

# 第 1 章

## 序論

## 1-1 多細胞動物の身体を構築する 2 つの細胞性成分

多細胞動物の形態は、種ごとに特有である。これらの違いは、それぞれの動物種の身体が機能分化した多様な細胞種から構築されていることに起因する。実際、最も進化した動物種であるヒトでは、約 200 もの細胞種が分類される。一方、身体を構成する細胞種の共通性という観点から、ヒトを構成する大部分の細胞種も、二つの細胞性成分として、上皮細胞群と間充織細胞群に分けて考えることが可能である。上皮細胞群は、互いに接着することにより、頂端側と基底側の極性を有したシート構造を構築する。一方、間充織細胞群は、上皮シートの基底側に位置する身体の内部に散在する細胞群である。

「多細胞動物の身体に共通する細胞性成分である上皮細胞群と間充織細胞群は、どのようにして身体を構築しているのか？」という問題を深く洞察していくために、動物の発生過程における形態形成現象を研究することは有効なアプローチである。なぜなら形態形成現象が生じる発生過程では、上皮細胞群と間充織細胞群の種類が少なく、身体の構造としては比較的単純であり、両細胞群に身体を構築するための根幹的な変化が経時的に生じるので、その本質の理解が可能になる。多くの動物の発生過程では、受精卵の卵割後、体軸が確立し、多細胞化した胚体において、最初に上皮シートが形成される。一方、間充織細胞群は、遊離性の細胞として、上皮シートから派生し（上皮—間充織転換）、両細胞性成分は胚体の構造的基盤を確立する。続いて、上皮細胞群と間充織細胞群に機能分化が生じ始め、胚の身体は、幼生、成体へと複雑になっていく。この過程で、最も重要な局面のひとつは、両細胞群の間で生じる相互作用（上皮—間充織相互作用）である。

## 1-2 棘皮動物ヒトデの系統進化的位置と上皮シートの変形による形態形成

本研究で用いたイトマキヒトデ *Asterina pectinifera* は、我々ヒトへ繋がる後口動物の基部に位置する棘皮動物門に属している。それゆえ、系統進化的な視点からも、後口動物の形態形成の根幹となるメカニズムの発見が期待できる。イトマキヒトデの胚、ならびにその幼生は、単層の上皮シートと一種類の間充織細胞から構成されている。また、外、中、内胚葉へ分化し、左右相称性を示す典型的な三胚葉性動物の体制を有する。なお、単層上皮シートである外胚葉の体壁は非常に透明であり、身体の内側で生じる種々の器官形成や間充織細胞の動態を生きた状態で直接観察することが可能である (Fig. 1-1)。この様に、イトマキヒトデは、最も単純な状況で上皮—間充織相互作用を解析できる優れた研究材料である。

イトマキヒトデ胚において観察される形態形成は、単層の上皮シートの変形の視点から言及できる (Table 1-1, see also Fig. 1-1)。具体的には、植物極側の上皮シートが肥厚し、胞胚腔中へ陥入することにより原腸が形成される。原腸胚期以降、単層上皮シートに局所的な膨出、陥入、切離、融合、区画化、肥厚、扁平化などの変形運動が生じ、体腔囊、口、消化管、繊毛帯、成体原基や幼生腕などの種々の器官が形成される (Table 1-1)。また、外胚葉の単層上皮シートの定位置に括れが生じ、次第にイトマキヒトデ幼生に特有なフォルムが現出する (Table 1-1)。これらの器官形成に観察される上皮シートの変形は、数多くの動物種から明らかにされてきた形態形成における種々の上皮シートの変形様式 (Quintin et al., 2008) を直接的に具現化している。なお、原腸胚期以後の発生過程では、外、中、内胚葉を構成する上皮細胞の増殖による単層上皮シートの発達により、各器官や身体サイズが増大する。イトマキヒトデで生じる器官形成は、間接発生型様式で進行する他のヒトデ種である *Asterias forbesii*、*Pisaster ochraceus*、*Asterias amurensis*、*Patiriella regularis* とともに共通している (Barros et al.,

1966; Crawford and Chia , 1978; Crawford and Abed, 1983; Abed and Crawford, 1986; Byrne and Barker, 1991; Kaneko et al., 1997; Byrne and Cisternas, 2002)。しかしながら、ヒトデ類をはじめ多くの無脊椎動物において、上皮シートの変形や発達が生じる際に、どのように間充織細胞が関与しているのかという問題に対する研究はほとんど行われていなかった。

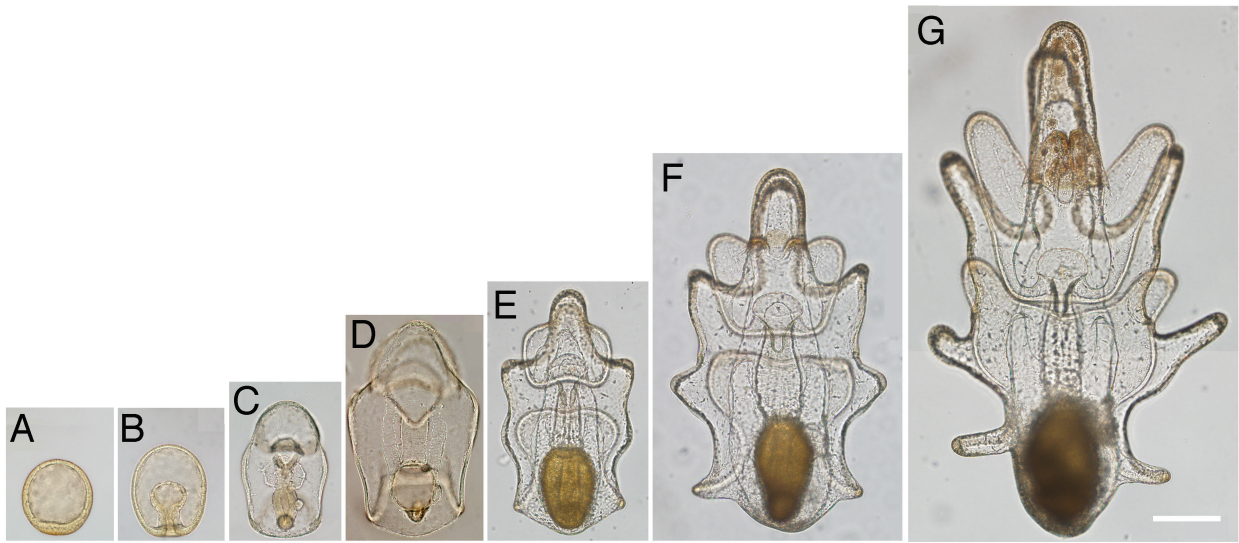


Fig. 1-1. Normal development of starfish, *Asterina pectinifera*. A, Blastula (16 hr); B, mid-gastrula (24 hr); C, early bipinnaria (42 hr); D, bipinnaria (72 hr); E, late bipinnaria (6 days); F, brachiolaria (10 days); G, brachiolaria (21 days). Scale bar: 200  $\mu$ m.

**Table 1-1. Organ formation and epithelial sheet movements during morphogenesis in the starfish, *A. pectinifera***

Stage	Time <sup>a</sup>	Organ	Epithelial sheet behavior			References
			Epithelial sheet movements	Cell status <sup>b</sup>		
Blastula	16 hr	Archenteron <sup>c</sup>	Invagination; Elongation	Columnar	Barros et al., 1966 <sup>e</sup> ; Kominami, 1984; Kuraishi and Osanai, 1992; Hamanaka et al. 2010a	
	18 hr					
Gastrula	24 hr	Archenteron tip	Expansion	Squamous	Dan-Sohkawa et al., 1980	
	36 hr	(Mesenchyme cells) <sup>d</sup>	Ingression			
		Ciliary bands	Extension	Columnar	Byrne and Cisternas, 2002 <sup>f</sup>	
		Epidermis	Expansion	Squamous		
		Mouth	Invagination; Fusion	Columnar	Crawford and Abed, 1983 <sup>g</sup> ; Abed and Crawford, 1986 <sup>g</sup>	
		Anterior coelom	Invagination; Separation; Expansion; Fusion	Squamous	Crawford and Chia, 1978 <sup>g</sup> ; Kuraishi and Osanai, 1992; Tamura et al., 1998	
		Posterior coelom	Invagination; Separation; Expansion; Fusion	Squamous		
		Hydropore	Expansion; Fusion	Squamous		
		Digestive tracts	Partition	Squamous		
		42 hr				
Bipinnaria	72 hr					
	6 days	Bipinnaria arms <sup>h</sup>	Expansion; Extrusion	Squamous; Columnar		
Brachiolaria	10 days	Brachiolar arms <sup>h</sup>	Expansion; Extrusion	Squamous; Columnar		
		• Adhesive pappila	Extrusion	Columnar	Murabe et al., 2007	
		• Adhesive disk	Extrusion	Columnar	Murabe et al., 2007	

<sup>a</sup> Fertilized eggs were allowed to development at 20°C. Time of development when organ first appears.

<sup>b</sup> Epithelial cell structure.

<sup>c</sup> The archenteron appears transiently during the gastrula stage.

<sup>d</sup> The mesenchyme cells are obviously not an organ, but the timing of their appearance is relevant to the present study.

<sup>e</sup> *Asterias forbesi*

<sup>f</sup> *Patiriella regularis*

<sup>g</sup> *Pisaster ochraceus*

<sup>h</sup> Bipinnaria arms and brachiolar arms are composed of ciliary band and epidermis.

