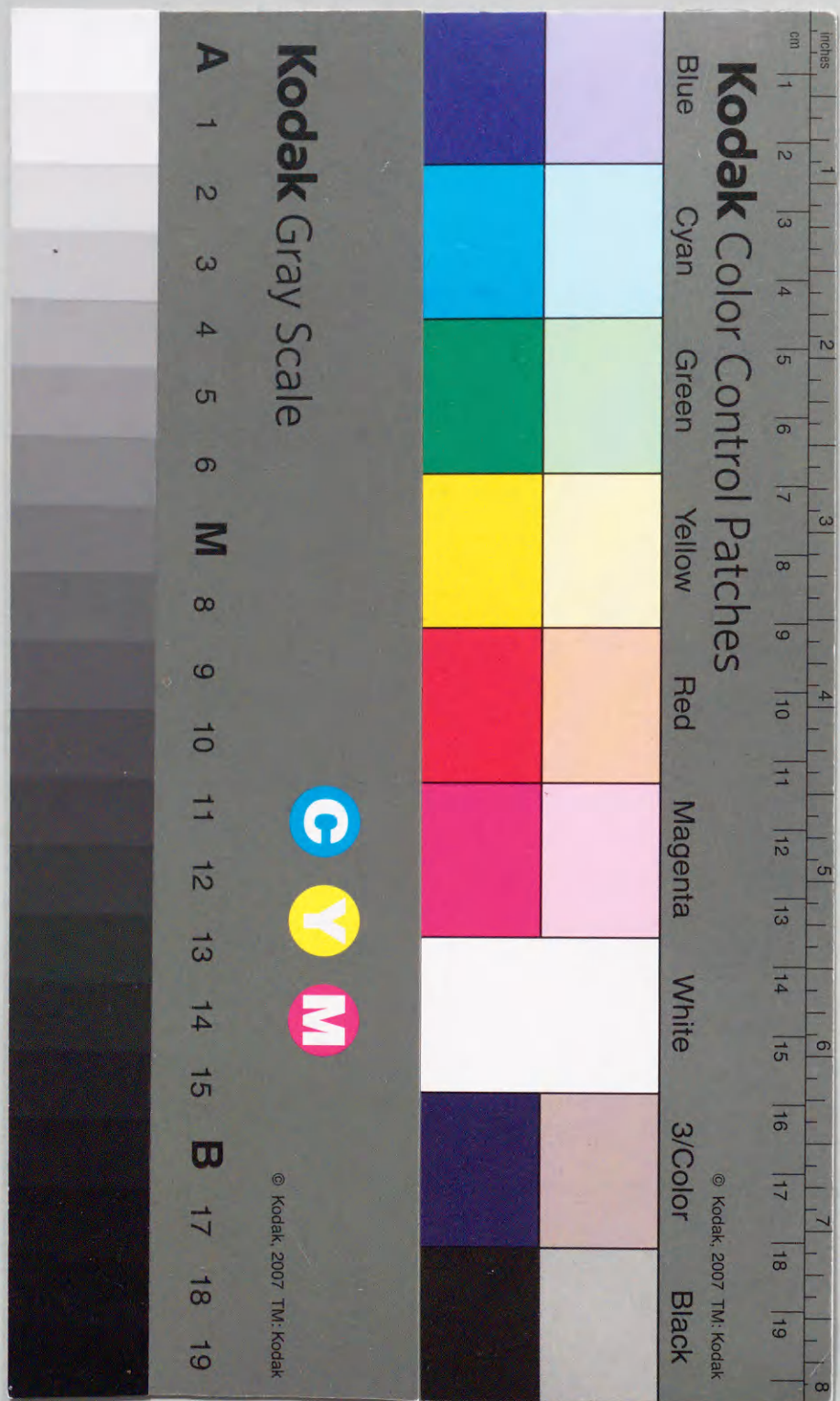


博士論文

四肢パターン形成時の  
間充織細胞間の親和性に関する研究

和田直之

1993年





①

博士論文

四肢パターン形成時の  
間充織細胞間の親和性に関する研究

和田直之

1993年



①

目次

|  | 頁  |
|--|----|
| 第1章、総合序論                                       | 2  |
| 第2章、枝芽間充織細胞の親和性の変化の培養系での変化                     | 10 |
| 序論   | 11 |
| 材料と方法  | 13 |
| 結果   | 16 |
| 議論   | 24 |
| 第3章、枝芽間充織細胞の領域特異性のin vivo における確立と<br>親和性の変化の解析 | 33 |
| 序論   | 34 |
| 材料と方法  | 37 |
| 結果   | 40 |
| 議論   | 48 |
| 第4章、総合議論                                       | 57 |
| 第5章、要約   | 65 |
| 第6章、謝辞   | 68 |
| 第7章、引用文献                                       | 70 |
| 第8章、図、表の説明                                     | 80 |
| 表1～3   |    |
| 図1～23  |    |



|     |             |
|-----|-------------|
|     | 目次          |
| 頁   |             |
| 1   | はじめに        |
| 2   | 1. 序論       |
| 3   | 2. 研究の目的と意義 |
| 4   | 3. 研究の方法    |
| 5   | 4. 研究の結果    |
| 6   | 5. 結論       |
| 7   | 参考文献        |
| 8   | 謝辞          |
| 9   | 索引          |
| 10  | 補遺          |
| 11  | おわりに        |
| 12  | 参考文献        |
| 13  | 謝辞          |
| 14  | 索引          |
| 15  | 補遺          |
| 16  | おわりに        |
| 17  | 参考文献        |
| 18  | 謝辞          |
| 19  | 索引          |
| 20  | 補遺          |
| 21  | おわりに        |
| 22  | 参考文献        |
| 23  | 謝辞          |
| 24  | 索引          |
| 25  | 補遺          |
| 26  | おわりに        |
| 27  | 参考文献        |
| 28  | 謝辞          |
| 29  | 索引          |
| 30  | 補遺          |
| 31  | おわりに        |
| 32  | 参考文献        |
| 33  | 謝辞          |
| 34  | 索引          |
| 35  | 補遺          |
| 36  | おわりに        |
| 37  | 参考文献        |
| 38  | 謝辞          |
| 39  | 索引          |
| 40  | 補遺          |
| 41  | おわりに        |
| 42  | 参考文献        |
| 43  | 謝辞          |
| 44  | 索引          |
| 45  | 補遺          |
| 46  | おわりに        |
| 47  | 参考文献        |
| 48  | 謝辞          |
| 49  | 索引          |
| 50  | 補遺          |
| 51  | おわりに        |
| 52  | 参考文献        |
| 53  | 謝辞          |
| 54  | 索引          |
| 55  | 補遺          |
| 56  | おわりに        |
| 57  | 参考文献        |
| 58  | 謝辞          |
| 59  | 索引          |
| 60  | 補遺          |
| 61  | おわりに        |
| 62  | 参考文献        |
| 63  | 謝辞          |
| 64  | 索引          |
| 65  | 補遺          |
| 66  | おわりに        |
| 67  | 参考文献        |
| 68  | 謝辞          |
| 69  | 索引          |
| 70  | 補遺          |
| 71  | おわりに        |
| 72  | 参考文献        |
| 73  | 謝辞          |
| 74  | 索引          |
| 75  | 補遺          |
| 76  | おわりに        |
| 77  | 参考文献        |
| 78  | 謝辞          |
| 79  | 索引          |
| 80  | 補遺          |
| 81  | おわりに        |
| 82  | 参考文献        |
| 83  | 謝辞          |
| 84  | 索引          |
| 85  | 補遺          |
| 86  | おわりに        |
| 87  | 参考文献        |
| 88  | 謝辞          |
| 89  | 索引          |
| 90  | 補遺          |
| 91  | おわりに        |
| 92  | 参考文献        |
| 93  | 謝辞          |
| 94  | 索引          |
| 95  | 補遺          |
| 96  | おわりに        |
| 97  | 参考文献        |
| 98  | 謝辞          |
| 99  | 索引          |
| 100 | 補遺          |

## 第 1 章 総合序論

本論文は、1970年代後半から1980年代前半にかけての日本の経済成長と、その背景となった技術革新と産業構造の変化に関する総合的考察を目的とする。本論文は、多くの大規模な調査データと、その分析結果に基づいて、日本の経済成長のメカニズムを明らかにし、その持続可能性を評価する。また、今後の日本の経済発展に向けた政策提言も行う。

本論文は、第1章から第5章まで構成されている。第1章は、本論文の目的と意義、研究の方法、研究の結果、結論を概観する。第2章は、日本の経済成長の歴史と現状を概観する。第3章は、日本の経済成長のメカニズムを明らかにする。第4章は、日本の経済成長の持続可能性を評価する。第5章は、今後の日本の経済発展に向けた政策提言を行う。

本論文は、多くの大規模な調査データと、その分析結果に基づいて、日本の経済成長のメカニズムを明らかにし、その持続可能性を評価する。また、今後の日本の経済発展に向けた政策提言も行う。



生物の発生過程、すなわちひとつの受精卵からひとつの個体が形成されるまでの過程は、時間的あるいは空間的に実に動的であるため、多くの人間の興味をそそる。中でも一個の細胞（受精卵）が、増殖や分化、さらには接着、移動等の過程を経て一定の形態を作る過程、すなわち形態形成は、この動的な変化が最も顕著に現れるため、古くから多くの研究が行われてきた。特に、発生の場合を構成する細胞（集団）が一定のパターンを形成するパターン形成の過程は、生物が特定かつ固有の形態を形成するうえで非常に重要である。しかし、パターン形成機構は単に分化や増殖などの個々の細胞の状態を観察するだけでは説明しきれず、むしろ細胞間や組織間の相互作用の重要性が指摘されてきた。

実際、パターン形成解析の材料として多用される脊椎動物の四肢パターン形成過程についても、移植等による多くの実験形態学的観察から細胞間や組織間の相互作用の重要性が指摘され、それらの結果を元にした理論的考察（モデル）がいくつか提唱されてきた（Wolpert, 1969; French *et al.*, 1976; Newman and Frisch, 1979; Oster *et al.*, 1985等）。しかし、具体的な“相互作用”の実態については不明な点が多く、これらはモデルのままであった。しかし、近年になり、分子生物学的手法を用いた実験結果が多く報告され、これらの報告を過去の実験形態学的観察と照らし合わせると、上記のモデルはかなり実際の機構を反映していることが明らかになってきた。そして、それらの報告やモデルをまとめることによって、現在、四肢パターン形成機構の流れが明らかになりつつある。本論文では、発生時における四肢のパターン形成の機構について、上記の流れをふまえつつ、一方で解析があまり進んでいなかった、間充織細胞の性質とパターン形成との関連に注目して解析を行った。



## 1、四肢パターン形成の定義

脊椎動物の四肢には外見上からもわかるように三次元的に明瞭な軸性（基部先端部軸、前後軸、背腹軸）が存在し、これは動物種の差をこえてほぼ共通している。一方、四肢を構成する組織には腱や真皮などの結合組織や骨、筋肉、血管、神経、表皮等があるが、これらの組織の配置は同一種では一定と考えてよく、四肢は発生学の中で形態形成の解析、中でもパターン形成の研究材料として多く用いられ、多くの情報を提供してきた。

四肢は発生初期の体側部の前後に、左右各一对の肢芽として観察され（図1 a）、発生に伴い体軸から離れる方向（遠位方向）へ伸長していく。肢芽は将来表皮となる外胚葉性上皮と、それによって取り囲まれる間充織とから構成される（図1 b）が、この間充織は主として側板由来であり、これらの細胞群は最終的に軟骨とそれを取り囲む繊維性結合組織（後に腱、真皮等になる）とに分化する。上記以外の組織は後に肢芽内に移動し、軟骨や結合組織の配置に従って配置されるので、四肢のパターン形成の問題とは、第一には側板由来の間充織細胞が、肢芽の特定の領域で軟骨または結合組織の決まった方向に分化する、その機構を解析する点にあると言える。とはいえ、実際には形態的な観察のし易さ等の点から軟骨の数や形態を指標に研究が進められてきた経緯もあり、軟骨のパターン形成を四肢のパターン形成とほぼ同義と考えて議論することも多い。この論文でも、同様の考えに基づいて四肢パターン形成過程の解析として、軟骨パターン形成機構について議論していく。

## 2、四肢軟骨パターン形成に関する知見

図1 c はニワトリ前肢の軟骨パターンを示したものである。四



肢の軟骨は基部先端部軸（近位遠位軸）や前後軸、あるいはこの図に垂直な軸である背腹軸に沿って一定のパターンを形成している。このような軸性は、肢芽を構成する間充織どうし、あるいは間充織と外胚葉間の相互作用によって形成、維持されている。ただし、前後軸と背腹軸は体軸に従って決まるのに対し、基部先端部軸は肢芽を構成する細胞だけで決定される点で、他の軸の場合とは異なっているといえる。この論文では主にこの基部先端部軸の決定機構について解析した。

図1 bに示すように、肢芽の先端部には他に比べ肥厚した外胚葉（外胚葉性頂堤；apical ectodermal redge、以下AER）があり、その下部には発生のかなり後期まで未分化な間充織細胞（図1 b、P Zと示した領域）がある。基部先端部軸方向の軟骨パターンは、古くからの実験形態学的手法を用いた従来の研究から、AERと間充織細胞の相互作用の結果決まるとされている。すなわち、

①、肢芽間充織細胞は、AERの下部200～300  $\mu$ mまでの領域にとどまっている間は未分化状態が保たれるが、細胞分裂によって肢芽の伸長が進行すると、増殖した細胞のなかでこの領域を離脱するものが出てくる。これらの細胞は肢芽の基部側から分化を始める。（図2 a、Summerbell *et al.*, 1973）。

②、AERは軟骨パターンの決定に不可欠であり、AERを除去すると、除去した発生段階に応じて先端部の軟骨が欠如する。例えば、初期にAERを除去すると基部の構造だけしか形成されないが、除去が後期になるほどより先端部側の構造まで形成される（図2 b、Summerbell, 1974）。

③、②とは逆に、初期の先端部領域を移植すると比較的基部から先端部までの構造が形成されるが、後期のものからは先端部のパターンしか形成されない（図2 c、Summerbell and Lewis, 1975）。



これらの結果から、AERの下部にとどまる時間の長さによって形成される軟骨パターンが決定され、初期にこの領域をはずれた細胞は基部側の軟骨を形成し、後期になるほど先端部の軟骨を形成すると思われる。なお、肢芽の形態形成には肢芽後端部の間充織領域 (zone of polarizing activity; 以下ZPA)も不可欠で、こちらは前後軸の決定に必要である。(図1b)。

上記の知見をもとに、基部先端部軸に沿った軟骨パターンの形成機構についていくつかのモデルが提唱されてきたが、中でもWolpertらの提唱した進行帯モデルが注目されてきた(Wolpert, 1969; Summerbell *et al.*, 1973)(図2d)。これは、決定される軟骨の違いを"位置価"の違いとしてとらえるもので、肢芽の発生に合わせて指定される位置価が変化し、異なった形態や数の軟骨が出来るというものである。このとき、指定される位置価はAERの下の未分化な領域にとどまっている時間の長さによって変化するものと考え、彼らはこの領域を進行帯(progress zone)と命名した(図1b、PZと示した領域、Summerbell *et al.*, 1973)。このモデルは上記のAERの除去実験や、肢芽先端部領域の移植実験の結果を容易に説明し得ることから支持を集めてきたが、位置価の実体については近年まで手掛かりがなく、この概念は"モデル"のままであった。

ところが、近年になって肢芽の分子レベル、特に遺伝子レベルでの研究が進むなかで、軟骨分化とは無関係に、しかし領域特異的に発現する分子の報告がいくつかなされてきた。その中で、多くの動物の形態形成に関与する遺伝子として注目されているHomeobox遺伝子のうち、クラスター(群)を構成するいくつかの遺伝子(Hox遺伝子)が染色体上の配列に従って、肢芽間充織において時間的、空間的に制御されて発現しているという報告がなされた(図3、



Dolle *et al.*, 1989; Yokouchi *et al.*, 1991a等)。この遺伝子群の発現パターンの組み合わせはその後形成される軟骨パターンともよく一致する (Yokouchi *et al.*, 1991a) (図3) ことから、それ以来、この組み合わせを一種の位置価と解釈し、これによって軟骨が指定されると考えられるようになった。この考えによれば、発生に従って、肢芽間充織はいくつかの領域に細分され、それぞれの領域に特異的な細胞の性質を発現することで、後の軟骨分化過程に影響しながら、特異的な軟骨を形成することになる。従って肢芽間充織は発生に伴って、あるいは領域特異的にその性質を変化させていると言える。しかしながら、発生に伴う細胞レベルの変化については仮説としては提唱されているものの、実験結果としては軟骨分化能が発生段階によって異なることが報告されているにとどまり (Cottorill *et al.*, 1987; Ide and Aono, 1988 等)、軟骨分化以前の変化についての報告はない。

### 3、細胞表面の変化、特に細胞選別と基部先端部軸の変化

一方、四肢のパターン形成に知見をもたらした実験系として、有尾両生類等を用いた再生系も用いられてきた (Stocum, 1991)。これは、四肢の切断後に形成される未分化な細胞集団である再生芽を、発生時の肢芽に類似した構造と考え解析するものである。四肢の再生では失われた部分より先端側の構造しか形成されないため、再生芽が形成される位置によって、その性質に違いがあると考えられるが、Stocumらは、基部の再生芽と先端部の再生芽には、少なくとも細胞集団として接着力の違いがあり (Nardi & Stocum, 1983) (図4)、さらにレチノイン酸処理によって基部先端部軸に沿った軸性を基部化すると、それに従って接着力も変化することを報告した (Stocum and Crawford, 1987; Crawford and Stocum, 1988)。こ



の結果は、基部先端部軸に沿った領域特異性は、再生芽を構成する細胞の接着力の変化、すなわち細胞接着で確認される細胞表面の変化としてとらえることが出来ることを示している。

この結果をもとに、私は、ニワトリ胚肢芽の場合も同様なことが言えるのではないかと考え、位置価が異なると考えられる細胞、即ち発生段階の異なる進行帯細胞を混合して培養し、両者の分布および軟骨分化との関連を調べた。その結果、初期と後期の細胞を混合した場合、両者は選別し、初期の細胞は軟骨凝集塊を形成していたことから、両者の間に凝集能の差があり、凝集しやすい初期の細胞は結果的に速く軟骨分化したと考えた（和田、修士論文；Wada et al., 1993）。この結果は、再生芽の場合と同様に細胞選別で見られる表面の変化があることを示唆したが、一方で、この変化は領域特異的な変化、即ち位置価の変化なのか、あるいは時間的な変化、即ち発生が進行したことにより肢芽を構成する間充織全体が変化した結果であるのかははっきりしない等の問題が残り、また軟骨分化の結果である可能性もあった。

#### 4、本研究の概要

そこで、本研究においては上記の点をふまえ、肢芽の時間的、空間的な変化を考慮した上で、間充織細胞の親和性の変化を細胞表面の違いに注目しながら検討し、それらが最終的な軟骨パターンに与える影響について考察した。

まず第2章では、先に報告した進行帯細胞の選別は、間充織細胞が軟骨分化する以前の段階で観察されること、一方で、発生の進んだ肢芽の基部の細胞は、初期の肢芽の進行帯細胞とは選別しにくいことから、肢芽間充織細胞には時間的、領域特異的な親和性を持つことを示す。また、この親和性の変化をもたらしている原因の一







... (faint text) ...

... (faint text) ...

## 第 2 章

### 肢芽間充織細胞の親和性の変化の培養系での解析

... (faint text) ...

... (faint text) ...



## 序論

前章で述べたように、進行帯領域は組織レベルでは発生段階の後期まで未分化であるが、形成できる軟骨パターンは後期になるほど先端部側に限定されていく。そのため、進行帯を構成する中胚葉細胞の性質が発生に伴って変化している可能性は数多く議論されている。一方、有尾両生類の再生芽の解析から、基部由来の再生芽と先端部由来の再生芽とでは接着力が異なるという報告 (Nardi and Stocum, 1983) があり、肢芽の発生においても基部と先端部の違いは細胞の接着力の違いによってもたらされる可能性が示されている (横内裕二、1991)。

筆者も同様の考えに立ち、混合培養系を用いて、進行帯細胞の凝集能が発生と共に変化している可能性を示唆した (和田、修士論文; Wada et al., 1993)。しかし、この実験では①観察結果が軟骨分化後であったため、細胞の凝集は軟骨分化の結果である可能性や、軟骨分化能の差の反映である可能性があり、また、②肢芽先端部についての検討だけでは不十分であり、肢芽の発生段階によって肢芽全体の親和性が異なっている可能性もあり、観察結果は時間的な変化なのか領域特異的なものなのかを区別出来ない、などの問題点が残った。

そこで、本実験では以下の点に留意して間充織細胞の時間的、空間的な親和性の変化を再度検討した。①細胞選別の判定を培養開始18~24時間後に行った。これにより軟骨分化の影響を出来るだけ排除した。②細胞の混合は、発生段階の異なる肢芽先端部由来の細胞だけでなく、基部先端部軸に沿ったいくつかの領域由来の細胞についても行い、親和性をもとにした肢芽内の領域特異性について検討した。また、この細胞選別を引き起こし得る細胞の性質の変化に、細胞間の接着性の変化が関与している可能性について示す。



... (faint text) ...

他方、肢芽を基部先端部軸に沿っていくつかの領域に切り分け、そこから調製した間充細胞を適当な条件で培養すると、どの領域由来のものであっても軟骨に分化できる (Archer *et al.*, 1984)。しかし、*in vivo* での基部先端部軸に沿った軟骨は連続ではなく、関節に見られる不連続性を有する。肢芽内での軟骨分化過程は、軟骨に多く発現するタンパクやその遺伝子の分布の観察などを通して調べられているが、分化直後の軟骨の分岐や分節といったパターンについて詳細に観察した報告は少ない。Hinchliffe (1977) は、発生段階 27 前後の手首から指にかけての軟骨分化の様子を  $^{35}\text{S}\text{O}_4$  の取り込みを指標にして観察しているが、これによると、最終的に関節の間に位置する細胞は最初から軟骨分化の程度が悪く、分節する位置 (関節の形成位置) はかなり初期から正確に決まっていることがわかる。一方で、肢芽間充細胞は高密度では軟骨細胞に、低密度では繊維芽細胞に分化することから、この予定分節領域では局所的な細胞密度の低下が起こっていることが考えられる。ここで、肢芽内において親和性の異なる二つの細胞集団が隣接して位置するならば、その境界においては親和性の差から細胞密度の低下が予想され、結果的にその位置において軟骨分化の不連続性をもたらす可能性がある。このような仮説のもとで、本章の後半では、細胞親和性の変化が形態に与える影響として、軟骨分化の不連続性との関連を考え、この仮説を検証する実験を行ない考察した。



## 材料と方法

### 1、動物

実験動物として、ニワトリ (*Gallus gallus*, 岩谷種卵) 卵を用い、Hamburger and Hamilton (1951) の発生段階表に基づいて必要とする発生段階まで孵卵して用いた。またキメラ解析を行う必要があるときはウズラ (*Coturnix coturnix*, 仙台ウズラ) 卵を同時に用い、肢芽の形態をもとに上記の発生段階表に準じて発生段階を定めた。

### 2、肢芽間充織細胞の調製

肢芽間充織細胞の調製は以下のとおり行った。まず、胚体をタイロッド液中に取り出し、漿膜、羊膜を取り除いた後、肢芽のみを切りだした。ここから目的とする領域の組織をタングステンニードルを用いて切り出し、4℃、0.5%に調製したトリプシン (Difco)-タイロッド液中に移した。20-40分後に再度タイロッド液中に移し、ここで外胚葉をはがした後、間充織組織のみをCMF-タイロッド ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  不含のタイロッド) 液に移して37℃で40分ほど放置した。これにより細胞間の結合がゆるくなるので、CMF-タイロッドを培養液に置換したのち、ピペッティングにより単細胞に解離した (Hattori and Ide, 1984)。

### 3、細胞培養

細胞の培養は Hattori and Ide (1984) の方法に従った。単細胞に解離した間充織細胞を血球計算盤 (TATAI) を用いて測定し、細胞濃度が  $2.2 \times 10^5$  cells/ml となるように培養液を添加した。培養液は Ham の F-12 (NISSUI) に、ウシ胎児血清 (FBS) を1%になるように加えたものを使用した。培養皿 (Falcon 3001 または 3002) 上に



内径6mmのステンレスカラムを立て、ここに上記の濃度に希釈した細胞浮遊液を0.3ml入れ、37℃、5% CO<sub>2</sub>の条件下で4時間放置した。これによりほとんどの細胞が培養皿上に付着するので、カラムを外したのち培養液を添加して培養を継続した。

2種類の細胞を混合培養する場合は、後述の方法で標識する細胞群と、標識しない細胞群とをそれぞれ上記の細胞濃度に調製し、前者を0.1ml、後者を0.2mlステンレスカラム中に入れた。

#### 4、細胞の標識

2種類の細胞を識別するための細胞の標識は、一方を細胞播種前にあらかじめ蛍光色素で染色する方法、またはニワトリとウズラの細胞を混合して培養したのち、ニワトリの細胞と特異的に結合する単クローン抗体A223抗体で免疫組織化学的に染色してキメラ解析をする方法を用いた。ここでは前者について記載する。

上記2の方法で調製した細胞浮遊液を100 × gで5分遠心し、上清を吸引除去して細胞のみを回収した。ここに蛍光染色液 PKH26 (ZYNAXIS) の色素溶液 ( $4 \times 10^{-6}$ M 濃度) を入れ、細胞を浮遊させて5分放置した。次いで、5%のFBSを含むF-12を入れて反応を停止させ、数回洗浄した後、遠心により細胞を回収した。

#### 5、選別の定量化

細胞選別の定量化は、画像解析装置 (OLYMPUS) を用いて行った。蛍光顕微鏡下で蛍光染色された細胞 (群) の分布を観察した後、この視野をTVカメラで装置に入力した。この後、入力した画面を画像処理して蛍光染色された細胞 (群) だけをピックアップし、この細胞 (群) の画面上での大きさを計測し、比較した。なお、画面上での一つの細胞の面積は約  $100 \mu\text{m}^2$  として計算した。



## 6、細胞間の接着の測定

上記2および3の方法で発生段階25と発生段階20の細胞の培養系を作り24時間培養した。培養液を除去した後、再度同じ場所にカラムを立て、ここに下記に示す方法で調製した発生段階20もしくは発生段階25の標識細胞浮遊液を0.15ml入れた。30分後カラムをはずしタイロード液で数回洗浄した後、培養細胞上に接着した標識細胞を蛍光顕微鏡下で観察し、この細胞数を計測した。

標識細胞の調製は上記2および4の方法に従い、最終濃度を $6.0 \times 10^5$  cells/mlに調整した。このとき、細胞の解離は上記2の方法に従ってCMF-タイロードを用いる方法と、CMF-タイロードを用いず、0.1%のトリプシンと10mMのCaCl<sub>2</sub>を含むタイロード中に37℃で一時間放置した後、ピペティングする方法(Takeichi *et al.*, 1979)の2通り行った。それぞれの方法によって得られた細胞は異なる接着性を示した(結果3を参照)。

## 7、細胞塊の培養

上記2の方法で調製した細胞浮遊液を100 × gで5分遠心し、上清を20%のFBSを含むF-12培養液に置換し37℃に2時間放置した。これにより細胞どうしが接着し、細胞塊として扱えるようになるので、ここから1辺約250 μmの立方体を切り出し、2%のFBSを含むF-12を満たした培養皿(Falcon 3001)中に移した。この中で、2個の細胞塊を200 ~ 300 μmほど離して並べ、マイクロウォームプレートを用いて培養皿をそのまま37℃に温め1時間放置した。細胞塊が培養皿の底に付着したのを確認した後、37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で4日間培養した(図9)。



## 8、免疫組織化学

培養した細胞（塊）を3%のパラホルムアルデヒド(PFA)を含むリン酸緩衝塩類溶液(phosphate buffered saline ;PBS)中で30分固定した後、0.1%のTriton-X100を含むPBSで10分処理した。洗浄の後、一次抗体としてニワトリの細胞と結合するA223抗体(A223抗体産生ハイブリドーマ培養上清)をのせ、1時間反応させた。このあと一次抗体を洗浄し、二次抗体をのせて再度1時間放置した。二次抗体としてはFITC-標識抗マウスIgG ヤギ IgG (Fab') (Tago)を用いた。抗体を洗浄した後、培養細胞は封入剤(0.1%のバラフェニレンジアミンを含むPBSとグリセロールを1:9に混合したもの)で封入して、細胞塊を染色した場合はPBS溶液に浸したままで蛍光顕微鏡で観察した。

## 9、軟骨分化領域の組織化学的検出

培養した細胞塊の軟骨分化領域を識別するためにアルシアンブルー染色を行った。細胞塊を3%PFA-PBSで固定した後、1%の塩酸を含む70%エタノール(HCl-EtOH)に置換し、さらに0.1%のアルシアンブルーを含むHCl-EtOH溶液中で染色した。HCl-EtOHで洗浄した後染色された領域を観察した。なお、免疫染色した試料をアルシアンブルー染色する場合は、上記8の方法で免疫染色して観察した後に行った。



## 結果

### 1、発生に伴う枝芽先端部細胞の親和性の変化

枝芽進行帯細胞の親和性の時間的な変化を細胞の混合培養によって調べた。2種類の細胞を混合したとき、親和性に違いがなければ両者は入り混ざり（分散）、違いがあれば両者は選別し同種のもので集まって細胞群（クラスター）を作ることが予想される。そこで、2つの発生段階の枝芽先端部の間充織細胞を混合して播種し、20時間培養したときの、それぞれの細胞の分布を調べた。

図5 bは細胞播種後4時間での様子を蛍光顕微鏡下で観察した結果である。混合した細胞の発生段階の違いに関係なく、播種直後は標識された細胞（写真では白く確認される細胞；ニワトリ由来、あるいは蛍光色素 (PKH26) で事前に標識したもの）と標識されていない細胞（ウズラ由来、あるいは蛍光色素で標識しなかったもの）は均等に入り混ざっていた。このとき、明視野像から分かるように、暗視野像（蛍光顕微鏡像）で細胞の分布が確認されない部分（図5 c、矢印）にも細胞は密に分布していた。以下に示す結果は全てこの図と同様に全視野に細胞が分布する領域において観察を行い、標識された細胞の分布だけを暗視野像にて示した。

図6に播種後20時間後の結果を示す。ここではニワトリ—ウズラのキメラを用いてニワトリの細胞だけをA223抗体で標識、観察した。図6 a、e、iの写真からわかるとおり、同じ発生段階由来の細胞を混合した場合は標識された細胞は全体に分散しており、集合している様子は見られない。これに対し、異なった発生段階の細胞を混合した場合は、標識された細胞は集合し、標識されない細胞とは選別していることが分かる（図6 b, c, d, f, g, h）。このとき、標識されたものとされていないものとの発生段階が離れるほど、標識された細胞はより集合している（図6, bとc, gとh



の間で比較)。

この結果を数量化したものを表1に示す。これは、暗視野面で蛍光を発している細胞、あるいは細胞群(クラスター)の画面上での大きさを面積に換算して計算、平均を求め比較したもので、標識された細胞の分散の程度を示している。すなわち、この値(平均の面積)が大きいほどクラスターが大きいこと、即ち細胞が集合していることを、また小さいほどクラスターは小さく、個々の細胞が分散して分布していることを示す。図6の写真に示した結果と同様に、同じ発生段階の細胞を混合した場合に比べ、異なった発生段階の細胞を混合した場合は標識された領域の平均面積が有意に大きい値を示していること、また混合する発生段階が離れるほど平均面積は大きくなることから、異なった発生段階の細胞間では選別が起こることが示唆される。これらの結果から、進行帯細胞は枝芽の伸長に伴ってその親和性を変化させていること、また選別の度合いの大きさから発生段階が離れるほどその親和性の違いが大きくなることが示唆された(Wada and Ide, 1994; Ide et al., 1994)。

## 2、基部先端部軸に沿った親和性の変化

図6に見られるような進行帯細胞の枝芽の伸長に伴う親和性の変化には、発生による枝芽全体の経時的な変化と、進行帯細胞が形成する領域に対応した変化の2つの可能性が考えられる。そこで、発生段階25の枝芽を基部先端部軸に沿って先端部(D)、中間部(SD)、基部(P)の3領域に切り分け、それぞれの領域を発生段階20、23、25の進行帯細胞と混合してその分布を調べた。このときの大きさは、先端部を約250  $\mu\text{m}$ 、中間部と基部をそれぞれ約300  $\mu\text{m}$ とした。結果を図7に示す。発生段階25の先端部細胞は25の進行帯細胞と混合した場合には両者は入り混じった(図7i)



が、他の2種類の細胞と混合すると選別した(図7c, f)。一方、中間部領域の細胞は発生段階23の細胞と混ぜたときに最もよく入り混じり、分散する様子が観察された(図7e)が、他の2種類の細胞と混ぜた場合は選別した(図7b, h)。さらに、基部の細胞は発生段階20の細胞と混合した場合には分散したが、それ以外の細胞と培養した場合は選別した(図7a, d, g)。

この違いを前項と同様に細胞のクラスターの面積の大きさに置換して示したものが表2である。この場合も図に示した結果と同様の結果が得られ、領域ごとの親和性の差が示された。これらの結果は、初期の枝芽先端部細胞の親和性は枝芽の発生(伸長)が進行しても基部領域の細胞に維持され、結果的に発生段階25の枝芽では親和性の異なるいくつかの細胞集団が、基部先端部軸に垂直に帯状に並んでいる可能性を示している(Wada and Ide, 1994)。

ただし、図7aからも分かるように、基部の細胞を20の細胞と混合した場合は、23や25の細胞と混合した場合よりは分散するものの、幾分選別している様子が観察された。この結果は表2からもわかり、25の先端部どうし(25D+25D)、あるいは23の先端部と25の中間部(23D+25SD)の混合の結果に比べ、20D+25Pはやや大きい値(247.6)を示している。このことは、25の基部の細胞の親和性と20の先端部の細胞の親和性がまったく同じではなくやや異なること、すなわち、幾分は時間的な変化が生じていることを示唆している。従って、ある発生段階の枝芽先端部細胞の親和性は、その後の発生段階では枝芽の基部側に維持されるが、発生の進行に伴って少しずつ変化することを示している。

なお、これらの細胞選別には細胞間の接触が必要であることが以下に示す実験からわかった。これは低密度下で細胞を混合培養したもので、初期細胞播種数を $1.0 \times 10^5$  cells/ml (通常播種時の半



分量) にすると細胞の選別は観察されなかった(図には示していない)。このときは24時間培養しても個々の細胞の接触は観察されず、また、特定の細胞種の集合も観察されなかった。一方、播種数を通常の場合よりも幾分減らし( $1.8 \times 10^5$  cells/ml、通常の場合の約85%)、播種直後には接触がないが、数時間後には接触できる状態にしておくと、この場合は選別が観察された(図には示していない)。以上の結果は細胞選別には播種直後の細胞間接触は必要ないが、増殖によって数時間後には接触することが必要であることを示しており、細胞表面の機能分子の関与を示唆している。

### 3、枝芽先端部細胞の接着性の変化

上記の結果から、枝芽先端部の細胞の親和性は基部先端部軸上の領域特異性を強く反映したものであることが示されたが、次に、親和性の違いが細胞表面の接着性の違いであることを示す実験を行った。実験としては、あらかじめ発生段階20と発生段階25の細胞を別個に培養しておき、この上に標識した20と25の細胞を別々に播種し、30分後にタイロード液で洗った後に培養細胞上に残った細胞の数を計測することを行った。これにより各発生段階の細胞表面の接着性の違いを判断できる。このとき細胞の解離方法として、 $Ca^{2+}$ 存在下で解離した場合に接着性の違いが見られた。この方法により得られた細胞を播種し、洗浄したあとに残った細胞の分布の一例を図8に示す(図8 a, b, c, d)。白い丸は標識された個々の細胞を示すが、この写真に見られるように、同じ発生段階の細胞と接した場合の方が、異なった発生段階の細胞と接した場合に比べ速く接着しやすいこと、即ち前者の組み合わせの方が接着しやすいことが分かった。この結果をグラフ化したのが図8 eとfである。これは、洗浄後に残った細胞の数を、同じ発生段階の組み合わせの場合



と異なる発生段階の組み合わせの場合とで比較し、前者の値を100%としたときの後者の割合を示してある(単位%)。ここに示したものはいずれも10回の実験の平均であり、後者の組み合わせでは前者に比べどちらも有意に低い値を示した( $p < 0.01$ ないしは $p < 0.05$ )。従って、上記の親和性の変化をもたらす要因のひとつに、細胞表面の接着性の違いがあることが示唆された。

