

論文内容要旨

序論

鶏胚肢芽は脊椎動物体制の形成機構の解析のために好適な系で、今迄これについて幾多の研究がなされてきた。そして実験発生学的な研究から肢芽の基部先端部軸方向、前後軸方向のパターン形成機構を説明するモデルとして、それぞれ、進行帯モデル、ZPA モデルが Wolpert らによって提唱されている (Wolpert, 1969 ; Summerbell et al., 1973, 1975)。これらのモデルから、パターン形成に必要な細胞の性質 (位置軸) は、基部先端部軸方向に関しては、発生初期から後期にかけて肢芽進行帯の全域で不可逆的に変化してゆき、前後軸方向のパターンに関しては発生初期から後期にかけて進行帯内に部域性が確立されてゆくことが考えられ、それを支持すると思われる分子レベルでの報告もなされている (Ohsugi et al., 1988 ; Dolle et al., 1989)。本研究の第二章では、この位置値の存在を確認するために進行帯組織片の異時的及び変位的移植実験を行った。また第三章においては、現在、前後軸方向のパターンを指定するモルフォゲンであると考えられているレチノイン酸 (Thaller and Eichele, 1987) の細胞培養条件下での作用の検討を試みた。現在のところ、ZPA の作用を細胞培養条件下においてレチノイン酸を用いて再現した報告は、レチノイン酸による肢芽先端部細胞の増殖の促進及び軟骨分化の促進 (Ide and Aono, 1988) が唯一である。本研究では、この系での解析を更に進める意味で、すなわち、レチノイン酸が位置値の変更あるいは指定をするかという点に着目して解析するために、細胞培養条件下でレチノイン酸処理した肢芽中胚葉を第二章で述べる移植実験系に導入し、細胞の行動を追跡した。

方法

(1) 異時的進行帯組織片の移植実験 (第二章)

発生段階20ウズラ胚の肢芽進行帯の第3指形成領域由来の組織片を、発生段階25ニワトリ胚の肢芽進行帯の第3指先端部の形成領域に移植した。さらに、この組み合わせと逆の移植も行った。作成したキメラ肢芽はニワトリ特異的単クローン抗体である A223 抗体を用いて免疫組織化学的に解析した。また、この際、移植片の DNA 合成能も BrdU 標識により測定した。

(2) 変位的進行帯の移植実験 (第二章)

発生段階20ウズラ胚肢芽の第3指形成領域由来の組織片を、発生段階20ニワトリ胚の肢芽進行帯の第2、第4指形成領域に移植した。発生段階25においても同様の移植を行った。

(3) 細胞培養条件下でレチノイン酸処理した細胞の移植実験 (第三章)

発生段階20ウズラ胚の第2、第3指形成領域をレチノイン酸存在下で高密度培養したものを、細胞塊にし発生段階20ニワトリ胚肢芽の第2指形成領域に移植した。発生させた肢芽についてキメラ解析を行い、またアルシアンブルー染色による軟骨パターンの解析及び in situ hybridization 法による Chox-4f 遺伝子の発現の検出を行った。

結 果

(1) 異時的移植実験 (第二章)

発生段階20の第3指形成領域の組織片を発生段階25の第3指形成領域に移植した時、移植片は周りの組織とは協調せず、主に独自に過剰な完全な指を形成し、移植した領域の細胞が本来形成するはずの第3指先端部の形成には参加しなかった。発生段階25の第3指形成領域の組織片を発生段階20の第3指形成領域に移植した場合、移植片は主に宿主の第2指、第3指の間の繊維性結合組織を形成し、移植した領域の細胞が本来作るはずの第3指の形成にはほとんど参加していなかった。なお、発生段階20、25の各発生段階それぞれにおいて、第3指形成領域の組織片を第3指形成領域に移植した時、移植片は周辺の組織と共に正常な軟骨パターンを形成した。

これらの結果から、異時的な移植実験において移植片は、移植された場所の発生運命に従わなかったことが示された。

また、同時に術後12時間の移植片のDNA合成能を測定したところ、発生段階25の移植片を発生段階20の進行帯に移植した場合に、本来のDNA合成能より3-4割ほど減少するのが観察された。発生段階20の組織片を発生段階25の進行帯に移植した場合には、移植片のDNA合成能は本来の値と変化はなかった。

(2) 変位的移植実験 (第二章)

発生段階20の第3指形成領域の組織片を同じ発生段階の第2指形成領域及び第3指形成領域に移植すると、移植片は移植された領域が本来形成するはずである第2指、第3指を形成した。

発生段階25の第3指形成領域の組織片を同じ発生段階の第2指形成領域に移植した場合、移植する場所の微妙な差異によって二通りの結果が得られた。移植片を第2指形成領域の中のより前側に移植した時には第2指形成を行い、より後側に移植した時には第2指形成には参加せず、主に第2指と第3指の間に繊維性結合組織を形成した。また、同発生段階において、第3指形成領域の組織片を第4指形成領域に移植した場合には、移植片は第4指の形成にはほとんど参加せず、第3指の一部を形成したり、第3指と第4指の間に軟骨塊を形成した。