### 1-3 間充織細胞の形態形成能

イトマキヒトデの発生過程において、胚体が原腸胚期に到達すると、原腸先端部で膨出し始めた上皮シートから、細胞外マトリックス (extracellular matrix, ECM) が充填された胚体の胞胚腔に向かって、間充織細胞は個々に移入を開始する。発生の進行に伴い、間充織細胞は胞胚腔中を移動し、外胚葉ならびに内胚葉の上皮シートからなる体壁に配置する (Dan-Sohkawa et al., 1980; Kominami, 1984; Hamanaka et al., 2010a)。受精4日目のビピンナリア幼生では、間充織細胞は幼生の身体を構成する全細胞数の約1%を占める。この時点で、間充織細胞は細胞突起である糸状仮足を発達させ、互いに接し合った状態のネットワーク構造を形成する (Furukawa et al., 2009)。

現在までに報告されている論文から、形態形成における間充織細胞の機能として、次の二つを挙げるができる。一つ目の機能は、胞胚腔中に充填される ECM 成分と間充織細胞が密接に作用し合うことである。具体的には、間充織細胞は、原腸先端部で基底膜直下に分布する繊維状 ECM の一部を外胚葉の予定口陥領域へとガイドする。これにより、陥入してくる予定口域の外胚葉の上皮シートは原腸先端部へ誘導され、口形成が正確に進行していく (Crawford and Abed, 1983; Abed and Crawford, 1986)。また、間充織細胞は ECM を構成する繊維状成分に対して物理的張力を発揮しながら、この繊維状成分を再配置させることにより、外胚葉と内、中胚葉の上皮シートを連結し、胚ならびに幼生のフォルムを維持する (Crawford, 1990; Reimer and Crawford, 1997; Kaneko et al., 2005)。

もう一つの間充織細胞の形態形成における機能は、貪食作用である。受精後4日目のビピンナリア幼生では、外胚葉の上皮シートを通過して胞胚腔中に侵入してくる異物や死に到った一部の上皮細胞の残骸を貪食作用により除去する (Furukawa et al., 2009)。また、いったん原腸胚を個々の細胞にまで解離した後、胚体を再構築させる実験系では、再構築に参加できずに胞胚腔中に残った上皮細胞に対しても、間充織細胞は活発な貪食作用を行い、再構築胚の内部環境で

ある胞胚腔を清浄に保ち、再構築の進行に関与する (Tamura et al., 1998)。以上、間充織細胞は、少なくとも ECM の繊維状成分への関与、胚体ならびに幼生の胞胚腔の浄化を介して形態形成に関与する。両状況において、全ての間充織細胞は、同等に機能している (等価である) と考えられることから、一種の間充織細胞には少なくとも二つの形態形成能が備わっていることが示唆される。

#### 1-4 本研究の目的

前項で述べたように、イトマキヒトデ胚の初期発生過程において、間充織細胞は重要な二つの形態形成能を有していることが判明している。しかしながら、これらの知見は、上皮—間充織相互作用の視点からの研究で得られたものでない。また、後期発生過程であるビピンナリア幼生期からブラキオラリア幼生期における間充織細胞の形態形成能に関する知見もない。このような現状を踏まえ、上皮—間充織相互作用の視点から、イトマキヒトデの形態形成における間充織細胞の機能をより広く、またより深く解明するためには、初期から後期発生過程を俯瞰した間充織細胞の分布パターンや細胞数の正確な把握、ならびに新たな実験アプローチをとおして間充織細胞の未知なる機能実体を探索することが必要である。

本研究の目的は、(1) 外、中、内胚葉の上皮シートの変形により生じる種々の器官形成を連関させながら、間充織細胞が出現する原腸胚中期から外部環境のシグナルにより成体へと変態可能なブラキオラリア幼生期に至るまでの広範な発生過程における間充織細胞の時空間的配置と間充織細胞数を記述すること、(2) 上皮細胞と間充織細胞の相互作用を解析できる細胞レベルでの実験系を創出し、間充織細胞の数を増加させた実験下で上皮シートの形態形成にどのような影響が生じるかを明らかにすることである。これら二つの研究は、第2章と第3章に記述する。また、以上の研究結果をもとに、第4章では予備的に行

っている分子レベルでの研究結果を含め、イトマキヒトデの形態形成過程における間充織細胞の機能研究の展望を論じる。

## 第 2 章

### 間充織細胞の時空間的配置と数の変化

## 2-1 緒言

本章では、間充織細胞マーカーとして MC5 モノクローナル抗体 (MC5 Mab) を用いた。MC5 Mab は、培養下に単離された間充織細胞を抗原として作成された。先行研究から、MC5 Mab が認識する抗原分子は、間充織細胞の膜表面に露出しているタンパク質であることが判明していた (Kadota et al., 2001)。それゆえ、間充織細胞の輪郭を把握し、その形態を正確に捉えることが可能である。本章では、初めに間充織細胞マーカーとしての MC5 Mab の有効性を検討した。続いて、MC5 Mab を用いて発生過程における間充織細胞の時空間的分布と、胞胚腔中に存在する間充織細胞の数の変化について解析した。

## 2-2 間充織細胞マーカーとしての MC5 Mab の評価

4つの発生段階 (胞胚 (受精 16 時間、Fig. 1-1A)、原腸胚 (受精 24 時間、Fig. 2-3A, C)、原腸胚 (受精 36 時間、Fig. 2-4B, E)、ビピンナリア幼生 (受精 72 時間、Fig. 2-5C, F))における固定した胚ならびに幼生に対して MC5 Mab を用いた免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡下で観察した (Fig. 2-1)。その結果、間充織細胞の膜表面にお強い陽性シグナルが検出された (Fig. 2-1C, D; arrows)。共焦点レーザー顕微鏡のレーザー強度を上げると、上皮細胞においても弱い陽性シグナルが検出された (Fig. 2-1A-D; arrowheads)。上皮細胞の MC5 Mab 陽性シグナルが間充織細胞と同様な生化学的性質を持つのかという問題を調べるために、同細胞数の間充織細胞と上皮細胞をサンプルとして、MC5 Mab による Western blotting を行った。間充織細胞と比べ、上皮細胞では、MC5 Mab に反応する抗原量は少なかったが、両サンプルで一本のバンドが 73 kDa の位置に検出された (Fig. 2-1E)。

次に、胞胚腔中における MC5 Mab の抗原特異性を検討した。イトマキヒトデ幼生の胞胚腔には、間充織細胞と同様に中胚葉由来の筋肉細胞が存在する (Miguchi et al., 2010)。そこで、MC5 Mab と rhodamine-phalloidin を用いて二重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡下で、筋肉細胞の産出器官である体腔囊領域を詳細に観察した (Fig. 2-2)。受精 48 時間幼生では、体腔囊から予定筋肉細胞が胞胚腔中へと細胞性突起を伸ばしていた (Fig. 2-2A, B; arrowheads)。受精 60 時間幼生では、体腔囊から移動した繊維状形態の筋肉細胞は食道を囲う様に存在していた (Fig. 2-2C, D; arrowheads)。どちらの発生時期においても、MC5 Mab は間充織細胞と反応したが、筋肉細胞とは反応しなかった (Fig. 2-2B, D)。

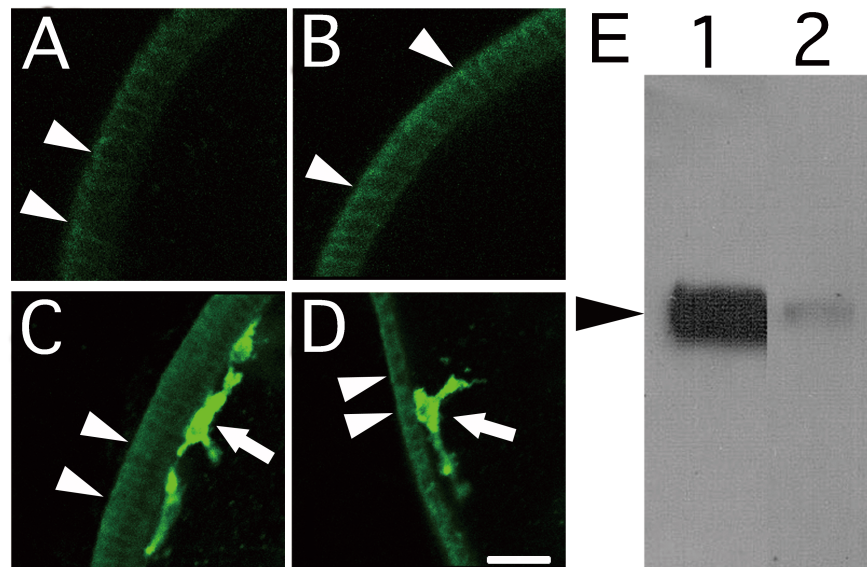


Fig. 2-1. Expression of MC5 Mab antigen in epithelial and mesenchyme cells at various stages of embryogenesis. (A) Blastula embryo (16 hr). (B) Mid-gastrula embryo (24 hr). (C) Late-gastrula embryo (36hr). (D) Bipinnaria larva (72 hr). Epithelial cells (arrowheads) and mesenchyme cells (arrows) show a very considerable difference in the intensities of their MC5 Mab fluorescence signals. Each epithelial cell can be distinguished by fluorescence signals in the cell boundaries (arrowheads). Scale bar: 20  $\mu$ m. (E) Western blot of equal number of mesenchyme cells (lane 1) and epithelial cells (lane 2) using MC5 Mab. MC5 Mab detects a single 73 kDa band in epithelial cells that is considerably weaker than in the mesenchyme cells.

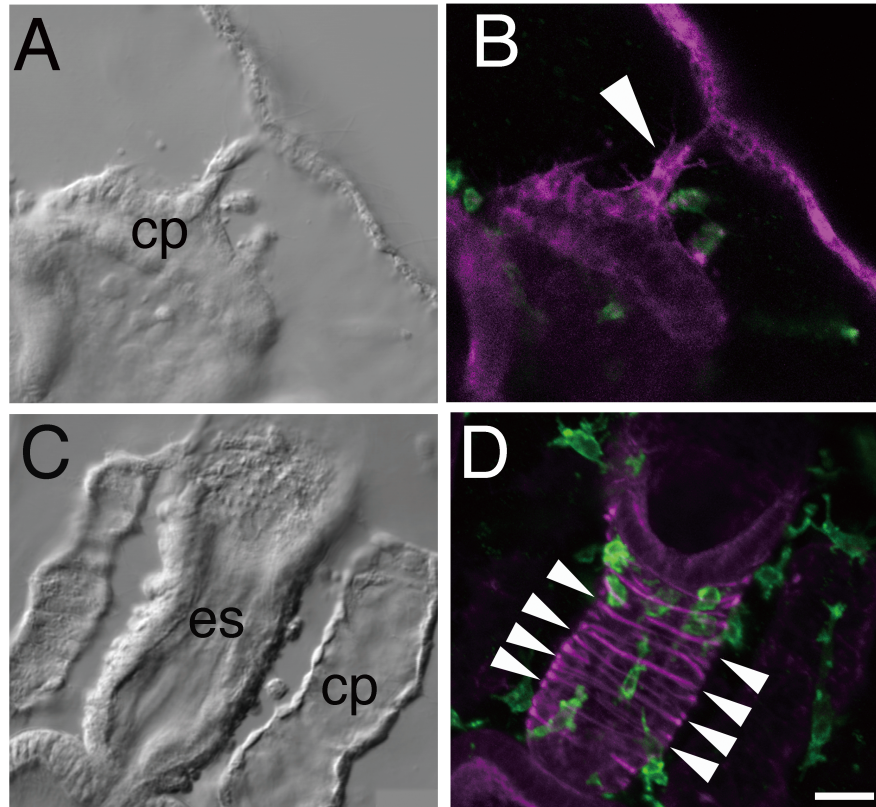


Fig. 2-2. Double staining of muscle and mesenchyme cells. Paired Nomarski (A, C) and confocal microscope (B, D) images of paraformaldehyde (PFA)-fixed sections that have been stained with MC5 Mab (green) and rhodamine-phalloidin (magenta). Rhodamine-phalloidin stains muscle cells in which actin filaments are abundant. A, B: 48 hr post-fertilization. A presumptive muscle cell (arrowhead) has emerged from the anterior coelom (cp). C, D: 60 hr post-fertilization. The differentiated muscle cells (arrowheads) acquire a thin morphology where they encircle the esophagus (es). Scale bar: 20  $\mu$ m.

