

氏名・（本籍）	わた なべ あき ひこ 渡 邊 明 彦
学位の種類	博 士（理 学）
学位記番号	理博第1333号
学位授与年月日	平成5年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科専攻	東北大学大学院理学研究科 （博士課程）生物学専攻
学位論文題目	ニワトリ胚枝芽の進行帯細胞の維持因子に関する研究
論文審査委員	（主査） 教 授 竹 内 拓 司 教 授 長 内 健 治 助 教 授 井 出 宏 之

論 文 目 次

序論

材料と方法

結果

1. 進行帯領域の特徴を維持する機能を持つ因子
2. ステージ20ニワトリ枝芽における bFGF タンパク質の分布
3. BRL - CM の成分
4. 進行帯由来細胞に見られる AV - 1 抗原発現の部域性
5. 枝芽先端部及び基部由来の中胚葉細胞の特徴
6. 枝芽先端部培養細胞の枝芽内への移植実験

論議

要約

謝辞

論文内容要旨

脊椎動物の四肢軟骨パターン形成における肢芽先端部中胚葉（進行帯）の重要性は古くから指摘されてきた。一連の研究から、進行帯は特殊な外胚葉（AER）によって維持され、軟骨パターン指定の場となる事が示唆されてきた。しかし、進行帯を維持する AER からの作用を担う因子についてはほとんど分かっていなかった。本研究はこの因子の同定を主要な目的としている。

進行帯細胞の特徴としては 1) 細胞増殖が活発である事 2) 未分化状態である事 3) 肢芽内で AER に依存した発現をする AV-1 抗原及び *Chox. 7* 遺伝子を発現している事が挙げられる。1), 2) はマーカーとしてあいまいであるため、まず AV-1 抗原の発現を利用してこれを維持する因子を検討した。AV-1 抗原はニワトリ細胞でしか検出ができないため、また単純な系が適する事からニワトリ肢芽細胞の培養系を用いた。この結果細胞成長因子の bFGF と BRL 3 A 細胞上清 (BRL-CM) の組み合わせの条件でステージ 20 肢芽培養細胞で AV-1 抗原の発現を維持しうる事が分かった。

ステージ 20 肢芽細胞における AV-1 抗原の発現は培養 1 日目にすでに観察でき、1.5 日から 2 日にかけての発現のピークがあり、以後減少する傾向が見られた。また、肢芽先端部前側由来の細胞で AV-1 抗原の発現が観察された。更に細胞集団としての発現が観察され、これらは肢芽内での AV-1 抗原の発現がこの条件によって維持されている事を示唆する。また培養の途中で条件を変える事によって bFGF が AV-1 抗原の発現の維持に関わる主要な因子である事が示唆された。

そこで細胞数の変化、軟骨分化、AV-1 抗原の発現、*Chox. 7* 遺伝子の発現に対する bFGF 及び BRL-CM の効果をステージ 20 とステージ 22 の肢芽中胚葉細胞について調べた。AV-1 抗原の発現はステージ 20 の培養細胞では bFGF または BRL-CM 単独では発現が見られなかった。ステージ 22 の培養細胞では bFGF 単独でも発現が見られ、ステージによる細胞の状態の違いが明らかになった。

細胞数の変化から、bFGF による細胞の維持作用及び増殖の促進作用が示唆された。中胚葉細胞の維持に関して bFGF の要求性はステージにより違いが見られ、この違いは肢芽内で観察されている先端部中胚葉維持に対する AER の要求性と一致し、bFGF が AER からの進行帯維持因子の作用を培養系で担っている事が示唆された。

軟骨分化に対しては bFGF によってステージによらず軟骨分化阻害作用が観察された。これは進行帯細胞の分化状態と一致する。また、*Chox. 7* 遺伝子の発現も bFGF によって維持される事が分かった。

以上の事実は bFGF が培養系において進行帯細胞の特徴を維持する効果を持つ事を示している。そこで肢芽内における FGF タンパク質の分布を bFGF に対するモノクローナル抗体を用いて調べた。この結果、肢芽全体に分布が見られ特に AER と肢芽先端部及び背側の中胚葉に多く存在している事が観察された。これは肢芽内においても FGF タンパク質が進行帯の維持因子と

して作用しうる事を示唆する。

AV - 1 抗原の発現に関する BRL - CM の因子は分子量 1 万から 3 万の範囲に活性が見られ、更に分子量 30 万以下にこの活性を補強する因子の存在が示唆された。しかし、BRL 3 A の細胞上清中に存在が知られている成長因子ではこの活性は見られず未知の因子である可能性が示唆された。

