

氏名・(本籍)	はっ とり とく じ 服 部 徳 治
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理第 833 号
学位授与年月日	昭和 61 年 3 月 11 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
最終学歴	昭和 52 年 3 月 東北大学大学院理学研究科 (前期 2 年の課程) 生物学専攻修了
学位論文題目	鶏胚肢芽細胞の軟骨分化に関する研究
論文審査委員	(主査) 教 授 竹 内 拓 司 教 授 小 西 和 彦 助 教 授 井 出 宏 之

論 文 目 次

第 1 章	序 論
第 2 章	軟骨分化に対する培養液中の血清濃度の影響
第 3 章	軟骨分化に対するジブチリルサイクリック AMP の影響について
第 4 章	軟骨分化と増殖速度との関係について
第 5 章	細胞増殖因子と肢芽のパターン形成について
第 6 章	総合論議
第 7 章	要 約
	謝 辞
	引用文献
	図の説明
	図 表

論文内容要旨

第1章 序 論

未分化な細胞がいかなる外部のシグナルによって形質を発現するか、これは発生学における重要な課題である。この課題に対し、組織培養は有力な研究手段であり、これまでも用いられてきている。

本研究で用いた鶏胚肢芽中胚葉は、比較的培養がしやすく、しかも *in vivo* における分化の過程の記載や細胞系統についての研究も十分になされているので、組織培養によって分化機構の解析を行なう材料としては好適といえる。

本論文の目的の第1は、培養条件を改良し、これまで不可能であった低密度の細胞培養で軟骨分化をひき起こす条件を見出すことにある。第2は、この培養条件を用いて軟骨分化機構の解析を行なうことにある。後者については、主に細胞集塊形成過程における細胞の形態的な変化、軟骨分化における細胞内のサイクリック AMP レベル及び細胞の増殖速度との関係に注目した。第3は、肢芽前縁部に細胞増殖因子を局所投与し、軟骨のパターン形成に対する影響について調べた。

以上の実験から、肢芽細胞の軟骨分化機構についての概要を把握することができたので、その結果について述べる。

第2章 軟骨分化に対する培養液中の血清濃度の影響

1) 血清濃度の軟骨分化に対する影響

細胞を低密度に播種し異なる血清濃度の培地で培養した結果、血清濃度が低い程軟骨分化の頻度が高くなった。

2) 血清濃度の細胞の形態に対する影響

異なる血清濃度の培地で培養し、細胞の形態を比較すると、血清濃度が低いと星状の形態となるが、高いと繊維芽細胞様の形態となった。

3) 軟骨分化に対する細胞密度と血清濃度の影響

播種する細胞の密度と培地中の血清濃度を変えて培養した結果、軟骨分化の頻度は、細胞密度が高かつ血清濃度が低い程大きくなった。

4) 軟骨分化の速度と血清濃度の関係

培地中の血清濃度が変わっても軟骨分化の進行速度に差は見られなかった。

5) 軟骨分化能の維持と血清濃度の関係

高濃度血清を含む培地で培養すると軟骨分化能の低下が起こることが、高密度細胞培養法、旋回培養法、低血清濃度培養法によって確かめられた。

6) 軟骨分化能の低下と細胞密度との関係

細胞密度が高いと軟骨分化能の低下が抑制されることがわかった。

7) 軟骨塊 (nodule) の形成過程

培養の過程に現われる細胞集塊 (aggregate) の数と軟骨塊の数とを経時的に数えた結果、軟骨塊はすべて細胞集塊という状態を経てから形成されることがわかった。