### 2-3 器官形成過程における間充織細胞の分布パターン

2-2 項で述べたように、適切なレーザー強度の下では、MC5 Mab は間充織細胞マーカーとして有効であることが判明した。続いて、MC5 Mab を用い、上皮シートに生じる形態形成運動と連関させながら、間充織細胞が出現を開始する受精 24 時間の中期原腸胚から変態直前のブラキオラリア幼生期までの間充織細胞の胞胚腔中における時空間的配置を解析した。

**受精 24-30 時間**：間充織細胞は、受精 24 時間の原腸胚の原腸先端部から上皮-間充織転換を行った後、胞胚腔中へ移入を開始した (Fig. 2-3C)。受精 30 時間では、胞胚腔に出現した間充織細胞は球状の形態を示し、原腸先端部を中心として放射状に分布していた (Fig. 2-3D)。この発生段階では、胚体は前後軸に沿って回転対称を示していた (Fig. 2-3A, B)。

**受精 30-42 時間**：受精 33 時間以降の発生過程の原腸胚において、間充織細胞は枝分かれした糸状仮足を形成していた (Fig. 2-4A, D)。受精 36 時間では、胞胚腔中において間充織細胞の不均一な分布が見られた (Fig. 2-4B, E)。一部の間充織細胞は体腔囊と口を形成する原腸前方部周辺に集合するように分布し (Fig. 2-4B, E; parenthesis; Fig. 2-6, arrow)、残りは繊毛帯と消化管を形成する外胚葉壁、内胚葉壁に沿って分布していた (Fig. 2-4B, E)。受精 36 時間における間充織細胞の不均一な分布パターンは、受精 33 時間で観察される均一な分布パターンと対照的であった (see also Fig. 2-4D)。

受精 36 時間で観察された間充織細胞の不均一な分布パターンは受精 42 時間には解消されていた (Fig. 2-4F)。この発生時期では、内胚葉が消化管へ、外胚葉では繊毛帯が分化を開始する (Fig. 2-4C, arrowheads)。さらに、後体腔囊を形成するために原腸の左側後方部から小さな隆起が生じる (Fig. 2-4C, arrow)。その後、

口が開口することによって、原腸胚期からビピンナリア幼生期へと胚は発生をシフトする。

**受精 42-72 時間**：ビピンナリア幼生は、ヒトデ発生段階において最初の幼生期として言及されている。この時期、間充織細胞は糸状突起をさらに発達させた複雑な形状を示す (Fig. 2-5D-F)。ほとんどの間充織細胞は、器官形成が進行しつつある外胚葉ならびに内胚葉壁 (Fig. 2-5A-C; Fig. 2-7) の裏側に配置していた (Fig. 2-5D-F)。特筆すべきは、多数の間充織細胞が外胚葉を三つの領域 (口側、側方、反口側) に区画する二環の繊毛帯 (Fig. 2-7B; cf. Fig. 4 of Nakajima et al., 2004) の裏側に沿って分布していたことである。その結果、間充織細胞は胞胚腔中において今までと異なった不均一な分布パターンをとる (Fig. 2-5D-F)。また、ビピンナリア幼生期では、間充織細胞がお互いの糸状仮足を接着、脱離を繰り返しながらネットワーク構造を形成していることが報告されている (Furukawa et al., 2009)。

**受精 3-10 日**：この発生時期のビピンナリア幼生では、以後の発生時期であるブラキオラリア幼生期に向かって、外胚葉壁の一部が突出しビピンナリア腕とブラキオラリア腕を形成し始める (Fig. 2-8A, D)。受精 6 日において、多くの間充織細胞は、幼生の身体を覆う二環の繊毛帯に沿って分布していた (Fig. 2-8A, arrowheads)。MC5 Mab を施した免疫染色サンプルを口側および反口側から観察すると、間充織細胞の配置のみでイトマキヒトデ幼生に特有のフォルムが影絵のように浮かび上がる (Fig. 2-8B, C)。さらに、成長を開始した成体原基周辺に集合している間充織細胞も観察された (Fig. 2-8A, parenthesis; Fig. 2-8B, C)。

繊毛帯と形成途中の成体原基領域でみられる間充織細胞の偏った分布は、繊毛帯領域を含むビピンナリア腕 (Fig. 2-8D, black arrows) やブラキオラリア腕 (Fig. 2-8D, magenta arrows) の形成が進行する受精 10 日の発生時期においても維

持されていた (Fig. 2-8E, F)。この発生時期までに、成体原基はサイズを徐々に増大させ、幼生全長の約 1/3 になった (Fig. 2-8D, parenthesis)。

**受精 10 日以降**：ブラキオラリア腕 (Fig. 2-G, magenta arrows)ならびにビピンナリア腕 (Fig. 2-8G, black arrows)の成長に伴い、幼生はビピンナリア幼生からブラキオラリア幼生へと発生をシフトする (Fig. 2-8G, see also Fig. 2-8D)。ブラキオラリア幼生の体長は、前後軸に沿って約 1.5 mm であった。受精 10 日以降、多くの間充織細胞は繊毛帯に沿って分布していた (Fig. 2-8H, I)。一部の間充織細胞は、伸長過程にあるビピンナリア腕ならびにブラキオラリア腕の先端部に集合していた (Fig. 2-8H, I, arrowheads)。

無機質性の骨片が形成される成体原基 (Fig. 2-9A, arrowheads) では、多くの間充織細胞は外胚葉壁と体腔囊に挟まれた領域に分布していた (Fig. 2-9A)。これらの間充織細胞は、成体原基中で特に骨片周囲に高密度で分布し、まるで“島”のような配置を示した (Fig. 2-9B, arrowheads)。共焦点レーザー顕微鏡を高倍率に設定し、MC5 Mab とカルセインによる二重染色サンプルを観察すると、すべての間充織細胞において、MC5 陽性シグナルと骨片に取り込まれたカルセインのシグナルは重ならなかった (Fig. 2-9C, D)。

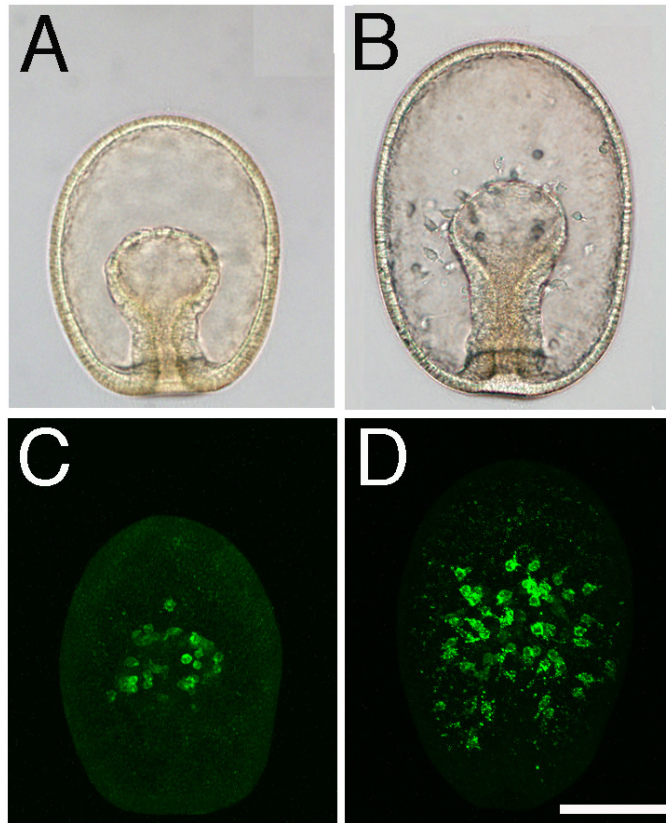


Fig. 2-3. Organ formation and mesenchyme cell distribution during the early developmental period (24 - 30 hr). Light microscopic images of living embryos (A, B), and stacked fluorescence images of MC5 Mab stained embryos (C, D). A, C: 24 hr post-fertilization. Mesenchyme cells begin to ingress into the blastocoel from the tip of the archenteron. B, D: 30hr post-fertilization. Mesenchyme cells are uniformly distributed in the blastocoel. Scale bar: 100  $\mu$ m.

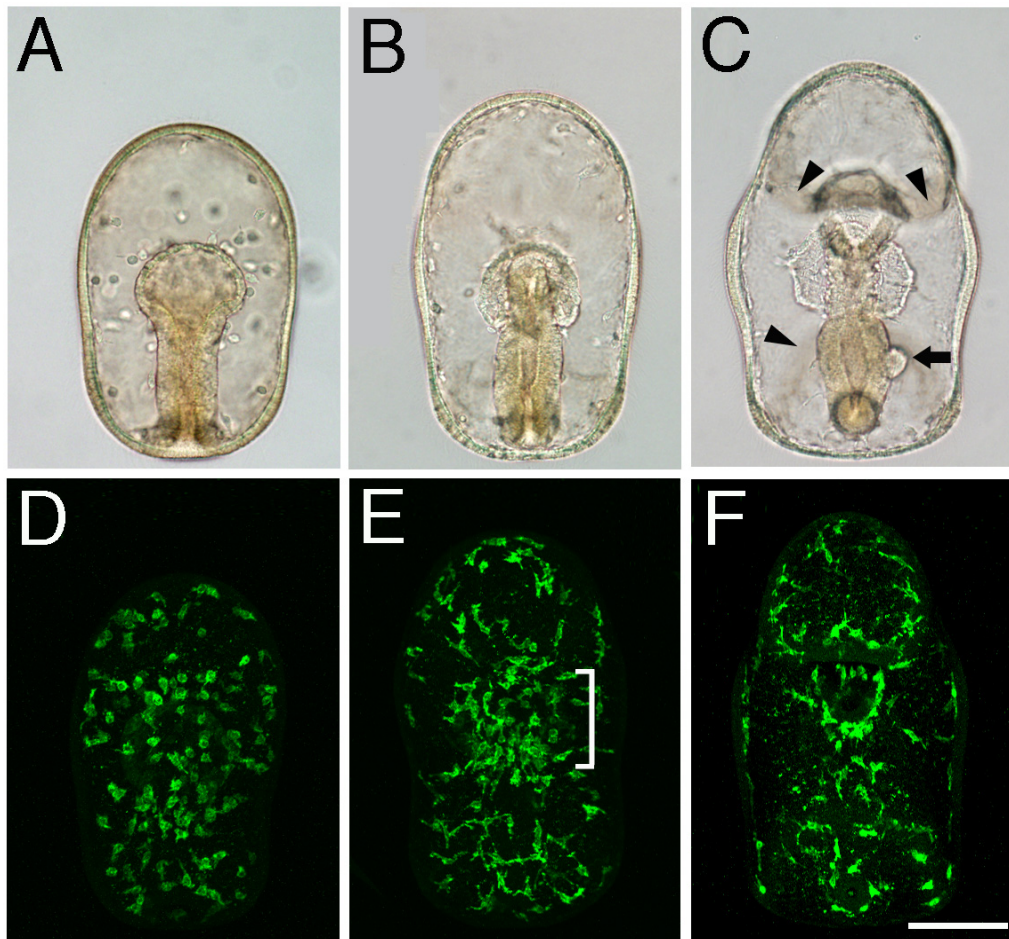


Fig. 2-4. Organ formation and mesenchyme cell distribution during the early developmental period (30 - 42 hr). Light microscopic images of living embryos (A-C; oral view), and stacked fluorescence images of MC5 Mab stained embryos (D-F). A, D: 33 hr post-fertilization. B, E: 36 hr post-fertilization. C, F: 42 hr post-fertilization. The primordia of some organs become apparent and there is a synchronous change in the distribution patterns of the mesenchyme cells. A significant number of mesenchyme cells can be seen to cluster around the tip of the archenteron in (E) (parenthesis). Black arrowheads, primordium of the ciliary band; arrow, the posterior coelom. Scale bar: 100  $\mu$ m.