なお、上記のように、ここで用いた標識細胞は $Ca^{2+}$ の存在下でトリプシン処理により解離したものであり、この条件では $Ca^{2+}$ 依存の接着分子は細胞表面に維持される(Takeichi *et al.*, 1979)ので、以上の結果は $Ca^{2+}$ 依存型の接着分子による作用であることが考えられた。 $Ca^{2+}$ 非存在下で細胞を解離、調製した場合は、上記のような結果は得られなかった(結果は示していない)。このことについては議論の項で考察する。

#### 4、親和性の異なる2つの細胞群の境界での軟骨分化

上記の親和性が、軟骨分化時に与える影響を調べる目的で次の実験を行った。材料と方法に示したように、発生段階20と25の先端部領域から調製した細胞塊を別個に作った。ここから、一辺約200  $\mu m$ の大きさの立方体を切り出し、二個の立方体を培養皿の底に200 ~ 300  $\mu m$ 離して付着させた。これを数日間培養するとそれぞれの立方体は軟骨に分化したが、一方で増殖によって多くの場合両者は接した。このときの接触面付近での軟骨分化の様子を調べた(図9)。この時組み合わせとしては実験区として20+25、対照区として20+20、25+25の立方体を用いた。

結果を図10に示す。これは4日間培養したもので、ニフトリーウズラのキメラを作って境界面でのニフトリ細胞の分布を合わせて調べた。上段(a, b, c, d)が明視野像(位相差像)、中段



(e, f, g, h) は同じ視野の暗視野像 (蛍光顕微鏡像) で、A223抗体によりニワトリ細胞がFITCで標識されている。下段 (i, j, k, l) はアルシアンブルー (alcian blue; 以下AB) 染色したもので、この場合ABで染色される領域は軟骨分化していると考えられる。暗視野像 (中段) からわかるように、接触面付近 (矢先) で両細胞群は、それほど混じり合わずに境界を形成している。観察する試料が立体的なので焦点面をずらしながら全体を観察すると、同じ発生段階どうしを接触させた場合の方が境界での細胞の入り混じりの度合いが大きい、そのことについては評価が難しいためここではとり上げない。同じ視野の領域での軟骨分化の様子を観察すると、AB染色の写真 (下段) で見られるように、実験区では境界付近での染色の程度が弱い、すなわち軟骨分化の程度が弱い。このとき、両者の境界がはっきりしている場合 (例; 図10i) と曖昧な場合 (図10j) とがあったが、染色前の位相差像からだけではさほどはっきりしたことはいえず、形態とは必ずしも一致しない。一方、対照区ではABの染色領域は連続しており、軟骨分化が連続して起こっていることを示している。

この結果を表3にまとめた。この表は4日間培養した時の、境界面と思われる領域での軟骨分化の程度を三段階に分けたもので、+は連続して軟骨分化しているもの (例; 図10k, l)、-は連続性が見られないもの (図10i)、±は両者の中間、すなわちABで弱いが染まる領域が一部に見られるもの (図10j)、という判断基準で観察結果を分類したものである。なお、細胞塊の増殖が悪くて、両者が接触しないものもいくつかあったが、それらについてはこの結果に入れず、接触した細胞塊の境界についてのみまとめている。表からわかるように、対照区 (20+20, 25+25) では+が多く、隣接した細胞塊は連続して軟骨分化しやすいことがわかる。一方、実







## 議論

本章の結果から、間充織細胞の基部先端部軸に沿った時間的、領域特異的な親和性の変化が示唆された。以下、個々の実験結果とこの変化をもたらす機構について議論していくが、肢芽内の領域特異性と親和性の変化、及び肢芽軟骨パターン形成の関連についての考察は、次章の結果もふまえて第四章で行なう。

### 1、細胞選別

複数の組織から細胞を調製し、これを均一に混合して培養すると細胞の由来によって選別が起こることから、それぞれの組織を構成する細胞の親和性の違いを調べる実験がいくつか行われてきた。中でも有名なものは、混合培養によって組織特異的な親和性があることを示した Townes and Holtfreter (1955) や Steinberg (1964) の実験であろう。これらの実験結果は、組織にはその秩序だった形態維持のために、構成する細胞は組織特異的な接着性を持ち、同種の接着性を示すものどうしがよく結合するために選別が起こると解釈されている。Steinberg (1964, 1970) はさらにこの考えを進めて "差次粘着説" という概念を発表した。これは、細胞選別を接着性の熱力学的安定性から説明しようとするもので、例えば、接着の異なる複数の細胞群を混合しておく、接着力の強いものは細胞塊の中心に集合し、接着力の弱い細胞群ほど周辺部に位置するというものである。この説はいくつかの細胞選別の実験をよく説明し得るために支持を得ており、細胞選別は接着力の強弱によるものと解釈されることもある。

しかし、選別を引き起こしうる細胞の性質は接着の強弱だけではない。他にも、同種、異種細胞間での接着のしやすさや細胞の運動性、また細胞周辺に存在する分子に対する反応性の違いなども考



えられ、選別現象の解釈は決して単純ではない。ただ、いずれの場合についても言えるのは、選別は“細胞を混合した時に観察される結果”であり、“細胞が同種と異種の違いを認識する”ことよって起こるということである。従って、細胞選別の機構を調べることは、細胞がどのようにして周囲の細胞を同種、あるいは異種として識別するのかという、その認識機構を探ることだといえる。もっとも、この選別という現象は先に述べたとおり細胞を人工的に混合した結果であるから、この認識機構が正常発生時に果たす役割についてはまた別個に考察しなければいけない。

## 2、肢芽間充織細胞の親和性の変化の意義

今回の実験結果から、肢芽間充織細胞には、細胞混合によって認識される親和性の違いが基部先端部軸に沿って領域ごとに、また発生の進行によっても生ずることが示唆された。現在までの多くの細胞選別に関する報告は、異なった胚葉や組織から調製された細胞を混合した結果観察されるものであって、分化との関連を示唆するものであった。これに対し、今回の結果は分化以前に観察され、しかもいずれの領域も軟骨分化はするので、選別に見られる親和性の変化は間充織細胞の基部先端部軸に沿った領域的な違い、つまり位置値に対応した最終的な軟骨パターンの違いと関連する可能性を示唆している。

肢芽間充織細胞の領域特異性が親和性に反映する可能性については、本論文で報告した基部先端部軸に沿った親和性の変化だけでなく、前後軸に沿った変化も観察される(Wada and Ide, 1994, Ide et al., 1994) ことから示唆される。これは、肢芽を前後軸に沿って2つの領域に切り分けて混合すると、異なった領域の混合培養では選別が観察されるというものである。前後軸方向の軟骨パター



ンの決定機構についても位置価モデルによる仮説が有力であり、前後軸に沿って細胞の性質が異なることについても、軟骨分化能の変化や (Ide *et al.*, 1993)、塩基性繊維芽細胞増殖因子 (FGF-2、旧名 b-FGF) への反応能が異なっていることが報告されている (Aono and Ide, 1988) ので、肢芽内の間充織細胞の領域ごとの変化、即ち細胞の持つ位置価の違いは親和性に反映すると考えられる。

親和性の変化と軟骨パターンとの関連については第四章で考察するが、一つの仮説として、親和性の差による肢芽間充織の細分化 (一種の区画化; 第4章参照) が起こることを仮定し、これによって細分化された領域ごとに特異的な軟骨形成が行われるという流れを考えている。より具体的には、間充織細胞はAERとの相互作用によって領域特異性を持つようになり、その特異性は細胞の親和性となって表われ、結果として肢芽内は親和性の異なるいくつかの細胞集団に細分化され、特定の軟骨形成を行うという流れである。以下、本論文ではこの仮説を考慮しながら議論を進める。

### 3、細胞選別を引き起こす機構

この親和性の違いをもたらす機構、すなわち選別を引き起こす機構にはいくつかの可能性が考えられ、これらをいくつかの項目に分けて議論する。ただ、結果でも触れたように、観察された選別には細胞の接触が必要であり、接触がない状態では選別や特定の細胞種の集合といった現象は起こらない (観察されない) ので、細胞膜の接触によって機能する分子によってもたらされている可能性が大きい。即ち、今回観察した細胞選別は、間充織細胞の表面変化により親和性が変化したと考えられる。親和性を変化させ得る機構としては、少なくとも以下の3通りの可能性を考える。

①細胞間の接着性の変化。この場合表面の変化としては接着分子に



よる調節を考える。

②表面の接触による細胞運動性の調節。この場合は表面の変化そのものよりむしろ細胞内での情報処理の違いを考える。

③より能動的な同種の細胞どうしの集合。この場合は分泌物による近傍の細胞への情報伝達、およびその受容体の変化を考える。

当然、これらの機構は単独で作用するだけでなく、相補的、相乗的に作用しあい親和性の変化をもたらすことも考えられる。ただし、①以外は実験的な根拠や報告に乏しいので、後から可能性を述べるにとどめ、ここでは①を中心に議論する。

#### (1) 細胞間接着性の変化

上に挙げた3つの可能性の中でまず第一に考えられるもので、今回の実験結果や他のいくつかの報告等を考慮すると実際に作用していると考えられるものである。先にも述べたが、数多くの過去の実験報告から、細胞選別を引き起こす機構の一つに細胞の接着性の違いが関与することが指摘されており、このことを接着に関与する分子の量的、質的变化で説明しようという考えがある。(Edelman and Crossin, 1991; Takeichi, 1990)。

今回の結果についても、細胞の接着性が変化しこれによって選別が起こっているという解釈ができる。実際に実験3で示したように、短時間の接触で接着できる細胞の数は、細胞種が異なる場合よりも同種の場合の方が多く、このことから接着性の変化が指摘される。この場合、結果でも述べたように、 $Ca^{2+}$ 存在下で細胞を解離した場合には上記に示した差が観察されるが、 $Ca^{2+}$ 非存在下で解離した場合はその差ははっきりしなかった。このことは、 $Ca^{2+}$ 依存型の細胞接着機構(例えばカドヘリン)が、今回示した胚芽間充織細胞の選別に関与している可能性を示している。実際、細胞を接触させる時間を30分よりもさらに長時間(1時間弱)にすると、同種間と



異種間の細胞の接着量に差が見られなくなる（データは示していない）。これは、 $Ca^{2+}$ 存在下で細胞を解離しても、一時間近く経過した場合は $Ca^{2+}$ 非依存性の接着分子もその機能を取り戻しうる (Takeichi *et al.*, 1979) ことの反映であると考えられる。従って、枝芽間充織細胞の接着機構には大きく分けて2種類あって、同種、異種の細胞識別に関与する接着機構と、細胞接着そのものに関与する接着機構とが作用している可能性がある。

このことを枝芽形態形成の視点から考察すると、枝芽間充織細胞の接着には発生過程を通じて枝芽全体で発現する接着と、発生段階や領域によって変化するやや弱いいくつかの接着とがあることが考えられる。枝芽内では、前者の変化しない接着性は形態維持のために用いられ、後者のいくつかの異なる接着性は形態を維持したまま、枝芽の細かな違い、例えば領域特異性を作り出すために用いられると考える。なお、領域特異性の維持に $Ca^{2+}$ 非依存型の接着機構（例えば免疫グロブリン・スーパーファミリーに属するCAMs）が関与することについても、その可能性を否定するものではないが、現在の結果からは何もいえず、この点についてはきちんとしたデータをまとめる必要がある。

接着性が細胞選別のひとつの原因であるとするれば、枝芽の中の接着性の変化の機構が次の問題になる。これには2つの可能性が考えられ、発現する接着分子の変化による“質的变化”による場合と、発現する分子が同一であっても発現量が変化したり、糖鎖の修飾の変化などで結合活性が変化する“量的変化”による場合である。枝芽の場合、発現している接着分子についての報告が少なく、また、報告されているものについても枝芽内でほぼ均一に分布している (Hatta *et al.*, 1987; Crossin *et al.*, 1985; Bee and von der Mark, 1990) など、これらの報告からだけでは今のところ両者



のいずれとも言えない。ただ、遺伝子レベルでの解析から、カドヘリンについてはその種類は当初考えられていたよりも非常に多いと考えられるようになってきた (Suzuki *et al.*, 1991) こと、また、細胞間基質を介して細胞接着に関与すると考えられている細胞表面分子のインテグリンについても、2本あるサブユニットの組み合わせによってかなりの選択的接着性を作りだすことができる (Humphries, 1990) ので、細胞表面に発現している接着分子の種類による親和性の変化を説明することは可能である。一方で、同種のCAMでも発現量の異なる培養細胞を旋回培養すると発現量と対応して選別が起こる (Friedlander *et al.*, 1989) という報告もあり、現在のところはどちらか一方と考えるよりも両者の組み合わせと考える方が良さそうである。

ところで、肢芽の領域特異性とHox遺伝子の発現の関連が示唆されているが、Hox遺伝子の発現の組み合わせはおおまかに、上腕、前腕、手首、指という4領域に分けられるので、接着性の違いも4つほどあるものと考えれば上記の選別は説明しやすい。一方で次章で示唆するようにHox遺伝子の発現と選別とが関連する可能性がある。また、Hox遺伝子の強制発現によりCAMsが発現してくるという報告 (Jones *et al.*, 1992) があるので、Hox遺伝子の発現に対応した形で接着分子が発現することは十分に考えられる。ただ、親和性は領域間の距離が離れるほど失われる傾向にあるので、Hox遺伝子の発現に見られるデジタル的な変化によって、親和性の変化のようなやや緩やかな変化を調節できるかどうかは不明である。

#### (2) 細胞間接触による細胞運動性の調節

この場合は、ある細胞が隣接する細胞を認識することでその運動性を調節し、それによる選別を考えるものである。すなわち、混合培養の系において同種の細胞どうしが接した場合にはそこで運動



の抑制がおこり、異種の細胞が接した場合には運動が促進されるものとするれば、結果的に同種の細胞が集合して落ち着くことになる。これは(1)のように、接着性の変化だけを考慮しても外見上は類似した結果になるはずだが、この場合は、均一に発現している細胞表面分子であっても認識機構として細胞内情報の変更を考慮すればよいことになる。筆者は発生段階20と25の細胞の運動性が変化している可能性を報告したが(和田; 修士論文)、両方の細胞を染色して識別できるようにして、混合培養時の両細胞の状態、特に運動性について調べていく必要はある。

### (3) 能動的な因子による同種の細胞どうしの集合

上記二つの説明が比較的偶然による細胞の接触を前提としていたのに対し、ここでは、より能動的な集合機構によって選別が起こると考える。肢芽以外のいくつかの系では、拡散性の分泌物質による特定の細胞の移動や集合の促進、すなわち化学走性が報告されている。この実験系においても単なる接触による選別に加えて、このような積極的な移動も考慮する必要があると思われる。ただ、先述のとおり、今回観察した選別には細胞間の接触または極めて接近した状態が必要であると考えられることから、一般的に言われるような拡散性の低分子物質をもとにした化学走性では説明がつかない。この場合は、何らかの理由で分泌物質が近傍の細胞にしか作用しない(分解されやすい、輸送タンパクや細胞間物質に運ばれて機能する等)こと、あるいは接触による細胞膜を介した拡散を行っている等の機構を仮定しなければならない。ただ、このような性質を示す分子の例としてショウジョウバエのsegment polarity遺伝子の一つwingless(wg)のコードするタンパクが挙げられる。このタンパクは分泌性であるにも関わらず、細胞数層の範囲にしか拡散しない。一方で、wgはショウジョウバエの細胞接着関連分子をコードする遺伝



子 armadillo (arm) と制御しあっていることから、wg タンパクが拡散する範囲だけ接着性が変化していることが予想されている。脊椎動物においても、wg に相同性の高い遺伝子として Wnt 遺伝子群が多数単離されており (McMahon, 1992; Nusse and Varmus, 1992)、一方で arm に対応する遺伝子がコードするタンパクは、カドヘリンの細胞内ドメインに結合する  $\beta$ -カテニンであることがわかり (McCreath et al., 1991)、分泌タンパクと接着分子の相互作用という点で注目されている。肢芽でこれらの分子が機能しているかどうかは不明だが、同様の性質を持った分子によって、領域特異的に接着性が制御されている可能性は十分に考え得る。

#### 4、親和性の変化と軟骨分化の連続性

実験 4 に示したように、発生段階の異なる先端部間充細胞を増殖によって接触するような状態にしておくと、個々の間充細胞塊は軟骨分化するにも関わらず、その境界付近では軟骨分化の程度は悪い。一方で、発生段階が同じ場合には境界付近でも細胞塊中央部と同様に連続して軟骨分化しやすい傾向が見られた。このことは、発生段階の異なる間充細胞が隣接して位置していても、その境界では軟骨分化の連続性は保たれにくいことを示している。この解釈は親和性の差を考慮すれば容易にできる。まず、同種の細胞塊を並べた場合にはその境界面では親和性の差による選別が起こりにくいため、両者はよく結合し軟骨分化が連続する。これに対し、異なる細胞種の細胞塊の接触面では同種の細胞種の接触に比べ親和性が低いために、細胞密度が他の領域に比べて相対的に下がり、その結果、軟骨分化が抑制されるものと考えられる。この仮説が成り立つならば、in vivo での軟骨分化の不連続性は親和性の領域の違いの反映ということになる。



ただ、このように考えるためには次の問題点をクリアしなければならぬ。すなわち、この結果は軟骨分化の結果であって、親和性との直接の関連は分からないという点である。この実験で細胞塊は4日目では軟骨分化するものの、塊の周辺部は軟骨分化していない（アルシアンブルーで染色されない）。従って、異なる発生段階の細胞塊を隣接させた場合は、細胞塊の接触面でもこの軟骨分化抑制の傾向が強くなり、軟骨が不連続になっている可能性がある。従って、今回の実験では、異なる領域由来の細胞を接した場合は、その境界面での軟骨分化は不連続となるという可能性は示唆できるが、上記のような問題点からそれ以上のことは言えない。今後この可能性をより確かなものにするためには、キメラを用いた組織の移植実験を行い、移植片の系譜と形成された軟骨パターンとの対応、特に軟骨の不連続性との関連について調べていく必要がある。in vivoでは、軟骨分化領域はかなり限定されていることから、キメラの境界領域での分化の有無についてはよく分かるはずである。また、in vitroに比べ増殖の度合いも大きいはずなので組織レベルでの解析がしやすく、境界領域での細胞密度や親和性と軟骨分化との関連を考察できるだろう。







## 序論

肢芽間充織細胞は、肢芽の伸長に伴ってその領域特異性を確保し、最終的に一定のパターンを形成するが、肢芽形成時からの領域の特異性を失ってもある程度のパターンはできる。例えば、間充織細胞を一度単細胞レベルにまで解離しても、遠心で集めて、得られた細胞塊をAERを持つ肢芽外胚葉の袋に入れて（再構成肢芽；recombinant）発生させることによって、分岐、分節した軟骨を持つ構造（肢状構造；limb-like structure）が形成される（MacCabe *et al.*, 1973）。筆者らも、同様の方法で肢状構造が形成されることを確認している（和田、修士論文）（図12）。従って、ある程度簡単な軟骨パターンは比較的単純な相互作用により形成されていると考えられる。一方で、肢状構造を構成する軟骨の形態から判断して、肢状構造は明らかに正常肢芽と同等の基部先端部方向の軸性を有している。このことは、解離後の間充織細胞が細胞間の相互作用を再構築して軟骨パターンを形成する時にも、AERの作用によって正常肢芽と同様な領域特異性が再び形成され、領域に応じた軟骨パターンが形成されることを示している。

一方、総合序論の章でも述べたが、正常肢芽での領域特異性はHomeobox遺伝子群の発現パターンから観察される（Dolle *et al.*, 1989; Yokouchi *et al.*, 1991a）（図4）。これは、クラスターを形成するHomeobox遺伝子（Hox遺伝子）のうち、AクラスターとDクラスターに属するいくつかの遺伝子がそれぞれ基部先端部軸、前後軸に沿って領域を変えて発現するというもので（図4）、これらの遺伝子発現の組み合わせは、最終的に形成される個々の軟骨と対応する（Yokouchi *et al.*, 1991a）。他方、肢芽ではAERが基部先端部軸の決定に、ZPAが前後軸の決定にそれぞれ関与することがわかっており、これらの組織を移植することによって軟骨パターンを変更さ



せることができる (Zwilling, 1958; Saunders, Jr. and Gasseling, 1968)。このとき、Hox 遺伝子の発現パターンは組織の移植後 24 時間で変化する (Izupisua-Belmonte *et al.*, 1991a; Nohno *et al.*, 1991; 横内裕二, 1991) ことから、これらの遺伝子の発現は肢芽内に新たに構築された領域特異性を反映していると考えられる。そこで、再構成肢芽内における Hox 遺伝子の発現を調べることで、個々の細胞が獲得した新たな領域特異性を考察できると思われる。また、細胞塊を構成する際に、用いる間充織の発生段階を変えると形成される軟骨パターンに違いが生ずる (和田、修士論文) が、このとき外胚葉等の細胞塊がおかれている初期の環境は同じなので、再構成肢芽内を構成する細胞の持つ領域特異性の違いでパターンが変化すると考えられる。本章では、解離後の細胞が再構成肢芽内で軟骨分化する過程と、新たに領域特異性が形成され、これが分化する軟骨のパターンに影響する可能性について、いくつかの分子マーカーを用いて観察して比較、考察した。

一方、上記の Hox 遺伝子の発現パターンの組み合わせから、軟骨分化が始まる発生段階の肢芽には基部先端部軸に沿ったいくつかの領域特異性があると考えられ、細胞の性質もそれに伴って変化している可能性がある。前章で、肢芽間充織は発生段階や肢芽の部域によって異なる細胞の親和性の変化を示し、またこの変化が細胞接着性の変化の結果である可能性を示唆した。一方でこの結果は、親和性の異なる細胞集団が基部先端部軸に沿って帯状に配置されていることを示唆しているので、親和性の変化と遺伝子の発現で観察される領域特異性が対応する可能性がある。この仮説に基づいて、領域特異性を連続的に作ることでできる系を用いれば、細胞選別の状態もそれに従って変化するはずである。上記のように、再構成肢芽内では領域特異性が形成されている可能性があること、また、細胞



... (mirrored bleed-through text from the reverse side) ...

の混合などの操作がしやすいこと等の点から、ここでは、枝芽のモデル系として再構成枝芽を用い、この中での細胞選別の様子を観察し、in vivoでの領域特異性と細胞親和性を考察した。

... (mirrored bleed-through text from the reverse side) ...

... (mirrored bleed-through text from the reverse side) ...

... (mirrored bleed-through text from the reverse side) ...



## 材料と方法

### 1、枝芽間充織細胞の調製、および再構成枝芽の作成

枝芽間充織細胞の調製は前章と同様に行い、解離した細胞を用いて再構成枝芽を作成した(Wada et al., 1993) (図11)。間充織細胞の浮遊液を遠心(100 × g、5分)して細胞塊を作り、20%のFBSを含むF-12中で37℃で2時間放置した。これとは別に発生段階23の枝芽からトリプシン処理によって外胚葉だけを袋状にはがし、この中に先に用意した間充織細胞塊を入れた(再構成枝芽)。これを発生段階20-22のウズラ胚の前肢芽を除去した領域に移植し、必要とする日数だけ発生させた。なお用いた動物種は、間充織はキメラ解析を行う場合にはニワトリとウズラの細胞を1:1で混合したものを、それ以外の場合はニワトリ胚由来の細胞を単独で用いた。一方、外胚葉はすべての場合でウズラ胚由来のものを用いた。

### 2、免疫組織化学

発生させた再構成枝芽は体側部から切除した後、3%-PFA-PBSで2時間固定した。このあと10%のショ糖を含むPBSに置換し、これを包埋剤(O.C.T.compound; Miles)中に包埋、凍結した。スライドガラス上にクリオスタットを用いて10μmの切片を作成し、洗浄のち前章の培養細胞の場合と同様に一次抗体、二次抗体を順に反応させ、最後に封入して観察した。一次抗体、二次抗体としては以下のものを適宜組み合わせて使用した。

#### 一次抗体

- ・ A223抗体(マウス由来)(ニワトリ細胞と特異的に結合)
- ・ AV-1抗体(マウス由来)(ニワトリ枝芽のAV-1抗原に結合)
- ・ 抗PG-H抗体(ウサギ由来)(軟骨組織に特異的なECMであるPG-H(aggrecan)に結合)



#### 二次抗体

- ・ FITC- 標識抗マウスIgG ヤギ IgG (Fab') (Tago)
- ・ FITC- 標識抗ウサギIgG ヤギ IgG (Fab') (Cappel)

#### 3, 軟骨分化領域の組織化学的検出

発生させた組織の軟骨パターンを観察する場合はアルシアンブルー染色を行った。組織を 3%PFA-PBSで固定した後、1%の塩酸を含む70% エタノール (HCl-EtOH) に置換し、さらに0.1%のアルシアンブルーを含むHCl-EtOH溶液中で染色した。HCl-EtOHで洗浄したのちアルコール系列を経て脱水してから、サリチル酸メチルに置換、透徹の後に観察した。

#### 4, *in situ* ハイブリダイゼーション

*in situ* ハイブリダイゼーションは、Yokouchi *et al.* (1991b)の方法に従って行った。プローブとしてはdigoxigenin-11-UTPで標識したHoxA11、HoxA13、HoxD12のRNA プローブ (Yokouchi *et al.*, 1991a)を用いた。これらのプローブはいずれもアルカリ処理を行い、平均分子量を約150base にそろえたうえで使用した。

移植により発生の進んだ再構成肢芽を胚ごと4%パラホルムアルデヒドで 4℃、2時間固定した後、0.2%のDEPC (diethylpyrocarbonate)を含む30% ショ糖-PBSに移して2時間洗浄した。このあと包埋剤 (O.C.T. compound) 中に包埋、凍結した。ここから、10 $\mu$ mの凍結切片を作成し、37℃で1時間、45℃で2時間乾燥させた。続いて、切片を以下の手順で処理した。① 0.3%Triton-X100/PBS(5分)、② PBS (5分×3回)、③ 0.2N-HCl (20分)、④ PBS(5分×3回)、⑤ 1 $\mu$ g/ml Proteinase K/PBS (37℃, 5分)、⑥ PBS(5分×3回)、⑦ 4% PFA/PBS(5分)、⑧ 0.1M glycine /PBS (15分×2回)、⑨



50% formamide/2 SSC (1時間)。このあと、1スライドガラス当たり150  $\mu$ l/mlのプローブ含有ハイブリダイゼーション溶液をのせ、湿潤箱中において45℃で16時間ハイブリダイズした。

この後、切片を以下の手順で洗浄した。① soln.A (50% formamide 2  $\times$  SSC), (45℃, 1時間), ② soln.B (0.5M-NaCl, 10mM-Tris-HCl, pH 8.0), (5分 $\times$ 2, 室温), ③ 20  $\mu$ g/ml RNase Aを含むsoln.Bで5分(37℃), ④ soln.A (1時間, 室温), ⑤ soln.C (50% formamide, 1  $\times$  SSC), (1時間, 45℃), ⑥ 同 (30分, 室温)。次いで、ALP-標識した抗digoxigenin抗体を反応させ、さらにcoloring solution (50mg/ml NBT 14  $\mu$ l + 50mg/ml BCIP 7  $\mu$ l, in 2ml buffer 2)を用いて発色、プローブがハイブリダイズした領域を観察した。

50% formamide/2 SSC (1時間)。このあと、1スライドガラス当たり150  $\mu$ l/mlのプローブ含有ハイブリダイゼーション溶液をのせ、湿潤箱中において45℃で16時間ハイブリダイズした。

この後、切片を以下の手順で洗浄した。① soln.A (50% formamide 2  $\times$  SSC), (45℃, 1時間), ② soln.B (0.5M-NaCl, 10mM-Tris-HCl, pH 8.0), (5分 $\times$ 2, 室温), ③ 20  $\mu$ g/ml RNase Aを含むsoln.Bで5分(37℃), ④ soln.A (1時間, 室温), ⑤ soln.C (50% formamide, 1  $\times$  SSC), (1時間, 45℃), ⑥ 同 (30分, 室温)。次いで、ALP-標識した抗digoxigenin抗体を反応させ、さらにcoloring solution (50mg/ml NBT 14  $\mu$ l + 50mg/ml BCIP 7  $\mu$ l, in 2ml buffer 2)を用いて発色、プローブがハイブリダイズした領域を観察した。



## 結果

### 1、再構成肢芽から形成される軟骨パターンの検討

序論でも述べたとおり、再構成肢芽を発生させて軟骨形成を行なわせると、前後軸に関しては鏡像対称だが、基部先端部軸に沿っては分岐、分節した軟骨パターンが形成される (MacCabe *et al.*, 1973)。このとき、中に入れる間充織として発生段階20前後の肢芽先端部由来のものを用いると、いくつかのサンプルで、基部先端部軸に沿って軛脚 (矢印) + 自脚 (矢先) といった正常肢の軟骨の形態によく似た軟骨パターンが観察された (図12a)。しかし、形成された軟骨の多くは基部にやや太い軟骨を持ち (図12b 矢印)、先端では1~2回分岐した軟骨 (図12b 矢先) なので、両者の差は細胞の増殖の程度や再構成肢芽を作る際の細胞数などの条件によるものと考えられる。このことは一方で、発生段階20の細胞は解離後でも軛脚より先端部の構造を形成できる能力を維持していることを示している。これに対し、発生段階25の先端部由来の間充織を用いた場合は単純に分岐、分節した自脚状の軟骨ばかりで、基部の太い軟骨、ひいては軛脚状の構造は形成されなかった (図12c、d 矢先)。肢芽先端部領域の移植実験から、20の間充織細胞は軛脚と自脚を、25の細胞は自脚のみを形成した (図12e) ので、以上の結果は、解離した細胞によっても基部先端部軸に沿った軸性、すなわち領域特異性が再確立することを示唆している。その一方で、細胞がおかれた環境は同じであっても、細胞の発生段階により形成できるパターンが異なることから、個々の間充織細胞の持つ形態形成能が発生に伴って変化していることも示している。

なお、領域特異性の再確立については以下の方法によっても検討した。再構成肢芽の作成に用いる間充織を前肢芽のZPAを含まない領域 (ほぼ前側2/3に相当) 由来とし、外胚葉の中に入れる際に



後肢のZPAの組織小片を細胞塊の一边に接するようにおく。初期(発生段階17~19)の肢芽の間充織を用いた場合、これによって形成される肢状構造の持つ軟骨パターンは正常肢芽のパターンをかなりよく反映することがわかっている(MacCabe et al., 1973)。この系を発生段階20と25の再構成肢芽に用いることで、形成される軟骨パターンの違いが観察できると考え、20と25の再構成肢芽の中にZPAを入れて発生させた。結果を図13に示す。図13a, bに見られるように発生段階20の間充織を用いた場合には、基部先端部軸に沿っては正常発生時の予定域(ひじよりも先端部)に相当するパターンを形成した。一方で、25の間充織を用いた場合には分岐した軟骨パターンが形成され、形態上からは正常指と対応させることは難しいが、分節の様子からそれぞれの軟骨は指に対応すると考えられる(図13d)。従って、これらの結果は、発生段階20と25の再構成肢芽とでは形成される軟骨パターンが異なっていることを示しており、上記のZPAを入れない場合の結果と一致する。

## 2、再構成肢芽での軟骨分化

上記のように、再構成肢芽内の間充織細胞は発生段階によって形成できる軟骨パターンに違いがあるとはいえ、いずれも肢状構造を形成した。そこで、まず再構成肢芽内での軟骨分化の初期過程を調べた。分化の様子は、軟骨組織に特異的な細胞間基質(ECM)のPG-Hの発現を抗体を用いて調べ、それによって判断した。結果を図14に示す。aは再構成肢芽を移植してから36時間後、bは60時間後のPG-Hの発現の様子である。移植後24時間ではPG-Hの発現は観察されない(図には結果は示していない)。36時間後になると基部に発現が確認される(図14a)。さらに60時間後では再構成肢芽の伸長に伴って、軟骨の分化領域も先端部側に広がっている(図14b)。



この時期には再構成肢芽は前後軸方向にも扇型に広がるが、軟骨分化領域の先端部（図の矢印）では分化領域が2か所に広がっており、この位置では軟骨は分岐していることが考えられた。正常肢芽での軟骨分化は発生段階24~25で基部から始まり、特定の領域で分岐、分節するが、この発生段階は肢芽がはっきり認識できる発生段階18から約30~36時間後であるから、以上の結果は、再構成肢芽の発生は軟骨分化で見ると限りは、時間的にも空間的にも正常肢芽と同様のプロセスを経て行われていることを示すものである。

### 3、再構成肢芽内でのHox 遺伝子の発現

次いで、再構成肢芽内での領域特異性を見るために、正常肢芽内で領域特異的に発現する遺伝子であるHox 遺伝子群の発現パターンを調べた。遺伝子プローブとしては、基部先端部軸に沿って領域特異的に発現することが知られているHoxAクラスターのうちHoxA11とHoxA13の2種類を、また前後軸に沿った特異性を示すHoxDクラスターのうちHoxD12をそれぞれ用いた（図15）。先述のようにHoxA11は、発生初期の肢芽では軛脚域よりも先端で発現し、後期には軛脚域に残る。これに対し、HoxA13は自脚域のみで観察される。一方、HoxD12は肢芽後半部で発現し、前肢では尺骨と第三指、第四指の領域に発現が残る（図15、正常肢芽での発現パターン；Izupisua-Belmonte *et al.*, 1991b; Nohno *et al.*, 1991; Yokouchi *et al.*, 1991a 等）。以降の実験では正常肢芽でのこのような発現パターンを考慮しながら観察を行った。

最初に、発生段階20の間充細胞を用いて再構成肢芽を作り上記の遺伝子の発現を調べた。結果を図16に示す。HoxA11は移植後24時間で既に間充織の全領域で発現している（図16a）。36時間後でも同様であり、宿主の組織との間に発現の境界が形成されている（図



16b、大きい矢印)。60時間後では先端部側でも軟骨の分化が進行し、分岐も見られたが、この時期でもHoxA11の発現は弱いながら全面で観察された(図16c)。一方、HoxA13は再構成肢芽の先端部領域でのみ発現が観察された。移植後24時間では再構成肢芽の先端部側半分の間充織でのみ発現しており(図16d)、この傾向は36時間後でも変わらなかった(図16e)。60時間後でも基部での発現は見られず、先端部側の分岐している軟骨領域の周辺で発現がみられた(図16f)。両者の間での発現パターンの違いは、HoxA11は比較的基部で強く発現し、HoxA13は先端部で強く発現するという正常肢芽内での発現パターンを反映したものと考えられる。

次に、正常肢芽では後半部に発現する遺伝子HoxD12についてもその発現を調べた。結果を図16g~iに示す。この場合の発現領域は、HoxA13の場合によく似ており、先端部側半分の間充織で強い発現が見られた。しかし、24時間後では外胚葉に接した間充織で強く発現し、この発現は基部でも見られること(図16g)、36時間後の発現パターンに見られるように、中央部~先端部での強い発現に加え、移植面(図16h、小さな矢印)から中央部にかけても弱いながら発現が見られる(図16h、大きな矢印)等の違いがあった。これは移植先の組織がHoxD12を発現していないので比較するとその発現がわかる(図16h、大きな矢印)。これは60時間後でも同様であり、この時の発現量の差に見られる境界はHoxA13よりもやや先端部側にあった(図16i、矢先)。HoxA13は基部ではまったく発現していない(図16f、矢先の左側)ので、再構成肢芽中央部付近でHoxA13とHoxD12の発現が制御されていると考えられるが、上記の発現パターンからHoxA13は発現そのものを、HoxD12は発現量を調節されていることが考えられる。以上の3つの遺伝子発現の結果から、再構成肢芽形成時にもそれを構成する間充織には、分子レベルでの基部



先端部軸に沿った領域特異性が形成されることが示された。

なお、上記の結果は領域特異性の再確立ではなく、解離前の系譜に従った細胞群の再配置である可能性、例えば、HoxA13を発現できる細胞だけが先端部側に選別し集合している可能性も考えられたが、これは進行帯を切り分けた実験で否定された。これは、進行帯領域をさらに基部と先端部に切り分け(0~100  $\mu\text{m}$  と100~200  $\mu\text{m}$ )、*in vivo* と *in vitro* で両者の分布を調べたもので、仮定した選別があるとすればこの実験においても選別が起こるはずである。しかし、いずれの系でも選別は観察されず、図16に示した結果は細胞の再配列の結果ではなく、領域特異性の再確立の結果であると考えられた。