8) 位相差顕微鏡による軟骨分化過程の観察

3時間間隔で写真を撮影して軟骨分化の過程を観察した結果、7)の結果のとおり軟骨分化は細胞集塊形成後に起こることが確認された。

9) 軟骨塊の電子顕微鏡による観察

軟骨塊には、軟骨細胞特有の球状の形態の細胞と多量の細胞間物質が観察された。

10) 細胞集塊形成過程の走査型電子顕微鏡による観察

細胞集塊を形成し始めた細胞は球状の形態をしており多数の filopodia を持っていた。

11) 高血清濃度の培養で生じた繊維芽状細胞の電子顕微鏡による観察

軟骨分化能を失った細胞は極端に扁平な形態をしており細胞表面の filopodia はほとんどなかった。

12) 軟骨分化に与える他細胞種の影響

肢芽細胞と他細胞種との混合培養を行なったが、軟骨分化に対する影響は認められなかった。

13) 血清濃度と増殖速度及び剥離細胞数との関係

細胞の増殖速度は血清の濃度と共に早くなったが、培養血からの細胞の剥離は、血清濃度と無関係に1日5%ずつ生じた。

14) 軟骨分化能を低下させる血清因子の温度安定性

熱処理した血清は軟骨分化能の低下を起こさなかった。

15) 軟骨分化を抑制する血清因子の分画

FCSをウルトラフィルター用限外・過器で分画した結果、軟骨分化能を低下させる因子は分子量200,000以上の分画にあることがわかった。

第3章 軟骨分化に対するジブチリルサイクリックAMP (db-cAMP) の影響について

1) 軟骨塊形成過程に及ぼす db-cAMP の効果

db-cAMP を添加した培地で培養すると細胞集塊形成過程を経ずに軟骨細胞の形質を発現して来た。

2) db-cAMP 濃度と軟骨分化頻度との関係

培地に添加する db-cAMP の濃度が高い程、軟骨分化の頻度は上昇した。

3) db-cAMP の軟骨分化能低下の抑止効果

高濃度血清の培地に db-cAMP を添加すると、軟骨分化能の低下は抑止された。

4) db-cAMP の軟骨分化の決定時間に及ぼす影響

db-cAMP を添加した培地で前培養すると、軟骨分化の決定時間は短縮された。

5) db - cAMPの細胞増殖に及ぼす影響

培地に添加する db - cAMP の濃度と共に細胞増殖速度は低下した。

6) db - cAMP と血清の効果の拮抗性

db - cAMP の効果は血清濃度が高くなるにつれて現われにくくなった。

第4章 軟骨分化と増殖速度との関係

1) 試薬の使用濃度の設定

細胞の生存率が50%以上の範囲内で試薬処理を行なうために試薬の細胞に対する毒性を調べた。

2) 試薬の軟骨分化能低下の抑止効果

高濃度血清の培地に試薬を添加し軟骨分化能低下の抑止効果を調べた結果、チミジン、ヒドロキシウレア、シクロヘキシイミドに抑止効果のあることがわかった。

3) 高濃度チミジンの細胞増殖に及ぼす影響

2.5%FCSの培地に1mM~5mMのチミジンを添加すると、チミジンの濃度と共に増殖速度が低下することがわかった。

4) 高濃度チミジンの軟骨分化の頻度に及ぼす影響

2.5%FCSの培地にチミジンを添加して培養すると、分化の頻度は1mM~2mMでほぼ最大となった。

5) 高濃度チミジンの軟骨分化の決定時間に及ぼす影響

高濃度チミジンを添加した培地で前培養を行なったが、決定時間の短縮は起こらなかった。

第5章 細胞増殖因子と肢芽のパターン形成について

1) 細胞増殖因子の肢芽の形態形成に及ぼす影響

肢芽の前縁部に繊維芽細胞増殖因子(FGF)を局所投与した結果、30%の頻度で過剰肢(digits)が生じた。

2) FGFの軟骨分化に及ぼす影響

低密度細胞培養にFGFを添加した結果、0.1 μg/mlでほぼ100%軟骨分化を抑制した。

第6章 総合論議

本研究で明らかになったことの1つは、培養した肢芽細胞が血清に対して非常に鋭敏に反応するということである。低細胞密度で高濃度の血清を作用させると急速に軟骨分化能が低下し、形態も繊維芽細胞様になってしまう。この反応は細胞の密度効果によって打ち消される。これまで高い細胞密度でなければ軟骨分化が起こらなかったのは、この血清の効果が原因であろうと思われる。

血清の濃度を低くするか、血清中からこの因子(分子量200,000以上の分画)を除去すること

によって低密度細胞培養でも軟骨分化が起きてくる。この培養条件は今後の軟骨分化の解析に非常に有効である。

この低密度細胞培養に db - cAMP を添加した結果、細胞集塊を形成せずに軟骨分化が起きてきた。又、db - cAMP は軟骨分化の決定時間を短縮する効果も示した。これらの結果は、細胞凝集の際に細胞内の cAMP レベルが上昇し軟骨の決定が起こるとする Solursh ら (1978) の仮説と一致する。

Janners ら (1970) は *in vivo* の観察で、軟骨分化と細胞増殖速度の低下との関連を指摘している。培地に過剰チミジンを添加し増殖速度を低下させた結果、軟骨分化の頻度が高まることがわかった。しかし、過剰チミジンには db - cAMP のように決定時間を短縮する効果はなかった。従って、増殖速度は直接的には軟骨分化能の維持にのみ関係しているものと思われる。

軟骨分化に影響のある繊維芽細胞増殖因子を肢芽前縁部に局所投与した結果、3割の頻度で過剰肢が生じたが、これは Cooke & Summerbell (1980) のモデルでは説明できない。むしろ形原の存在を仮定しない機械的なパターン形成のモデルと矛盾しないが、そのモデルの真偽を直接的に確かめる研究は今後の課題である。