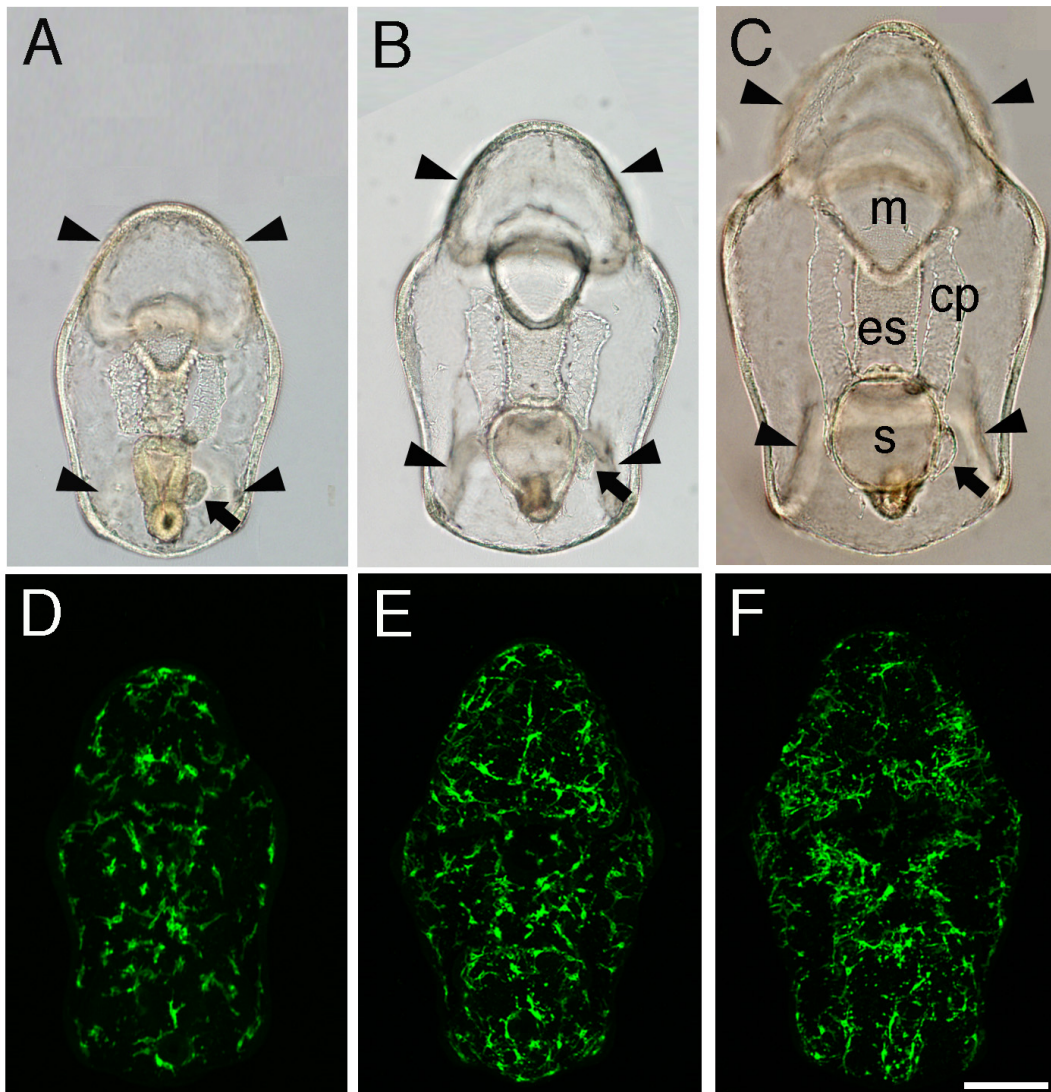


Fig. 2-5. Organ formation and mesenchyme cell distribution patterns during the early developmental period (42 - 72 hr). Light microscopic images of living larvae (A-C; oral view), and confocal stacked images of MC5 Mab stained larvae (D-E). A, D: 48 hr post-fertilization. B, E: 60 hr post-fertilization. C, F: 72 hr post-fertilization. Some mesenchyme cells become distributed along the ciliary band, while the epithelial monolayer forms intrinsic organs, such as the ciliary band (arrowheads), mouth (m), esophagus (es), stomach (s), and coelom (cp). Arrow, the posterior coelom. Scale bar: 100  $\mu$ m.

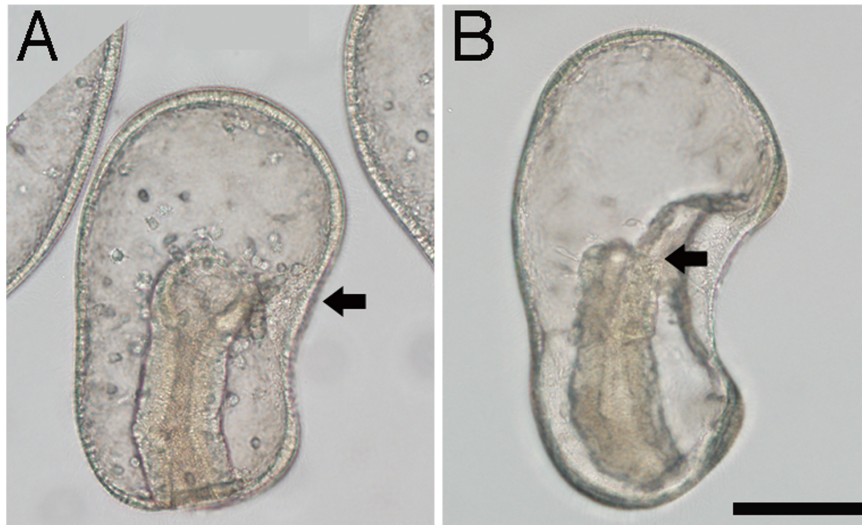


Fig. 2-6. Lateral views of gastrula embryos during the early developmental period (30 - 42 hr). Light micrographs were taken at 33 hr (A) and 40 hr (B) post-fertilization. The presumptive oral ectoderm bends to form the mouth (arrow), thereby establishing an oral-aboral axis in the embryo. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ .

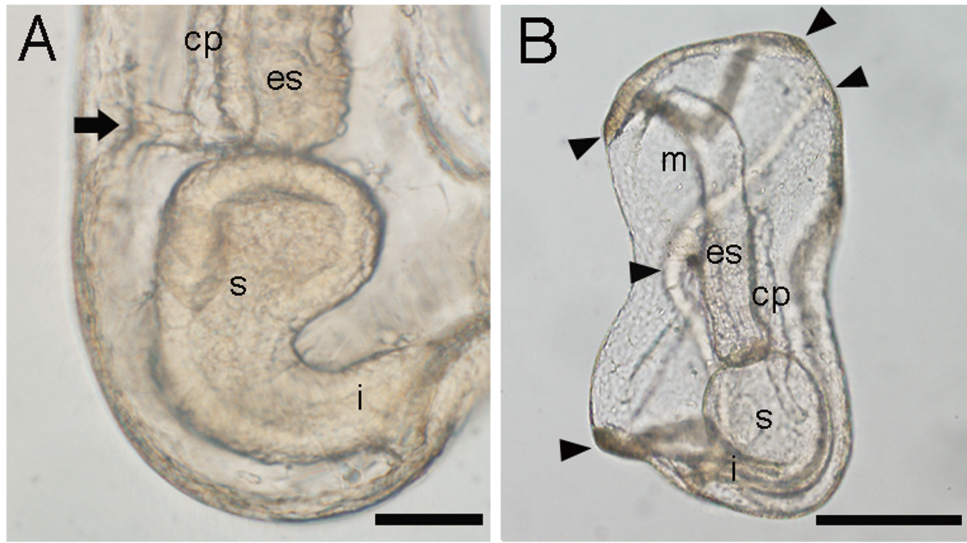


Fig. 2-7. Lateral views of bipinnaria larvae during the early larval period (42 - 72 hr). Light micrographs were taken at 72 hr post-fertilization. A: A hydopore (arrow) has opened in the dorsal ectodermal wall. B: The preoral, lateral and aboral ectodermal walls are encircled by two rows of ciliary bands (arrowheads). Abbreviations are as follows: es, esophagus; s, stomach; i, intestine; cp, the anterior coelom; m, the mouth. Scale bars: 50  $\mu$ m in A; 100 $\mu$ m in B.