次いで、発生段階25の間充織細胞を用いて再構成肢芽を作り、この内部での発現を調べた(図17)。この場合は36時間後、60時間後の2つの段階での発現を見たが、いずれの場合も発生段階20の間充織細胞を用いた場合とは異なり、領域特異性は確認されなかった。HoxA11は、36時間での発現は弱く(図17a)、60時間後になると発現はほとんど見られなかった。この時、移植先のHoxA11を発現している組織との間に明瞭な境界が観察された(図17b、矢先)。これに対し、HoxA13、HoxD12はともに再構成肢芽の全領域で発現が観察され、宿主の組織との間にこの場合もはっきりとした境界が見られた(図17c, d, e, f、矢先)。従って、発生段階25の間充織細胞から成る再構成肢芽の形態形成は、発生段階20の間充織細胞を含む再構成肢芽の場合と異なり、上記の遺伝子の発現パターンで確認される、より基部に対応した領域(特異性)を作らずに進行していると考えられた。

なお、いずれの実験においても前後軸方向に偏りのある発現は観察されなかったが、これは細胞の解離、混合により前後軸が失わ



れた結果と考えられる。この結果は、形成される軟骨が前後の軸性を失っていることと一致し、また、肢芽の前後軸の軸性を失い多指となる突然変異株、talpid<sup>3</sup>の肢芽での Hox遺伝子の発現パターンともほぼ一致している (Izpisua-Belmonte *et al.*, 1992a)。

#### 4、再構成肢芽内でのAV-1抗原の発現

Hox遺伝子の発現パターンから、再構成肢芽の発生時には基部先端部軸に沿っていくつかの領域特異性が作られること、またその発現パターンは再構成肢芽を調製する際の間充細胞の発生段階によって異なることが分かった。このことを更に確認するために、正常肢芽で領域特異的に発現するAV-1抗原の再構成肢芽内での分布について調べた。AV-1抗原は正常肢芽では図18gの模式図に示すように肢芽前半部の腹側領域に扇状に発現が認められ、発生後期になると前側2本の指の軟骨形成領域の間に弱く発現が残るので、前後軸の違いを反映しているといえる (Ohsugi *et al.*, 1989)。一方で、発生初期にはAERの直下にも発現が確認されるが、後期になるとAER下の発現はなくなり指の基部にとどまることから、基部先端部軸に沿った位置の違いも反映すると考えられる。

発生段階20の間充細胞を持つ再構成肢芽でAV-1の発現を図18に示す。発生開始後24時間では発現は弱い(図18a)が、36時間後になると再構成肢芽の中央部にかなり強く発現が見られる(図18b)。このとき基部先端部軸に垂直な断面での発現も中央部分で楕円形に見られる(図には示していない)ことから、再構成肢芽内ではAV-1の発現に見られるAP軸、DV軸方向の軸性は失われていることが予想される。60時間後になると発現が弱くなるが、その発現は基部から中央部に限られ、先端部では発現そのものが確認出来なくなる(図18c;先端部側の発現の境界を矢先で示す)。同じ試料の近



傍の切片で軟骨分化の様子をPG-Hの発現をもとに調べると図18dのようになり、軟骨が分岐し始める位置ではAV-1の発現はほとんどない。これらの結果については数サンプルについて同様の結果が得られた。前項の結果からこの付近はHoxA13、HoxD12の発現が強くなる部位と考えられるので、領域の特異性がAV-1の発現にも影響していることが考えられる。

一方、発生段階25の間充細胞を用いた再構成肢芽ではAV-1の発現は確認出来なかった(図18e, f)。Hox 遺伝子の発現からこの場合は領域特異性は見られなかったことから、発現が見られない理由は、再構成肢芽内での領域特異性を反映した結果であると考えられる。以上のHox 遺伝子及びAV-1の発現パターンの結果を図19にまとめる。

#### 5、再構成肢芽内での細胞選別

前項までの実験で、間充細胞は解離した後でも再構成肢芽のような構造を作ると、その位置に応じて領域特異性を獲得することが示された。一方、前章の実験で間充細胞の親和性が領域ごとに異なっていることを示した。この親和性の変化が領域特異性の変化と関連するとすれば、*in vivo* で選別を行わせた場合、領域特異性にあわせて選別の程度が変化するはずである。そこで、このことを検証するために、再構成肢芽を構成する間充細胞として発生段階20と25を混合したものを用い、発生時間と両者の分布との関連を調べた。ここではニワトリ-ウズラのキメラを用い、ウズラ胚の前肢芽を除去した部位に再構成肢芽を移植した。したがって、観察しているのは再構成肢芽内にあったニワトリ細胞の分布である。

結果を図20に示す。混合した細胞の発生段階が異なる場合には移植後24時間で両者が選別を起こしている(図20a, c)。このと



き、発生段階20の細胞が占める領域は再構成肢芽の中央部に比較的  
多く観察された（図20a, c 矢印）が、移植後24時間では再構成肢芽  
での軟骨分化は観察されない（先述）こと、また位相差顕微鏡を用  
いた観察では、軟骨分化に先立つ間充細胞の凝集はこの時間では  
観察されなかった（結果は示していない）ことから、これは軟骨分  
化とは別個の現象だと考えられる。さらに移植後36時間後では、基  
部側ではより発生段階間での選別が見られるようになった（図20b,  
d 矢印）。24時間後の分布がパッチ状であったこと、また、先に述  
べたように、軟骨分化はこの時間では基部において観察される（図  
14a)ので、この領域ではパッチがより集合して前軟骨凝集塊（pre-  
cartilage condensation）を形成していると考えられる。ところが、  
再構成肢芽の先端部側では細胞の選別は弱く、かなり分散して  
いた（図20b, d、矢先）。これを、図19g, hに示したHoxA13の  
発現領域と比較すると、同一組織由来ではないので正確なことはい  
えないが、発現の境界と選別が弱くなる領域とが大体一致する。こ  
のことは、Hox 遺伝子の発現で見られる再構成肢芽内の領域特異性  
は、細胞の親和性に影響し細胞選別の程度に影響することを示唆す  
る（議論を参照）。なお、対照実験として行った同じ発生段階（発  
生段階20）の細胞を混合した場合は全く選別は観察されなかった  
（図20e, f）。これらの結果から、前章で観察された細胞選別の  
機構は再構成肢芽内でも維持されていること、一方で、細胞選別の  
程度が領域によって異なることから、*in vivo*でも細胞の親和性は  
領域特異性と関連することが考えられた。この結果は前章の結果と  
ほぼ一致する。



## 議論

まず実験結果を整理する。

- ①、発生段階20の間充細胞を用いて再構成肢芽を作り、この発生過程におけるHoxA11、HoxA13、HoxD12、AV-1の発現を調べたところ、基部先端部軸に沿って発現の違いが見られた。一方、前後軸に沿った違いは観察されなかった。
- ②、発生段階25の間充細胞を用いた再構成肢芽で同様の実験を行ったところ、Hox 遺伝子については発現が確認されたが、そのパターンは①の場合とは異なっていた。AV-1については発現が観察されなかった。
- ③、発生段階20と25の間充細胞を混合して再構成肢芽を作り、発生時の両者の分布を観察したところ、両者は選別した。しかし、基部と先端部で選別の程度に差があり、先端部での選別は弱く、両者はほぼ均一に分布している様子が観察された。

これらの結果をもとに、全体を3つに分けて議論する。まず、①の結果から、再構成肢芽内でも細胞（群）が正常肢芽と同様の領域特異性を確立し、これに基づいて形態形成を行っていることが示唆された。このことについて実験結果の解釈と合わせて、1で議論する。また①と②の結果から、同一の環境下で軟骨形成を行わせても、用いる間充細胞の発生段階によって指定される軟骨が異なることが示唆された。この結果については、最終的に形成される軟骨パターンとの比較で2で検討する。さらに、③の実験を通して、第2章の実験から予想された細胞選別と領域特異性との関連が、*in vivo*の場合でも示唆された。これについては3で議論すると共に、第4章で総合的に議論する。



### 1、肢芽内での領域特異性の確立と、実験結果の解釈。

基部先端部軸に沿った領域特異性は間充織がAERの影響から外れる時間によって決まると考えられるが、その一方で、AERや間充織の移植実験から、初期の領域特異性は比較的緩やかな拘束で、細胞(群)がおかれている周囲の環境によって比較的容易に変化し得るものであると考えられている。例えば、肢芽の基部の組織をAERの下に移植すると、その組織は先端部、即ち指の軟骨を形成する(Saunders et al., 1959)。また、AERを肢芽背部に移植すると背側にも肢芽は伸長し(Zwilling, 1956)、Hox遺伝子も順次発現する(横内裕二、1991)。従って、間充織は肢芽から切り出した組織塊の状態ではAERの影響下で領域特異性を獲得し直すことができると考えられる。

今回の実験結果は、解離後の細胞も(細胞集団の中で)組織を再構築するとき、周囲の環境に応じた領域特異性を獲得し直し、形態形成を行うことを示しているが、このことから、四肢形態形成における細胞レベルでの相互作用の重要性が考えられる。ただ、この場合、解離された細胞が、組織塊を形成した後に配置された場所に応じた領域特異性を確保するのか、逆に個々の細胞が領域特異性を確保した後に組織塊を形成するのかは不明である。いずれにしても、再構成肢芽内ではHox遺伝子の発現に見られるように間充織細胞には基部先端部軸に沿った領域特異性が再確立されている。

次の問題は、再構成肢芽内での領域特異性の形成機構、すなわちどのようにしてHox遺伝子の発現に見られるような境界が、再構成肢芽の基部先端部軸の中央部付近に形成されるかという点である。基部先端部軸に沿っての領域特異性は、何度も述べるようにAER因子の影響下にある時間の長さで決まるとされている。ところが、再構成肢芽は移植後24時間ではほとんど伸長が見られない(これは移植直後の再構成肢芽は、間充織細胞間、あるいは間充織細胞



と外胚葉の間隙が多く、細胞増殖による細胞数増加が再構成肢芽の伸長ではなく、細胞密度増加に働くためと思われる)ので、この場合の領域特異性の違いは時間の長さではなく、AER 因子が作用できる範囲の反映と考えられる。最近になっていくつかの実験結果をもとに、FGF4 (hst-1)がAER 因子の一つと考えられるようになっている (Niswander *et al.*, 1993a, b)。FGF はヘパリン結合性であるため分泌性のタンパクではあるが、それほど拡散しないと考えられており、作用範囲も限られるものと思われる。従って、これらの因子が作用できる間充織細胞とできないものとの間で遺伝子発現が異なることで、結果に示したような境界ができるものと思われる。以下、この仮説をもとに今回の実験結果の解釈を行う。

最初の実験で用いた発生段階20の間充織では、Hox 遺伝子のうち、後期に発現してくる5'側の遺伝子(例えばHoxA13)はまだ発現領域も狭く、また発現量も少ない。一方で、これらの遺伝子が間充織細胞で発現を開始、維持するためにはAER を必要とすることが示唆されている(横内裕二、1991; Izupisua-Belmonte *et al.*, 1992b)。従って、発生段階20で既に発現がはっきりと観察されるHoxA11は、AER 因子によらない自律的な発現を維持できるが、HoxA13はこの発生段階ではまだ発現が弱いため、AER 因子の作用を受けない基部の細胞は自律的な発現を維持することはできず、AER 因子が作用できると思われる先端部領域でのみ発現が維持されるものと思われる(図21)。

この可能性を考慮すれば、HoxD12の発現パターンが、正常肢芽と異なり、HoxA13と極めて似ていることを説明できる。HoxD12は、正常肢芽では尺骨よりも後半部の先端部分で発現するが、この領域は、基部先端部軸に沿ってはHoxA11よりもさらに基部側である。これに対し、HoxA13は前後軸に沿ってはほぼ均一に、手根骨より先端部で発現する(Yokouchi *et al.*, 1991a)。再構成肢芽から形成され



る軟骨パターンから、前後軸の消失は予想されるものとしても、基部先端部軸については正常肢芽を反映していると考えられるので、単純に考えればHoxD12は基部側から強い発現が見られるはずである。ところが、実際には、強い発現が見られるのはHoxA13とほぼ同じ領域からで、基部では弱い発現しか見られなかった。この結果の解釈は難しいが、いくつかの実験からDクラスター上の遺伝子の発現には、AERとZPAの協調が必要であるとされている。一方、ZPA領域の細胞は解離するとそのままではZPA活性を維持できないが、AER作用を一部代償できる成長因子のFGF-2 (b-FGF) (Riley *et al.*, 1993; Watanabe and Ide, 1993)の影響下では維持できる (Anderson *et al.*, 1993)。先に仮定したように、再構成肢芽内ではAER因子の拡散する範囲はほぼ中央部までとすれば、ZPA活性を維持できるのもこの範囲までということになる。従って、AERとZPAの協調を必要とするHoxD12は、発生段階20の間充細胞を用いた再構成肢芽では、AER因子が届く範囲では強く発現できるが、ここより基部側では弱い発現しか維持できないものと考えれば、ここに発現量の境界ができ、結果的にHoxA13と似た発現パターンになるものと思われる (図21)。

一方、発生段階25の間充細胞を用いた場合はHoxA13とHoxD12は上記のような領域特異性を示さず再構成肢芽全体で発現しているが、この場合は用いた肢芽は発生が進んでいるため間充細胞がAERやZPAの影響なしに自律的にこれらの遺伝子を発現、維持できる状態になっているものと考えられる。他方、HoxA11は既にほとんど観察できない程発現が弱くなっているが、これも正常肢芽では発現が徐々に先端部から消失することの反映と思われる。なお、発生段階25の間充細胞を用いた場合はHox遺伝子で観察される領域特異性はないが、再構成肢芽形成に用いたAERは20の間充細胞を用いた場合と同じ発生段階23由来なので、AER因子の作用の有無による領域特異性の



違いは、この場合も程度の差はあれ作られていると思われる。実際、形成された軟骨パターンはこの場合も基部先端部軸に沿った形態の違いを有している。

また、AV-1の発現はHox 遺伝子で観察される領域特異性とは一見無関係に見える。しかし、発生段階20の間充織を用いた場合、60時間後では再構成肢芽先端部で発現が消失するが、このとき、HoxA13やHoxD12は先端部で強く発現すること、また、発生段階25の間充織を用いた場合にはAV-1は発現せず、この場合はHoxA13やHoxD12は全領域で発現していることなどから、AV-1とHoxA13、HoxD12の発現は関連している可能性がある。AV-1の機能は不明だが、正常肢芽の軟骨分化時には橈骨や尺骨等の軛脚から自脚の一部付近で発現していることから (Ohsugi *et al.*, 1989)、この場合もAV-1が発現している領域の軟骨は軛脚の性質を維持しているものと思われ、Hox 遺伝子で領域特異性が形成された場合と、そうでない場合とで形成される軟骨の性質が異なっていることを示している。このことについては次の項で再度考察する。なお、初期のAV-1の発現パターンは全ての軸に関して中央部分でのみ発現が見られ、外胚葉から一定範囲の領域では発現が見られない。この理由は不明だが、正常肢芽間充織でのAV-1の発現が発生後期には比較的外胚葉から離れた肢芽中央部の間充織に観察されること (Ohsugi *et al.*, 1989) と関連するものと思われ、外胚葉からの発現抑制作用が考えられる。

## 2、再構成肢芽での軟骨パターン形成、及び領域特異性の影響

### (1) 再構成肢芽における軟骨パターン形成のモデル

正常肢芽の発生においてはAER とZPA が必須とされ、外科的にAER もしくはZPA を含むと考えられる領域を除去すると、その発生段階までに決定された構造しか形成されず、より先端部のパターンは欠損する (Summerbell, 1974; Hinchliffe and Gumpel-Pinot,



1981)。このとき、後半部を欠損するとAERが維持されないのでZPAはAER維持因子を産生していると考えられている。一方、再構成肢芽を用いた解析から、Y字形の軟骨形成が行われるためにはAERがあればよく、ZPA領域の間充織は必要ないとされる(MacCabe et al., 1973; Crosby and Fallon, 1975)。しかもこのとき、ZPA領域の間充織細胞は軟骨形成をむしろ阻害することがわかっており、これらの結果は一見矛盾する。

この結果の解釈のためには、先に述べた“ZPAがAER維持因子を分泌している”というモデルを考え直す必要がある。即ち、上記のようにZPA領域を含まない間充織で再構成肢芽を形成しても軟骨パターンはできるので、ZPAは間充織の極性形成に関与するが、AERの維持には関係なく、AER維持因子は間充織そのものから出ていると考えべきである。従って、ZPAを持たない再構成肢芽でも外胚葉の中にある間充織によってAERは維持され、結果的に単純ながら基部先端部軸に沿った軟骨パターンが形成されるものと思われる(図12)。この場合、AP軸方向については極性が失われていると考えられることから、ZPAを移植することで新たな極性が形成され、結果的に図13に示したような、正常肢に近いパターンができると思われるが、発生段階25の間充織を用いた場合には、もともと指領域しか形成できないので、極性が形成されても正常な形態形成には至らないのではないかと考えられる。

## (2) 領域の特異性と軟骨パターン

以前に筆者は再構成肢芽から形成される軟骨パターンは用いる間充織の発生段階によって異なり、発生段階20の再構成肢芽の場合は靴脚状+自脚状の構造を形成し得るが、25の再構成肢芽の場合は自脚状の構造のみしか形成できないことを示した(和田、修士論文)。この結果から発生段階20の再構成肢芽には靴脚と自脚の区別に関連した領域特異性が形成されるが、25の再構成肢芽にはその



特異性が形成されないと考えられた。

今回の分子マーカーの発現パターンの観察結果は、この推測を間接的ながら支持するものである。結果に示したように、発生段階20の間充織を持つ再構成肢芽と、25の間充織を持つ再構成肢芽とではHox遺伝子、およびAV-1の発現パターンは異なっている。この原因として考えられる可能性を1で述べた。正常肢芽では、HoxA11は軛脚域に強く発現が残り、HoxA13は自脚域に発現が残ることがわかっている(Yokouchi *et al.*, 1991a) (図15)。このことと比較すると、発生段階20の再構成肢芽でHoxA11は初期では全間充織細胞で発現し、後期では基部側に弱いながら発現が残ること、またHoxA13の発現は再構成肢芽中央から始まることから、軛脚+自脚の構造を形成できるものと思われる(図22)。一方、発生段階25の再構成肢芽ではHoxA11の発現はほとんど観察されず、HoxA13は再構成肢芽全体で発現していることから、自脚相当の構造しか形成できないと思われる(図22)。これは先に示した軟骨パターンの違いとほぼ対応すると考えられる(図12、図22)。従って、このような単純な系における形態形成でも、Hox遺伝子発現に見られる領域特異性の違いが形成されると、それに基づいた形態形成を行い、結果的に異なった軟骨パターンができるものと考えられる。

肢芽内での軟骨形成の過程は組織レベルでの観察、また細胞培養系を用いた観察から、比較的単純な細胞間相互作用で説明される(Solursh, 1983; Ede, 1983)。しかし、再構成肢芽を用いた実験から得られた結果は、軟骨分化の過程は同じであっても、位置価に対応した軟骨を形成するためには、細胞の発現する遺伝子の組み合わせが問題となることを示している。また一方でこのことは、これらの遺伝子は細胞の性質を変化させ相互作用に影響することを示唆するものである。



### 3、領域特異性と細胞親和性の変化

上記のように、Hox 遺伝子の発現パターンから推測する限り、再構成肢芽の性質はその中央部で変化している。そしてまた、選別についても基部と先端部とではその程度は異なり、基部では明瞭な選別が起きているが、先端部では選別は弱い（結果5）。これについては筆者らが以前に報告したように、さらに発生を進ませ軟骨分化させるとより明らかで、基部の軟骨のほとんどは初期の細胞で占められるのに対し、先端部の軟骨には初期と後期の細胞が混在している (Wada *et al.*, 1993)。このことは、Hox 遺伝子の発現の組み合わせが、選別に関与する因子（前章議論参照）に影響を与えることを示唆している。以下、このことを発生段階20と25の細胞を混合した場合をもとに検討していく。

この場合、両者は単独で再構成肢芽を形成した場合と同様に遺伝子を発現するはずである。すなわち、基部では発生段階20の細胞はHoxA13を発現しないが、25の細胞はHoxA13を発現することになり、ここでHoxA13を発現する細胞と発現しない細胞とが混在することになる。一方、上記の仮定に基づいて、HoxA13を発現する細胞としない細胞とでは親和性が変化しているとすれば、発生段階20と25の細胞は選別を起こし、図19に見られるような分布が観察される。他方、先端側ではHoxA13の発現はいずれの細胞でも確認されるから、選別は弱くなるはずである。ただ24時間後ではHoxA13の発現と選別が対応せず、選別がまだ見られる（図19矢印）。この理由としては、先端側では両者がHoxA13を発現しているが、発現開始からの時間を考慮すると、発生段階20の細胞は25の細胞の場合に比べて短く、結果的にその下流にある分子（この場合親和性に関係する分子）の遺伝子の発現、および実際の機能はさらに遅れることが考えられる。従って、24時間後ではまだ親和性の変化は起きていないか、変化が起こっていてもわずかなものと考えられ、選別が起こる



と考えられる。このあと12時間たつと（36時間後）両者の選別は弱くなるが、これは上記の遺伝子発現と細胞の機能との時間的ずれが解消された結果と考えられ、両者の細胞での親和性がほぼ一致したことを示している。

Hox 遺伝子発現と *in vivo* での選別が関連する可能性については、発生段階20と25の細胞を混合した再構成肢芽内でのHoxA13の発現を調べてみれば分かることであるが、一方でHox 遺伝子の発現と選別が対応しても、それだけでは、両者の間に直接の関連があることにはならない。最終的には遺伝子導入系を用いたHox 遺伝子の強制発現、あるいは遺伝子破壊によって親和性の変化が起こることを確認しなければいけない。なお、このことについては、前章にも示したように、Hox 遺伝子と接着分子の発現の関連を示す報告がある（Jones *et al.*, 1992; Gould and White, 1992）ことから、同様の関連を肢芽間充織細胞でも予想することはできる。

一方、Hox 遺伝子の発現が細胞の親和性に影響するという可能性を逆に考えると、前章でも示唆したようにように正常肢芽内における領域特異的な親和性の変化は、Hox 遺伝子の発現と対応することになる。従って、前章と本章で得られた個々の結果をまとめると、Hox 遺伝子の組み合わせによって、親和性の異なるいくつかの細胞集団ができる。これによって肢芽はいくつかの領域に細分化され、この領域でそれぞれに特異的な形態形成を行なうという仮説を立てることができる。この仮説で、遺伝子発現から最終的なパターン形成までの流れを間充織細胞の性質変化という視点で説明できるが、この仮説の検討は次章で行なうこととする。



... (faint text) ...

... (faint text) ...

### 第4章 総合議論

... (faint text) ...



本研究では、細胞培養系、及び再構成肢芽を用いて、肢芽間充織細胞の親和性の変化を示した。この変化は発生の進行に伴い、また、Hox 遺伝子の発現から推測される領域特異性とよく対応することから、四肢軟骨パターン形成と密接に関連することが示唆された。これらの結果をまとめると、前章の議論で述べたように、遺伝子発現から最終的な軟骨パターン形成までの流れを間充織細胞の性質変化という視点で説明できる。本章では、間充織細胞の親和性の変化が軟骨パターン形成に与える意義について、他の実験系での研究報告をふまえながら考察する。

#### 1、細胞親和性の変化と形態形成

第2章の議論にも書いたとおり、形態形成における細胞親和性の変化の意義は古くから議論されてきたが、その多くは組織特異的な親和性の違いであり、領域特異性との関連についての議論は多くない。しかし、親和性の変化が領域特異性と密接に関連することを示唆する報告を以下に示す。これらの報告は今回の実験結果を考察するうえで非常に参考になるものと思われる。

##### (1) 区画形成と細胞親和性

ショウジョウバエの付属肢（触角、翅、肢など）は変態前は成虫原基と呼ばれる構造をとっている。成虫原基内での領域の決定、即ち付属肢のどこを作るかの決定は幼虫の過程を通じて徐々になされる。このとき、決定は原基を構成する領域の二分割、すなわち原基内の細胞集団の二群化によってなされ、この繰り返しによって全体の構造が決定するとされている（Garcia-Bellido, 1975）。このとき分割によりできた、同じ細胞集団によって占められる領域を区画（compartment）とよぶ。変態前の成虫原基内では細胞増殖が起こってはいるが、区画形成が行われる発生段階には器官としてはさほど



大きく成長しないので、区画形成、すなわち区画化 (compartmentalization) は、原基内の領域の細分化の過程ととらえてよい。このとき、各区画内に位置する細胞群は同一の遺伝子 (選択遺伝子) を発現することによって、区画ごとの特異性を発現、維持し、これが領域特異性となって最終的なパターンに影響すると考えられている。遺伝子の変異により区画形成がうまくいかない個体では形態異常が見られる (同列突然変異; homeotic mutation) ことから、付属肢の形態形成における区画の重要性がわかる。

一方で、いくつかの観察結果から区画形成は細胞の親和性の変化の結果であることが示唆されている。例えば、多くの場合、区画の境界は明瞭な一本の線となって確認され、境界の両側の細胞集団の細胞は入り混じらないこと、また区画形成後は正常細胞であればその区画をまたいで増殖することはないこと (Garcia-Bellido, 1975; Morata and Lawrence, 1975) などである。これらの解釈としては、選択遺伝子の作用で一つの細胞集団は二つの亜集団に分岐し、この分岐により新しく獲得された性質は細胞表面に影響を与え、これにより細胞の親和性が変化し、両細胞集団 (各区画) の境界付近で選別が起こるためとされている (Crick and Lawrence, 1975)。実際に細胞レベルで区画間の接着性を調べた実験では、異なった結果が報告されており (Garcia-Bellido, 1966; Fausto-Sterling and Hsieh, 1987)、結論には至っていない (Blair, 1993)。しかし、区画特異的で、かつ細胞接着に関連する膜タンパクの発現がいくつか報告されている (Brower *et al.*, 1984; Bryant, 1993) こと、また、脊椎動物の菱脳形成時に形成される区画では接着性の差が指摘されている (Fraser *et al.*, 1990; Guthrie and Lumsden, 1991) ことなどから、親和性の差が区画となって表れている可能性は高い。このことは、発生の場の細胞集団の



差異は、細胞親和性を変化させるような領域特異性によって形成され、結果的に最終的な形態の違いを作り出すという可能性を示唆する。

## (2) 再生芽の領域特異的な親和性

区画形成とは別に、細胞の親和性の変化が領域の特異性と関連していることを示す報告として、有尾両生類の再生芽の親和性に関する報告 (Nardi and Stocum, 1983) がある。これは序章でも述べたとおり、上腕部、肘、手首の三領域から形成された再生芽を接して培養しておく、同じ位置の再生芽とは均等に結合するが、別の領域の再生芽とは接着性が異なり、基部の再生芽は先端部の再生芽を取り囲んでしまう。これは、差次粘着説に基づいて先端部の接着性が基部のそれよりも強いために起こると解釈されている。再生芽はそれが形成された領域よりも先端部の構造しか形成しないことから、再生芽を構成する細胞は基部先端部軸上のある特定の領域の位置値を与えられていると考えられるが、この結果は、位置値の一つの指標が親和性として観察されることを示したものである。したがって、この場合も細胞親和性の差異は細胞集団の差、ひいては形成できる形態の差を示しているといえる。この場合、基部先端部軸に沿って親和性の強弱が明らかであることから、再生芽を構成する細胞は、周囲の細胞との親和性の強弱を認識することで、基部先端部軸上の位置を確認しながらその場に応じた形態を作ることも考えられる。

## 2、軟骨パターン形成において細胞親和性が変化する意義

本実験では、第2章で間充細胞の親和性が領域ごとに異なっていることを示し、また領域間での軟骨分化の不連続性が形成される可能性を示した。一方、第3章では、Hox 遺伝子の発現と親和性



の変化の関連について示唆した。これらの結果、及び、前項で示した親和性の変化と形態形成の関連をふまえ、間充織細胞の親和性の変化は、肢芽内細胞集団の細分化、維持に作用すると考える。そのうえで、位置価としてのHox 遺伝子の発現から、軟骨パターン形成に至る流れを以下のようにまとめる。

位置価 = Homeobox 遺伝子の組み合わせ

→ 領域特異性の決定 = 細胞の親和性の決定

→ 同親和性の細胞を集団として維持、軟骨分化開始

→ 領域特異的な軟骨形成

この時、親和性の変化によって間充織細胞をいくつかの細胞集団として細分化、維持することは、同一の遺伝子を発現する細胞をひとまとまりに維持することであるから、この細胞集団については後の分化も同じように進行し、最終的に一種類の軟骨を形成すると考えられる。一方、この細胞集団のなかでひとまとまりの軟骨形成が行なわれるとすれば、細胞集団間の境界は、軟骨分化の境界、すなわち分化の不連続として観察され、最終的に関節形成に至ると考えられる。以下、親和性に見られる肢芽内での細胞集団の形成機構と、軟骨分化に与える影響を議論する。

#### (1) 領域ごとの細胞集団形成

第2章結果1、2より、発生段階の進行した肢芽においては、基部先端部軸方向に限定すれば、親和性の異なるいくつかの細胞集団が帯状に並んでいるはずである。一方、先端部ではほぼ一定の割合で細胞が増殖する (Ede, 1976) ため、増殖により基部側に送り出された間充織細胞はAER の影響を脱し、一定の範囲で親和性の異なるひとまとまりの細胞集団を形成すると考えられる。進行帯モデルにおいては、間充織が形成する構造 (軟骨) の決定はAER の影響から脱した時になされるとされるが、上記の結果を考慮すると、AER



の影響を脱すると、まずひとつの細胞集団が決まり、それぞれの細胞集団に異なる細胞親和性が付加されると考えられる。これにより、同一集団内の細胞は同一の親和性を持ち、他集団の細胞とは異なるため、肢芽内にいくつかの独立した領域が形成されることになる。このあと、それぞれの領域の中で特定の形態の軟骨が形成されると考えればよい。この仮説の下では肢を構成する個々の軟骨の決定は基部から先端部にむけて徐々に決まるのではなく、一本ごとにそれぞれをひとつの単位として決定されることになる（もっとも、これを証明する実験結果は今のところ報告されていない）。

この仮説は成虫原基における区画化を考慮したものである。先に述べたように成虫原基の区画形成は領域の細分化の面が大きいのに対し、肢芽の場合は基部先端部軸に限っていえば常に増殖しているため、この場合の“区画形成”は肢芽先端部に領域が付加される過程であるといえるが、概念としては同じである。今回の実験では、細胞を調製する領域を基部先端部軸に沿って先端部領域では200 ~ 250  $\mu\text{m}$ 、基部側でも250 ~ 300  $\mu\text{m}$ の長さとした。これらの領域の細胞がそれぞれ選別を起こすことから、おおむねこの範囲内でひとつの細胞集団が形成されていることが考えられる。

一方で、Summerbell and Lewis (1975)の報告にあるように、細胞の分裂回数（すなわち、肢芽の伸長）と、形成される軟骨の長さや大きさは必ずしも一致しない。これは、付加される領域の大きさと最終的な組織の大きさ（多分細胞数だと考えられる）が対応しないことを示している。これは肢芽の段階では、ほぼ同じ大きさの細胞集団であっても、その後の増殖の割合が異なることを示唆しており、これは細胞集団の差、すなわち遺伝子発現の差であると解釈でき、この場合遺伝子とはHox 遺伝子を想定する。従って、肢芽発生時には増殖によってAERの影響を脱した細胞群のなかで、そのとき



発現しているHox 遺伝子の組み合わせによって親和性が決まり、これによってある細胞集団が形成されるものと考えられる。この様子を図23にまとめる。

## (2) 軟骨形態に与える影響

Cottorill *et al.* (1987)が報告したように、進行帯領域の細胞の軟骨分化の状態は発生段階によって変化する。また、*in vivo*での軟骨分化の過程には細胞の凝集が観察されており(Ede, 1983)、さらに接着力が強くなることで軟骨分化の程度が進行することも報告されている(Chuong *et al.*, 1993)ので、細胞群の軟骨分化と細胞接着は密接に関連している。その一方で、親和性、特に接着性が軟骨の形態に与える影響については、Oster などによる数式モデル(1985)があるだけで、実験結果に基づく考察はない。今回の親和性についての結果も領域特異性を示してはいるが、軟骨形態との直接の関連を示唆するものではない。すなわち、①今回示した領域特異的な親和性は、*in vivo*での軟骨分化以前にすでに観察されることから、軟骨そのものの親和性の差と対応するかどうかわからない、②親和性の差が立体的な形態にどのように作用するか不明である、などの疑問点が残るためである。

しかし、第2章結果4で示したように、異なった発生段階の細胞塊を隣接して培養すると、それぞれの細胞塊は軟骨分化するが、その接面のところは軟骨が不連続になりやすい。この場合同一発生段階の細胞塊を並べた場合には軟骨分化領域は連続しやすいので、発生段階の違いが分化する軟骨の不連続を作り出すと考えられる。このことは、先に述べたように同一細胞集団内では一種類の軟骨分化を行なうと考えれば解釈しやすく、異なる細胞集団の境界では逆に軟骨分化が起こりにくいといえればよいわけである。

ところで、正常発生の過程で軟骨と軟骨の間に不連続が生じた



場合には、軟骨には含まれた領域の細胞（中間帯間充織；inter-zonal mesenchyme）のうち周辺部は滑膜や靭帯に分化し、中心部は消失して関節腔を形成し、全体として関節を形成する。今回示した軟骨の不連続な分化が肢芽内の軟骨分化時に起こっているならば、それは最終的にはこのような関節形成の場となるはずである。すなわち、肢芽内にあるいくつかの細胞集団ができると、集団単位で軟骨分化が起こり、一方で細胞集団の境界では軟骨分化が起こりにくく、そこでは関節が形成されることになる。このことを逆に解釈すると、関節は発生時における領域の境界ということになる。

### 3、展望

本論文の結果、及び議論は、遺伝子レベルで示されていた領域特異性を細胞レベルの特異性に反映させることで、遺伝子発現の連続性を軟骨の連続性に、また逆に遺伝子発現の不連続性を軟骨の不連続性に結びつけるものである。四肢パターン形成機構の解析は、古くは組織レベル、最近では遺伝子レベルでの解析が中心となっているが、その間をつなぐ細胞レベルでの解析は操作や解釈の難しさ等もあってあまり進んでいないように思われる。その意味では、本論文での結果は非常に重要だと思われるが、一方で、個々の現象と現象の間の因果関係がいまひとつはっきりしない。この理由のひとつとして、本論文の中心である細胞間の親和性の差をもたらしている機構（たぶんいくつかの分子だと思われる）が明らかになっていないことがあげられる。この機構を明らかにすることは、四肢パターン形成を理解する上で重要なだけでなく、多くのパターン形成や組織形成など発生過程の細胞間相互作用を理解する上でも重要な視点を提供するものと思われる。







脊椎動物の四肢は単純な形態をしているが、三次元的な軸性ははっきりしているため、古くから形態形成の研究材料として用いられてきた。中でも、四肢におけるパターン形成機構の研究は、移植等による組織レベルでの実験形態学的なアプローチによって始まり、近年では分子生物学的手法を中心として進められてきた結果、多くの重要な知見が得られており、これらは単に四肢のパターン形成機構にとどまらず、多くのパターン形成機構に示唆を与えるものとなっている。その一方で、パターン形成過程における細胞レベルでの知見、特にパターンに対応した細胞の性質の変化については、その研究の重要性が指摘されているにもかかわらず、報告は現在に至るまで決して多くない。これはパターン形成に影響する細胞の性質の初期の変化は、細胞種ごとの分化の違いのようなダイナミックなものではなく、むしろ微小な変化であると考えられるためである。筆者はこの初期の細胞の変化は、細胞表面の変化として現れることを考え、実験を行い考察した。

まず、*in vitro*において、発生段階の異なる肢芽進行帯の間充細胞を混合培養した結果、同一発生段階の細胞を混合した場合は両者は入り混じって分布したが、発生段階が異なると選別した。このとき、両者の発生段階が離れるほど選別の度合いは大きかった。このことから進行帯細胞の親和性が変化していることがわかった。また、発生の進んだ肢芽の、基部先端部軸に沿ったいくつかの領域から細胞を調製し、上記の発生段階の異なる進行帯細胞と混合した場合、基部の細胞は初期の進行帯細胞と、先端部の細胞は後期の進行帯細胞と親和性が近いことがわかった。これらの結果は肢芽進行帯細胞の親和性は発生によって変化し、変化した親和性は基部領域に維持されており、結果的に領域特異性を形成していることを示している。短時間で接着できる細胞数を調べた結果から、この親和性



... (faint, illegible text) ...

