

	さとう こうせい
氏名（本籍地）	佐藤 耕世
学位の種類	博士（生命科学）
学位記番号	生博第96号
学位授与年月日	平成19年3月27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	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）生命機能科学専攻
論文題目	鶏胚前肢芽の基部先端部軸に沿った発生運命と自脚部形成に関する研究
博士論文審査委員	（主査）教授 井出 宏之 教授 仲村 春和 助教授 美濃川 拓哉 助教授 田村 宏治

論文内容の要旨

脊椎動物の四肢は、内部の骨格パターンなど様々な特徴が基部-先端部軸（肩-指先方向の軸、以下 PD 軸）方向に沿って異なっている。例えば鶏の前肢の場合、柱脚部（上腕部）と軛脚部（前腕部）にはそれぞれ長く太い骨が 1 本あるいは 2 本、自脚部（手首、掌部、指）には手根骨（手首関節を構成する細かい骨）と中手骨（掌部を構成する細長い骨）、指骨（指を構成する細く短い骨）が PD 軸方向に順番に配置される。また、各部分で四肢を輪切りにした場合、柱脚部と軛脚部の断面はおおよそ円形であるのに対して、自脚部は断面が扁平な楕円形（円の直径が手の甲-平方向に小さく、親指-小指方向に大きい）である。このような PD 軸に沿ったパターンの違いが肢芽の発生過程においていつどこで形成され、何に起因するのか、を明らかにするために本研究を行った。

この問題を解決するために、まず位置情報の受け手である間充織細胞がいつ、肢芽のどこで特定の構造を作るように発生運命を定めるのかを調べた。発生の初期と中期の肢芽において PD 軸方向の詳細な発生運命図を作成した結果、四肢の各構造の予定領域は基部から先端部に向かって順番に（柱脚部、軛脚部、手根骨部、中手骨部、指骨部の順番で）領域化されること、予定領域の分離が肢芽の先端部（150 μm の範囲内）で起こり始め、基部で完了することが示唆された。例えば、発生初期（鶏胚の発生段階 19）の肢芽では、柱脚部と軛脚部の予定領域は肢芽の基部において異なる場所に領域化されているが、軛脚部と自脚部の予定領域は、肢芽の先端部において互いに分離しつつあるものの大部分が重なり合っていた。自脚部の構造（手根骨部、中手骨部、指骨部）に関しては予定領域の領域化は全く観察されなかった。これとは対照的に、発生中期（鶏胚の発生段階 23）の肢芽では、軛脚部と自脚部の予定領域は分離が進み、肢芽の基部において異なる場所に領域化されていた。一方、自脚部の構造は、手根骨部と中手骨部の予定領域が異なる場所に領域化されていたが、中手骨部と指骨部の予定領域は、互いに分離しつつあるものの大部分が重なり合っていた。発生運命図はさらに、細胞が肢芽先端部において PD 軸に沿った自身の位置を変化させており、細胞どうしがミキシング（離れた位置の細胞が混じり合うこと）することを示唆した。この現象が主に起こっている場所は先端部の約 150 μm の範囲であり、基部では顕著ではない。ミキシングし合う細胞が意図的に（PD 軸上の特定の構造を作るようにあらかじめプログラムされた結果）自身の位置を基部方向あるいは先端部方向に変化させる可能性について検討した。PD 軸のマーカー遺伝子である

hoxa-11 と *hoxa-13* の発現を単一細胞レベルで詳細に観察した結果、二遺伝子の発現状態を異にする細胞が肢芽先端部においてモザイク状に含まれる状態は観察されなかった。このことは、PD 軸に沿って異なる指定を受けた細胞が肢芽先端部においてモザイク状に含まれるわけではないことを示唆している。すなわち、ミキシングする細胞が意図的に自身の位置を変化させるわけではなく、むしろ移動先の環境に応じて発生運命を定めるような、発生運命を決められていない状態、あるいは（受けていたとしても）非常に弱い指定しか受けていない状態であることが示唆された。発生運命図によると、肢芽先端部の極せまい範囲（細胞 4-5 層程度）には発生運命に関して領域差がない領域が存在する。この領域に由来する構造は発生とともに四肢の先端部のものへと限定されていく。加えて、この領域において PD 軸のマーカ遺伝子である HoxA-11/A-13 の発現状態が変化していくことは、PD 軸に沿った指定の状態が先端部のものへと変化していく可能性を支持する。

以上の結果を総合して間充織細胞がどのようにして PD 軸に沿った位置情報を得るのかを次のように考察した。肢芽の先端部約 40 μm の範囲内（細胞 4-5 層分の範囲）には PD 軸方向に関して発生運命の領域差が見られない領域がある。この内部に含まれる間充織細胞は自身の発生運命を四肢のより先端部の構造に限定していく。一方 AER から 50 μm 以上離れた場合、細胞は徐々に基部を作るように運命づけされ始める。発生段階 19 ではこの状態の細胞が軛脚部をつくる。しかしながら指定の状態は非常にあいまいで、PD 軸上の位置を変えるような細胞も含まれている。AER から離れていった細胞は徐々に指定の状態を強めていき PD 軸上の位置をあまり変えなくなり（その結果細胞どうしのミキシングがあまり起こらなくなり）、PD 軸に沿ったある特定の構造だけをつくるように発生運命を定めていく。発生段階 19 の肢芽において柱脚部、軛脚部、自脚部の領域差は形成され始めている（特に柱脚部と軛脚部の領域化はすでに起こっている）が、軛脚部と自脚部の領域化はこの発生段階では完全ではなく発生段階 23 までに起こる。自脚部内の構造（手根骨部、中手骨部、指骨部）の領域化がさらに後期発生段階に起こることは、基部側から先端部側に向かって徐々に発生運命が領域化されていくことを示している。