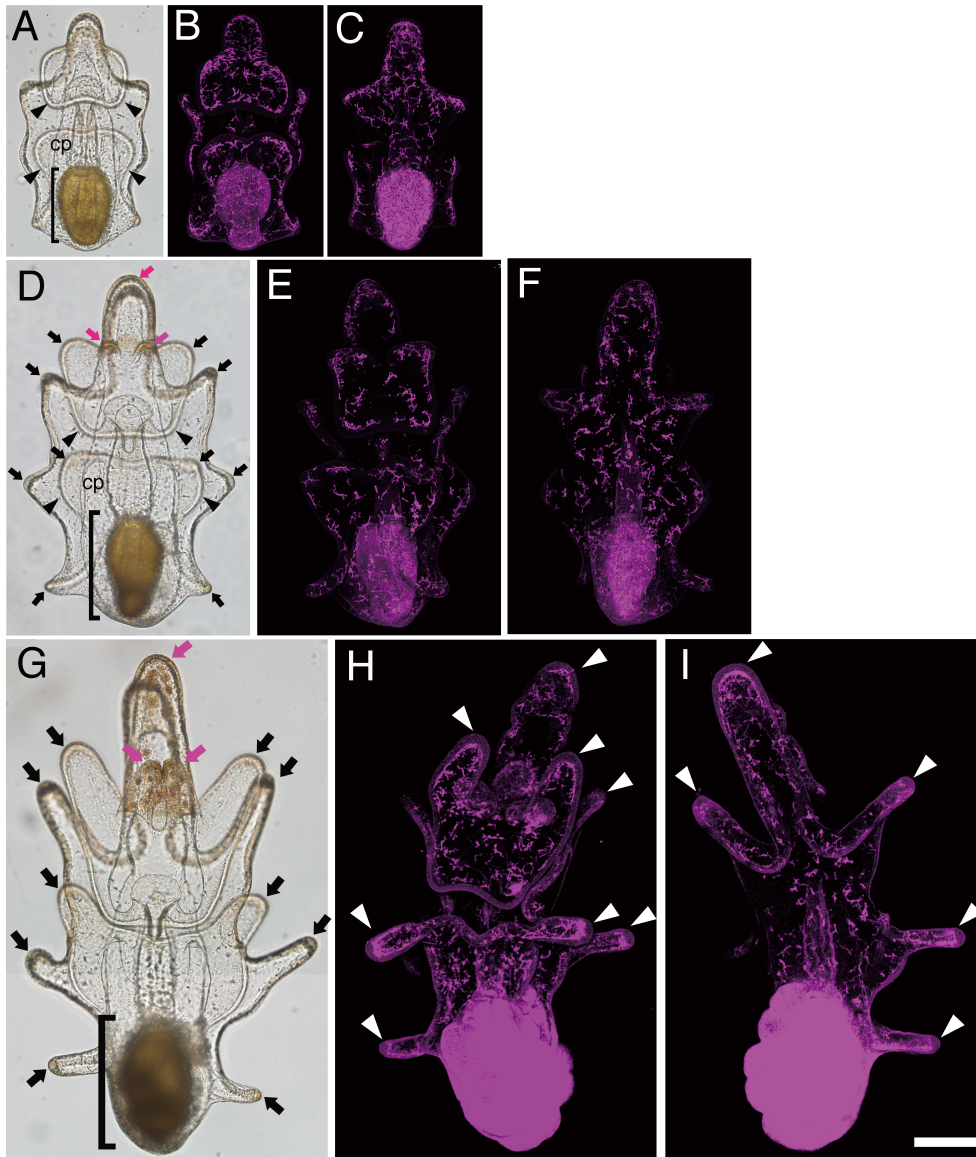


Fig. 2-8. Organ formation and mesenchyme cell distribution during the late larval period (post-3 days). Light microscopic images of larvae (A, D, G; oral view), and confocal stacked images of MC5 Mab stained larvae (B, E, H, oral view; C, F, I, aboral view). A-C: 6-day-old bipinnaria larva. D-F: 10-day-old brachiolaria larva. G-I: 21-day-old brachiolaria larva. In (G), three brachiolar arms (magenta arrows) and ten bipinnaria arms (black arrows) are seen to form larval appendages, and the adult rudiment has become opaque (parenthesis). During this period, some mesenchyme cells have accumulated at the tip of the larval arms (white arrowheads). Symbols and letters indicate the following: black arrows, the bipinnaria arms; magenta arrows, the brachiolar arms; black arrowheads, the ciliary band; white arrowheads, the tip of the larval arms; parenthesis, the adult rudiment; cp, the anterior coelom. See text for further explanation. Scale bar: 200  $\mu$ m.

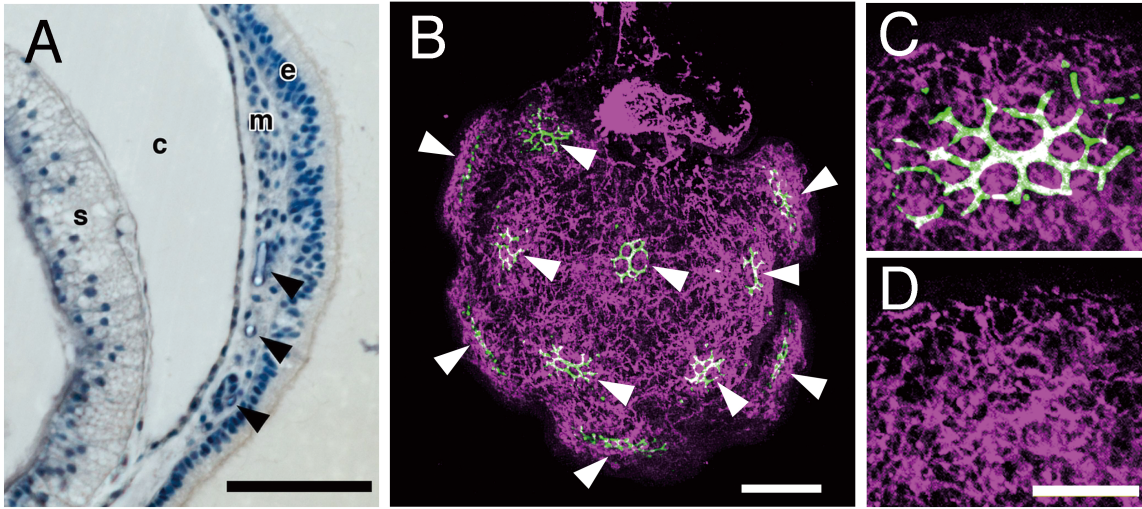


Fig. 2-9. Mesenchyme cells in the adult rudiment. A: Section through the adult rudiment of a plastic-embedded 14-day-old brachiolaria larva. Some spicules (arrowheads) are present in a population of mesenchyme cells in the blastocoelic region: e, ectodermal wall; m, mesenchyme cells; c, cavity of coelom; s, stomach. B: An adult rudiment of a calcein-labeled 21-day-old brachiolaria larva. Mesenchyme cells cluster to form “islets” around each spicule (arrowheads). C, D: Higher magnification of an “islet” formed by mesenchyme cells (21-day-old brachiolaria larva). The same region of the “islet” is shown double-stained for calcein (green) and MC5 Mab (magenta) in (C), but only for MC5 Mab (magenta) in (D). Scale bars: 50  $\mu\text{m}$  in A; 100  $\mu\text{m}$  in B; 20  $\mu\text{m}$  in C, D.

## 2-4 発生過程における間充織細胞の数の増加

Fig. 2-3、2-4、2-5 で見られるように、間充織細胞は受精 24 時間の原腸胚の原腸先端部から胞胚腔中に出現を開始し、発生を通じて数が増加していた。そこで、原腸胚からビピンナリア幼生の発生過程 (24 時間、30 時間、36 時間、42 時間、48 時間、60 時間、72 時間)における間充織細胞の数と、胚ならびに幼生の構成細胞数を計測した。

この発生段階において、胞胚腔中に存在する間充織細胞の数の増加パターンは一定でなかった (Fig. 2-10, see also Supplementary Table 2-1)。受精 24 時間から出現を開始した間充織細胞は、受精 30 時間には  $69 \pm 7$  個の間充織細胞が胞胚腔中に出現しており、一時間あたり約 11 個の増加率であった。その後、受精 30-42 時間にかけて、その増加率は約 2 個へと減少し、受精 36 時間ならびに 42 時間では、それぞれ  $85 \pm 3$  個、 $92 \pm 2$  個の間充織細胞が胞胚腔中に存在していた。続いて、増加率は受精 42-48 時間にかけて再び上昇し一時間あたり約 5 個となり、受精 48 時間では  $124 \pm 6$  個の間充織細胞が胞胚腔中に存在した。一方、48-72 時間にかけて増加率は再び減少し、受精 72 時間までは、一時間あたり約 1 個となり、受精 60 時間と受精 72 時間では、胞胚腔中の間充織細胞の数はそれぞれ  $133 \pm 3$  個、 $145 \pm 11$  個であった。また、各発生段階における胚ならびに幼生の構成細胞数は、 $4,945 \pm 204$  個、 $5,733 \pm 61$  個、 $6,596 \pm 264$  個、 $8,093 \pm 111$  個、 $10,674 \pm 365$  個、 $13,378 \pm 252$  個、 $15,415 \pm 178$  個であった。受精 30 時間から 72 時間の発生過程において、胞胚腔中に存在する間充織細胞の数は、胚ならびに幼生を構成する全細胞数の約 1%であった (Fig. 2-10, parenthesis; see also Supplementary Table 2-1)。

上記の発生過程において、間充織細胞はどのようにしてその数を増加させているのかという問題を検証するために、受精 24 時間胚ならびに受精 48 時間幼生を BrdU を添加した ASW 中 (BrdU/ ASW) で 24 時間インキュベートした後、MC5 Mab と抗 BrdU 抗体を用いて二重免疫染色を行った (Fig. 2-11)。受精 24 時

間から 24 時間 BrdU で処理したサンプルでは、BrdU 陽性シグナルは、外胚葉のみならず、内胚葉においても一様に検出された (Fig. 2-11A, B)。同様に、受精 48 時間から BrdU 処理したサンプルでも、BrdU 陽性シグナルは外、内胚葉に検出され (Fig. 2-11C, D, E)、中胚葉器官である体腔囊においても同様に検出された (Fig. 2-11E, arrowheads)。特に、受精 48 時間から 24 時間 BrdU/ ASW でインキュベートされた幼生では、外胚葉に検出される BrdU の陽性シグナルが、成長過程における繊毛帯領域に高密度に検出された (Fig. 2-11C)。一方、どちらのサンプルにおいても、間充織細胞に BrdU 陽性シグナルは検出されなかった (Fig. 2-11B, D, E)。

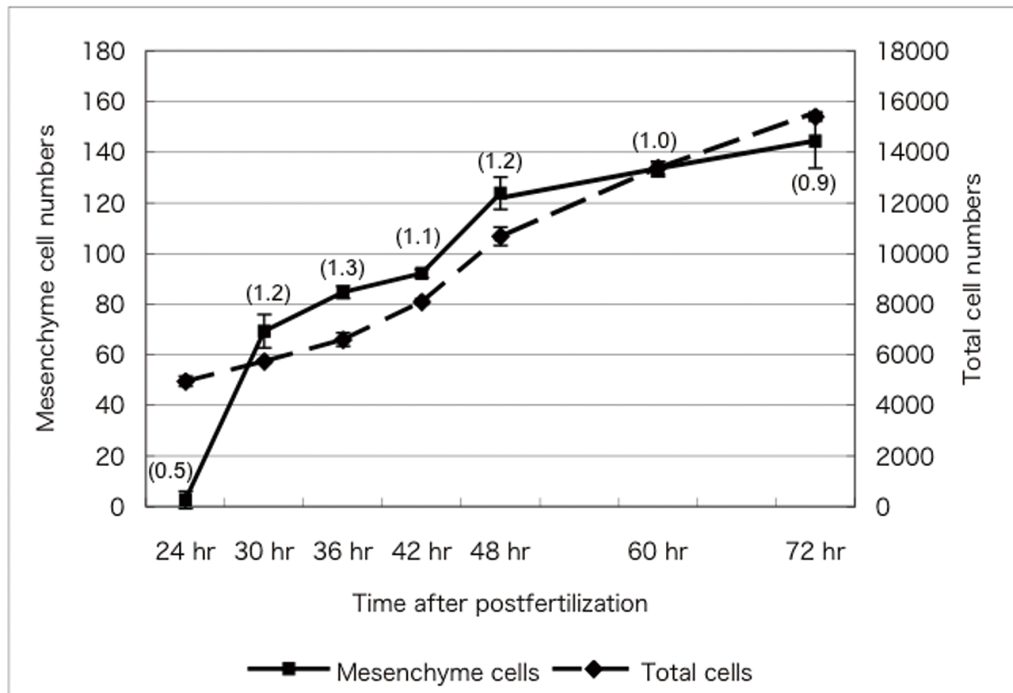


Fig. 2-10. Increases in the mesenchyme cell numbers and total cell numbers during the embryonic and early larval period. Points and bars show means  $\pm$  SD of values from three independent experiments; in each experiment, mesenchyme cell numbers were determined in ten embryos and larvae stained with MC5 Mab at each developmental time. The numbers in parentheses after the mesenchyme cell numbers indicate the mesenchyme/total cell ratio. The number of mesenchyme cells increased at different rates at different development intervals.