の変化は細胞の接着性の変化によることが考えられた。一方、親和性の異なる細胞群を並べて軟骨分化させると、その境界面での軟骨分化が悪かったことから、親和性の変化は軟骨分化の不連続性の形成に影響する可能性が示唆された（以上第2章）。

次に、*in vivo* における親和性の変化を、間充織細胞の領域特異性の確立と併せて調べた。進行帯細胞を単細胞に解離した後、再構成肢芽を形成して発生させると、分岐分節した単純な軟骨パターンができた。このときその形態から、基部先端部軸については正常肢芽と同じ領域特異性が再確立していると考えられた。そこで、このことについてHomeobox遺伝子やAV-1の発現パターンを調べ、実際に領域特異性が再確立していることを確認した。この系を用いて、*in vitro*で行ったのと同様に親和性の変化を調べると、上記の領域特異性に沿った形で親和性の変化している可能性が示され、肢芽における親和性の変化は領域特異性の変化と対応することが示唆された（以上第3章）。

以上の結果をもとに、肢芽における遺伝子発現の組み合わせと親和性の変化、及びそれが最終的に形成される軟骨パターンと関連する可能性について考察した。



... (mirrored bleed-through text from the reverse side) ...

... (mirrored bleed-through text from the reverse side) ...

... (mirrored bleed-through text from the reverse side) ...

### 第 6 章 謝 辞

... (mirrored bleed-through text from the reverse side) ...

... (mirrored bleed-through text from the reverse side) ...



本論文をまとめるにあたり、研究方針を御指導、御助言いただいた、東北大学理学部生物学教室教授、井出宏之先生に心から感謝致します。

in situ ハイブリダイゼーションについては、HoxA11、HoxA13、HoxD12のプロープの提供、また実験操作について名古屋大学理学部分子生物学科教授、黒岩厚先生と、名古屋大学理学部生物学科助手、横内裕二先生の御協力をいただきました。深く感謝致します。

井出研究室、並びに旧竹内研究室の皆様には、研究から私事に至るまで日常的にお世話になりました。心から感謝致します。

最後に、生物棟内の方々を初めとする、日常的にお世話になった多くの皆様に感謝致します。







- Anderson, R., Landry, M. and Muneoka, K. (1993). Maintenance of ZPA signaling in cultured mouse limb bud cells. Development 117, 1421-1433.
- Aono, H. and Ide, H. (1988). A gradient of responsiveness to the growth-promoting activity of ZPA (zone of polarizing activity) in the chick limb bud. Dev. Biol. 128, 136-141.
- Archer, C.W., Cottrill, C.P. and Rooney, P. (1984). Cellular aspects of cartilage differentiation and morphogenesis. In Matrices and Cell Differentiation (ed. Kemp, R.B. and Hinchliffe, J.R.), pp.409-pp.426. Alan R. Liss.
- Bee, J.A. and von der Mark, K. (1990). An analysis of chick limb bud intercellular adhesion underlying the establishment of cartilage aggregates in suspension culture. J. Cell Sci. 96, 527-536.
- Blair, S.S. (1993). Mechanisms of compartment formation: Evidence that non-proliferating cells do not play a critical role in defining the D/V lineage restriction in the developing wing of Drosophila. Development 119, 339-351.
- Brower, D.L., Wilcox, M., Piovant, M., Smith, R.J. and Reger, A.L. (1984). Related cell-surface antigens expressed with positional specificity in Drosophila imaginal discs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 7485-7489.
- Bryant, P.J. (1993). The polar coordinate model goes molecular. Science 259, 471-472.
- Chuong, C.-M., Widelitz, R.B., Jiang, T.-X., Abbott, U.K., Lee, Y.-S. and Chen, H.-M. (1993). Roles of adhesion molecules NCAM and tenascin in limb skeletogenesis: Analysis with antibody perturbation, exogenous gene



Anderson, W., Landry, M. and Hensley, K. (1983). Maintenance of the signaling in cultured mouse limb bud cells. Development 111, 1431-1433.

Adon, W. and Lee, H. (1988). A gradient of responsiveness to the growth-promoting activity of TPA (zone of polarizing activity) in the chick limb bud. Dev. Biol. 128, 136-141.

Archer, G.W., Gotschall, C.P. and Rooney, P. (1984). Cellinase aspects of cartilage differentiation and morphogenesis. In Neuroscience and Cell Differentiation (ed. Kemp, S.B. and Hinchcliffe, J.H.), pp. 409-418. Alan R. Liss.

Boe, J.A. and von der Mark, K. (1980). An analysis of chick limb bud interdigital mesenchyme underlying the establishment of cartilage aggregates in suspension culture. J. Cell Biol. 55, 517-526.

Blair, S.E. (1983). Mechanisms of compartment formation. Evidence that non-proliferating cells do not play a critical role in defining the W/W lineage restriction in the developing wing of Drosophila. Development 119, 329-331.

Brown, B.L., Wilson, M., Plavick, M., Sells, N.J. and Reed, A.L. (1984). Related cell-surface antigens expressed with positional specificity in Drosophila imaginal discs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 7485-7489.

Byrne, P.J. (1983). The polar coordinate model gene. Cellular Science 109, 471-475.

Chuang, G.-M., Widelitz, R.B., Jiang, Y.-X., Abdel, V.B., Lee, Y.-C. and Chen, H.-W. (1987). Roles of adhesion molecules NCAM and L1 in limb morphogenesis: Analysis with antibody perturbation. Development 99, 111-117.

expression, talpid<sup>2</sup> mutants and activin stimulation. In Limb Development and Regeneration (eds. Fallon, J.F., Goetinck, P.F., Kelly, R.O. and Stocum, D.L.). pp.465-474. Wiley-Liss.

Cottrill, C.P., Archer, C.W. and Wolpert, L. (1987). Cell sorting and chondrogenic aggregate formation in micro-mass culture. Dev. Biol. 122, 503-515.

Crawford, K. and Stocum, D.L. (1988). Retinoic acid coordinately proximalizes regenerate pattern and blastema differential affinity in axolotl limbs. Development 102, 687-698.

Crick, F.H.C. and Lawrence, P.A. (1975). Compartments and polyclones in insect development. Science 189, 340-347.

Crosby, G.M. and Fallon, J.F. (1975). Inhibitory effect on limb morphogenesis by cells of the polarizing zone coaggregated with pre- or postaxial wing bud mesoderm. Dev. Biol. 46, 28-39.

Crossin, K.L., Chuong, C.-M. and Edelman, G.M. (1985). Expression sequences of cell adhesion molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6942-6946.

Dollé, P., Izpisua-Belmonte, J.-C., Falkenstein, H., Renucci, A. and Duboule, D. (1989). Coordinate expression of the murine Hox-5 complex homeobox-containing genes during limb pattern formation. Nature 342, 767-772.

Ede, D.A. (1976). Cell interactions in vertebrate limb development. In Cell Surface Reviews vol.1 (eds. Poste, G. and Nicolson, G.L.). pp.495-543. North-Holland Publishing co.

Ede, D.A. (1983). Cellular condensations and chondrogenesis. In cartilage vol.2 (ed. Hall B.k.) pp.143-186. Academic



extension during retinal and optic stimulation  
in limb development and regeneration. Wound Repair, 7, 1.  
Goslinck, P.V., Kelly, R.D. and Hirsch, D.A. (1985). pp.485-  
492. Wiley-Liss.

Collier, C.F., Archer, C.W. and Wolpert, L. (1987). Cell  
sorting and morphogenetic aggregate formation in vitro  
and in vivo. Dev. Biol. 122, 503-512.

Crawford, K. and Stamen, D.B. (1988). Cell-cell and cell-  
matrix interactions regulate pattern and lineage  
differentiation in neural tube development.  
Dev. Biol. 125, 687-698.

Crick, F.H.C. and Lawrence, P.A. (1975). Compartmental  
organization in insect development. Science 191, 348-351.

Crosby, G.R. and Fajana, J.E. (1975). Inhibitory effect on  
lipid synthesis by cells of the polarizing zone  
coagulated with poly- or polyacrylamide and heparin.  
Dev. Biol. 48, 38-49.

Crossin, K.L., Crossin, C.M. and Edelman, G.M. (1985). Exp-  
ression of cell adhesion molecules. Proc.  
Natl. Acad. Sci. USA 82, 6943-6946.

Hall, J., Tappin, S., and Edelman, G.M. (1985). Hetero-  
philic interactions. In (1985). Localized expression of the  
avian Notch-1 gene in developing genes during  
limb pattern formation. Nature 315, 767-771.

McC.D.A. (1978). Cell interactions in vertebrate limb devel-  
opment. In Cell Biology Reviews vol. 1, (eds. Fagan, G.  
and Nicolson, D.R.) pp.355-411. North-Holland Publ-  
ishing Co.

Lee, D.A. (1983). Cellular communication and morphogenesis.  
In Cell Biology vol. 3 (ed. Hall, G.K.) pp.143-186. Academic

Press.

Edelman, G.M. and Crossin, K.L. (1991). Cell adhesion mole-  
cules: Implications for a molecular histology. Annu.  
Rev. Biochem. 60, 155-190.

Fausto-Sterling, A. and Hsieh, L. (1987). In vitro culture  
of Drosophila imaginal disc cells: aggregation, sorting  
out, and differentiative abilities. Dev. Biol. 120,  
284-293.

Fraser, S., Keynes, R. and Lumsden, A. (1990). Segmentation  
in the chick embryo hindbrain is defined by cell line-  
age restrictions. Nature 334, 431-435.

French, V., Bryant, P.J. and Bryant, S.V. (1976). Pattern  
regulation in epimorphic fields. Science 193, 969-981.

Friedlander, D.R., Mege, R.-M., Cunningham, B.A. and Edelman,  
G.M. (1989). Cell sorting-out is modulated by both the  
specificity and amount of different cell adhesion  
molecules (CAMs) expressed on cell surfaces. Proc.  
Natl. Acad. Sci. USA. 86, 7043-7047.

Garcia-Bellido, A. (1966). Pattern reconstruction by  
dissociated imaginal disk cells of Drosophila melano-  
gaster. Dev. Biol. 14, 278-306.

Garcia-Bellido, A. (1975). Genetic control of wing disc  
development in Drosophila. In Cell Patterning. CIBA  
Symposium 29, pp.161-183. Elsevier.

Gould, A.P. and White, R.A.H. (1992). Connectin, a target of  
homeotic gene control in Drosophila. Development 116,  
1163-1174.

Guthrie, S. and Lumsden, A. (1991). Formation and regene-  
ration of rhombomere boundaries in the developing chick  
hindbrain. Development 112, 221-229.



Stojan, G.W. and Crossin, S.L. (1987). Cell adhesion molecules: implications for a molecular biology. Ann. Rev. Biochem. 56, 155-190.

Yamato-Hartung, A. and Hales, J. (1987). In vitro culture of fibroblasts isolated from chick embryo aggregation, sorting out, and differentiative inhibition. Dev. Biol. 119, 114-123.

Yamato, S., Koyama, N. and Yamashita, A. (1990). Segmentation in the chick embryo hindbrain is defined by cell lineage age restriction. Nature 334, 431-435.

Yamashita, V., Bryant, F.L. and Bryant, G.V. (1976). Pattern regulation in epimorphic tissue. Science 193, 969-981.

Yamashita, D.K., Naga, N.-M., Yamashita, N.A. and Edelman, G.M. (1983). Cell sorting-out is mediated by both the specificity and amount of different cell adhesion molecules (CAMs) expressed on cell surfaces. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 7043-7047.

Yamashita, A. (1988). Pattern reconstruction by associated radial glial cells of fibroblasts. Development 100, 178-186.

Yamashita, A. (1992). Genetic control of wing disc development in fibroblasts. In Cell Patterning. CIBA Symposium 17, pp. 161-163. Elsevier.

Yamashita, A.T. and White, R.A.R. (1992). Connectin, a target of homeotic gene control in fibroblasts. Development 115, 1161-1174.

Yamashita, S. and Yamashita, A. (1991). Formation and regulation of membrane boundaries in the developing chick hindbrain. Development 113, 331-339.

Hamburger, V. and Hamilton, H. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. J. Morph 88, 49-92

Hatta, K., Takagi, S., Fujisawa, H. and Takeichi, M. (1987). Spatial and temporal expression pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenesis processes of chicken embryos. Dev. Biol. 120, 215-227.

Hattori, T. and Ide, H. (1984). Limb bud chondrogenesis in cell culture, with particular reference to serum concentration in the culture medium. Exp. Cell Res. 150, 338-346.

Hinchliffe, J.R. (1977). The chondrogenic pattern in chick limb morphogenesis: a problem of development and evolution. In Vertebrate limb and somite morphogenesis (eds. Ede, D.A., Hinchliffe, J.R. and Balls, M.), pp. 293-309. Cambridge Univ. Press.

Hinchliffe, J.R. and Gumpel-Pinot, M. (1981). Control of maintenance and anteroposterior skeletal differentiation of the anterior mesenchyme of the chick wing bud by its posterior margin (the ZPA). J. Embryol. exp. Morph. 62, 63-82.

Humpheries, M.J. (1990). The molecular basis and specificity of integrin-ligand interactions. J. Cell Sci. 97, 585-592.

Ide, H. and Aono, H. (1988). Retinoic acid promotes proliferation and chondrogenesis in the distal mesodermal cells of chick limb bud. Dev. Biol. 130, 767-773

Ide, H., Wada, N., Kameyama, T. and Uchiyama, K. (1993). Position-specific chondrogenesis of chick limb bud



Handberg, V. and Halliday, H. (1981). A series of dorsal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 181, 49-62.

Balle, E., Takagi, T., Fujisawa, H. and Taketomi, H. (1987). Spatial and temporal expression pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryo. *Dev. Biol.* 120, 315-327.

Halliday, H. and Ide, H. (1984). Limb bud development in chick embryo: with particular reference to nerve concentration in the culture medium. *Exp. Cell Res.* 150, 138-142.

Hinchliffe, J.R. (1977). The chick embryo system as chick limb outgrowth: a problem of development and evolution. In *Vertebrate Limb and Avian Morphogenesis* (eds. Eds. P.A., Hinchliffe, J.R. and Bais, H.-J. pp. 291-309. Cambridge Univ. Press.

Hinchliffe, J.R. and Goppel-Riesch, M. (1981). Control of anteroposterior and dorsoventral axial differentiation of the anterior mesenchyme of the chick wing bud by the posterior margin (the ZPA). *J. Embryol. exp. Morph.* 65, 61-67.

Hinchliffe, J.R. (1980). The molecular basis and specificity of integrin-ligand interactions. *J. Cell Biol.* 97, 585-592.

Ide, H. and Amano, H. (1988). Patterns of cell division, proliferation and chemotaxis in the distal mesoderm of chick limb bud. *Dev. Biol.* 120, 387-397.

Ide, H., Wada, N., Kawamura, T. and Uchiyama, K. (1993). Position-specific characteristics of chick limb bud cells in culture. in Limb Development and Regeneration. (eds. Fallon, J.F., Goetinck, P.F., Kelly, R.O. and Stocum, D.L.). pp.465-474. Wiley-Liss.

cells in culture. in Limb Development and Regeneration. (eds. Fallon, J.F., Goetinck, P.F., Kelly, R.O. and Stocum, D.L.). pp.465-474. Wiley-Liss.

Ide, H., Wada, N. and Uchiyama, K. (1994) Sorting out of cells from different parts and stages of the chick limb bud. Dev. Biol. in press.

Izupizua-Belmonte, J.-C., Tickle, C., Dolle, P., Wolpert, L. and Duboule, D. (1991). Expression of the homeobox Hox-4 genes and the specification of position in chick wing development. Nature 350, 585-589.

Izupizua-Belmonte, J.-C., Ede, D.A., Tickle, C. and Duboule, D. (1992a). The mis-expression of posterior Hox-4 genes in talpid<sup>3</sup> mutant wings correlates with the absence of antero-posterior polarity. Development 114, 959-963.

Izupizua-Belmonte, J.-C., Brown, J.M., Duboule, D. and Tickle, C. (1992b). Expression of Hox-4 genes in the chick wing links pattern formation to the epithelial-mesenchymal interactions that mediate growth. EMBO J. 11, 1951-1957.

Jones, F.S., Prediger, E.A., Bittener, D.A., De Robertis, E. M. and Edelman, G.M. (1992). Cell adhesion molecules as targets for Hox genes: Neural cell adhesion molecule promoter activity is modulated by cotransfection with Hox-2.5 and -2.4. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 2086-2090.

MacCabe, J.A., Saunders, J.W.Jr., and Pickett, M. (1973). The control of the anteroposterior and dorsoventral axes in embryonic chick limbs constructed of dissociated and reaggregated limb-bud mesoderm. Dev. Biol. 31, 323-335



Cells in culture. In limb development and regeneration.  
J. Cell Biol. 113, 1-10. (1992).  
Stocum, D.L. (1992). pp. 455-474. Wiley-Liss.  
Ito, H., Wada, N. and Schmitt, K. (1992). Cloning out of  
cells from different parts and stages of the chick  
limb bud. Dev. Biol. in press.  
Tajiri, S., Tickle, C., Vogler, C., Ball, E., Wolpert, L.  
and Duboulet, E. (1991). Expression of the homeobox Hox-4  
gene and the specification of position in chick wing  
development. Nature 350, 585-588.  
Tajiri, S., Tickle, C., Ball, E., Wolpert, L. and Duboulet,  
E. (1992a). The mis-expression of posterior Hox-4 genes  
in *fatigid* mutant wings correlates with the absence of  
anteroposterior polarity. Development 114, 355-363.  
Tajiri, S., Tickle, C., Ball, E., Wolpert, L. and Duboulet, E.  
(1992b). Expression of Hox-4 genes in the  
chick wing stalk pattern formation in the epithelial-  
mesenchymal interactions that mediate growth. Dev. Biol.  
151, 195-197.  
Jansz, F.S., Fiedler, E.A., Hiltner, D.A., De Robertis, E.  
M. and Stalling, G.M. (1993). Cell adhesion molecules as  
targets for Notch signaling: Neural cell adhesion molecule  
promotes activity and is modulated by cotransfection with  
Hox-2.9 and -2.4. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90,  
3088-3090.  
Mendelsohn, J.A., Saunders, J.W., Jr., and Pickart, M. (1977).  
The control of the anteroposterior and dorsoventral  
axis in embryonic chick limb: construction of dissep-  
tion and resuspended limb bud vesicles. Dev. Biol. 57,  
373-385.

McCrea, P.D., Turck, C.W. and Gumbiner, B. (1991). A homolog  
of the armadillo protein in Drosophila (plakoglobin)  
associated with E-cadherin. Science 254, 1359-1361.  
McMahon, A.P. (1992). The Wnt family of development regu-  
lators. Trend Genet. 8, 236-242.  
Morata, G. and Lawrence, P. (1975). Control of compartment  
by the engrailed gene of Drosophila. Nature 255, 614-  
617.  
Nardi, J.B. and Stocum, D.L. (1983). Surface properties of  
regenerating limb cells: Evidence for gradation along  
the proximodistal axis. Differentiation 25, 27-31.  
Newman, S.A. and Frisch, H.L. (1979). Dynamics of skeletal  
pattern formation in developing chick limb. Science  
205, 662-668.  
Niswander, L. and Martin, G.R. (1993a). FGF-4 and BMP-2 have  
opposite effects on limb growth. Nature 361, 68-71.  
Niswander, L., Tickle, C., Vogel, A., Booth, L. and Martin,  
G.R. (1993b). FGF-4 replaces the apical ectodermal  
ridge and directs outgrowth and patterning of the limb.  
Cell 75, 579-587.  
Nohno, T., Noji, S., Koyama, E., Ohshima, K., Myokai, F.,  
Kuroiwa, K., Saito, T. and Taniguti, S. (1991). Invol-  
vement of the Chox-4 chicken homeobox genes in deter-  
mination of anteroposterior axial polarity during limb  
development. Cell 64, 1197-1205.  
Nusse, R. and Varmus, H.E. (1992). Wnt genes. Cell 69, 1073-  
1087  
Ohsugi, K., Ide, H. and Momoi, T. (1988). Temporal and spa-  
tial expression of a position specific antigen, AV-1,  
in chick limb buds. Dev. Biol. 130, 454-463.



McGee, G.D., Throck, E.M. and Gumbart, N. (1991). A homolog  
of the fibronectin protein in *Escherichia coli* (1991)  
associated with F-actin. Science 251, 1392-1394.

McGee, G.D. (1992). The *fib* family of developmental regu-  
lators. Trends Genet. 8, 336-343.

Molina, R. and Lawrence, P. (1972). Control of compartment  
by the regulated gene of *Drosophila*. Nature 235, 614-  
617.

Wardle, J.B. and Stocum, D.L. (1983). Surface properties of  
regenerating limb cells: Evidence for gradients along  
the proximodistal axis. Development 85, 37-51.

Newman, F.A. and Prince, H.L. (1972). Dynamics of neural  
pattern formation in developing chick limb. Science  
175, 562-568.

Rindler, J. and Kessler, G.R. (1992). *FGF-4* and *FGF-5* have  
opposite effects on limb growth. Nature 357, 88-91.

Rindler, J., Tucker, C., Vogel, A., Hecht, J. and Kessler,  
G.R. (1993b). *FGF-4* replaces the apical ectodermal  
ridge and directs outgrowth and patterning of the limb.  
Cell 75, 519-527.

Rohde, T., Kojima, S., Koyama, E., Geyer, E., Woychik, E.,  
Kuroki, K., Gallo, T. and Tsunoda, S. (1991). *fgfr-1*  
ventral of the *fgfr-1* chicken homeobox gene in deter-  
mination of anteroposterior axial polarity during limb  
development. Cell 64, 1197-1207.

Roscoe, R. and Varma, H.R. (1992). *Ref* genes. Cell 69, 1073-  
1087.

Sheng, M., Lee, H. and Tsao, T. (1988). *Furrow* and *axo-*  
*fil* expression of a position specific antigen. AV-J  
in chick limb buds. Dev. Biol. 120, 454-463.

Oster, G.F., Murrey, J.D. and Maini, P.K. (1985). A model  
for chondrogenic condensation in the developing limb:  
The role of extracellular matrix and cell tractions. J.  
Embryol. exp. Morphol. 89, 93-112

Riley, B.B., Mary, P.S., Simandl, B.K., Olwin, B. and Fallon,  
J.F. (1993). Retroviral expression of FGF-2 (bFGF)  
affects patterning in chick limb bud. Development 118,  
95-104.

Saunders, J.W.Jr. and Gasseling, M.T. (1968). Ectodermal-  
mesenchymal interactions in the origin of symmetry.  
In Epithelial-mesenchymal interactions (eds. Fleisch-  
majer, R. and Billingham, R.F.), pp.78-97. Williams and  
Wilkins, Baltimore.

Saunders, J.W.Jr., Gasseling, M.T. and Cairns, J.M. (1959).  
The differentiation of prospective thigh mesoderm  
grafted beneath the apical ectodermal ridge of the wing  
bud in the chick embryo. Dev. Biol. 1, 281-301.

Solursh, M. (1983). Cell-cell interactions and chondro-  
genesis. In cartilage vol.2 (ed.Hall, B.k.) pp.121-141.  
Academic Press

Steinberg, M.S. (1964). The problem of adhesive selectivity  
cellular interactions. In Cellular Membranes in Devel-  
opment (ed. Locke, M.), pp.321-434. Academic Press.

Steinberg, M.S. (1970). Does differential adhesion govern  
self-assembly processes in histogenesis? Equilibrium  
configurations and the emergence of a hierarchy among  
populations of embryonic cells. J. exp. Zool. 173, 395-  
434.

Stocum, D.L. (1991). Limb regeneration: A call to arms (and  
legs). Cell 67, 5-8.



Stocum, D.L. and Crawford, K. (1987). Use of retinoids to analyze the cellular basis of positional memory in regenerating amphibian limbs. Biochem. Cell. Biol. 65, 750-761.

Summerbell, D. (1974). A quantitative analysis of the effect of cell excision of the AER from the chick limb-bud. J. Embryol. exp. Morphol. 32, 651-660

Summerbell, D. and Lewis, J. H. (1975). Time, place and positional value in the chick limb-bud. J. Embryol. exp. Morphol. 33, 621-643

Summerbell, D., Lewis, J. H. and Wolpert, L. (1973). Positional information in chick limb morphogenesis. Nature 244, 492-496.

Suzuki, S., Sano, K. and Tanihara, H. (1991). Diversity of the cadherin family: Evidence for eight new cadherins in nervous tissue. Cell Regul. 2, 261-270.

Takeichi, M., Ozaki, H.S., Tokunaga, K. and Okada, T.S. (1979). Experimental manipulation of cell surface to affect cellular recognition mechanisms. Dev. Biol. 70, 195-205.

Takeichi, M. (1990). Cadherins: A molecular family important in selective cell-cell adhesion. Annu. Rev. Biochem. 59, 237-252.

Townes, P.S. and Holtfreter, J. (1955). Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells. J. Exp. Zool. 128, 53-120.

Wada, N., Uchiyama, k. and Ide, H. (1993). Cell sorting out and chondrogenic aggregate formation in limb bud recombinants and in culture. Dev. Growth Differ. 35, 421-430.

Stocum, D.L. and Crawford, K. (1987). Use of retinoids to analyze the cellular basis of positional memory in regenerating amphibian limbs. Biochem. Cell. Biol. 65, 750-761.

Summerbell, D. (1974). A quantitative analysis of the effect of cell excision of the AER from the chick limb-bud. J. Embryol. exp. Morphol. 32, 651-660

Summerbell, D. and Lewis, J. H. (1975). Time, place and positional value in the chick limb-bud. J. Embryol. exp. Morphol. 33, 621-643

Summerbell, D., Lewis, J. H. and Wolpert, L. (1973). Positional information in chick limb morphogenesis. Nature 244, 492-496.

Suzuki, S., Sano, K. and Tanihara, H. (1991). Diversity of the cadherin family: Evidence for eight new cadherins in nervous tissue. Cell Regul. 2, 261-270.

Takeichi, M., Ozaki, H.S., Tokunaga, K. and Okada, T.S. (1979). Experimental manipulation of cell surface to affect cellular recognition mechanisms. Dev. Biol. 70, 195-205.

Takeichi, M. (1990). Cadherins: A molecular family important in selective cell-cell adhesion. Annu. Rev. Biochem. 59, 237-252.

Townes, P.S. and Holtfreter, J. (1955). Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells. J. Exp. Zool. 128, 53-120.

Wada, N., Uchiyama, k. and Ide, H. (1993). Cell sorting out and chondrogenic aggregate formation in limb bud recombinants and in culture. Dev. Growth Differ. 35, 421-430.



Strom, D.L. and Crawford, K. (1987). Use of retinoids to analyze the cellular basis of positional activity in regenerating amphibian limbs. Biochem. Cell Biol. 55, 159-161.

Summersell, D. (1974). A quantitative analysis of the effect of cell position on the AER from the chick limb bud. J. Embryol. exp. Morphol. 32, 521-530.

Summersell, D. and Lewis, J. H. (1975). Time, space and positional value in the chick limb bud. J. Embryol. exp. Morphol. 33, 531-543.

Summersell, D., Lewis, J. H. and Wolpert, L. (1973). Positional information in chick limb regeneration. Nature 244, 495-498.

Suzuki, S., Sano, K. and Tanihara, H. (1981). Diversity of the cadherin family: Evidence for eight new cadherins in nervous tissue. Cell 26, 281-290.

Takelch, M., Ozaki, H., Yoshizawa, S. and Ozaki, Y. S. (1979). Experimental manipulation of cell surface to affect cellular recognition mechanisms. Dev. Biol. 70, 195-202.

Takelch, M. (1980). Cadherins: A molecular family important in selective cell-cell adhesion. Ann. Rev. Biochem. 49, 337-351.

Townes, H. S. and Holtzman, J. (1952). Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells. J. Exp. Zool. 128, 83-100.

Wada, N., Nishiyama, K. and Ide, H. (1983). Cell sorting out and chondrogenic aggregate formation in limb bud mesenchyme and in culture. Dev. Growth Differ. 14, 411-420.

Wada, N. and Ide, H. (1994). Sorting out of limb bud cells in monolayer culture. Int. J. Dev. Biol., in press.

Watanabe, A. and Ide, H. (1993). Basic FGF maintains some characteristics of the progress zone of chick limb bud in cell culture. Dev. Biol. 159, 223-231.

Wolpert, L. (1969). Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. J. theor. Biol. 25, 1-47.

Yokouchi, Y., Sasaki, H. and Kuroiwa, A. (1991a). Homeobox gene expression correlated with the bifurcation process of limb cartilage development. Nature 353, 443-445.

Yokouchi, Y., Ohsugi, K., Sasaki, H. and Kuroiwa, A. (1991b). Chicken homeobox gene Msx-1: Structure, expression in limb buds and effect of retinoic acid. Development 113, 431-444.

横内裕二 (1991). 博士論文 (東北大学・理学部)

Zwilling, E. (1956). Interaction between limb bud ectoderm and mesoderm in the chick embryo. I. Axis establishment. J. exp. Zool. 132, 157-172.



Wada, H. and Ido, H. (1954). Gearing out of fish and cells  
in monolayer culture. *Int. J. Dev. Biol.* 5, 13-18.  
Watanabe, A. and Ido, H. (1955). Basic 45% solution  
characteristics of the progeny zone of chick limb bud  
in cell culture. *Dev. Biol.* 12, 233-234.  
Wolpert, L. (1957). Positional information and the spatial  
pattern of cellular differentiation. *J. Theor. Biol.*  
12, 1-17.  
Yokouchi, Y., Sasaki, H. and Kuroda, A. (1961). Histochemical  
studies on the differentiation of the blastula region  
of fish ovule development. *Kyoto J.* 40, 403-412.  
Yokouchi, Y., Ogasawara, K., Sasaki, H. and Kuroda, A.  
(1962). Chemical histochemical studies on the  
reaction in fish buds and effect of retentive acid.  
*Development* 11, 431-444.  
佐野 浩二 (1951). 博士論文 (東京大学・理学部)  
Belling, R. (1958). Interaction between fish bud ectoderm  
and mesoderm in the chick embryo. *J. Exp. Zool.* 122, 157-171.

図1. ...  
図2. ...

### 第8章 図、表の説明

図1. ...  
図2. ...

図3. ...



図1、a、発生開始後約3.5日目のニワトリ胚の様子。ドットで印をつけた領域が肢芽である。

b、発生開始後約3.75日（発生段階23）の肢芽の水平方向への断面図。AERは外胚葉性の組織であり、ZPAとPZは間充織組織に含まれる。

c、発生開始後10日目の前肢の軟骨パターン。方向は図の左に示したとおりであり、本論文の図は断りのない限りこの方向で並べてある。図の下に示した表は各骨の一般名称で、本文中の名称は全てこの表に従った。

図2、a、肢芽の発生と軟骨分化の様子。肢芽先端部のドットで示した領域は進行帯（PZ）を示す。軟骨領域は階調をつけた影をつけてあり、分化が基部側から起こっていることを示す。

b、AERの除去実験とその結果を示す図。初期の肢芽からAERを除去すると基部の軟骨しか形成できないが、後期になるほど先端部の軟骨を形成する。

c、肢芽先端部領域の移植実験とその結果を示す図。初期の肢芽と後期の肢芽先端部領域では、移植する大きさがさほど変わらないが、形成されるパターンは大きく異なり、後期になるほど先端部しか形成できない。

d、進行帯モデル。進行帯領域（PZ）はドットで示してあるが、間充織細胞がこの領域を初期に脱すると1や2の位置価が与えられ、後期では4や5の位置価が与えられる。これらの位置価は1→5となるにつれ、基部→先端部の構造を指定する。

図3、Homeobox遺伝子の発現パターンを示す図。上段はHoxA遺伝子群とHoxD遺伝子群について、肢芽内で領域特異的に発現する遺伝子とその近傍の遺伝子の配列を示してある。中段と下段は各発生段階における各遺伝子の発現パターンを示す（Yokouchi *et al.*, 1991a より改変して引用）。



図4、上段、有尾両生類における再生過程を模式化した図。切断面より先端部側の構造しか再生しない。

下段、再生芽の形成位置と組織の親和性の様子を模式化した図。Nardi and Stocum(1983)に基づく。それぞれの円は再生芽の組織を示し、白い再生芽とドットをつけた再生芽とを接触させて培養した時、基部先端部軸に沿って同じレベルの再生芽の組み合わせでは再生芽は均等に並んだままだが、基部と先端部の再生芽の組み合わせでは基部の再生芽が先端部の再生芽を取り囲む。

図5、a、混合培養の手順を示す。蛍光色素で標識した細胞を白で、標識していない細胞をドットで示す。

b、混合培養開始4時間後の細胞の様子を示す。標識された細胞が均等に分布している。

c、bの明視野像。矢印はbにおいて標識されていない領域を示すもので、蛍光が観察されない領域にも細胞が分布していることを示す。

図6、異なった発生段階の先端部領域を混合培養して20時間後の様子。この場合は一方をニワトリ、他方をウズラとし、A223抗体で染色してある。同じ発生段階の混合培養ではニワトリの細胞は分散して分布する(a, e, i)が、それ以外は選別している。バー=100 μm

図7、発生段階25の肢芽を基部先端部軸に沿って3つの領域に切り分け、各発生段階の肢芽先端部と混合培養したときの様子。この場合は発生段階25の細胞をニワトリ細胞としてある。発生段階20の細胞は基部の細胞と、発生段階23の細胞は中間部領域の細胞と、発生段階25の細胞は先端部の細胞と混合した場合はそれぞれ分散して分布する(a, e, i)が、それ以外は選別する。バー=100 μm



Figure 8: Diagram illustrating the relationship between cell adhesion and developmental stages. It shows various experimental conditions and results, including cell counts and statistical significance. The text is in Japanese and describes the experimental setup and findings.

図8、細胞接着性の違いと発生段階の関連を示した図。

a 及び b はそれぞれ発生段階20、及び25のの培養細胞 (20, 25) の上に蛍光標識した20の細胞 (20L) をまき、30分後に接着した細胞の様子を示した。20+20Lは25+20Lに比べて接着した細胞数が多い。

c, d は標識した細胞を発生段階25の細胞 (25L) とした場合の結果で、25+25Lは20+25Lに比べ接着した細胞数が多い。従って、同じ発生段階の細胞とは接着しやすいことが分かる。バー = 100  $\mu$ m

e, f は、上記の結果を数量化してグラフに示したもので、同発生段階の細胞を接着させた時の細胞数を100%として、異なった発生段階の細胞を接着させた時の細胞数を示してある。eでは危険率  $p < 0.01\%$  で、fでは危険率  $p < 0.05\%$  でいずれも有意差がある。

図9、細胞塊の培養方法の手順を示した図。手順の詳細については第2章の材料と方法6を参照。右下の白抜き矢印は観察した方向を示す。

図10、図9のようにして細胞塊を培養、軟骨分化させた時の様子を示す。上段は明視野像で、矢先は2つの細胞塊の境界を示す。中段は暗視野像 (蛍光顕微鏡像) で、細胞塊の一方をニワトリ、他方をウズラ由来として、A223抗体で染色し、境界を決定した。下段はアルシアンブルー染色した後同じ領域を観察したもので、主に軟骨分化した領域が染色されている (黒い領域)。異なった発生段階の細胞塊を隣接した場合は、境界での軟骨分化が余りよくない (i, j) が、同じ発生段階の細胞塊を隣接させた場合は、連続して軟骨分化する (k, l)。

バー = 100  $\mu$ m



図11、再構成肢芽の作成の手順を示す。手順の詳細については、第3章の材料と方法1を参照のこと。

図12、再構成肢芽から形成される軟骨パターンを、用いる間充織の発生段階と対応して示す。a、bは発生段階20の間充織を用いて再構成肢芽を形成した場合。c、dは発生段階25の間充織を用いて再構成肢芽を形成した場合で、eは正常肢の軟骨パターンを示す。いずれの写真においても矢印は軛脚（状）の軟骨を、矢先は自脚（状）の軟骨を示す。eにおいて20、25は、それぞれの間充織が形成できる予定域の最基部を示す。

図13、再構成肢芽形成時にZPAを組み込んだ場合の軟骨パターンを示す。a、bは発生段階20の前半部の間充織とZPAを組み合わせたもの、cは25の間充織とZPAを組み合わせた場合、dは正常肢の軟骨パターンである。Rは橈骨を、Uは尺骨を示し、2、3、4の各番号は正常肢における指の番号と対応する。cにおいて20、25は図12の場合と同じ最基部を示す。

図14、再構成肢芽発生時における軟骨分化の様子を、PG-Hの発現で示した図。aは発生開始後36時間後、bは60時間後の様子である。bに示した矢印はPG-Hの最先端部の発現を示し、これが2方向に分岐しているため、形成される軟骨が分岐することが予想される。バー=100  $\mu$ m。

図15、正常肢芽におけるHomeobox遺伝子の発現パターン。ここでは実験に用いた遺伝子の発現のみを示した（Yokouchi *et al.*, 1991a より引用）。

図16、発生段階20の間充織を用いた再構成肢芽内でのHomeobox遺伝子の発現パターンを示す。a、b、cはHoxA11の、d、e、fはHoxA13の、g、h、iはHoxD12の発現パターンを示す。また、a、d、gは移植後24時間後、b、e、hは移植後36時間後、c、f、iは60時間後の発現パタ



Figure 17: Homeobox gene expression patterns in reconstituted limb buds at stage 25. Panels a-f show HoxA11, HoxA13, and HoxD12 expression at 36h and 60h post-transplantation. Arrows indicate expression boundaries.