これらの結果は、発生段階20では移植片は移植された場所の発生運命に従うのに対し、発生段階25では第2指形成領域のより前側に移植した場合には移植した場所の発生運命に従い、第2指形成領域のより後側に移植したとき及び第4指形成領域に移植した場合には、移植された場所の発生運命に従わないことを示すものである。

(3) 細胞培養条件下でレチノイン酸処理した細胞の移植 (第三章)

レチノイン酸処理した細胞を移植された肢芽は過剰肢を形成し、またキメラ解析からこの過剰指は宿主の細胞で形成されていることが示された。このことからレチノイン酸処理された細胞は宿主に対して過剰肢を誘導しZPAと同様の作用を有することが判明した。またZPAと同様の作用を持つことは、移植片の周辺の宿主組織にChox-4f遺伝子の二次的な発現が誘導されていたことから遺伝子レベルにおいても確認された。

議 論

異時的移植実験（第二章）の結果から、基部先端部軸方向の位置価は発生が進行するにつれ不可逆的、自律的に変化してゆくことが再確認された。また、位置価が異なると考えられる細胞が隣接した場合、それぞれは独立に分化することから、細胞間の情報伝達機構が発生にともない変化する可能性が考えられる。

変位的移植実験（第二章）の結果から、前後軸方向の位置価は、発生段階20から発生段階25の間に ZPA の影響等によって後側から決定されてゆく可能性が示唆された。特に、第3指形成領域と第4指形成領域の違いは、第4指形成領域の一部にまで ZPA が伸びている (Honig and Summerbell, 1985) 以外には知られておらず、組織レベルで両領域間の違いを示したのは本研究が最初である。さらに、発生段階25において第3指形成領域を第2指形成領域に移植した実験の結果から、発生段階25前後から前側からの影響（前側化因子）の存在の可能性も示唆された。

細胞培養条件下でレチノイン酸処理した細胞を移植する実験の結果（第三章）と、このようにして移植された細胞にはレチノイン酸が残留している可能性あるいは新たにレチノイン酸の合成を開始する可能性が低いと考えられる (Eichele et al., 1985 ; Wanek et al., 1991) ことから、レチノイン酸は枝芽に対してモルフォゲン様の作用を示すのではなく、枝芽進行帯先端部の前側領域の細胞を ZPA 細胞化をしていることが示唆された。また、レチノイン酸による ZPA 細胞化は、活性は弱いながらも細胞培養条件下で、外胚葉の存在なしに可能であることも示された。このことは、ZPA 細胞を容易に大量に得ることを可能にし、ZPA 活性の分子レベルでの解析の道を開くものである。

論文審査の結果の要旨

脊椎動物の四肢は基部－先端部軸，前後軸，背腹軸によって規定される三次元構造であり，そのパターンは肢芽の発生時にその先端部の進行帯領域において決定される，即ち，発生の初期には均一な細胞集団であるが，発生の進行と共にパターンに関して不可逆的に特殊化が起ると考えられているが，その証明は未だ無い。

本研究は肢芽の発生初期（stage 20）と後期（stage 25）の進行帯の組織片を種々の部位について交換移植し，移植した組織が宿主の四肢の形態形成に適合して取り込まれるか，独自の組織を作るかを観察することによって，時間的空間的に特殊化が起こったか否かを調べたものである。移植片由来の細胞を同定するために，新たにニワトリ細胞特異的単クローン抗体を作成し，移植片をウズラ由来，宿主をニワトリ由来にして，蛍光抗体法により識別した。

その結果，基部先端部軸方向に関しては，発生初期の進行帯細胞と後期の進行帯細胞は互いに交換移植されても独立に発生する。つまり発生段階に応じて特殊化が起こっていることが示された。また前後軸に関しては，発生初期には交換されても宿主の形態形成に適合するのに対し，発生後期には独立性を持つ，つまり特殊化が進むことが明らかになった。またこの特殊化は，後部から起こることが明らかになった。この結果は，これらの軸に関する位置情報が独立に細胞に与えられ，少なくとも細胞小集団内で維持されていることを示している。

さらにこのキメラ解析を用いて，肢芽の前後軸方向の決定に重要な役割を持つと考えられているレチノイン酸で前部の進行帯細胞を処理して，ZPA（極性化活性域）細胞化を誘導した。この結果は「レチノイン酸＝モルフォゲン」説に反対するもので，大量に得られるZPA細胞を用いて，前後軸形成機構の解明への道を拓くものである。

これらの成果は四肢パターン形成機構に関する新しい知見であり，博士論文として適当である。また，この論文は，著者が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。

よって，内山孝司提出の論文は博士（理学）の学位論文として合格と認める。