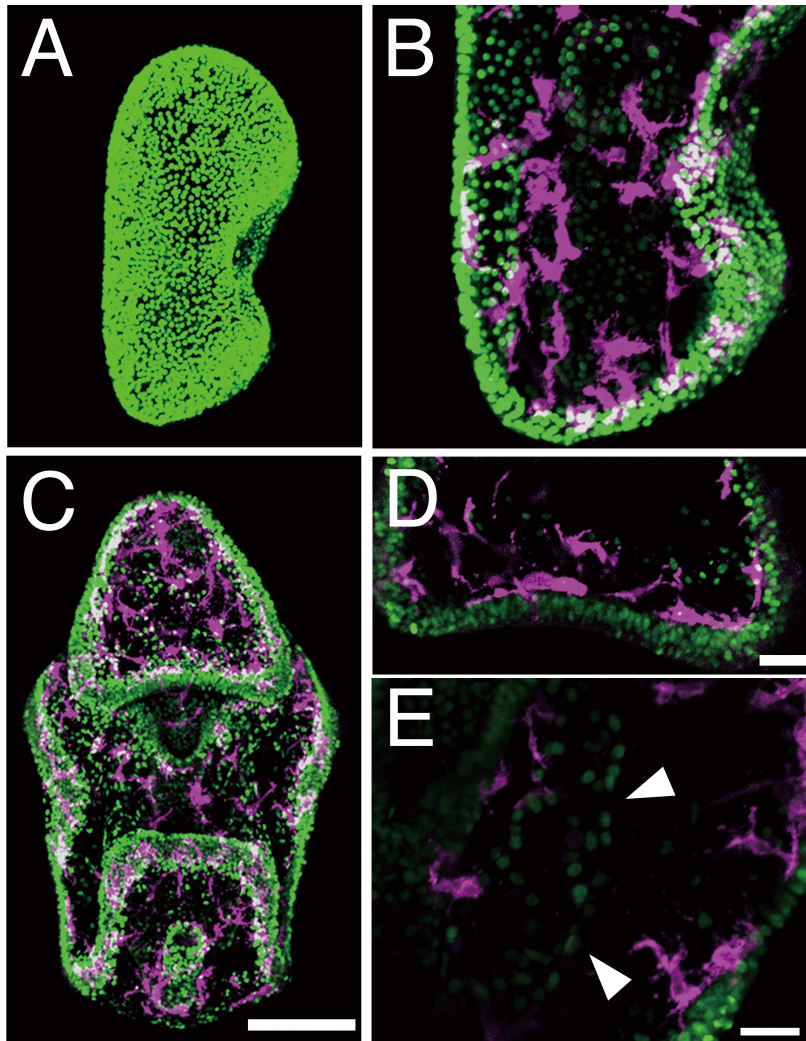


Fig. 2-11. BrdU-labeling experiment. A, B: Stacked fluorescence images of MC5 Mab stained samples cultured in the presence of BrdU from 24 to 48 hrs post-fertilization. BrdU-positive signals (green) are observed in ectodermal epithelial cells (A) and endomesodermal epithelial cells (B). C-E: Stacked fluorescence images of MC5 Mab stained samples cultured in the presence of BrdU from 48 to 72 hrs post-fertilization. BrdU-positive signals are prominent in the ciliary bands (C, D) and coelom (E; arrowheads). Notably, no BrdU-positive signals were seen in mesenchyme cells (magenta). Scale bars: 100  $\mu\text{m}$  in A, C; 20  $\mu\text{m}$  in B, D; 20  $\mu\text{m}$  in E.

**Supplementary Table 2-1. Mesenchyme cell and total cell numbers in embryos and larvae at different developmental stages in the starfish, *A. pectinifera***

	24 hr	30 hr	36 hr	42 hr	48 hr	60 hr	72 hr
Mesenchyme cells <sup>a</sup>	3±3	69±7	85±3	92±2	124±7	133±3	145±11
Total cells <sup>b</sup>	4945±204	5733±61	6596±264	8093±111	10674±365	13378±252	15415±178
Ratio (MCs/ Total)	0.5	1.2	1.3	1.1	1.2	1	0.9

<sup>a</sup>Mean and s.d. of mesenchyme cell numbers were calculated in 10 embryos and larvae from three independent batches (see also Fig. 2-10).

<sup>b</sup>Mean and s.d. of total cell numbers were calculated in 90 embryos and larvae from three independent batches.

## 2-5 考察

第2章では、最初に MC5 Mab が間充織細胞の時空間的配置を解析する抗体として有効であることを評価した (Fig. 2-1, 2-2)。続いて、間充織細胞が胞胚腔中に出現を開始する原腸胚期から変態直前のブラキオラリア幼生まで網羅した発生段階において、間充織細胞の分布パターンを解析した。その結果、間充織細胞は、発生を通して身体の中で均一に分布するのではなく、一過的あるいは半恒久的に特定の領域に偏って不均一に分布することが判明した。この間充織細胞の不均一な分布パターンは、外、内胚葉の上皮シートが器官形成を開始、進行と密接な関連があった。

### 間充織細胞の不均一な分布と様々の器官形成との相関性

受精 36 時間の原腸胚において、内胚葉上皮シートである原腸先端部は、体腔囊ならびに口を形成する過程で劇的な構造変化を示す (Fig. 2-4B)。受精 33 時間の原腸胚と比べると、受精 36 時間の間充織細胞は体腔囊、口形成領域の周りに密に分布している (Fig. 2-4E, parenthesis)。イトマキヒトデ胚ならびに幼生の胞胚腔は繊維状 ECM (4H11 繊維) で満たされており、受精 36 時間の原腸胚では、4H11 繊維は原腸先端部と外胚葉の予定口陥領域との間で高密度な状態に凝縮していることが示されている (Kaneko et al., 2005)。この 4H11 繊維の凝縮は、口形成過程において、原腸先端部と予定口陥領域とが融合するために両者ではさまれた空間が狭まって生じていると考えられている。また、間充織細胞は、4H11 繊維を足場として胞胚腔中を移動しているだけでなく、4H11 繊維に対して物理的張力発揮し胚体のフォルム形成に関与していること、さらにこの凝縮した 4H11 繊維をほぐすことで 4H11 繊維を再配置させ胚体の形態形成運動に関与しているとも考えられている (Kaneko et al., 2005)。このような予想に立脚すると、

口形成領域ならびに体腔嚢形成領域で観察される間充織細胞の一過的な密度の高い分布は、一部の間充織細胞が 4H11 繊維を再配置させることにより、体腔嚢形成ならびに口形成を円滑に進行させるために生じていると考えられる。また、この発生時期における間充織細胞の特徴的な不均一な分布パターンは、体腔嚢形成および口形成が完了すると解消されることから、上皮シートの形態形成運動と間充織細胞の分布に密接な関係があることが強く支持される。

幼生期における間充織細胞の不均一な分布パターンは、原腸胚期と異なった様相を呈する。これは、二つの器官形成過程における観察結果をもとに言及できる。一つは、繊毛帯形成である。繊毛帯は、幼生の身体を覆うように外胚葉において二環出現する。BrdU を用いた実験から、繊毛帯は、外胚葉で細胞増殖が活発に行われている領域と考えられる (Fig. 2-11C)。MC5 Mab と抗 BrdU 抗体の二重免疫染色サンプルでは、BrdU の取り込みが盛んに行われた繊毛帯に沿って多くの間充織細胞は密に分布していた (Fig. 2-11C, D)。これらの結果から、間充織細胞は、上皮細胞において細胞増殖が盛んに行われている領域に多く集合していると考えられる。それゆえ、間充織細胞が上皮細胞の増殖に関与している可能性が浮かび上がる (第 3 章参照)。この仮説は、上皮細胞の増殖が必要なブラキオラリア幼生の腕の先端部に間充織細胞が局所的に分布していた結果からも支持される (Fig. 2-8H, I)。また、繊毛帯には神経細胞が分布しており、軸索を伸ばしたネットワーク構造が形成されていることが報告されている (Nakajima et al., 2004; Murabe et al., 2008)。この事実から、間充織細胞が繊毛帯に分布して、神経細胞の分化、神経細胞の軸索伸長や神経ネットワーク形成に関与している可能性がある。

二つ目は、ブラキオラリア幼生期において間充織細胞は成体原基の形成が行われる領域に数多く分布することである。この時期の間充織細胞は、発達しつつある成体骨片の周辺に集まって“島”状の分布パターンを示した (Fig. 2-9A, B)。

この事実から、間充織細胞が骨片形成過程に関与している可能性は高い。MC5 Mab が骨片を認識しない事実から (Fig. 2-9C, D)、間充織細胞自身が骨片に分化するのではなく、骨片形成をサポートする役割を担っている可能性が考えられる。逆に、骨片形成が生じることに先立って、間充織細胞は脱分化したのかもしれない。現在まで、ヒトデ幼生で開始される成体骨片の形成過程における上皮—間充織細胞相互作用についての報告はない。

上述した器官以外の形成過程においても、間充織細胞の不均一な分布パターンが生じている可能性も考えられる。間充織細胞は、一過的に狭い領域に集合しているのかもしれない。間充織細胞の不均一な分布パターンの重要性を統合的に理解するために、あらゆる器官形成時における外胚葉ならびに内、中胚葉の上皮シートの形態形成運動と間充織細胞の分布パターンの連関性をより詳細に解析する必要があると考えられる。