Figure 18: AV-1 expression in reconstituted limb buds. Panels a-c show AV-1 expression at 24h, 36h, and 60h post-transplantation. Panel d shows AV-1 expression in a cartilage differentiation region.

Figure 19: AV-1 expression patterns in reconstituted limb buds. Panels e-f show AV-1 expression at 36h and 60h post-transplantation. Panel g shows AV-1 expression in a normal limb bud.

Figure 20: Cell selection patterns in reconstituted limb buds. Panel C shows Niwatori cells and panel Q shows Kimera cells.

ーを示す。矢先は発現の強さに変化が見られる領域を示す。矢印は移植片と宿主の間の境界を示し、大きな矢印で間充織における発現の境界を示す。バー = 100  $\mu$ m

図17、発生段階25の間充織を用いた再構成肢芽内でのHomeobox遺伝子の発現パターンを示す。a, bはHoxA11の、c, dはHoxA13の、e, fはHoxD12の発現パターンを示す。またa, c, eは移植後36時間後、b, d, fは60時間後の発現パターンを示す。b, d, fにおいて、矢先は各遺伝子の発現の境界を示し、境界は再構成肢芽と宿主の境界と考えられる。バー = 100  $\mu$ m。

図18、再構成肢芽内でのAV-1の発現を示す。a, b, cは発生段階20の間充織細胞を用いた場合で、aは移植後24時間後、bは移植後36時間後、cは60時間後のもので、いずれも再構成肢芽の中央部で発現していることがわかる。また、dはcに近接した領域の切片で軟骨分化の様子をPG-Hの発現で調べたもので、cでのAV-1の発現の境界(矢先)をdにも示す。dで矢印に挟まれた領域は、より基部なので軟骨分化しているはずであるが、この切片ではPG-Hが発現していない。

e, fは発生段階25の間充織細胞を用いた場合で、eは36時間後、fは60時間後の切片である。いずれもAV-1の発現は観察されない。バー = 100  $\mu$ m。

gは正常肢芽におけるAV-1の発現の模式図。荒いドットで示した領域がAV-1の発現領域で、細かいドットで示した領域は軟骨分化領域を示す。

図19、再構成肢芽内におけるHomeobox遺伝子とAV-1の発現パターンをまとめたもの。60時間後の図において点線で囲まれた領域は軟骨分化領域を示す。

図20、再構成肢芽内での細胞選別の様子を示した図。ニワトリ(C) - ウズラ(Q)のキメラを用いてニワトリ細胞だけをA223



抗体で染色した。領域特異性との対応をつけるために HoxA13 の発現も併せて示した。a, c, e, g は移植後 24 時間のもの、b, d, f, h は移植後 36 時間のもの、a, b は発生段階 20 のニワトリと 25 のウズラを混合した間充織 (C20+Q25) を持つ再構成肢芽での様子。c, d は発生段階 25 のニワトリと 20 のウズラを混合した場合 (C25+Q20)。e, f は発生段階 20 のニワトリとウズラを混合したもので、対照区である。a, b, c, d において、矢印は発生段階 20 の細胞だけが集合している領域を示す。また、b, d において矢先はニワトリとウズラの細胞が分散している領域を示す。g における矢先は Hox A13 の発現の境界を示す (図 16 b と同じ)。

バー = 100  $\mu$ m。

図 21、再構成肢芽内における Homeobox 遺伝子の発現調節機構のモデル。A クラスターの 2 つの遺伝子は AER 因子依存的に発現が制御されるものとし、その一方で HoxA11 は再構成肢芽形成時に既に発現の自律性が確立していると考えられるため、AER 因子が広がる範囲以外でも強く発現するが、HoxA13 は発現に AER 因子を必要とするため AER 因子の届く範囲でしか発現できない。

一方、HoxD12 は強く発現を維持するためには AER 因子の他に ZPA 因子も必要であると考えられ、解離された ZPA 細胞が活性を持ち得る範囲 (AER 因子の届く範囲) だけで発現が強くなり、基部では発現が弱くなる。

モデルの説明の詳細は、第 3 章議論を参照のこと。

図 22、再構成肢芽内での領域特異性と形成される軟骨パターンの関係をまとめた図。図の左半分は図 19 と同じである。発生段階 20 の間充織を持つ再構成肢芽では、Homeobox 遺伝子や AV-1 の発現に見られる領域特異性が観察され、これは結果として基部先端部軸に沿って 2 種類の異なった軟骨



を形成することになる（軛脚+自脚）。一方、発生段階 25 の間充織を用いた場合は、Homeobox 遺伝子の発現では領域特異性は見られず、AV-1 も発現しない。そのため、形成される軟骨は自脚相当の軟骨だけになる。

軛脚域を荒いドットで、自脚域を細かいドットで示す。

図 23、肢芽の伸長と Homeobox 遺伝子の発現、付加される親和性および最終的な軟骨パターンを示した図。

- a, AER の影響によってその下にある間充織の位置価が変更していくことを示してある。初期に AER の影響を脱すると若い番号で位置価が固定される（①等）が、後期まで残っていると番号は大きくなり位置価も順次変化する。d に示すようにこの番号は最終的に細胞の親和性に対応する。
- b, 肢芽先端部では常に細胞が増殖しているので、一定数の細胞群が常に基部に送り出される（矢印）。ところが送り出される細胞群は AER の影響を受ける時間の差によって異なる。これには c に示す Hox 遺伝子の発現が関係する。
- c, Hox 遺伝子の発現パターン。図を見やすくするために A クラスター、D クラスターを区別せず、両遺伝子群の発現の境界のみを示す。b のようにして送り出された細胞群は Hox 遺伝子の組み合わせによって、特異的な親和性を持つようになる。
- d, c に示した肢芽の図において同一の親和性を持つ範囲を一本の線で示したもの。肢芽の伸長と共に先端部側に親和性の異なる細胞群が付加される。
- e, 正常肢の軟骨パターン。番号は a ~ d で用いてきたものに対応する。



発生段階の異なる進行帯細胞を混合培養した時のクラスターの大きさ

表1 発生段階の異なる進行帯細胞を混合培養した時のクラスターの大きさ

| 組み合わせ                           | 20+20         | 20+23           | 20+25          |
|---------------------------------|---------------|-----------------|----------------|
| 平均面積 (±S.D.) (μm <sup>2</sup> ) | 218.7 (±16.1) | *365.3 (±20.2)  | *516.8 (±89.2) |
|                                 | 23+23         | 23+25           | 25+25          |
|                                 | 211.9 (±20.4) | **389.8 (±93.2) | 254.9 (±18.2)  |

\*,\*\*は対照区 (同じ発生段階どうしを混合した場合) に比べて有意差があることを示し、危険率はそれぞれ\* p<0.01、\*\* p<0.05 である。

表1 発生段階の異なる進行帯細胞を混合培養した時のクラスターの大きさ

| 組み合わせ                           | 20+20         | 20+23           | 20+25          |
|---------------------------------|---------------|-----------------|----------------|
| 平均面積 (±S.D.) (μm <sup>2</sup> ) | 218.7 (±16.1) | *365.3 (±20.2)  | *516.8 (±89.2) |
|                                 | 23+23         | 23+25           | 25+25          |
|                                 | 211.9 (±20.4) | **389.8 (±93.2) | 254.9 (±18.2)  |

\*,\*\*は対照区 (同じ発生段階どうしを混合した場合) に比べて有意差があることを示し、危険率はそれぞれ\* p<0.01、\*\* p<0.05 である。



| 時期      | 時期       | 時期      | 時期      |
|---------|----------|---------|---------|
| 20D+25P | 20D+25SD | 20D+25D | 20D+25D |
| 23D+25P | 23D+25SD | 23D+25D | 23D+25D |
| 25D+25P | 25D+25SD | 25D+25D | 25D+25D |

表2、発生段階25枝芽の基部先端部軸上のいくつかの領域の細胞を初期の枝芽の進行帯細胞と混合培養した時のクラスターの大きさ

| 組み合わせ                             | 20D+25P        | 20D+25SD        | 20D+25D          |
|-----------------------------------|----------------|-----------------|------------------|
| 平均面積 (±S. D.) ( $\mu\text{m}^2$ ) | 247.6 (±20.5)  | *539.3 (±100.5) | *1044.6 (±257.2) |
|                                   | 23D+25P        | 23D+25SD        | 23D+25D          |
|                                   | *379.8 (±71.4) | 218.2 (±44.1)   | **423.9 (±171.0) |
|                                   | 25D+25P        | 25D+25SD        | 25D+25D          |
|                                   | *577.3 (±60.1) | *511.9 (±64.5)  | 215.8 (±23.3)    |

\*,\*\*はクラスターの大きさが最も小さいものに対して有意差があることを示し、危険率はそれぞれ \* $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.05$ である。



表3、発生段階の異なる細胞塊間での軟骨分化の様子

| 発生段階  | 軟骨分化 | 細胞数 | 割合 (%) |
|-------|------|-----|--------|
| 20+20 | +    | 19  | 79.2   |
| 20+20 | ±    | 3   | 12.5   |
| 20+20 | -    | 2   | 8.3    |
| 20+25 | +    | 3   | 12.0   |
| 20+25 | ±    | 8   | 32.0   |
| 20+25 | -    | 14  | 56.0   |
| 25+25 | +    | 10  | 62.5   |
| 25+25 | ±    | 2   | 12.5   |
| 25+25 | -    | 4   | 25.0   |
| Total |      | 24  |        |
|       |      | 25  |        |
|       |      | 16  |        |

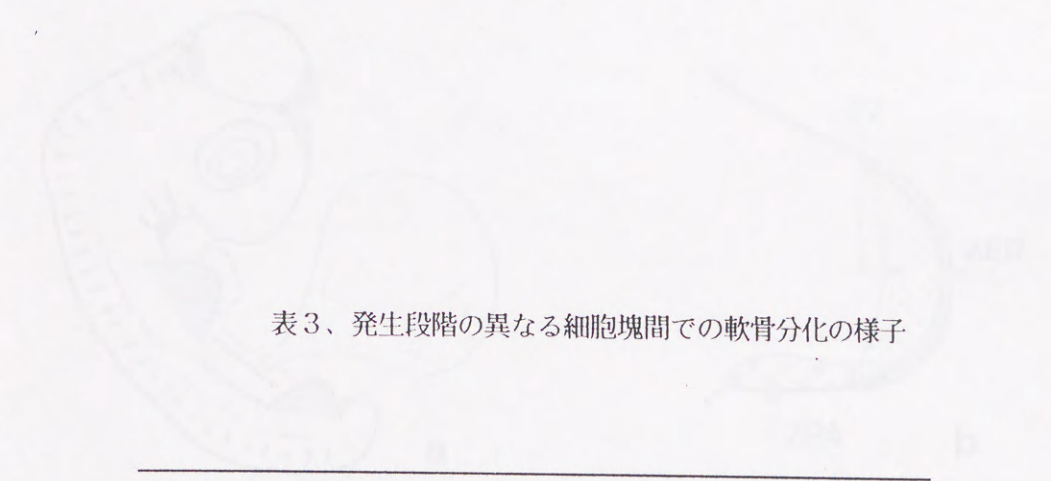


表3、発生段階の異なる細胞塊間での軟骨分化の様子

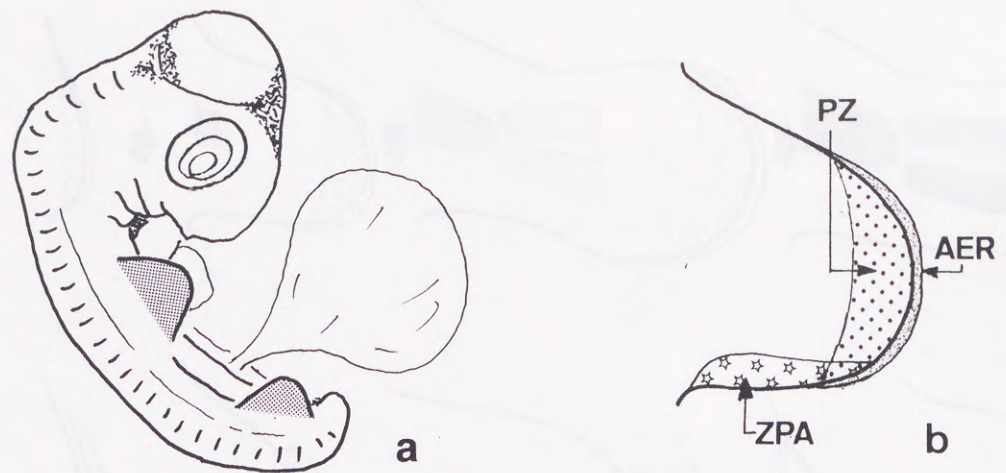
| 組み合わせた発生段階 | 軟骨分化 | 20+20     | 20+25     | 25+25     |
|------------|------|-----------|-----------|-----------|
| 軟骨分化       | +    | 19 (79.2) | 3 (12.0)  | 10 (62.5) |
|            | ±    | 3 (12.5)  | 8 (32.0)  | 2 (12.5)  |
|            | -    | 2 ( 8.3)  | 14 (56.0) | 4 (25.0)  |
| Total      |      | 24        | 25        | 16        |

軟骨分化は以下のように分類した。

- + ; 分化した軟骨が連続しているもの
- ± ; 分化した軟骨が弱く連続しているもの
- ; 分化した軟骨が連続しないもの

| 発生段階  | 軟骨分化 | 細胞数 | 割合 (%) |
|-------|------|-----|--------|
| 20+20 | +    | 19  | 79.2   |
| 20+20 | ±    | 3   | 12.5   |
| 20+20 | -    | 2   | 8.3    |
| 20+25 | +    | 3   | 12.0   |
| 20+25 | ±    | 8   | 32.0   |
| 20+25 | -    | 14  | 56.0   |
| 25+25 | +    | 10  | 62.5   |
| 25+25 | ±    | 2   | 12.5   |
| 25+25 | -    | 4   | 25.0   |
| Total |      | 24  |        |
|       |      | 25  |        |
|       |      | 16  |        |





|               | 柱脚 (stylopod) | 軛脚 (zeugopod)             | 自脚 (autopod)                                   |
|---------------|---------------|---------------------------|--|
| 前肢 (forelimb) | 上腕骨 (humerus) | 橈骨 (radius)<br>尺骨 (ulna)  | 基骨 (carpus)<br>掌骨 (metacarpus)<br>指骨 (phalanx) |
| 後肢 (hindlimb) | 大腿骨 (femur)   | 脛骨 (tibia)<br>腓骨 (fibula) | 跗骨 (tarsus)<br>趾骨 (metatarsus)<br>指骨 (phalanx) |

図 1





| Diagram 1 | Diagram 2 | Diagram 3 | Diagram 4 |
|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Diagram 1 | Diagram 2 | Diagram 3 | Diagram 4 |
| Diagram 1 | Diagram 2 | Diagram 3 | Diagram 4 |
| Diagram 1 | Diagram 2 | Diagram 3 | Diagram 4 |

[ 图 ]

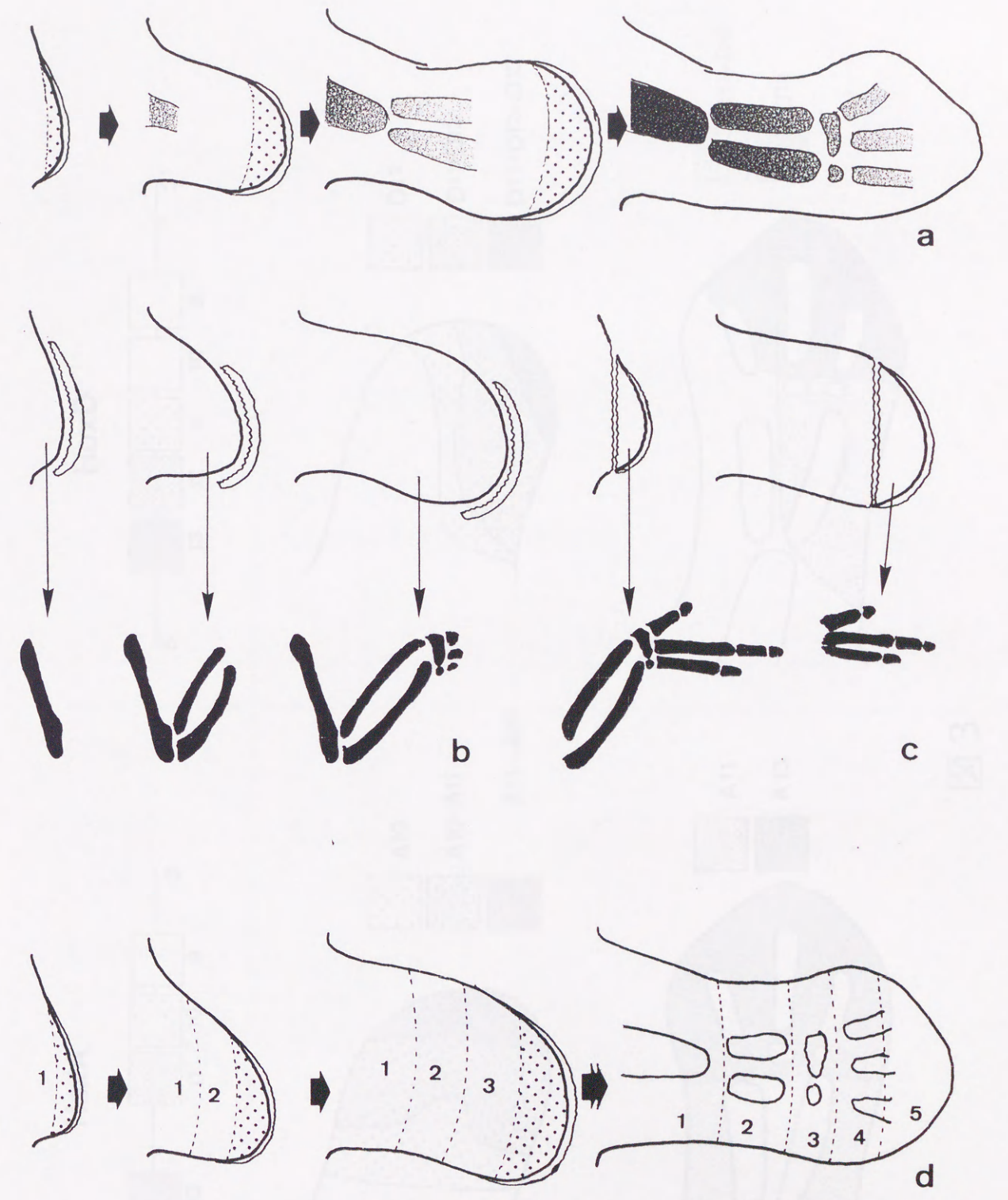
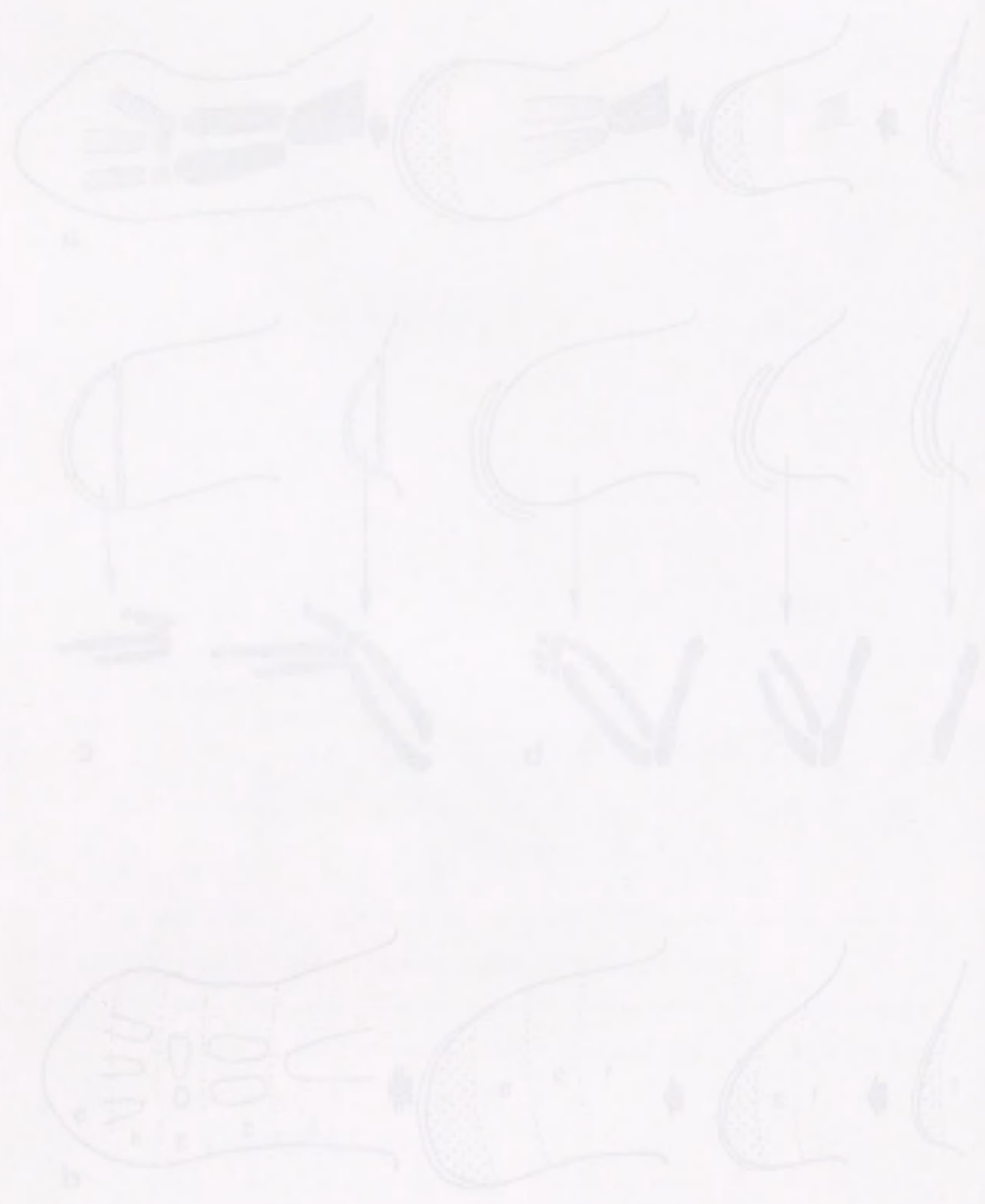
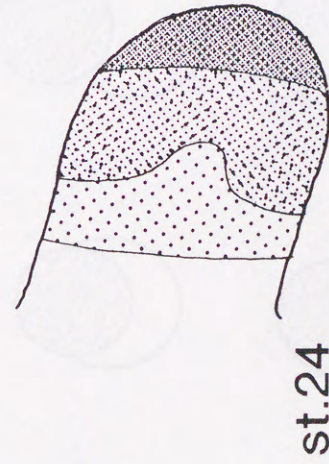
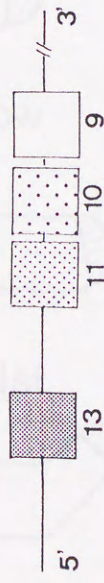


图 2

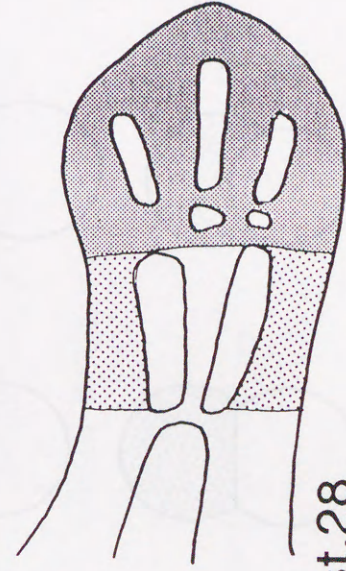
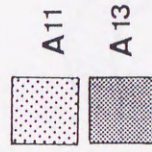
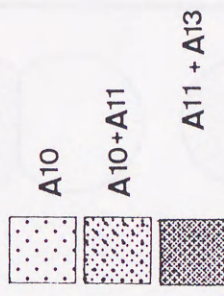




HoxA

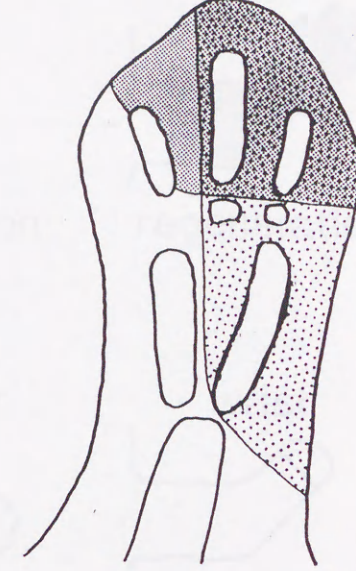
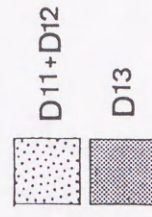
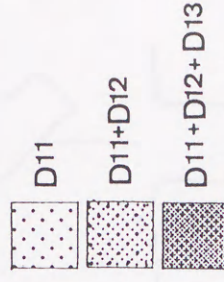
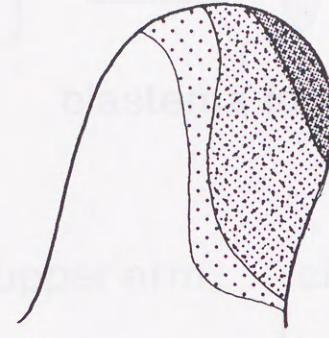
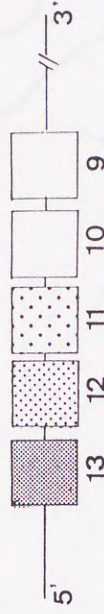


st.24



st.28

HoxD





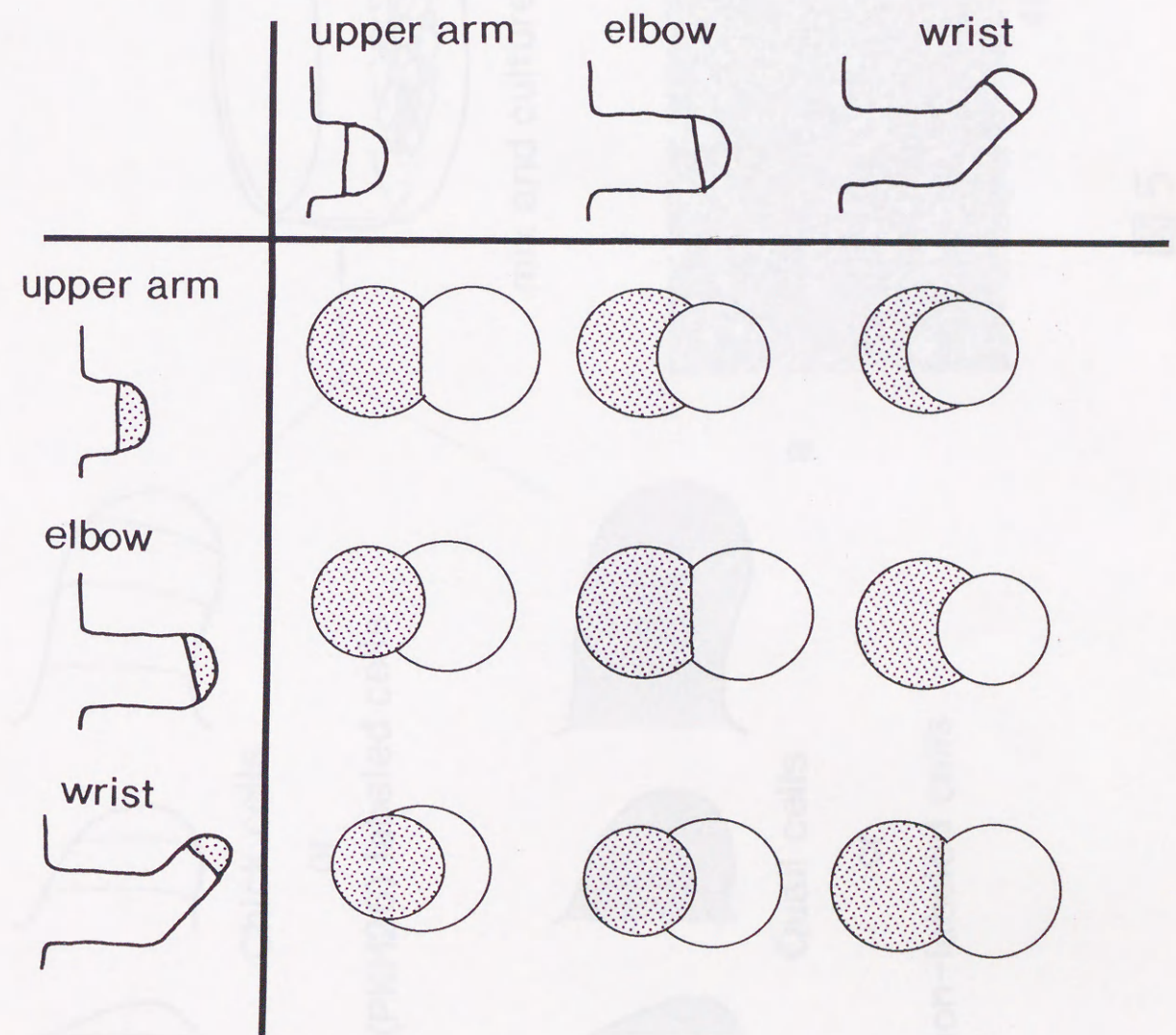
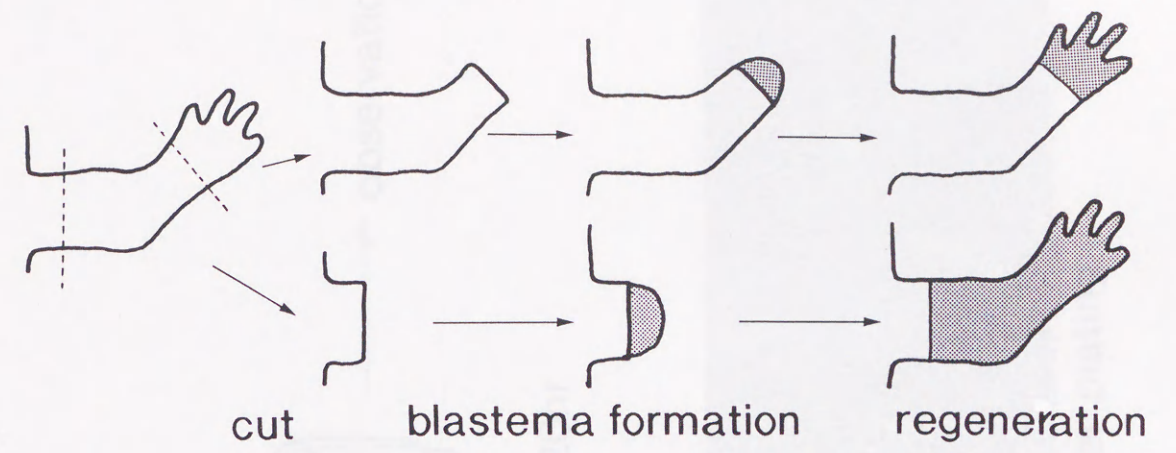


图 4



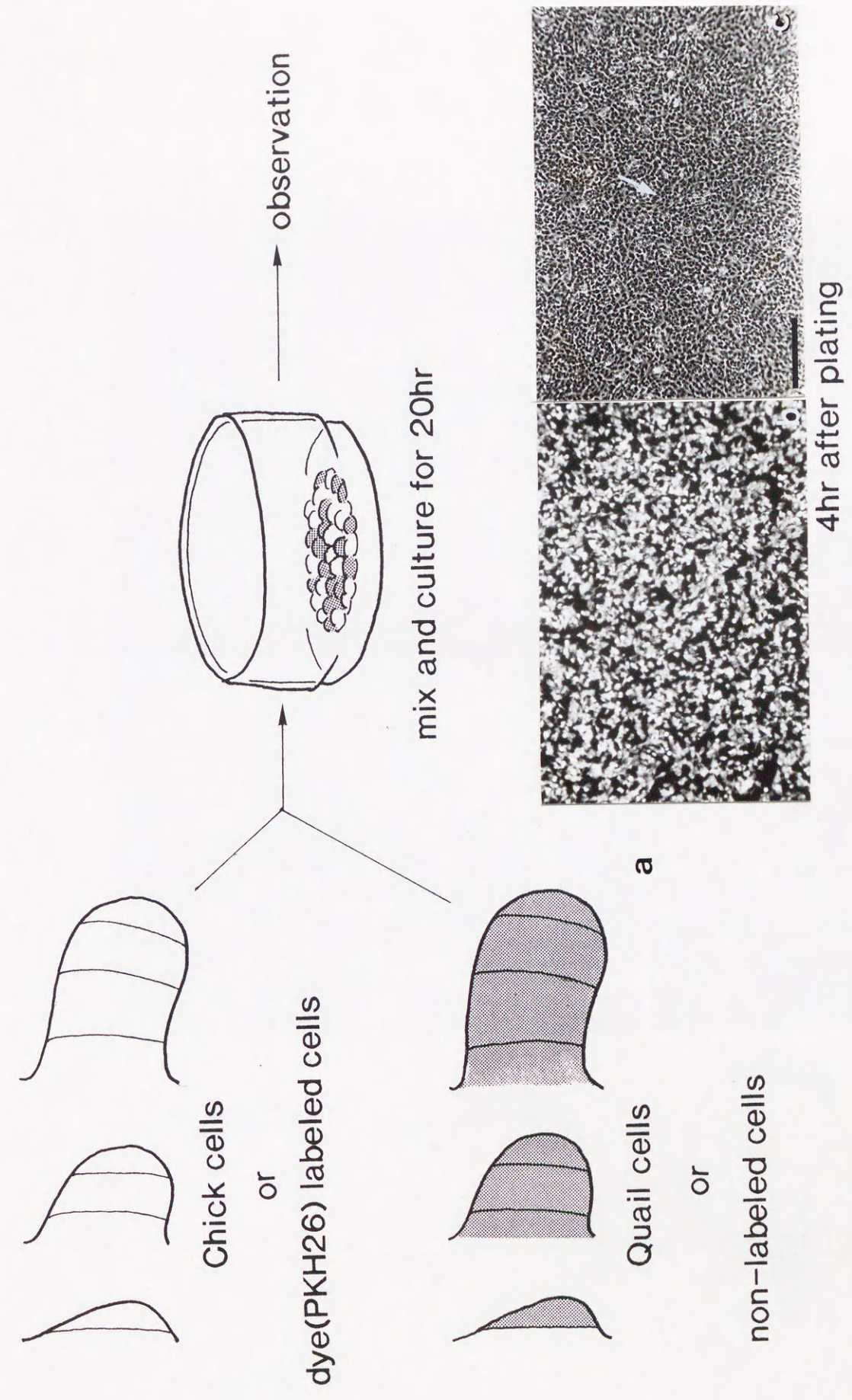
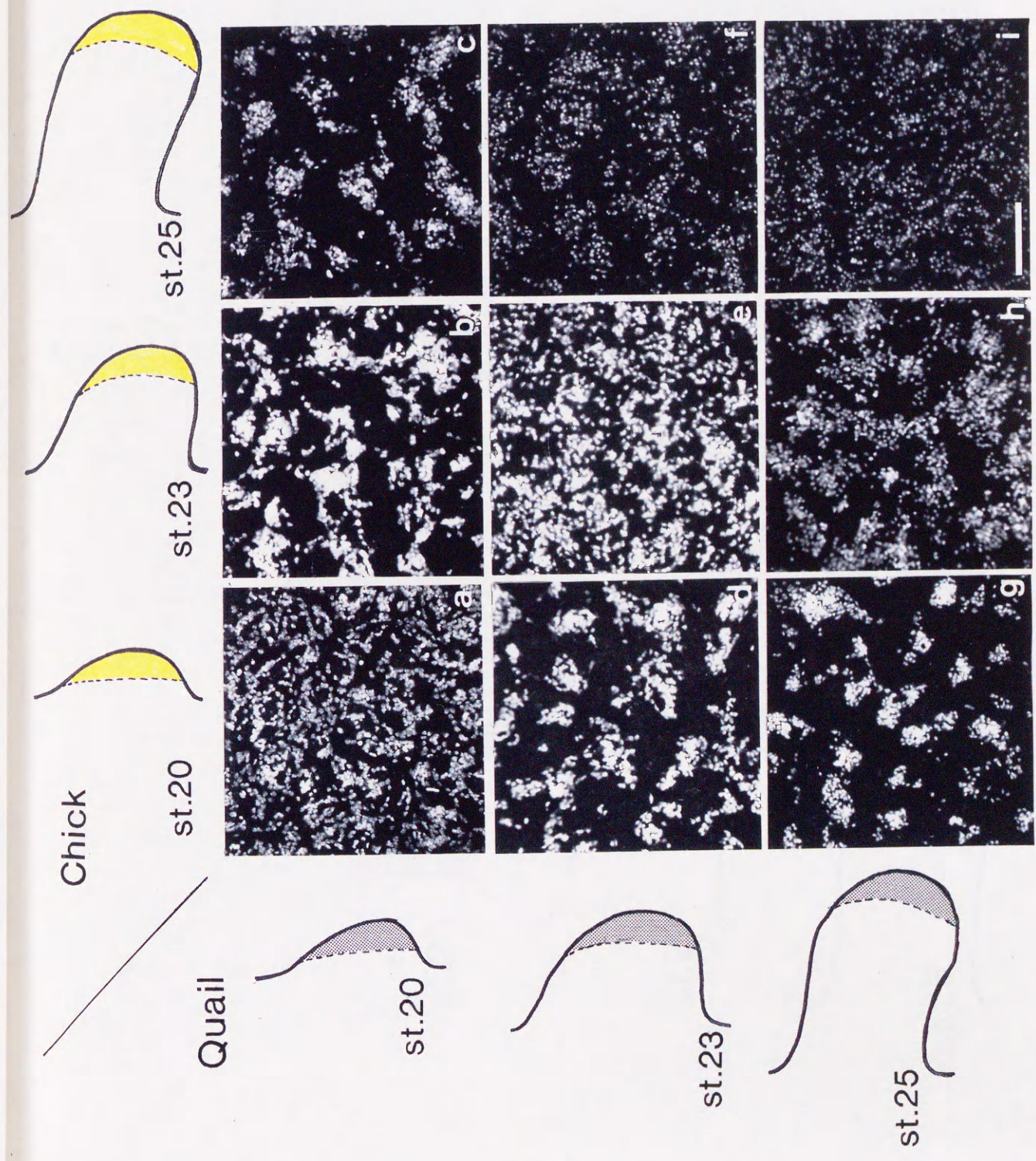