第7章 要 約

発生段階 23 - 24 の鶴胚肢芽中胚葉細胞を培養し、細胞の性状並びにその軟骨分化機構についての解析を行なった結果、以下のことが明らかとなった。

- 1) 血清中には軟骨分化能を低下させる因子が含まれており、それは分子量 200,000 以上の分画にある。
- 2) 血清因子による軟骨分化能の低下は、細胞の密度効果によって打ち消される。
- 3) 血清濃度を低くするか、血清から分子量 200,000 以上の分画を除去すると、低密度細胞培養でも軟骨分化が起きてくる。
- 4) 培養液に db - cAMP を添加すると、軟骨分化の前の細胞集塊形成の過程を経ずに軟骨細胞の形質発現に進行する。
- 5) db - cAMP を作用させると軟骨細胞への決定時間が短縮される。
- 6) 高濃度血清によって起こる軟骨分化能の低下は、db - cAMP の添加で抑制することができる。
- 7) 細胞に対する db - cAMP の効果は培地に添加する血清の濃度と拮抗し、血清の濃度が高い場合には db - cAMP の効果は現われにくくなった。
- 8) 軟骨細胞の形質発現には、細胞の形態が球状になることが必要である。
- 9) 高い血清濃度の培地でも高濃度チミジン、ヒドロキシウレア、シクロヘキシイミドを作用させると軟骨分化能の低下を抑制することができた。
- 10) 高濃度チミジンには軟骨分化の決定時間を短縮する効果はなかった。
- 11) 培地に過剰チミジンを添加して培養すると細胞の増殖速度は低下した。軟骨分化の頻度も

チミジン濃度を増加させるに伴って上昇した。

12) 骨のパターン形成の機構を解析するために挿入法によるZPA活性のassay法について改良を加えた。その結果、繊維芽細胞増殖因子(FGF)にZPAに類似した活性のあることがわかった。

論文審査の結果の要旨

鶴胚肢芽は、脊椎動物の四肢の発生の研究にモデルとして古くから使われてきた。四肢の発生の基本的な過程は軟骨パターンの形成過程であり、未分化な肢芽の中胚葉性細胞が如何にして軟骨細胞に分化するかという過程である。この過程を研究する方法のひとつに細胞培養があり、鶴胚肢芽中胚葉性細胞の培養は多くの研究者によって為されてきた。

本論文は従来行われてきた肢芽の細胞培養の条件について再検討を行なって、軟骨分化に対する血清の阻害効果を見出し、低密度培養下での軟骨分化の機構を明らかにしたものである。

従来、肢芽中胚葉細胞を低密度 ($3 \times 10^5/cm^2$) で培養すると、多くの細胞は軟骨細胞へ分化せず繊維芽細胞へ分化することが知られていた。この理由はこれ迄不明であったが、本研究によって培養液に加えられている血清(ウシ胎児血清等)が軟骨分化を阻害する為である事が明らかになった。高濃度血清(5-10%)中で低密度培養を行うと軟骨分化の頻度は減少し、また軟骨分化能力も低下した。しかし血清濃度を0.1%に減少させるか、または阻害因子を含む分子量200 K以上の分画を除去することにより低密度培養下でも軟骨分化は起こり、また軟骨分化能が維持されることが明らかになった。この結果、軟骨分化過程で個々の細胞の追跡が可能となり、細胞集塊形成が軟骨分化に必要なことが明らかにされた。

次に低密度培養下におけるジブチリルサイクリックAMPの作用について調べ、その存在下では細胞集塊形成過程を経ずに軟骨細胞の分化が起こることを見出した。また、ジブチリルサイクリックAMPは軟骨分化の頻度を上昇させるだけでなく、血清による軟骨分化能の低下を抑制し、血清とジブチリルサイクリックAMPの軟骨分化への効果は拮抗する事を見出した。

次に血清による軟骨分化能の低下の機構を更に調べる為に細胞増殖の阻害剤を培地に加え、軟骨分化能低下に対する効果を調べた。その結果、高濃度のチミジンで増殖を抑制すると軟骨分化頻度が上昇し、軟骨分化能の低下は増殖と密接に関連していることを明らかにした。

最後に軟骨パターン形成と増殖の関係を調べる為に繊維芽細胞増殖因子(FGF)を肢芽の前縁部に局所投与し、極性化活性領域(ZPA)移植と同様の過剰肢を得た。また上記増殖因子は低密度培養下での軟骨分化を完全に阻害した。この結果はZPA領域に増殖促進、分化阻害因子のある可能性を示すとともに、増殖因子が極性形成に関与していることを示唆する。

これらの結果は、肢芽の軟骨細胞分化、軟骨パターン形成に関する新しい知見であり、多細胞体制の形成機構の研究に大きく寄与するものである。従ってこの論文は、著者がこの分野で自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示しており、よって服部徳治提出の論文は理学博士の論文として合格と認める。