### 間充織細胞数の増加のメカニズム

本章で間充織細胞は受精 24 時間の原腸胚から出現を開始し、発生の進行に伴いその数を増加していることが明らかになった (Fig. 2-10)。また、受精 24 時間の原腸胚から受精 72 時間のビピンナリア幼生における間充織細胞の数の定量的解析から、その増加率は発生を通じて一定ではないことが判明した (Fig. 2-10)。間充織細胞の増加率と上皮シートの形態形成の関連において、間充織細胞の増加率が下がる発生時期は、上皮シートがダイナミックに形態を変化させる体腔嚢形成期ならびに口形成期と一致していた (Fig. 2-4)。それゆえ、上皮シートが盛んに形態形成運動をしている時期では、上皮シートが形態形成運動していない時期と比べて、間充織細胞が胞胚腔中に出現する数は減少していることが考えられる。さらに、本実験から、受精 30 時間から 72 時間にかけて、間充織細

胞の数は、胚体、および幼生の構成細胞数の約 1%であることが判明した (Fig. 2-10)。この比率は、受精 4 日のビピンナリア幼生でも見られている (Furukawa et al., 2009)。全構成細胞数において間充織細胞の比率が一定である現象は興味深い。

Fig. 2-3A, C で示されたように、間充織細胞は、受精 24 時間の原腸胚の原腸先端部から出現を開始する。以後、発生の進行に伴って胞胚腔中に存在する間充織細胞の数は増加し続ける (Fig. 2-10)。一方、BrdU を用いた実験から、間充織細胞自身は細胞分裂せずに、数だけが増加していることが明らかになった (Fig. 2-10, 2-11)。この事実は、原腸先端部自体が存在しなくなる口形成期以降において、間充織細胞を産出する器官が存在することを示唆している。その有力な候補として、体腔嚢が考えられる。体腔嚢は、間充織細胞が分化してくる原腸先端部に由来する器官である。しかしながら、MC5 Mab を用いた免疫染色では、発達過程の体腔嚢に、受精 24 時間の原腸胚の原腸先端部で見られたような陽性シグナルを検出することはできなかった (Fig. 2-3C)。間充織細胞は、MC5 Mab が認識する抗原の合成を行わずに胞胚腔中へ移入し、移入直後から抗原の合成を初めているのかもしれない。

## 材料と方法

### 実験動物

イトマキヒトデ *Asterina pectinifera* を、5月上旬に東京湾、6月上旬に英虞湾、9月上旬に陸奥湾で採集した。これらは 15°C の恒温循環水槽内において pH 8.0 の人工海水 (Artificial seawater, ASW; MARINE ART SF-1, Tomita Pharmaceutical) で飼育した。

### 受精ならびに幼生飼育

ハサミとピンセットを用いて雌個体から外科的に取り出した卵巣を、10  $\mu$ M 1-methyladenine (1-MA; Sigma) を含んだ ASW で処理することにより成熟卵を得た (Kanatani, 1969)。雄個体から精巣を同様に取り出し、ASW で適切な濃度に希釈することで精子懸濁液を得た。パスツールピペットを用いて成熟卵の入った ASW 中に精子懸濁液を数滴加え、受精膜が形成されたことを確認した。バック 1 ml 量の受精卵に対し、300-500 ml の ASW を加え、プロペラを装着したモーター (SYNCHRONOUS MOTOR, JAPAN SERVO) で攪拌しながら受精卵を 20°C で発生を進行させた。なお、異常発生を防ぐ為に、1-MA 処理後 40 分以内に受精を完了させた。受精 3 日から珪藻 *Chaetoceros gracilis* を 4 日おきに与え、さらに 20°C で発生を進行させた (Murabe et al., 2007)。

### BrdU ならびにカルセイン処理

細胞増殖活性を解析するために、受精 24 時間の原腸胚、ならびに受精 48 時間のビピンナリア幼生に対し、終濃度 5  $\mu\text{M}$  となるように 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, Sigma) を ASW に加えた。各サンプルは 20°C で 24 時間発生させた。

骨片を染色するために、20  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  となるようにカルセイン (Dojindo) を加えた ASW 中でビピンナリア幼生 (受精 72 時間) を飼育し、20°C で目的の発生段階になるまで飼育した。

## 固定・染色

受精 16 時間から受精 60 時間の発生段階の胚ならびに幼生は、2% (w/v) paraformaldehyde (PFA, Sigma) / 1.5 x ASW を用いて、室温で 2 時間固定した。受精 72 時間以降の幼生に対しては、6.8%  $\text{MgCl}_2$  中で数分間インキュベートした後、前述の方法で固定した。これらは、0.01% TritonX-100 (TX-100, Wako Pure Chemical Industries Ltd.) を含んだ生理食塩水 (phosphate buffer saline containing 0.1% TX-100, PBST) で洗浄後、冷アセトン (Wako Pure Chemical Industries Ltd.) を用いて、-20°C で 20 分間後固定を施した。この固定後に以下の操作を行った。PBST を用いて 10 分間ずつ 5 回洗浄後、一次抗体の非特異的結合を防ぐために、10% (v/v) ウシ胎児血清 (fatal bovine serum, FBS; JRH BIOSCIENCES) を含んだ PBST (FBS-PBST) 中において、室温で 1 時間インキュベートした。その後、一次抗体として、MC5 Mab を加え、室温で 30 分間インキュベートし、PBST で 10 分間ずつ 3 回洗浄後、二次抗体として Alexa 488 標識ヤギ抗マウス IgG (H+L) (Molecular Probes、FBS-PBST で 3000 倍希釈)、または Alexa-568 標識 F(ab')<sub>2</sub> ヤギ抗マウス IgG (H+L) (Molecular Probes、FBS-PBST で 2000 倍希釈) を加え、室温で 30 分間インキュベートした後、PBST を用いてよく洗浄した

筋肉細胞の検出には、上述の方法で MC5 Mab 染色を行った受精 48 時間ならびに 60 時間幼生に対し、rhodamine-phalloidin (2 units/ ml、Molecular Probes) を

含んだ PBST を加え、室温で 30 分間インキュベートした。続いて、PBST で 10 分間ずつ 5 回洗浄し観察サンプルとした。

核内に取り込まれた BrdU の検出は以下のように行った。BrdU で処理を行った後、前述の方法で固定をした胚ならびに幼生を、PBST により 2N に希釈した 12N-HCl (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) 中で 2 時間室温でインキュベートした。PBST で 10 分間ずつ 5 回洗浄後、前述の方法で MC5 Mab による免疫染色を行った。その後、PBST で 20 倍に希釈した FITC 標識ラット抗 BrdU IgG<sub>2a</sub> (Oxford Biotech, Ltd.) を加え、室温で 30 分インキュベートした後、PBST を用いてよく洗浄した。

カルセイン処理を行った胚に対する染色は以下のように行った。上記の方法で固定後、サンプルを NBT/ BPT 溶液 (Roche, Tris-HCl 緩衝液 (0.1 M Tris-HCl, pH 9.5, 0.1 M NaCl, 0.05 M MgCl<sub>2</sub>) で 50 倍希釈) で消化管が紫色に呈するまで室温でインキュベートした。着色後、Tris-HCl 緩衝液を用いて反応を停止させ、PBST で洗浄し、上述したように MC5 Mab を用いて免疫染色を行った。

## 光学顕微鏡ならびに共焦点レーザー顕微鏡

生きた胚ならびに幼生は、ビニールテープをスペーサーに用いたスライドグラスにマウントし、光学顕微鏡 (IX71, Olympus) 下で観察した。各種の染色を施した胚ならびに幼生は、共焦点レーザー顕微鏡 (FluoView FV300, Olympus) を用い、Alexa 488、カルセインならびに FITC はアルゴンレーザー (487 nm)、Alexa 568 と rhodamine-phalloidin はヘリウムネオンレーザー (543 nm) を照射して観察した。上皮細胞における MC5 分子の蛍光を検出する場合、共焦点レーザー顕微鏡のレーザー強度の設定値 (PMT) を 800 に、間充織細胞の検出には PMT を 600 に設定した。間充織細胞の分布パターン解析のために、光学切片像を 1  $\mu\text{m}$  ごとに撮影し、スタック像を作成した。

## 構成細胞数ならびに間充織細胞数の測定

各発生段階の胚、ならびに幼生の構成細胞数の計測は以下のように行った (Hamanaka et al., 2010)。30 匹の胚、あるいは幼生を集め、細胞解離液 (dissociation medium containing EDTA and trypsin, DMET; 1.2 M glycine, 2 mM EDTA, 0.1% Trypsin) で軽く洗い、新たな DMET で 100  $\mu$ l までメスアップし、室温で 5 分間インキュベートした。その後、80  $\mu$ l にセットしたピペットマン (P200, Gilson) で 20 回懸濁し、血球計算版 (#A106, Sunlead Glass Corporation) を用いて、位相差顕微鏡下 (CK2, Olympus) で計数し、それぞれの発生段階における 1 個体あたりの構成細胞数を求めた。

各発生段階における間充織細胞の数は、以下のように計測した。MC5 Mab の免疫染色サンプル一個体ごとに、共焦点レーザー顕微鏡を用い 1  $\mu$ m 間隔で撮影した光学切片像を重ね合わせ、MC5 Mab 陽性シグナルを有した細胞を計数し、これらの総計を間充織細胞数とした。各発生段階において 10 個体のサンプルから間充織細胞数を求めた。

3 個体の親バッチを材料として得た構成細胞数ならびに間充織細胞数のデータについて、その平均ならびに標準偏差を算出した。

## プラスチック切片の作成

6.8%  $MgCl_2$  溶液で処理したブラキオラリア幼生を 5% グルタルアルデヒド / ASW を用い、室温で 1 時間インキュベートし、エタノールシリーズ中で脱水した。その後、サンプルを GMA-Quetol-523 樹脂 (Quetol 523M, NISSHIN EM COPORATION) 中に包埋し、ミクロトーム (Microm HM 340 rotary, Carl Zeiss)

を用いて厚さ 5  $\mu\text{m}$  の切片を作成した。切片はスライドガラスにのせ、Mayer's Hematoxylin (Wako Chemicals) で染色後、Aquatec (Merck) にマウントした。