細胞の維持及び増殖、軟骨分化、*Chox. 7* 遺伝子の発現に関しては BRL - CM は効果がないか進行帯の特徴をむしろ失わせる作用が見られた。これについては細胞培養中で、AV - 1 抗原の発現に関わる因子のほかに、CM 中の複数の因子が作用している事を示唆する。

次に、培養系において bFGF と BRL - CM の組み合わせの条件で維持されたステージ 20 の進行帯細胞に見られる特徴について調べた。肢芽先端部培養細胞集団において AV - 1 抗原発現細胞は細胞集団としての領域を再形成する性質を持つ事が示された。また、基部細胞においても AV - 1 抗原の発現が観察され、基部細胞が進行帯細胞の性質の一部を発現する能力を持つ可能性が示された。

また、培養系において bFGF と BRL - CM の組み合わせの条件下でステージ 20 の肢芽先端部細胞と基部細胞との間で細胞選別の現象が観察された。これは先端部細胞と基部細胞の間に親和性の違いがある事を示す。

更に、進行帯細胞の特徴を維持されたステージ 20 肢芽先端部培養細胞の肢芽内での軟骨パターン形成能について調べた。コントロールでは前腕部に分布が見られ、宿主の軟骨パターンと独立に軟骨形成をする事が分かった。それに対して bFGF と BRL - CM の組み合わせの条件で培養した細胞は前腕部から先端部にかけて分布が見られた。これは培養細胞が肢芽内で先端部細胞と同程度の増殖をしうる事を示唆する。また、宿主細胞と協調しての軟骨パターン形成をする事が分かった。これは培養細胞が正常な軟骨パターンの形成能を持つ事を示す。この結果この条件がステージ 20 の進行帯細胞の特徴を維持するに十分である事を示す。

bFGF 単独の条件で培養した細胞では上記の双方の場合が観察された。これは bFGF が進行帯細胞の特徴を発現する能力を維持する事を示唆する。また、BRL - CM の因子はこの能力を細胞の性質として具現化するための補助的な作用を持つと考えられる。

以上の結果から、1) bFGF が進行帯細胞の維持に関する主要な因子である事、2) BRL - CM の因子が bFGF によって維持された細胞に進行帯細胞の特徴を具現化する作用を持つ事 3) 進行帯の特徴を維持された細胞に細胞集団を再形成する能力がある事、4) 先端部細胞と基部細胞との間に新和性の違いが存在する事が強く示唆された。

論文審査の結果の要旨

四肢能力が軟骨パターンはその原基である肢芽の先端部中胚葉領域、進行帯で形成される。進行帯の細胞はその先端部にある AER の作用によって、未分化の状態で活発に増殖する。またこの状態の維持に関連すると考えられるいくつかの領域特異的なタンパク、mRNA を作っている。

これらの分子をマーカーとして、培養したニワトリ進行帯細胞をもちいて、進行帯の維持に関与している分子を捜し、塩基性繊維芽細胞成長因子にその作用のあることを見いだした。さらに発生初期の肢芽においては、肝由来の株細胞である BRL の培養上清中の成分も必須であることを見出した。塩基性繊維芽細胞成長因子を添加することによって、位置特異的膜タンパク、AV-1 の発現が起こることが Immunoblotting と蛍光抗体法によって、また先端部中胚葉領域に特異的なホモオボックス遺伝子 *chox7* の発現がみられることが、In situ hybridization によって示された。また繊維芽細胞成長因子の添加によって、進行帯細胞の増殖は促進され、軟骨分化は阻害された。

さらに進行帯細胞を培養後、肢芽に戻すと、対照の培養液で培養した場合は、宿主の軟骨パターン形成に参加せず、過剰な軟骨を作るのに対し、繊維芽細胞成長因子と BRL の培養上清を含む培養液で培養した場合は、移植細胞は宿主の軟骨パターン形成に参加し、その分布は、進行帯片を直接移植した場合と同様に AER 直下まで、基部-先端部軸方向に伸びていた。また抗-塩基性繊維芽細胞成長因子抗体を用いた蛍光抗体法により、肢芽の先端部での塩基性繊維芽細胞成長因子の存在が認められた。

以上の結果から、肢芽進行帯では、AER の作用により、塩基性繊維芽細胞成長因子が多量に存在しており、この成長因子の作用によって、未分化状態での活発な増殖が維持されていると考えられる。

この論文は、提出者が自立して、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、渡辺明彦提出の論文は、博士（理学）の学位論文として合格と認める。