图 5







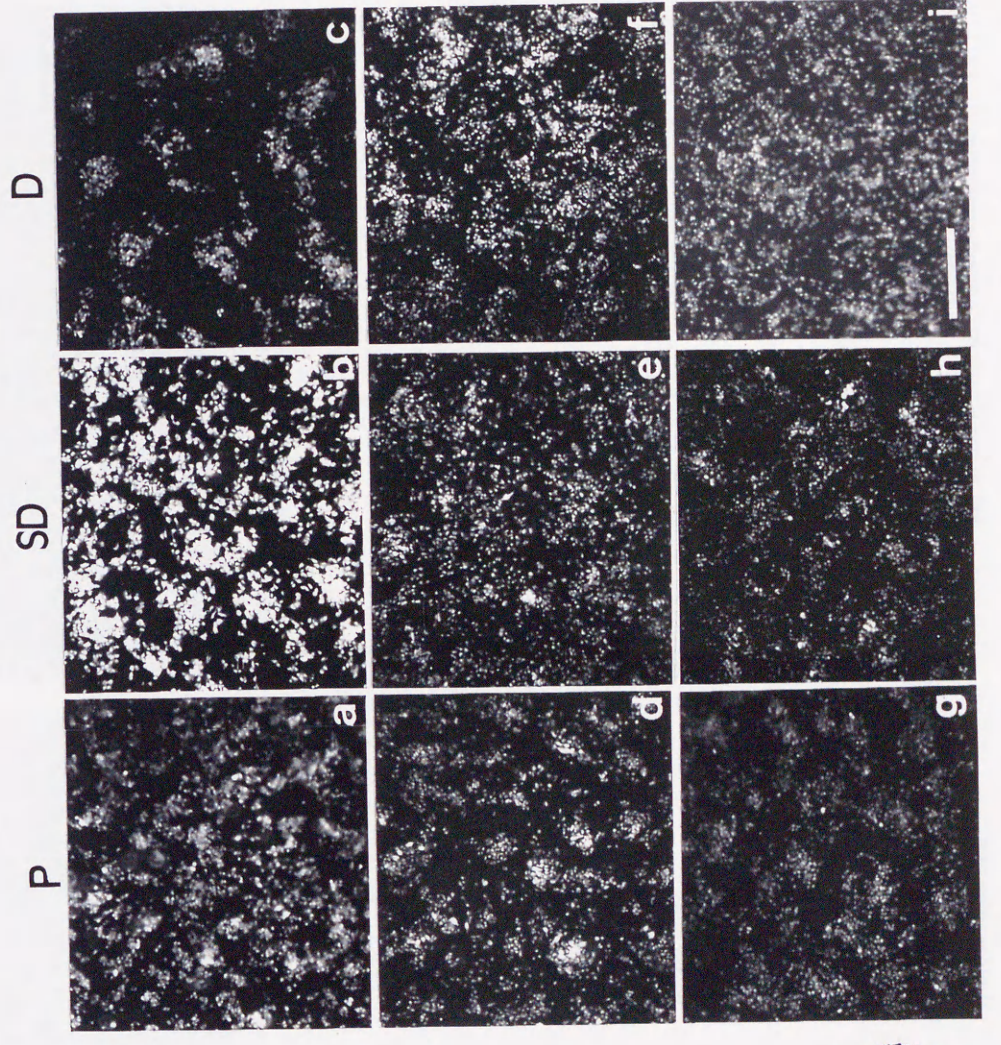
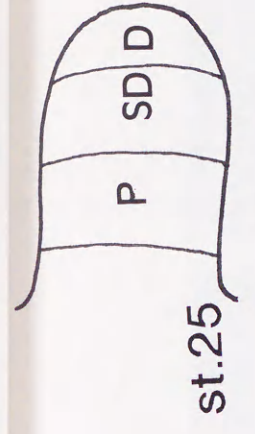
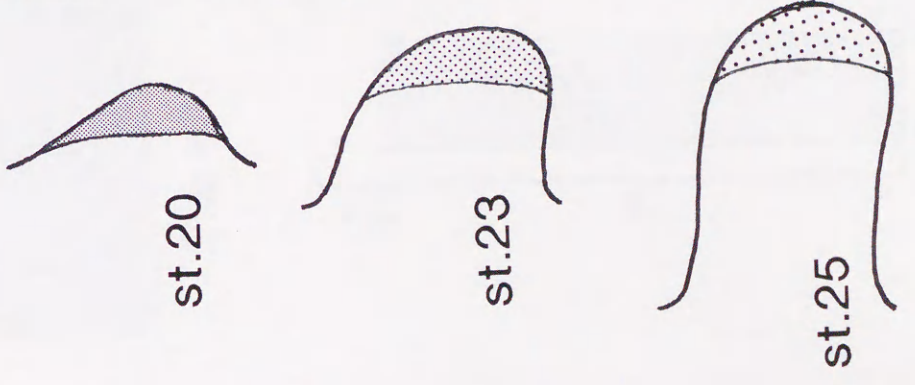
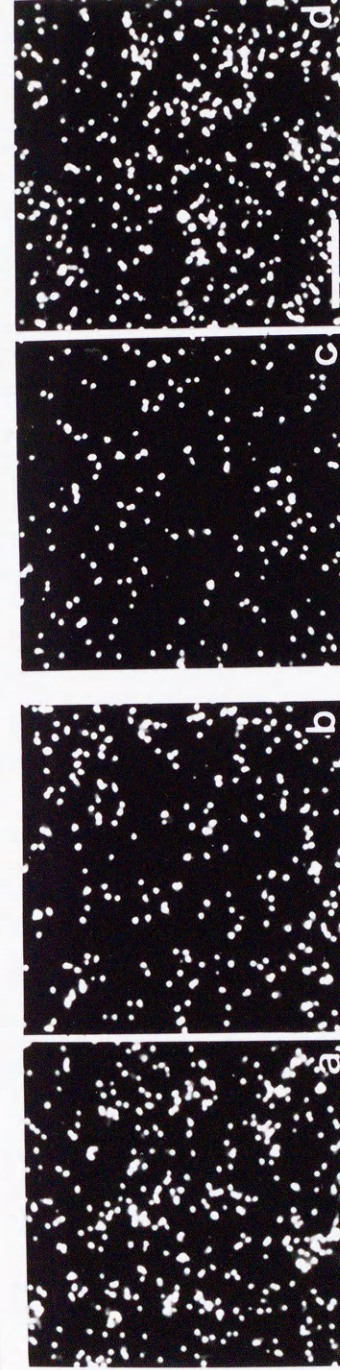
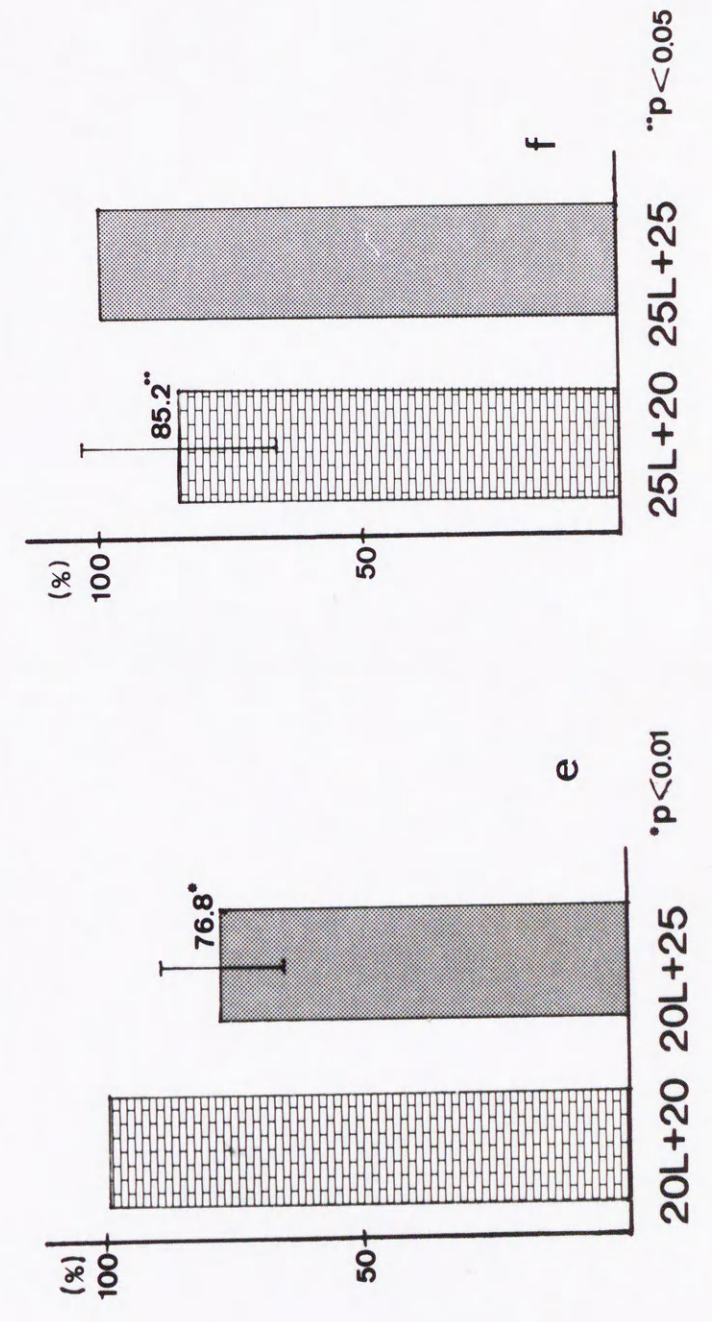


图7

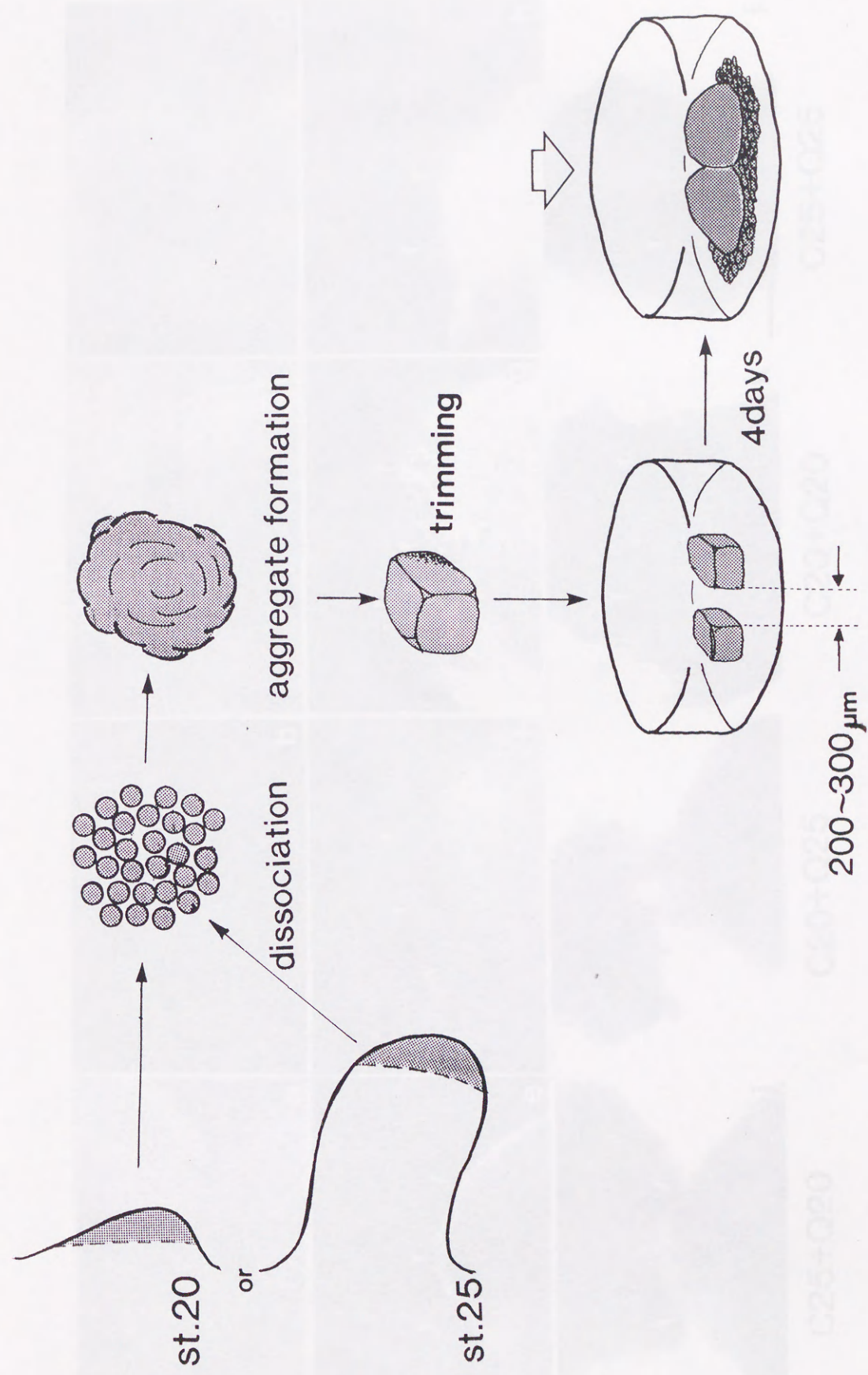




20L+20      20L+25      25L+20      25L+25













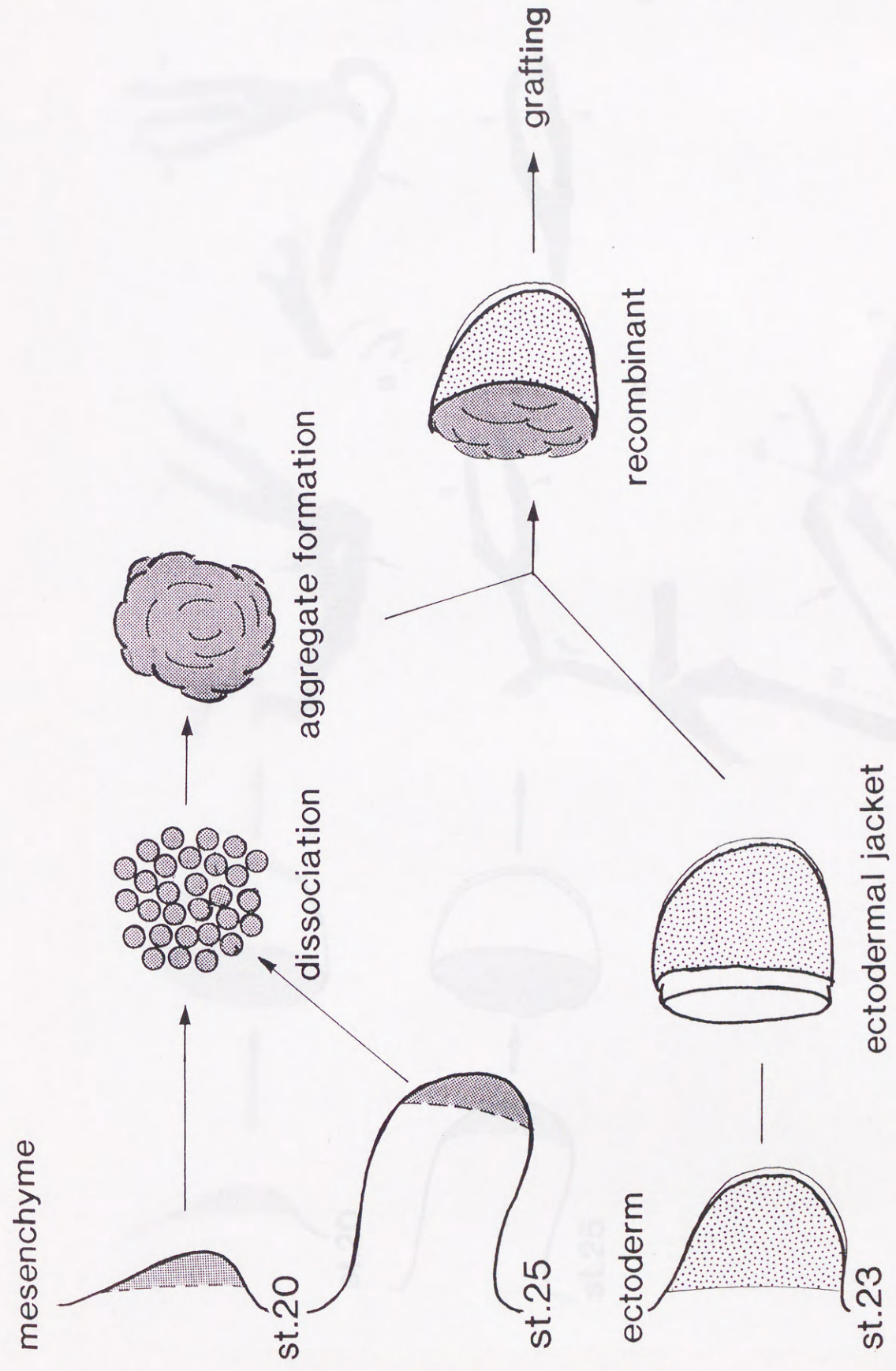




图 11

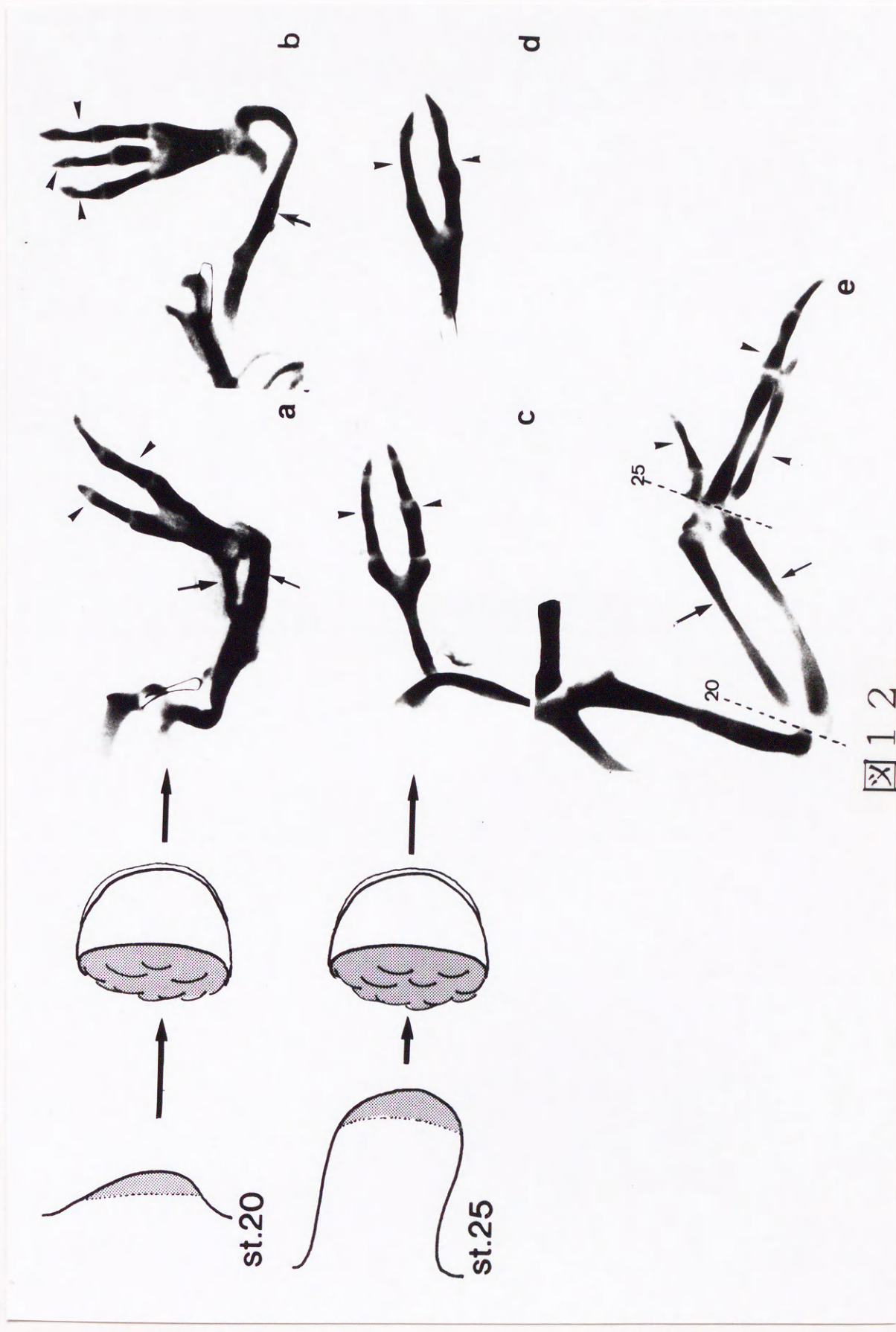


图 12



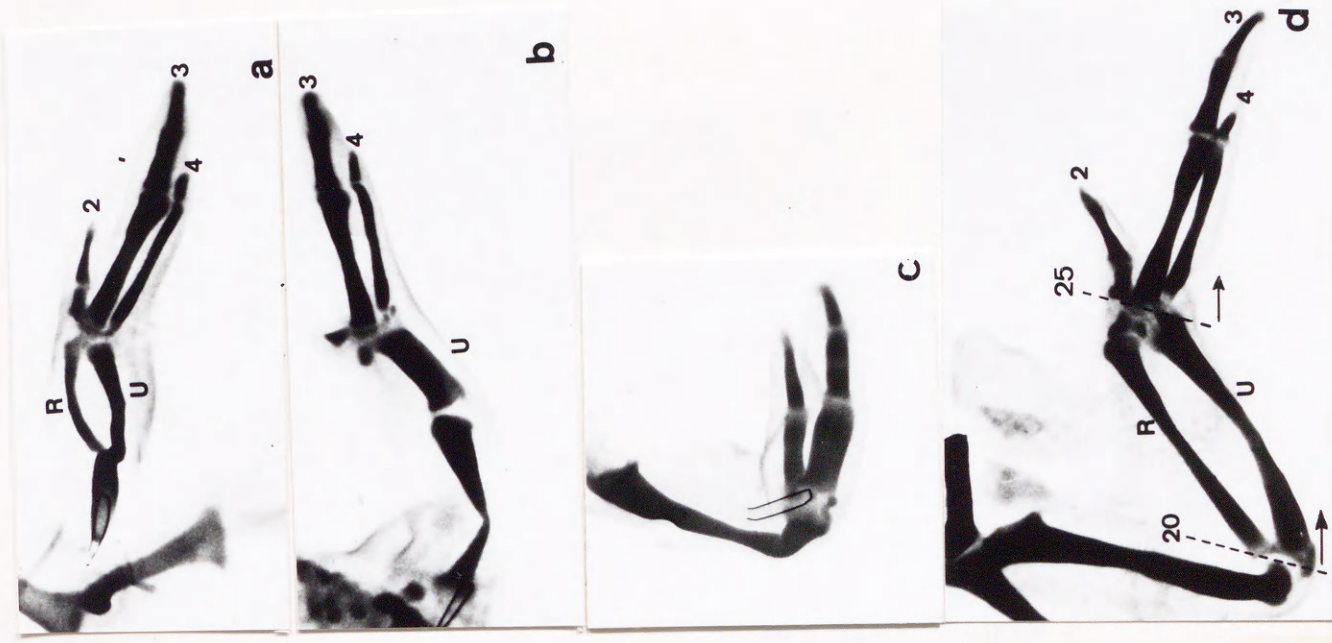
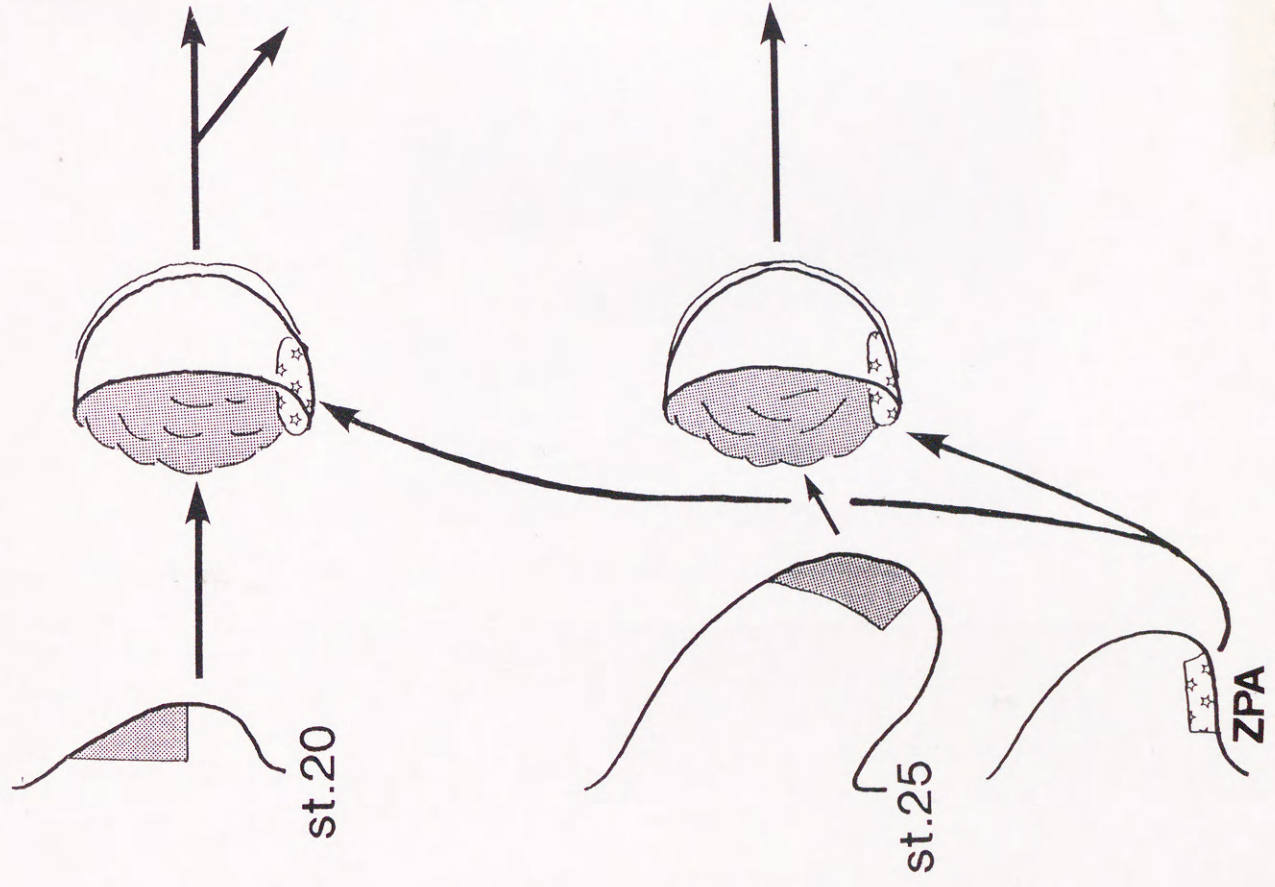
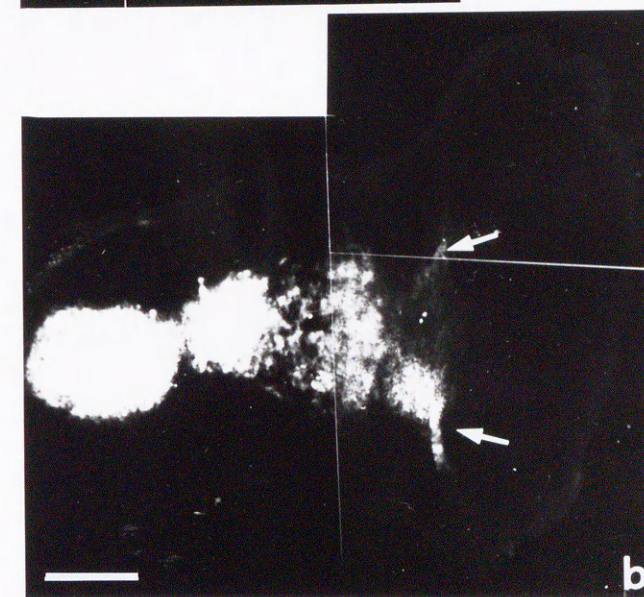
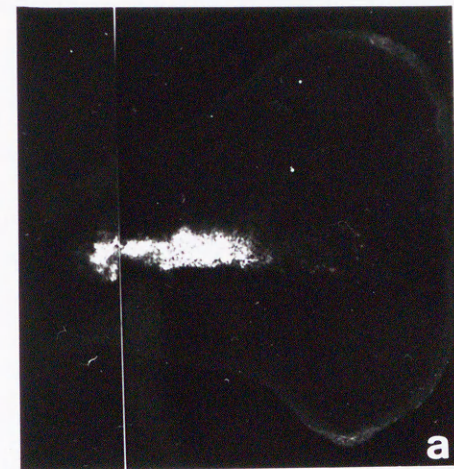


图 13



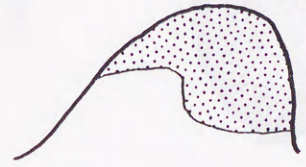


Pr ← → Di

图 14

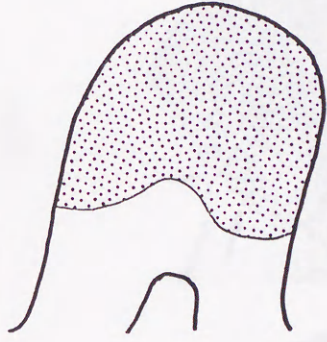


st.22



HoxA11

st.24

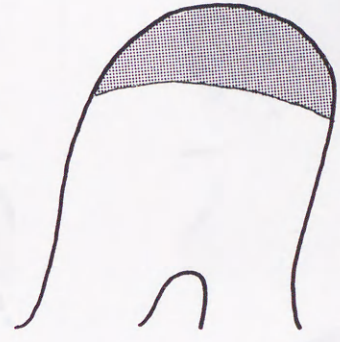


HoxA13

st.28



HoxA13



HoxD12

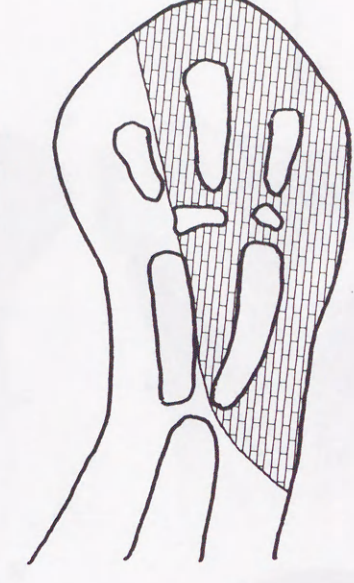
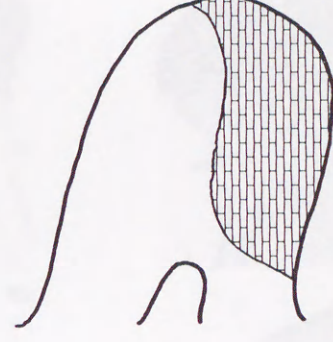