PD 軸に沿った各構造の領域化と特異化に関する問題に解答が得られたため、次に実際の形態差（冒頭で説明した断面の形態の違い）が形成される仕組みを明らかにするために研究を行った。PD 軸に沿った形態差が形成される過程をいろいろな発生段階において詳細に観察した結果、肢芽先端部が前後軸（親指-小指方向の軸）方向に幅が広く、背腹軸（手の甲-平方向の軸）方向に幅が狭くなるように形態変化していった。肢芽のどの部分がこの形態変化に

関与するかを調べたところ、限られた一部分ではなく枝芽全体の関与によることが示唆された。次にこの形態変化が細胞のどのような挙動の変化によって起こるのかを検討した。枝芽の形態変化（前後軸方向への拡大と背腹軸方向への縮小）を細胞増殖と細胞死で説明するためには、枝芽内におけるこれらの領域差が前提となるが、形態変化が起こる場所ではほとんど細胞死が起きておらず、細胞増殖についても領域差が観察されなかった。すなわち、細胞の増殖と死だけではこの形態変化を十分に説明できない。そこで、細胞増殖、細胞死によらない個々の細胞の形態形成運動（例えば、方向性をもった形態変化、細胞分裂方向の制御、移動など）が関与する可能性を検討した。まず個々の細胞の形態が枝芽の形態変化と同じように変化する可能性を検討したところ、方向性をもった細胞の伸長は観察されなかった。次に、細胞の密度が背腹軸方向と前後軸方向で異なる可能性を検討したところ、二軸（背腹軸と前後軸）の間で違いは見られなかった。細胞分裂方向が制御されている可能性を検討したところ、前後軸方向への細胞分裂（娘細胞が前後軸方向に偏って生み出されるような分裂）の頻度が背腹軸方向の分裂（娘細胞が背腹軸方向に偏って生み出されるような分裂）頻度よりも約 10%多いことを示唆する結果が得られた。今回観察された個々の細胞の挙動と枝芽の大きなスケールの形態変化とを結びつけるために様々な角度からのさらなる解析が必要であるものの、細胞分裂方向の制御が PD 軸形成を背腹軸、前後軸形成と密接に関連させる仕組みである可能性が示唆された。

以上の研究から、四肢を構成する各構造が PD 軸に沿って異なる場所に領域化され、実際の形態差として現れるまでの過程が明瞭になった。本論文では得られた知見をもとに、PD 軸形成に関して対立する 2 つのモデル（進行帯モデルと early prespecification モデル）に対しても見解を加え、実際の PD 軸形成がどのように起こるのかを考察した。

論文審査結果の要旨

肢芽で四肢の基部先端部パターンが決定される機構として、古くから進行帯モデルが提唱されてきた。このモデルでは、肢芽先端部の進行帯で発生とともにパターンが基部側から先端部側へ順に決定されると考える。進行帯を維持する AER が初期に切除されると四肢の基部側しか形成されず、切除が後期になると欠損は先端部のみになることがこれを支持している。これに対し、数年前に、prespecification モデルが提案された。このモデルでは、四肢のパターンは初期の肢芽で決定されており、AER 除去で欠損が起こるのは、決定された細胞が死ぬためと考える。いずれのモデルが正しいかを調べるため、まず肢芽の微小領域を蛍光色素でラベルし、そこに存在する細胞の子孫を追跡した。その結果、含まれる細胞が軀脚部と自脚部に分布することになる領域が広く存在し、prespecification が厳密には起こっていないことが示された。しかし stage19 の肢芽先端部 50 μ m 以内には四肢先端部構造しか作らない領域があり、これは進行帯モデルでは説明できない。

次に、領域に含まれる細胞の子孫が 2 つの領域にまたがるのが、2 つの領域になることが決まっているそれぞれの細胞がモザイク状に混合していることによるのかどうかを見るため、転写因子 Hoxa11, Hoxa13 に対する抗体で細胞核をラベルした。その結果、中間域では各細胞で両タンパク質は混合して存在しており、個々の細胞が別々のタンパクを持って混在しているのではないことが示された。

次に軀脚部と自脚部の形態の差のうち、後者で前後軸方向の長さが伸び、背腹軸方向の長さが縮む機構を解析した。その結果、前後軸方向への細胞分裂が背腹軸方向への細胞分裂に比べ、約 10%多いことが示された。これは細胞分裂の方向が四肢の形態に関与していることを示唆している。

本研究は、佐藤耕世が自立して研究活動を行うに必要な研究能力と学識を有することを示している。したがって佐藤耕世提出の論文は、博士(生命科学)の博士論文として合格と認める。