图 12



HoxD15

HoxA13

HoxA11

24hr

36hr

60hr

24hr

36hr

60hr

HoxA11

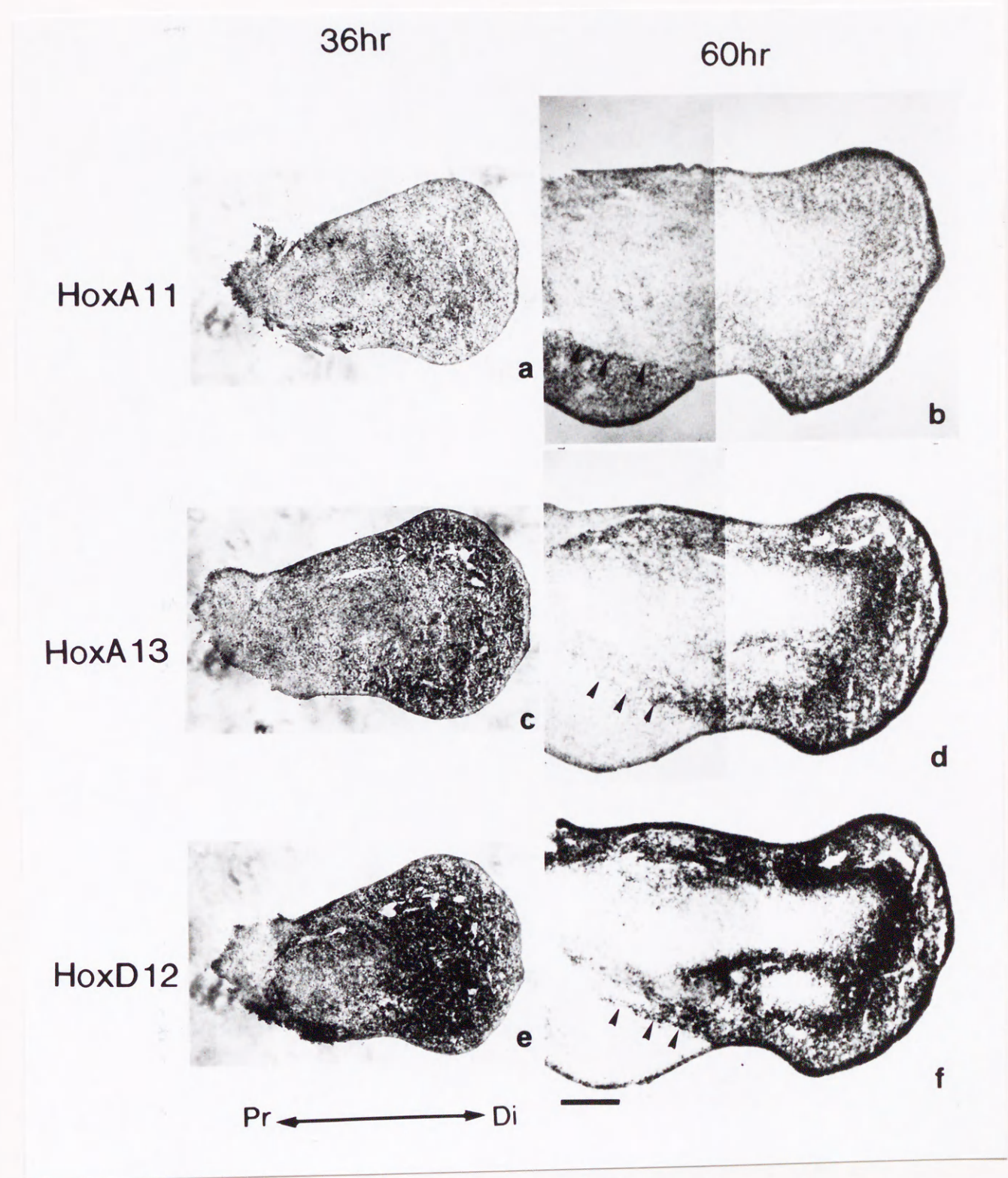
HoxA13

HoxD12

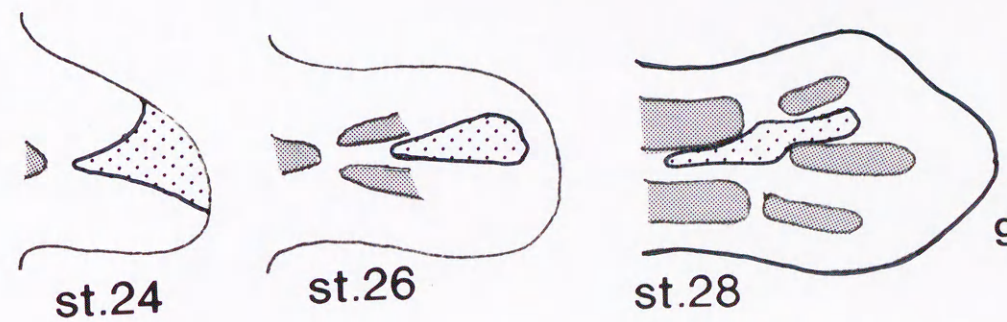
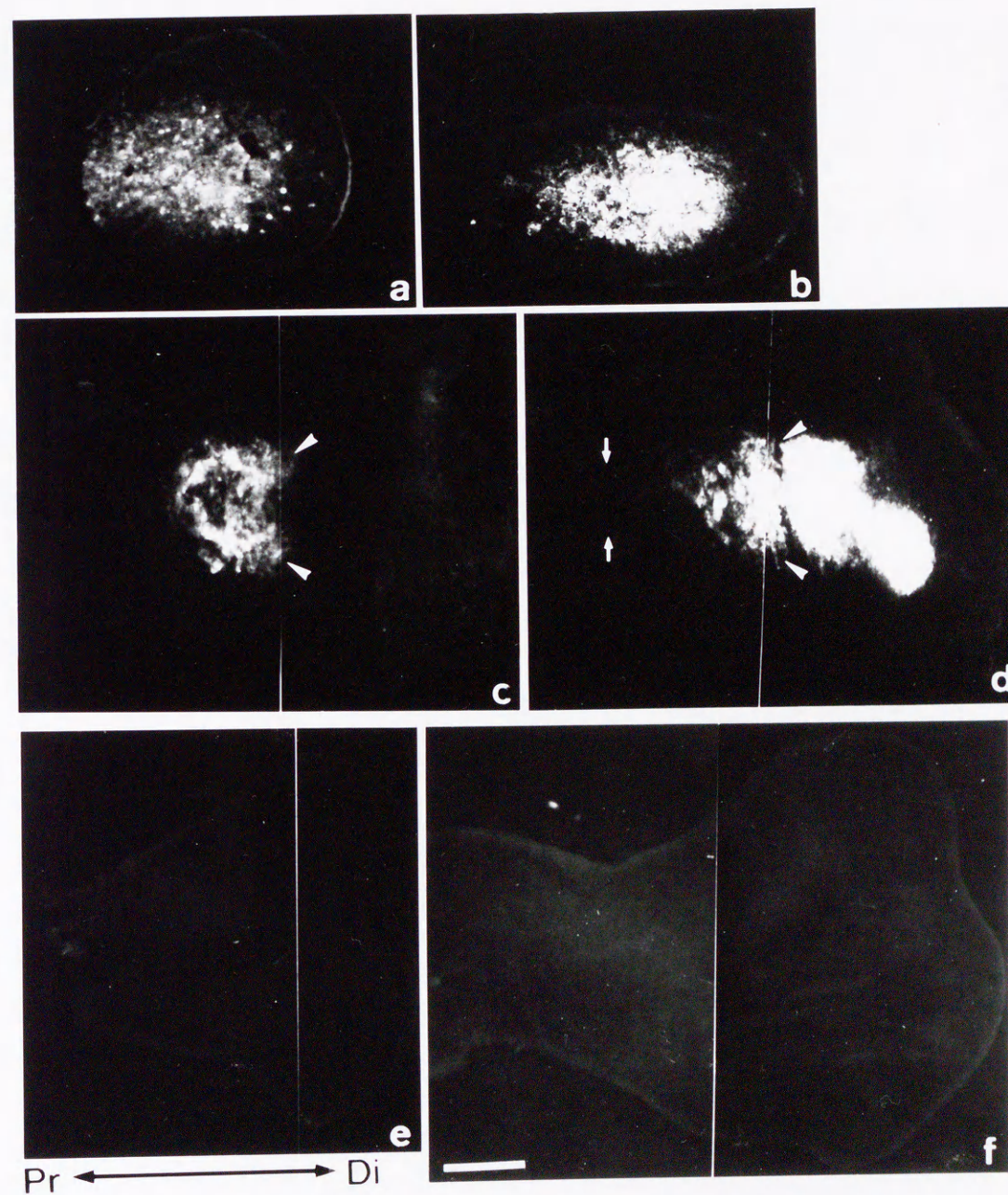


图 16

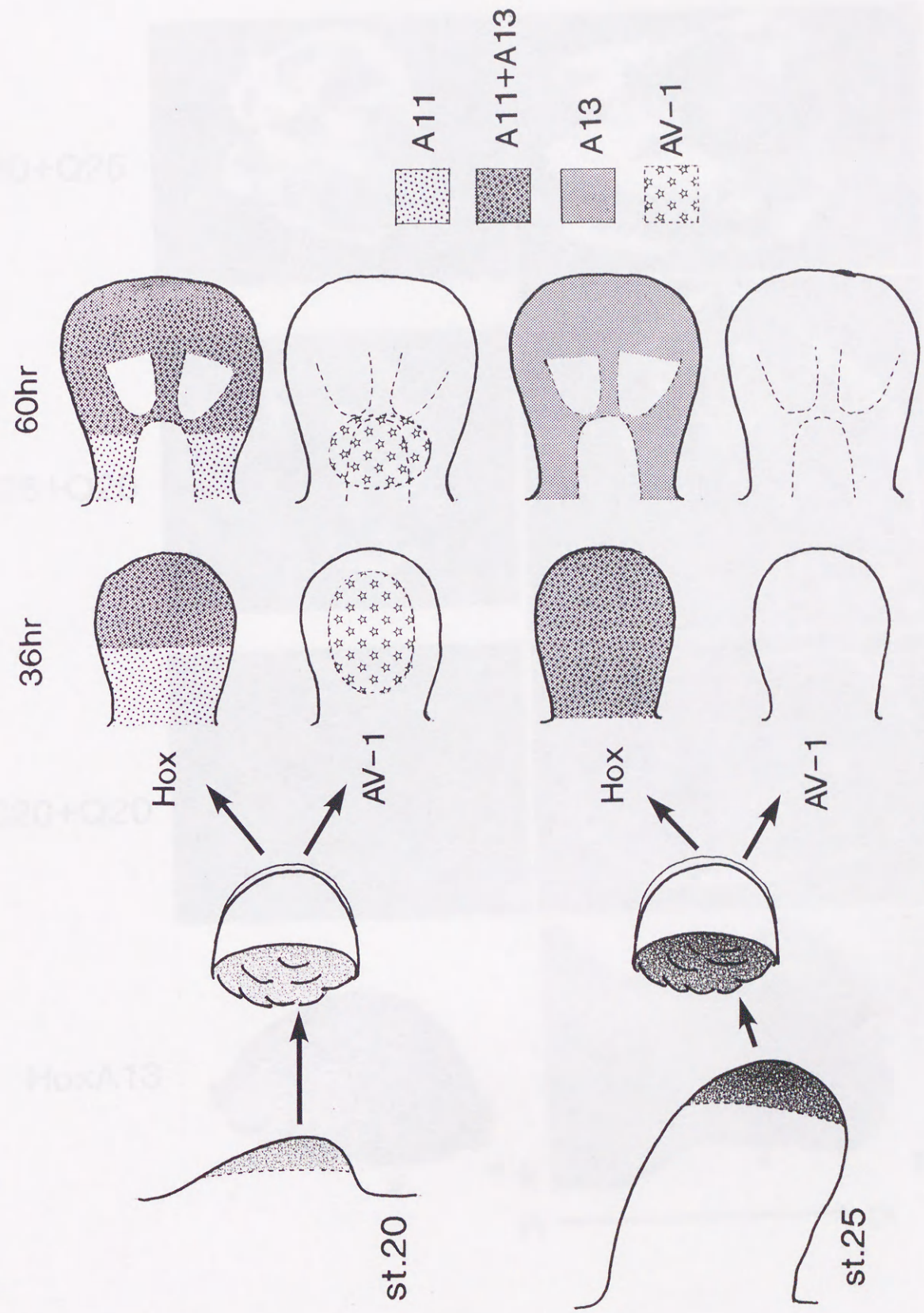




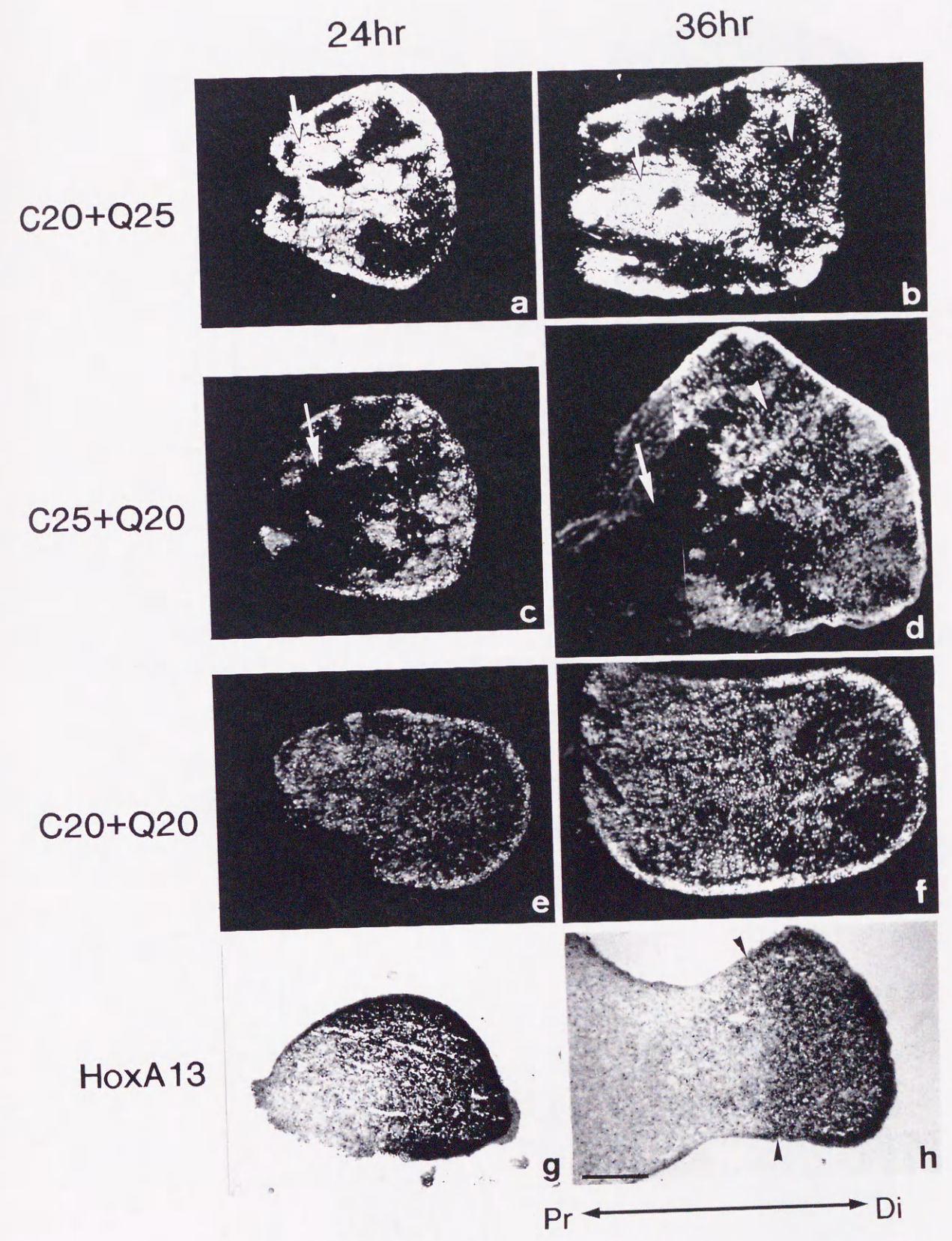














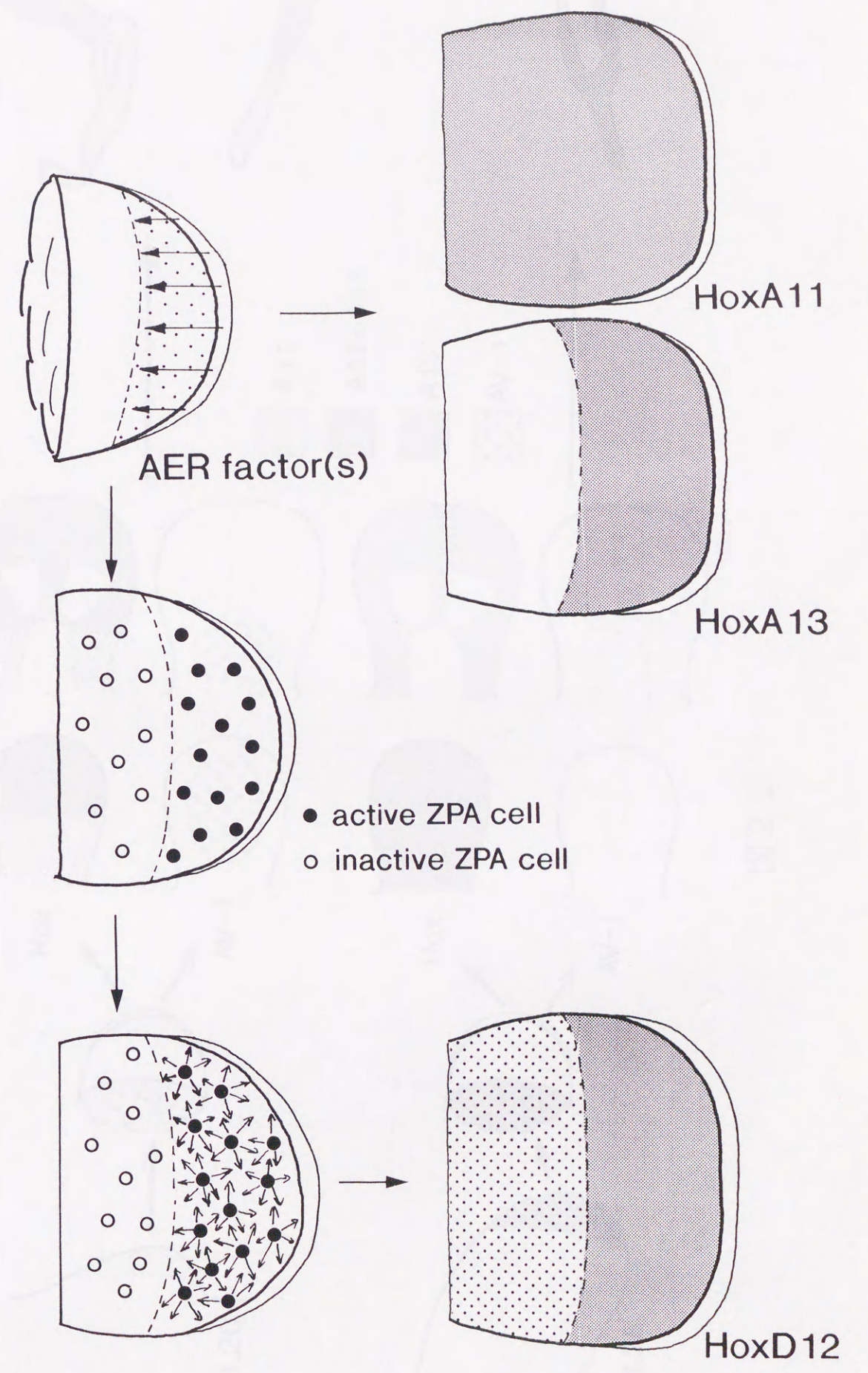
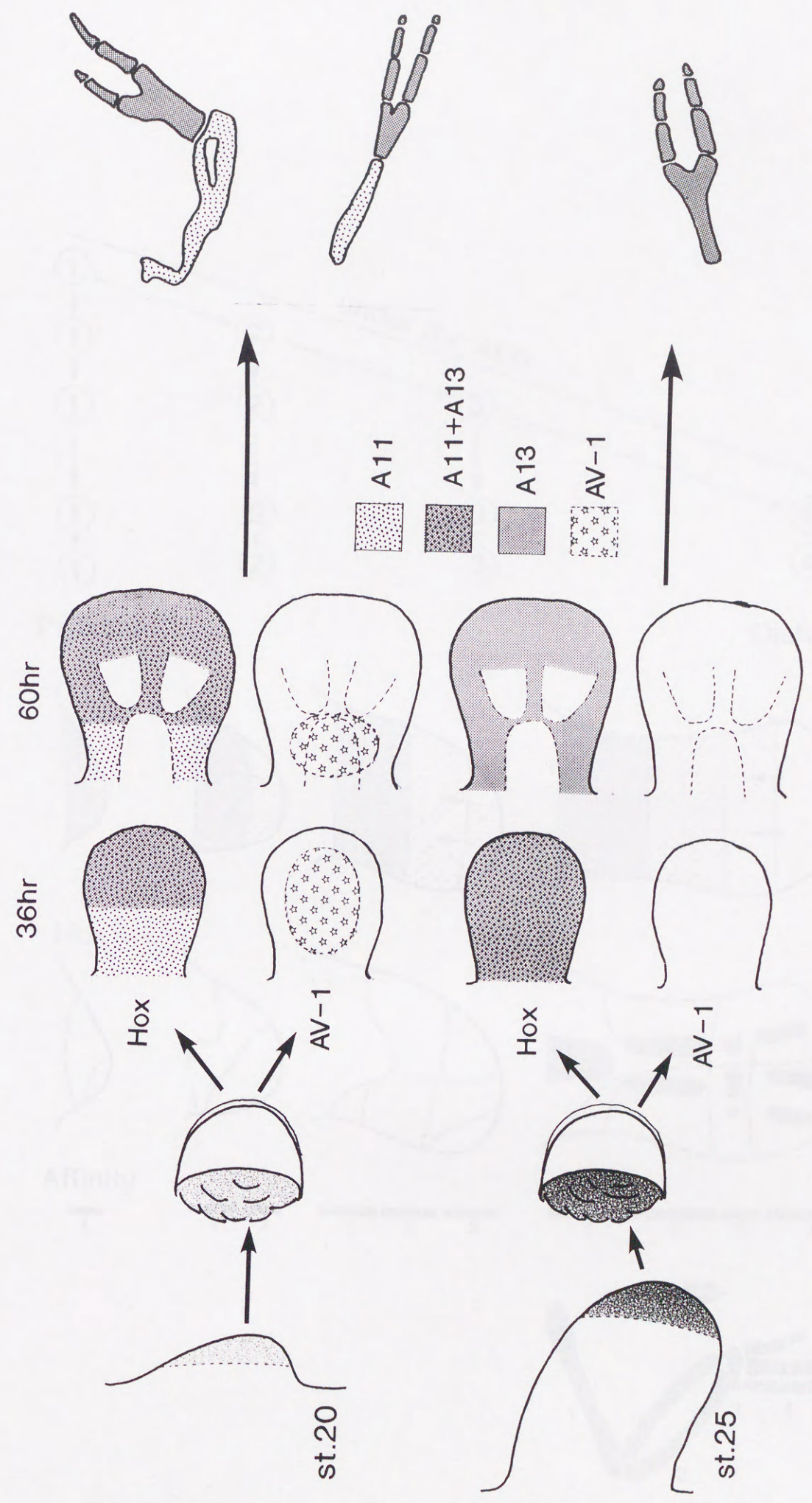
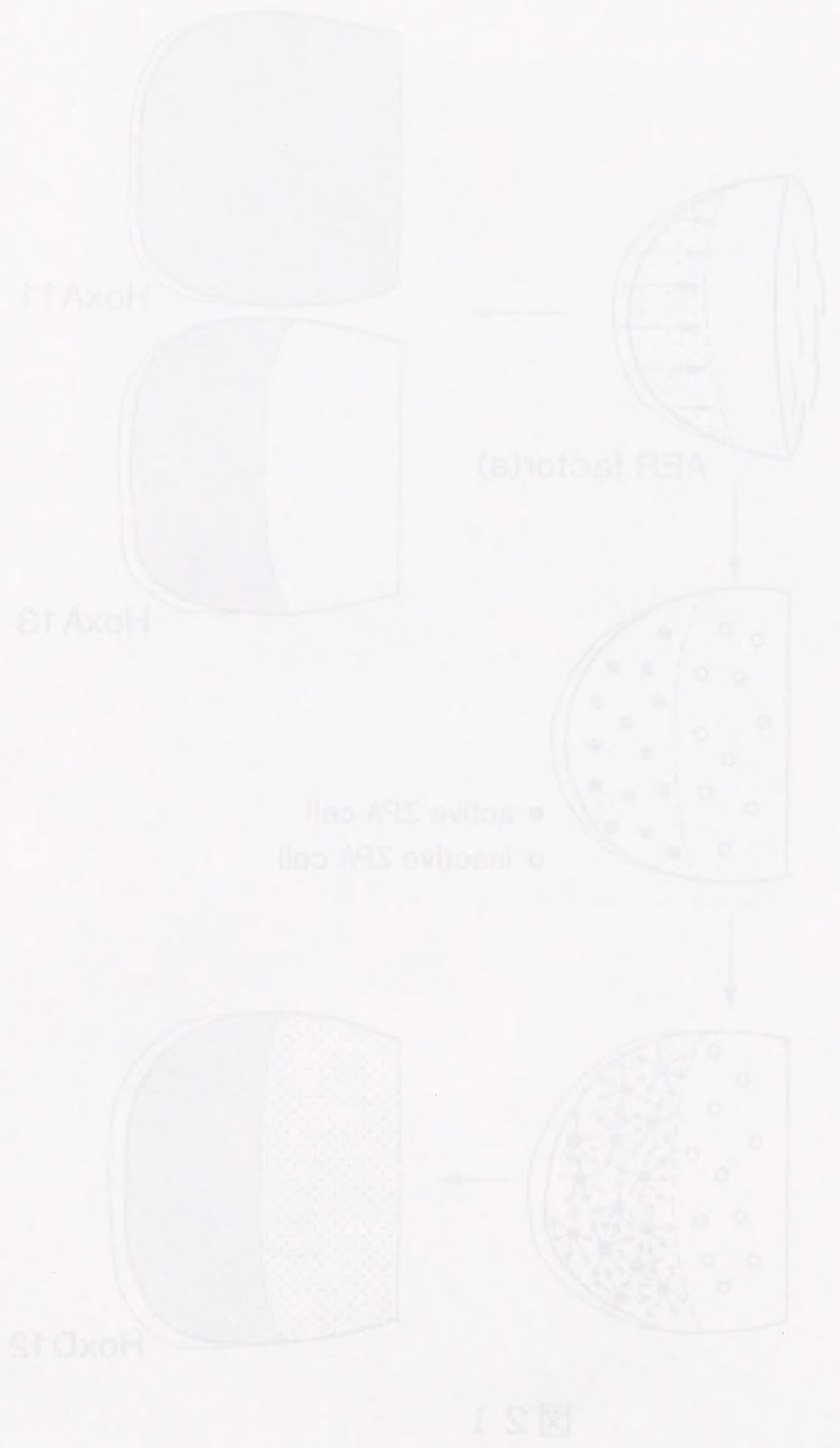


图 21













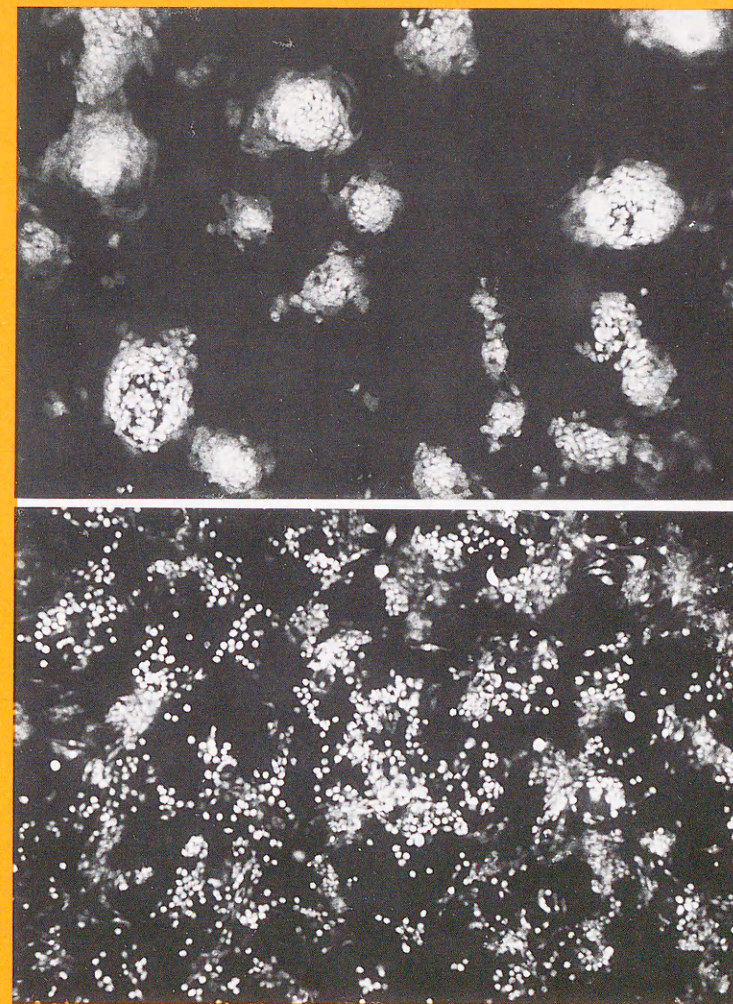


ISSN 0012-1592

# *Development*

## Growth & Differentiation

Volume 35, Number 4, August 1993



*Segregation between the progress zone cells at different stages*

---

Published by  
The Japanese Society of  
Developmental Biologists

Distributed by  
Business Center for  
Academic Societies Japan  
ACADEMIC PRESS, INC.



## Cell Sorting and Chondrogenic Aggregate Formation in Limb Bud Recombinants and in Culture

(cell sorting/cell aggregate/chick limb bud/proximal-distal axis/chondrogenesis)

Naoyuki Wada, Kohji Uchiyama\* and Hiroyuki Ide

Biological Institute, Tohoku University, Sendai, Japan

The cartilage pattern of the developing chick limb changes along the proximal-distal (PD) axis. It is assumed that these spatial changes are brought about by differences in the cellular properties of distal mesoderm, the progress zone (PZ). To examine whether these differences are actually maintained in the individual cells composing the PZ, we dissociated early (stage 20) and late (stage 25) PZ tissues into single cells, then mixed and recombined them with ectodermal jackets. The recombinants were grafted to limb bud stumps and allowed to develop into limb-like structures. Early PZ cells were distributed within whole cartilage elements along the PD axis of the limb-like structures, while cells from late PZ participated only in the formation of distal cartilage elements.

A difference in distribution pattern between the cells of early and late PZ in mixed culture was also observed. Cells of early PZ aggregated rapidly in patches and formed cartilage nodules, while the cells of late PZ distributed in regions surrounding these cell aggregates and gradually differentiated to cartilage cells. These results suggest that the cellular properties in the PZ concerning the rate of chondrogenic aggregate formation change during limb bud development, and that this change may relate to the cartilage pattern formation along the PD axis.

### Introduction

The progress zone (PZ) of the developing chick limb bud is the distal mesodermal region where limb cartilage pattern is specified along proximal-distal (PD) and anterior-posterior (AP) axes (15, 16). Cells in the PZ are in an undifferentiated state. After leaving the PZ, as a result of distal outgrowth of limb bud, the cells gradually differentiate to form cartilage or soft connective tissues. The pattern of cartilage elements changes along the PD axis of the limb.

Summerbell *et al.* (16) have proposed the concept of "positional value", which cells acquire depending on the length of time spent in the PZ, to interpret the observed changes in the cartilage pattern along PD axis. It was proposed that the cells spend a short time in the PZ and leave it early acquire the positional values for proximal cartilage elements, while those that spend a long time in the PZ acquire values for distal cartilage elements.

Recent studies have reported that several genes display position-specific expression in the PZ during limb bud development (eg. 2, 18), and these reports support the concept of positional

value. However the differences in proximo-distal values that exist in PZ at different developmental stages have not been reported. In the case of amphibian limb regeneration, Stocum and colleagues reported that the blastema tissue in the plane of amputation plane were specified along to the PD axis (14), and confirmed the possibility that this specification was induced by the changes in adhesiveness of blastema cells according to their position along PD axis (11). It is possible that a similar specification mechanism involving PZ cell behavior may be operating during limb development.

To elucidate differences in PZ cell behavior, we combined chick and quail PZ cells at different developmental stages with ectodermal jackets and grafted them as described by MacCabe *et al.* (10). We then examined the distribution of PZ cells in the limb-like structures formed. In addition, we studied *in vitro* behavior of PZ cells at different stages by examining distribution of cells in the aggregates that formed in mixed cultures.

### Materials and Methods

#### Preparation of cell suspension

Chick and quail eggs were incubated at 38°C and staged after Hamburger and Hamilton (6).

\* Present Address: YOSHIZATO Morphomatrix Project, ERA-TO, Research Development Corporation of Japan, Tsukuba, Japan



Wing and leg buds of embryos at stages 20 and 25 were used. Distal regions of limb buds (within 200  $\mu\text{m}$  of the AER at stage 20, and 250  $\mu\text{m}$  at stage 25) were excised and used for preparation of the cell suspensions. Ectoderms were removed after trypsinization and mesodermal tissues (PZ) were dissociated after Hattori and Ide (7).

#### Preparation of recombinants

For the recombinants, we used the method of MacCabe *et al.* (10) with a slight modification. Stage 20 and stage 25 PZ cells were suspended in culture medium, then centrifuged at  $100\times g$  for 10 minutes. The resulting pellets were incubated at 37°C for 1 hr to promote cell adhesion. For incubation of pellet, Ham's F12 (Nissui) supplemented with glucose (X3) and sodium bicarbonate (X2) and containing 25% fetal calf serum (FCS, GIBCO) and 5% chick embryo extract was used. Four types of cell mixtures were prepared: C20+Q20 (chick and quail PZ cells at stage 20) and C25+Q25 for controls, and C20+Q25 and C25+Q20 for the experimental recombinants.

Ectodermal jackets were prepared as follows: Whole limb buds at stages 22–23 were excised and incubated in 0.5% trypsin at 4°C for 3 hr, and then ectodermal jackets were mechanically isolated in Tyrode's solution containing 10% FCS. The mesodermal pellet was transferred to this solution and dissected into small fragments. These fragments were packed into the ectodermal jackets and kept at room temperature for 2 hr in the incubation medium to enable tissue-to-tissue binding.

The hosts were chick or quail embryos at stages 21–23. Forelimb buds were cut off at the base and the recombinants were grafted with a tungsten pin in the anterior region of the cut surface to minimize the effects of the host ZPA (zone of polarizing activity). Grafted embryos were incubated for 5 days at 37°C.

#### Cell culture

For culturing cells, we used the method of Hattori and Ide (7) with a slight modification. Briefly, a small stainless-steel column (6 mm inside diameter) was attached using silicon grease into each well of plastic culture dishes or plates (Falcon 3002 or 3047), and 0.3 ml of single cell suspension ( $6.7\times 10^5$  cells/ml) was poured into each column. As culture medium, Ham's F-12 containing 1% FCS was used. After 4 hr of incubation, culture medium was added into each well, the column was removed, and the cultures were maintained at 37°C

in 5% CO<sub>2</sub> for 4 days.

#### Immunohistochemistry

After incubation for 5 days, embryos were dissected out and the limb-like structures that developed from the recombinants were excised, washed in 0.01 M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4), fixed in 2% paraformaldehyde in PBS for 2 hr at 4°C, embedded in O.C.T. compound (Miles). Frozen sections were stained with A223, a chick specific mouse monoclonal antibody, for 30 min, and then stained FITC-labeled F(ab')<sub>2</sub> fragments of sheep anti-mouse IgG (Tago) at room temperature for 1 hr. Detailed characterization of this antibody will be described elsewhere (Uchiyama and Ide, submitted). The sections were rinsed with PBS, stained with propidium iodide (PI) for 5 min and mounted. Cultured cells were fixed and stained similarly.

To quantitatively analyze the distribution of chick cells in the chimeric structures and in cell cultures, we counted the number of chick cells (A223-positive) and total cells (PI-positive) using fluorescence microscopy, and calculated the ratio of chick cells to total cells.

#### Alcian blue staining

After the immunohistochemical observations, the cultures were fixed in 10% formalin and stained with alcian blue at pH 1.0 to estimate chondrogenic activity.

#### Results

##### Distribution of quail PZ cells in the limb-like structures

First of all, the specificity of binding of the A223 antibody was examined. All cells of the chick limb bud immunostained intensely with the antibody (Fig. 1a, b), while those of quail limb bud were unstained (Fig. 1c, d). In order to clearly demonstrate the extent of graft-derived region in the limb-like structures, we grafted the recombinants composed of quail PZ cells and chick ectodermal jackets to host chick limb bud stumps, and examined the distribution of quail cells in the limb-like structures that developed. All of the cartilage elements and most of soft tissues in the limb-like structures were found to be of quail origin (Fig. 2). The tungsten pins used for grafting were always found at the boundary between the graft and host tissues, although muscles and blood vessels from the stump were found in the limb-like structure, as in normal limb development. Thus,

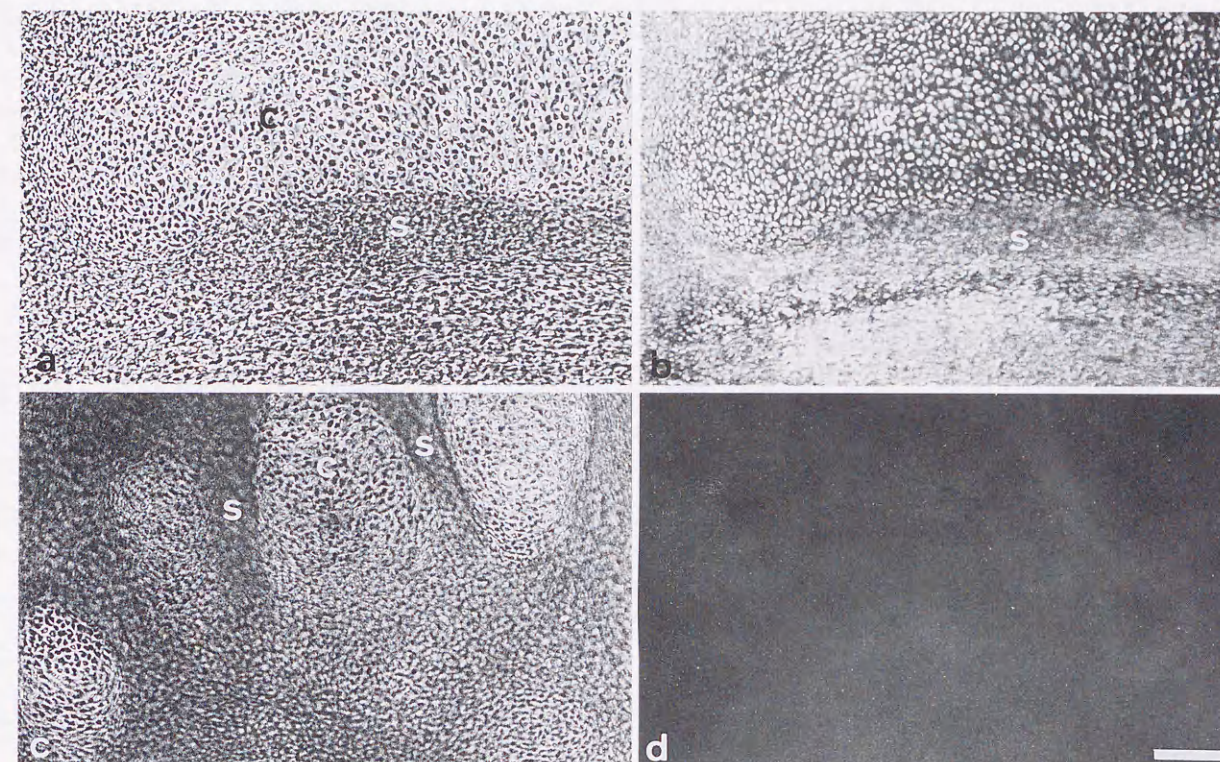


Fig. 1 Specificity of A223 antibody binding to wing tissues of 8 day chick and quail embryos. a, Phase contrast image of chick cartilage (c) and soft tissue (s) regions. b, A223 immunostaining. All of the cells in the cartilage and surrounding soft tissues were stained. c, Phase-contrast image of quail cartilage (c) and soft tissue (s) regions. d, A223 immunostaining. No cells were stained. Bar=100  $\mu\text{m}$ .

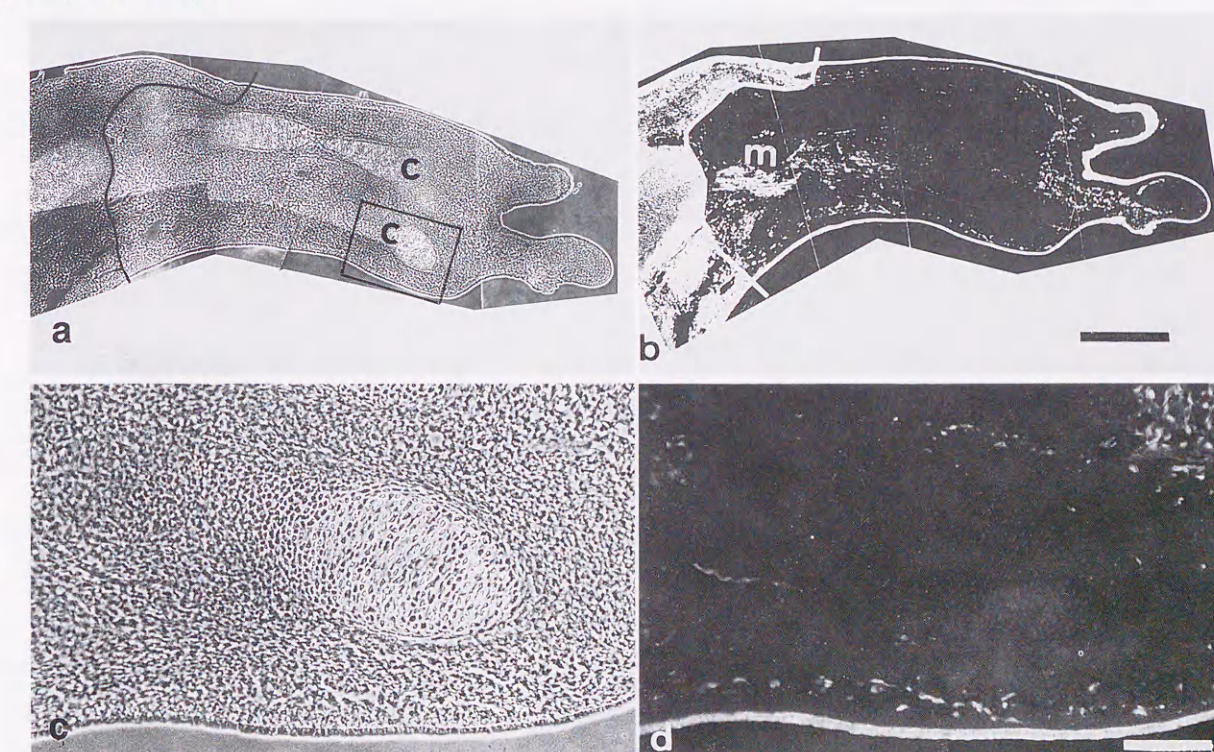


Fig. 2 Horizontal section of a limb-like structure that developed from a recombinant with quail PZ cells and chick ectoderm. a, Phase-contrast. b, A223 immunostaining. Grafted ectoderm and stump tissues were stained. Black (a) and white (b) lines represent boundary between host and graft tissues. (c) cartilage; (m) muscle. Bar=500  $\mu\text{m}$ . c, High power image of the area enclosed by rectangle in a. d, A223 immunostaining of the same area as c. No stained cells were observed in the graft mesoderm tissues except in epidermis, muscle and blood vessels. Bar=100  $\mu\text{m}$ .



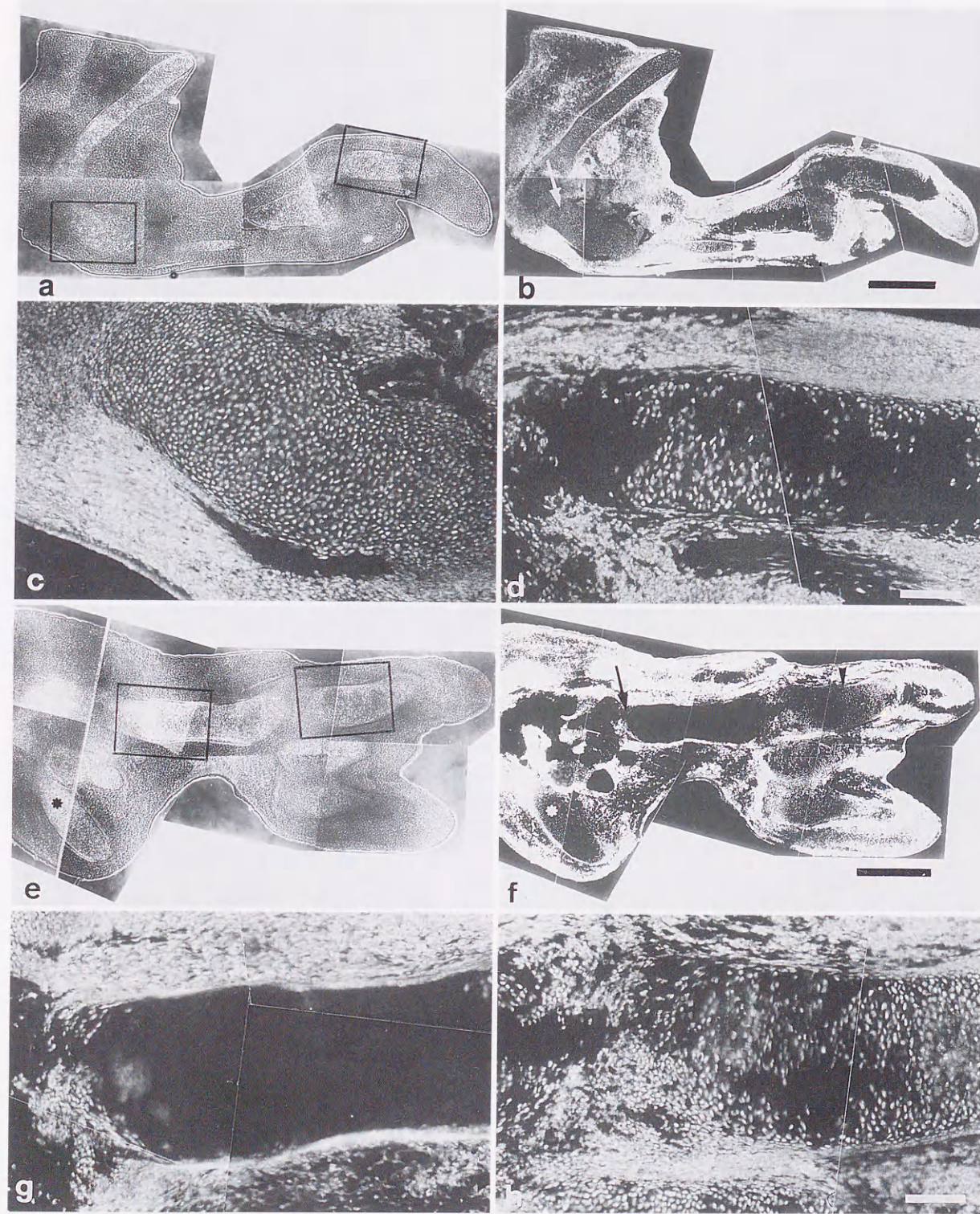
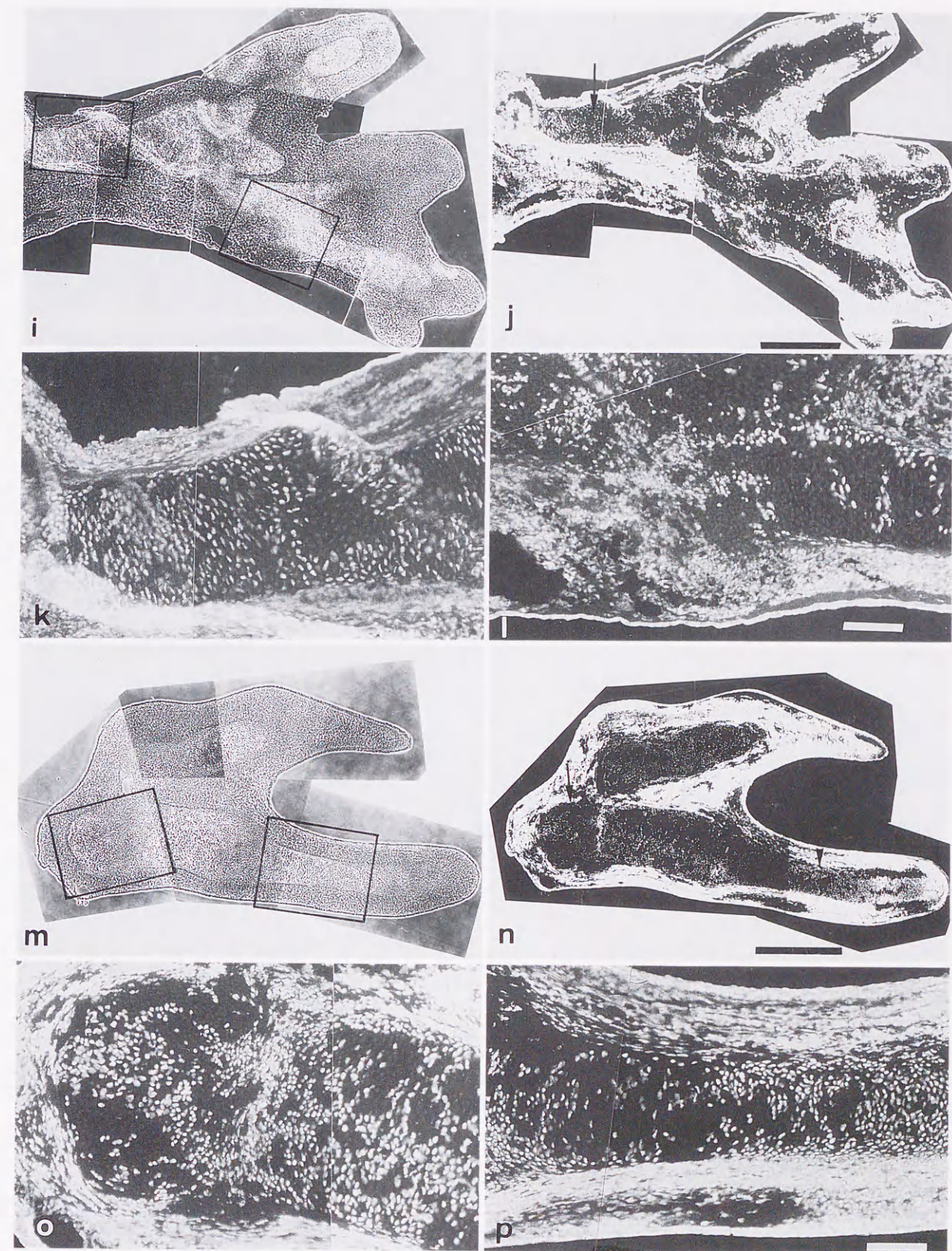
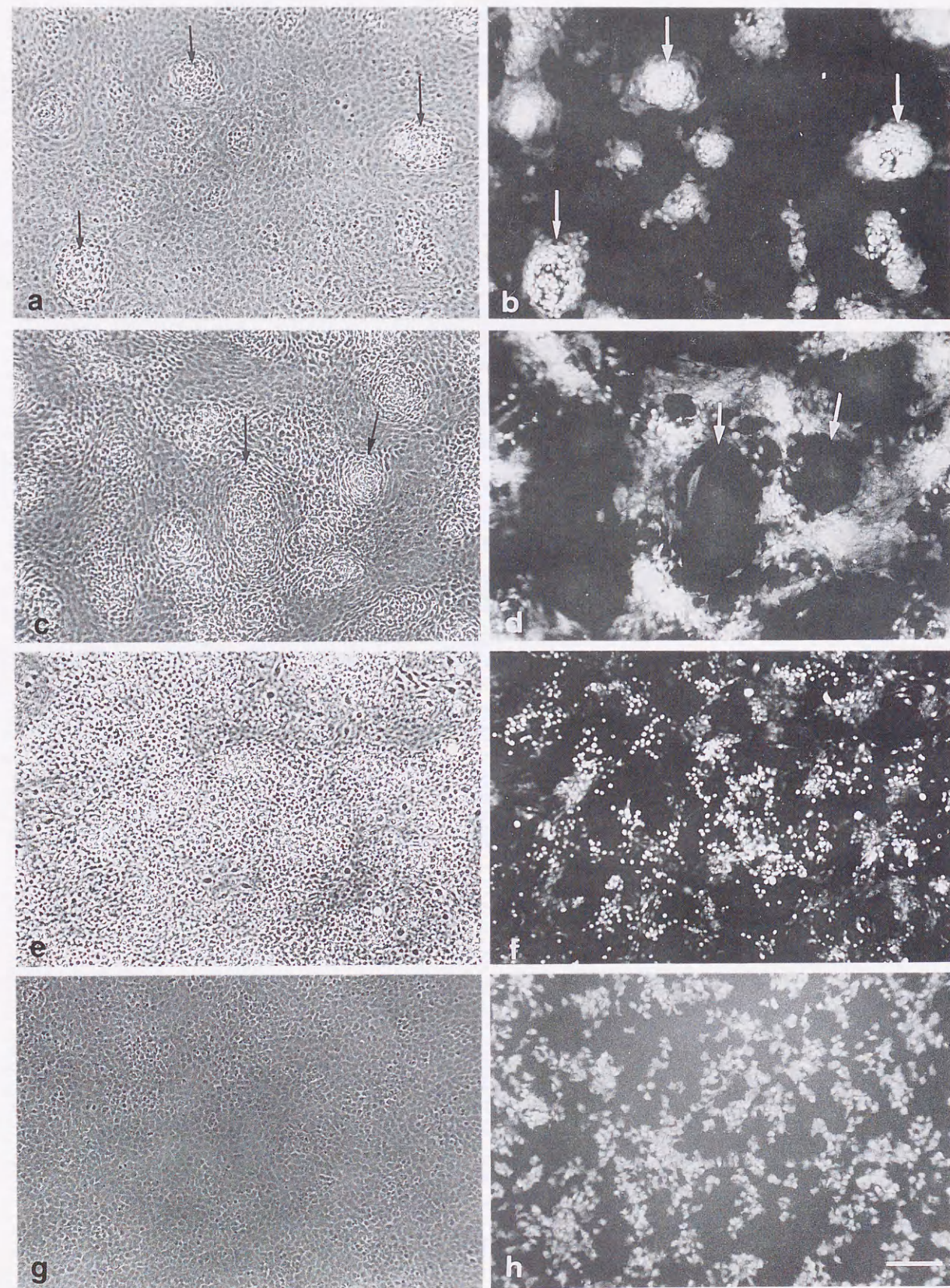


Fig. 3 Horizontal sections of limb-like structures that developed from recombinants with mixed PZ cells. a, e, i, m. Phase contrast. b, f, j, n. A223 staining image. Bar=500  $\mu$ m. Arrows and arrow heads indicate proximal and distal cartilage tissues, respectively, of recombinant-origin. c, d, g, h, k, l, o, p. High power A223 staining images of the area enclosed by rectangles in a, e, i, m. Bar=100  $\mu$ m. a-d. Recombinant containing a mixture of stage 20 chick and stage 25 quail cells. Proximal cartilage tissues (arrows) were composed of chick cells (c), although distal cartilage tissues (arrowhead) were composed of both stained chick cell areas and unstained quail cell areas. e-h. Recombinant with a mixture of stage 25 chick and stage 20 quail cells. Proximal cartilage tissues (arrows) were composed of quail cells (g), although distal cartilage tissues (arrowhead) were composed of both the stained



chick cell areas and unstained quail cell areas (h). Asterisk indicates cartilage of host-origin. i-l. Recombinant with stage 20 chick and stage 20 quail cells. All of the cartilage tissues were composed of both chick and quail cells with relatively even distribution (k, l). m-p. Recombinant with stage 25 chick and stage 25 quail cells. All of the cartilage tissues were composed of both chick and quail cells with relatively even distribution (o, p).





when the limb-like structures that developed from the recombinants with mixed PZ cells were examined, all of the cartilage elements located distal to the tungsten pin were considered to be of recombinant origin.

#### *Distribution of early and late PZ cells in chimera limb-like structures*

Mixtures of early (stage 20) and late (stage 25) PZ cells, either of which was of quail-origin, were used for the recombinants (C20+Q25 and C25+Q20, 10 recombinants each), and the chimeric limb-like structures that developed were examined immunohistochemically with the A223 antibody. Cells from late PZ were found only in the distal cartilage elements of the limb-like structures, while those from early PZ were found within elements along PD axis (Fig. 3a-h). Some of the limb-like structures contained a small number of late PZ cells in proximal regions but these cells were always observed as small patches surrounded by the cells from early PZs. On the other hand, a uniform distribution of quail and chick cells was observed in the cartilage elements of control recombinants consisting PZ cells from the same stages (ie. C20+Q20 and C25+Q25, six recombinants each) (Fig. 3i-p). The recombinants C20+Q20 formed relatively large limb-like structures and chick cells distributed evenly in both distal and proximal cartilage elements (Fig. 3i-l). The recombinants C25+Q25 formed relatively small and poor limb-like structures presumably corresponding to distal elements and chick cells distributed evenly in the cartilage elements (Fig. 3m-p).

The ratios of chick cells to total cells in the proximal and distal cartilage elements of limb-like

Table 1. Percentage of chick cells in the proximal or distal cartilages of limb-like structures

| mixture pattern   | proximal <sup>a</sup> | distal <sup>b</sup> |
|-------------------|-----------------------|---------------------|
| chick 20+quail 25 | 91.0 ± 1.5            | 62.0 ± 11.8         |
| chick 25+quail 20 | 13.9 ± 4.2            | 63.9 ± 8.8          |
| chick 20+quail 20 | 44.4 ± 7.8            | 38.5 ± 8.3          |
| chick 25+quail 25 | 57.0 ± 15.6           | 52.0 ± 13.4         |

<sup>a</sup> Proximal area of the graft is defined as the region within 500  $\mu$ m distal to the boundary between host and graft tissue inferred by the tungsten pin.

<sup>b</sup> Distal area is defined as the region within 500  $\mu$ m of the distal tip of the limb like structure.

structures are shown in Table 1. Each value shown is the average of three recombinant experiments. When the cells of young chick and late quail PZ cells were mixed, chick cells made up about 90% of the total cells in the proximal cartilage elements, although both types of cells were distributed rather uniformly within the distal cartilage elements. Similar results were obtained when the cells of early quail PZs and late chick PZs were mixed. In control recombinants, however, about half of the cells in both proximal and distal cartilage elements of the limb-like structures were of chick origin.

From these results, we conclude that cells of early PZ are able to form both proximal and distal cartilage elements, but those of late PZ form only distal cartilage elements in the recombinants. Non-cartilage elements, however, were occupied by cells from both early and late PZs, and no obvious differences in the distribution patterns were observed.

#### *Distribution of PZ cells from different stages in mixed cultures*

When the cells of stage 20 and stage 25 PZs were mixed and cultured for 4 days, the stage 20 cells formed aggregates which later differentiated into cartilage nodules, whereas the stage 25 cells were distributed in the spaces between these aggregates (Fig. 4a-d, Table 2). Each value in Table 2 represents the average of three culture experiments. In mixtures of C20+Q25 cells, as shown in Fig. 4a and b, the stage 20 cells (FITC-labeled cells) aggregated to form nodules in which few stage 25 (unlabeled) cells were found. Similar results were observed with C25+Q20 mixtures (Fig. 4c and d), in which labeled stage 25 cells were distributed around the aggregates of unlabeled stage 20 cells. The ratio of cells from stage 20 PZs to those from stage 25 PZs was high in the aggregates and low in the non-aggregated regions (Table 2).

In control cultures with mixtures of PZ cells from the same stages, no such segregation was observed. The mixed cultures with stage 20 PZ cells showed homogeneous chondrogenic differentiation (Fig. 4e, f) as reported previously (1, 8). Those with stage 25 PZ cells showed a uniform pavement of polygonal cells and a delay in chon-

Fig. 4 Mixed cultures of chick and quail cells from PZs at the same or different stages. a, b. Mixture of stage 20 chick and stage 25 quail cells. c, d. Mixture of stage 25 chick and stage 20 quail cells. e, f. Mixture of stage 20 chick and stage 20 quail cells. g, h. Mixture of stage 25 chick and stage 25 quail cells. a, c, e, g. Phase contrast. b, d, f, h. A223 staining. Arrows indicate cartilage nodules. Bar=100  $\mu$ m.



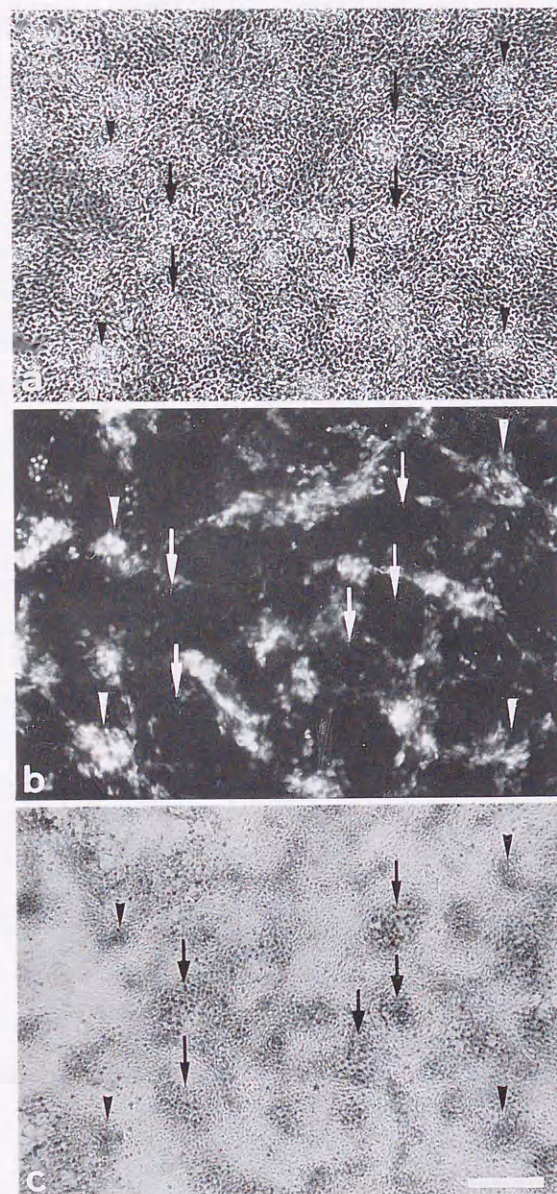


Fig. 5 Chondrogenesis in mixed culture. Stage 20 quail and stage 25 chick PZ cells were mixed and cultured for 5 days. (a) phase contrast. (b) staining with A223 antibody. (c) alcian blue staining. Arrows indicate nodules of quail origin and arrow heads show nodules of chick origin. Bar = 100  $\mu$ m.

Table 2. Percentage of chick cells in various areas of the mixed cultures

| mixture           | percentage of chick cells   |                    |
|-------------------|-----------------------------|--------------------|
|                   | Aggregate Area              | Non-aggregate Area |
| chick 20+quail 25 | 78.0 $\pm$ 6.2              | 10.3 $\pm$ 4.4     |
| chick 25+quail 20 | 12.1 $\pm$ 8.1              | 59.5 $\pm$ 3.6     |
| chick 20+quail 20 | 55.0 $\pm$ 6.4 <sup>a</sup> |                    |
| chick 25+quail 25 | 44.8 $\pm$ 8.2              |                    |

<sup>a</sup> In control cultures (lower two), areas were randomly selected.

drogenesis (Fig. 4g, h). Labeled and unlabeled cells were dispersed evenly throughout the culture areas. Thus, the segregation observed in experimental recombinants seems to be caused difference in the behaviour of cells at different developmental stages, rather than by differences between cells from different species.

Both the stage 20 and 25 PZ cells differentiated to form alcian blue-positive cartilage nodules (Fig. 5). In the mix cultures of stage 20 quail and stage 25 chick PZ cells, stage 20 cells formed large nodules of round shape. Stage 25 cells formed somewhat small nodules among the nodules of stage 20 PZ origin.

### Discussion

#### *Positional values and chondrogenic activity in the progress zone*

In the chick limb bud, the PZ extending towards from AER for about 400  $\mu$ m remains apparently undifferentiated up to stage 28 or so (16). The cells of the PZ show relatively consistent differentiative activity *in vitro* (1). When the cells of PZ (within 350  $\mu$ m of AER) at stage 21–24 were grown in micromass culture, they showed entirely chondrogenic differentiation. The cells within 100  $\mu$ m of AER at stage 19–20 were also entirely chondrogenic and the cells of PZ at stage 25–27 were also chondrogenic, although not entirely, and formed patchy distribution of cartilage nodules (1).

However, the cells in the PZ are considered to change their positional values along the proximo-distal axis in sequence (16). Thus, the cells in the PZ may change some intrinsic properties during limb development. In the present study, we have examined the rate of prechondrogenic aggregate formation *in vivo* and *in vitro* as a candidate for the intrinsic property.

#### *Distribution of PZ cells at different stages in the chimeric limb-like structures*

Chimera analysis of the limb-like structures that developed from recombinants with stage 20 and stage 25 PZ cells revealed that the stage 20 cells were distributed in cartilage elements along the PD extent of the limb, while stage 25 cells were found only in distal cartilage elements. This pattern of distribution suggests that stage 20 and stage 25 PZ cells behave independently in the chimeric recombinants and that stage 25 cells can form only distal cartilage elements, although stage 20 cells can participate in the formation of both

proximal and distal cartilage elements. Similar results on cell behavior have been reported for the cells of blastema of regenerating amphibian limbs (14), where it appears that blastema cell retain their original positional values along PD axis and behave according to these values when grafted to different positions.

The non-uniform distribution of stage 25 PZ cells, however, was found only in the cartilage elements and not in the soft tissues, where stage 25 PZ cells were also found in proximal regions. The difference in distribution pattern of cells between the cartilage and soft tissues may be explained by two ways. First, although only stage 20 PZ cells may form proximal soft tissues, a non-uniform distribution of PZ cells in the recombinant soft tissues may be masked by the migration of myogenic and vascular cells from the host into recombinant soft tissues. Second, sorting out between cells may occur only in chondrogenic region, and stage 20 PZ cells may be highly chondrogenic and may preferentially aggregate to form proximal cartilage elements. Since less than 10 percent of cells in the limb bud normally differentiate to form chondrocyte *in vivo* (9), a relatively small number of stage 20 PZ cells may contribute cartilage formation. Other stage 20 PZ cells and all of the stage 25 PZ cells may remain in peripheral proximal regions and distal regions of the recombinants. Thus, cells from both stage 20 and 25 PZs may distribute in the peripheral soft tissue regions.

Alternatively, it may be that sorting out occurs between prechondrocytes at different stages of chondrogenesis, and that the prechondrocytes from stage 20 PZs sort out from those of stage 25 PZs.

Different capacities for cartilage pattern formation in PZ cells at different developmental stages have been suggested by the AER-excision experiment on chick wing buds (17) and leg buds (13) and by experiments in which chick PZ tissues at various stages were grafted to host sites (17). These experiments show that stage 20 PZ cells possess the capacity to form both the zeugopod and autopod, while stage 25 PZ cells possess the capacity to form only distal autopod elements (metacarpus/metatarsus and phalanges). Temporal changes in PZ tissues which give rise to changes in the cartilage pattern along PD axis in normal limb development seem to be reflected in differences in cartilage formation in recombinants composed of stage 20 and stage 25 PZ cells. From these results, we conclude that some system

for sorting out cells may be operating in the developing recombinants. That is, stage 20 PZ cells may aggregate more rapidly than stage 25 cells, and thus preferentially differentiate to form cartilage elements cells in proximal regions.

#### *Distribution of PZ cells from different stages in mixed cultures*

The idea that sorting out occurs between PZ cells was supported by the results of the mixed culture experiment in which stage 20 PZ cells aggregated more rapidly when compared to stage 25 PZ cells. Thus, we inferred that the surface of PZ cells change in normal limb development and the rate of chondrogenic aggregate formation of PZ cells decreases gradually as development proceeds.

Summerbell *et al.* (16) proposed that PZ cells acquire different positional value along the PD axis depending on the length of time they are under the influence of AER, and that cartilage pattern is determined according to these values. This suggests that changes in cell properties occur depending on the duration of time spent near the AER, but the nature of these properties remains uncertain. Our results indicate that early and late PZ cells differ in aggregate-forming ability. These differences may be reflected in patterns of cartilage elements along PD axis. In the case of the blastema of regenerating amphibian limbs, a relationship between PD level of the blastema and adhesive properties of the blastema cells has been reported (11). When proximal and distal blastema tissues were mixed and co-cultured in a hanging drop, more distal cells were more cohesive. These results suggest that some differences exist in the surface properties of distal and proximal blastema cells, but does not seem to be consistent with the results of this study. The behavior of tissues *in vitro*, however, may be different from that of cells *in vivo*.

Sorting out of limb bud cells in culture was reported from the experiments using a mixture of chondrogenic and non-chondrogenic cells (1). In this case, chondrogenic cells sorted out from non-chondrogenic cells and aggregated to form cartilage nodules. Our results may reflect such a process, although both the stage 20 and stage 25 PZ cells used in our study retain chondrogenic activity *in vitro* (Fig. 5).

#### *The relationship between cell aggregation and cartilage pattern formation*

As shown in this study, the rapidly aggregating



cells of early PZs with rapid aggregate-forming ability can form cartilage elements along the PD axis of the limb, while the slowly aggregating cells of later PZs with slow ability can form only distal elements. The relationship between the cartilage pattern specified in the PZ and aggregate-forming ability of PZ cells suggests that early PZ cells may aggregate in the core region of the limb bud to form one or two cell clusters, which finally form one or two cartilage elements in the proximal region. Non-aggregated early PZ cells continue to proliferate under the influence of the AER. Cells of later PZs may aggregate non-uniformly to form many small cartilage structures, mainly digits, since they show slow aggregate-forming activity.

Similar results on aggregate-forming capability were reported from the comparison of cell adhesiveness and motility between normal and *talpid<sup>3</sup>* mutant limb bud (4, 5), in which it is concluded that the *talpid<sup>3</sup>* cells are more adhesive and less motile compared to normal cells. Considering these results, it is likely that cell adhesiveness and motility, which are the factors controlling aggregate-forming capability, may change in the PZ cells and determine cartilage pattern of limb bud. We are now investigating adhesiveness and motility of early and late PZ cells.

To date no stage-specific expression of surface molecules which relate to cell adhesion and motility, e.g. CAMs, proteoglycans, in chick limb buds has been observed. However, it was recently reported that a homeobox containing gene cluster, Chox-1 complex, was expressed sequentially along PD axis according to the chick limb bud development (18), suggesting that some molecules which regulate cell adhesiveness and motility may be expressed according to the expression of the Chox-1 complex in the limb bud. On the other hand, we have already reported a cell surface protein, AV-1, which shows a temporal and spatial expression pattern in the chick limb bud, especially in the PZ of early limb development (12). The relationship between the expression of these molecules and cell behavior is uncertain, but the behavior of PZ cells may change by the effects of these molecules to form cartilage pattern along PD axis.

**Acknowledgements:** The authors thank Prof. Susan V. Bryant and Dr. Terry Hayamizu for their invaluable advice in preparing the manuscript. Supported by Grant-in-Aid from the Ministry of Education, Science, and Culture to H.I.

## References

1. Cottrill, C. P., C. W. Archer and L. Wolpert, 1987. Cell sorting and chondrogenic aggregate formation in micromass culture. *Develop. Biol.*, **122**, 503-515.
2. Dolle, P., J.-C. Izpisua-Belmonte, H. Falkenstein, A. Renucci and D. Duboule, 1989. Coordinate expression of the murine *Hox-5* complex homeobox-containing genes during limb pattern formation. *Nature*, **342**, 767-772.
3. Ede, D. A., 1983. Cellular condensations and chondrogenesis. *In* Cartilage vol. 2 (Ed. B. K. Hall), pp 143-186. Academic Press, New York.
4. Ede, D. A. and G. S. Agerbak, 1968. Cell adhesion and movement in relation to the developing limb pattern in normal and *talpid<sup>3</sup>* mutant chick embryos. *J. Embryol. exp. Morph.*, **20**, 81-100.
5. Ede, D. A. and O. P. Flint, 1975. Cell movement and adhesion in the developing chick wing bud: Studies on cultured mesenchyme cells from normal and *talpid<sup>3</sup>* mutant embryos. *J. Cell Sci.*, **18**, 301-313.
6. Hamburger, V. and H. Hamilton, 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph.*, **88**, 49-92.
7. Hattori, T. and H. Ide, 1984. Limb bud chondrogenesis in cell culture, with particular reference to serum concentration in the culture medium. *Exp. Cell Res.*, **150**, 338-446.
8. Ide, H. and H. Aono, 1988. Retinoic acid promotes proliferation and chondrogenesis in the distal mesodermal cells of chick limb bud. *Develop. Biol.*, **130**, 767-773.
9. Lewis, J., 1977. Growth and determination in the developing limb. *In* Vertebrate limb and somite morphogenesis (Eds. Ede, D. A., J. R. Hinchliffe and M. Balls), pp 215-228. Cambridge University Press.
10. MacCabe, J. A., J. W. Saunders, Jr. and M. Pickett, 1973. The control of the anteroposterior and dorsoventral axes in embryonic chick limbs constructed of dissociated and reaggregated limb-bud mesoderm. *Develop. Biol.*, **31**, 323-335.
11. Nardi, J. B. and D. L. Stocum, 1983. Surface properties of regenerating limb cells: Evidence for gradation along the proximodistal axis. *Differentiation*, **25**, 27-31.
12. Ohsugi, K., H. Ide and T. Momoi, 1988. Temporal and spatial expression of a position specific antigen, AV-1, in chick limb buds. *Develop. Biol.*, **130**, 454-463.
13. Rowe, D. A. and J. F. Fallon, 1982. The proximo-distal determination of the skeletal parts in the developing chick leg. *J. Embryol. exp. Morph.*, **68**, 1-7.
14. Stocum, D. L. and K. Crawford, 1987. Use of retinoids to analyze the cellular basis of positional memory in regenerating amphibian limbs. *Biochem. Cell Biol.*, **65**, 750-761.
15. Summerbell, D., 1974. A quantitative analysis of the effect of cell excision of the AER from the chick limb-bud. *J. Embryol. exp. Morphol.*, **32**, 651-660.
16. Summerbell, D., J. H. Lewis and L. Wolpert, 1973. Positional information in chick limb morphogenesis. *Nature (London)*, **244**, 492-496.
17. Summerbell, D. and J. H. Lewis, 1975. Time, place and positional value in the chick limb-bud. *J. Embryol. exp. Morphol.*, **33**, 621-643.
18. Yokouchi, Y., H. Sasaki and A. Kuroiwa, 1991. Homeobox gene expression correlated with the bifurcation process of limb cartilage development. *Nature (London)* **353**, 443-445.

(Received October 23, 1992; accepted May 20, 1993)