## SDS-PAGE および Western blotting

培養間充織細胞の作成は、Kaneko et al.の方法に従った (Kaneko et al., 1995)。上皮細胞は、受精 16 時間後の胞胚を個々の細胞に解離することにより得た。これらのサンプルを  $4 \times 10^5$  個になるようにエッペンチューブに集め、卓上俺心機で 1 分間遠心し、上清を取り除いた。続いて、ホモジェナイズ緩衝液 (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM Leupeptin) を 44  $\mu\text{l}$  加え、氷上で 30 分間インキュベートした。その後、さらに懸濁を行い、15,000 rpm で 10 分間遠心し、沈殿画分を得た。この画分に等量の 2 $\times$ サンプルバッファー (125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 20% (v/v) glycerol, 100  $\mu\text{l}/\text{ml}$   $\beta$ -mercaptoethanol) を加え、沸騰水中で 5 分間インキュベートした後、15000 rpm で 3 分間遠心した上清 20  $\mu\text{l}$  をサンプルとして、Laemmli の方法に従い、12.5 %のゲル (E-R12.5L, Atto Co.) を用いて SDS-PAGE を行なった(Laemmli, 1970)。泳動後、転写バッファー (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20%(v/v) MeOH) 中で、SDS-PAGE を行った分画サンプルをセミドライ式プロッティング装置 (Bio-Rad) と電源装置 (AE8270, ATTO Co.) を用いて、1.5 mA/  $\text{cm}^2$ 、20 V、1 時間の条件下で polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Millipore Co.) に転写した。続いて、PVDF 膜を 5 %スキムミルク/Tris-buffered saline (TBST, 50 mM Tris-HCl pH7.4, 150 mM NaCl, 0.05 % (v/v) Tween20) 中で、室温で 1 時間ブロッキングした。その後、PVDF 膜の転写面を MC5 Mab で浸し、PVDF 膜をパラフィルムで挟み、4  $^{\circ}\text{C}$  でインキュベートした。翌日、5%スキムミルク/TBST で 20 分洗い、5 %スキムミルク/TBST で 1000 倍に希釈した horseradish peroxidase (HRP) 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体を室温で 1 時間反応させた。最後に PVDF 膜を 5 %スキムミルク/TBST で 3 回洗い、TBST で 10 分間ず

つ3回洗った後に、Western Blotting Detected Reagands Solution (Amarsham Biosci.)  
を用い、X線フィルム (Fuji Photo Film Co.) に感光させ、現像した。

## 第 3 章

### 間充織細胞の上皮細胞に対する増殖誘起能

### 3-1 緒言

形態形成過程の上皮—間充織相互作用において、間充織細胞の新たな機能探索を行った。そのアプローチとして、胚体内の間充織細胞数を増加させた場合の影響を解析した。先行研究で、培養下に単離された間充織細胞を正常発生胚の胞胚腔に顕微注射する技術は確立されていた (Kaneko et al., 2005; Furukawa et al., 2009)。また、予備的実験下で、様々な発生段階の胚の胞胚腔に培養間充織細胞を顕微注射し発生を進行させると、胚体のサイズが増大していることが観察されていた。この事実から、間充織細胞は上皮細胞に対して増殖誘起を行っている可能性が十分に考えられる。また、第2章で見出した間充織細胞が増殖の活発な外胚葉の上皮シート領域に偏って分布する観察もこの考えを支持する。本章では、胞胚から中期原腸胚の発生段階では間充織細胞が出現していないことに着目し、胞胚の胞胚腔中に培養間充織細胞を顕微注射することにより、間充織細胞の有無が上皮細胞の増殖にどのような影響を与えるかを主体的に解析した。

### 3-2 正常発生過程における胞胚から中期原腸胚での上皮細胞の増殖

最初に、注射実験のレシピエントとなる胞胚から中期原腸胚における形態形成と構成細胞数の変化に関して調べた。胞胚は、単層の上皮シートから構成された球状の形をしている (Fig. 3-1A, B)。その後、胞胚の植物極側領域は胞胚腔中へ陥入することにより原腸形成が開始され、中期原腸胚になると、原腸先端部は大きく膨れる。この一連の形態形成過程において、上皮細胞は単層のシート構造を維持していた (Fig. 3-1C, D)。30 個体の胚を用いて、胞胚ならびに中期原腸胚の構成細胞数を計測すると、それぞれ 1 個体あたり 3,326 (s.d.  $\pm$ 384)、4,744 (s.d.  $\pm$ 384) であった。また、アポトーシス細胞を検出する TUNEL (terminal

deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridinetriphosphate nick end-labeling) 法、ならびにネクロース細胞を検出する PI (propidium iodide) 法を用いて、胞胚から中期原腸胚の発生過程において細胞死が生じているか否かを調べた。Fig. 3-2で示すように、胞胚から中期原腸胚において TUNEL 陽性シグナルはほとんど検出されなかった (Fig. 3-2)。また PI 法でも、胚体を構成する全ての細胞の核においても PI 陽性シグナルは検出されなかった (data not shown)。

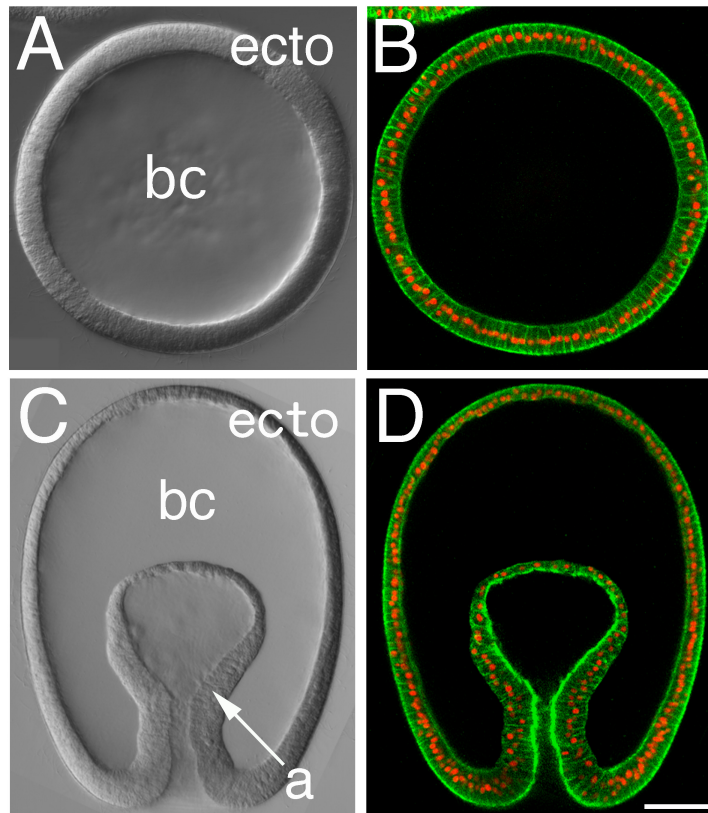


Fig. 3-1. Structure of blastula (A, B) and mid-gastrula embryos (C, D) of the starfish *Asterina pectinifera*. Blastula embryos reach the mid-gastrula stage after 8 hrs at 20°C. Paired Nomarski (A, C) and fluorescence (B, D) images of PFA fixed embryos optically sectioned at the median plane. Both blastula and mid-gastrula embryos are characterized by the presence of an epithelial monolayer and the lack of mesenchyme cells in the blastocoel. In panels (B) and (D), cell boundaries and the positions of nuclei in epithelial cells were identified after staining with phalloidin (green) and PI (red), respectively. bc, blastocoel; a, archenteron (endoderm); ecto, ectoderm. Scale bar: 50  $\mu$ m.

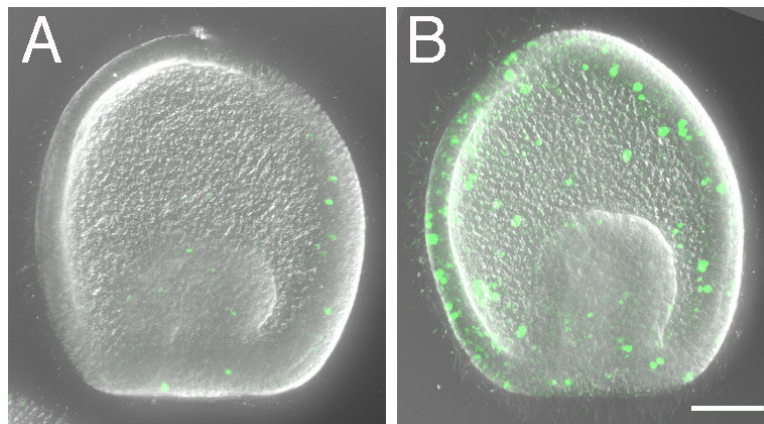


Fig. 3-2. Cell death assay in a normally developing gastrula embryo (A) and a positive control treated with DNase (B). Very few cell death-positive signals were detected in the normal embryo compared to the positive control. These embryos were fixed with PFA and then examined using the In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche) according to manufacturer's protocols. Scale bar: 50  $\mu$ m.

### 3-3 1 個体からの構成細胞数の計数系の確立

胞胚に達した胚は、どの親バッチ由来であっても、単層上皮シートから構成される球状の形をしているが、その大きさにばらつきが見られた (Fig. 3-3A-F)。そこで、胞胚期の各個体における大きさのばらつきと構成細胞数間にどのような関連があるのか以下の方法で調べた。1 個体の胞胚の上皮シートが占める体積を近似球体として求め (Fig. 3-3G)、続いて、バクテリアカウンターを用い同一個体で構成細胞数を計測した (材料と方法参照)。Fig. 3-3H は、4 バッチのヒトデ由来の 6 個体の胞胚における各 1 個体の胞胚の構成細胞数と同一個体の上皮シートが占める体積をグラフ上にプロットした結果である (Fig. 3-3H)。Fig. 3-3A-F で示されるように近似球体として得られた体積にばらつきは見られるものの、1 個体の胞胚の構成細胞数は 3,000 から 3,500 個の範囲に入っていた。この細胞数は、3-2 で 30 個体の胚を用いて算出された構成細胞数の値とほぼ同等であった。

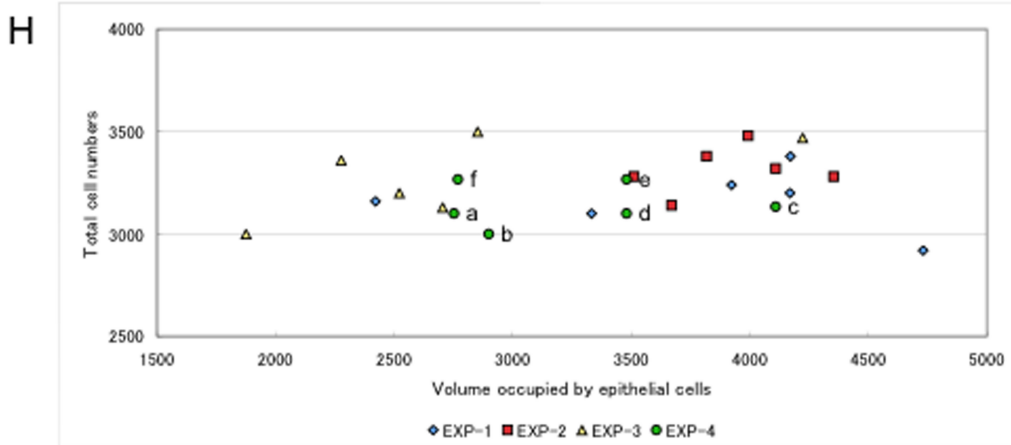
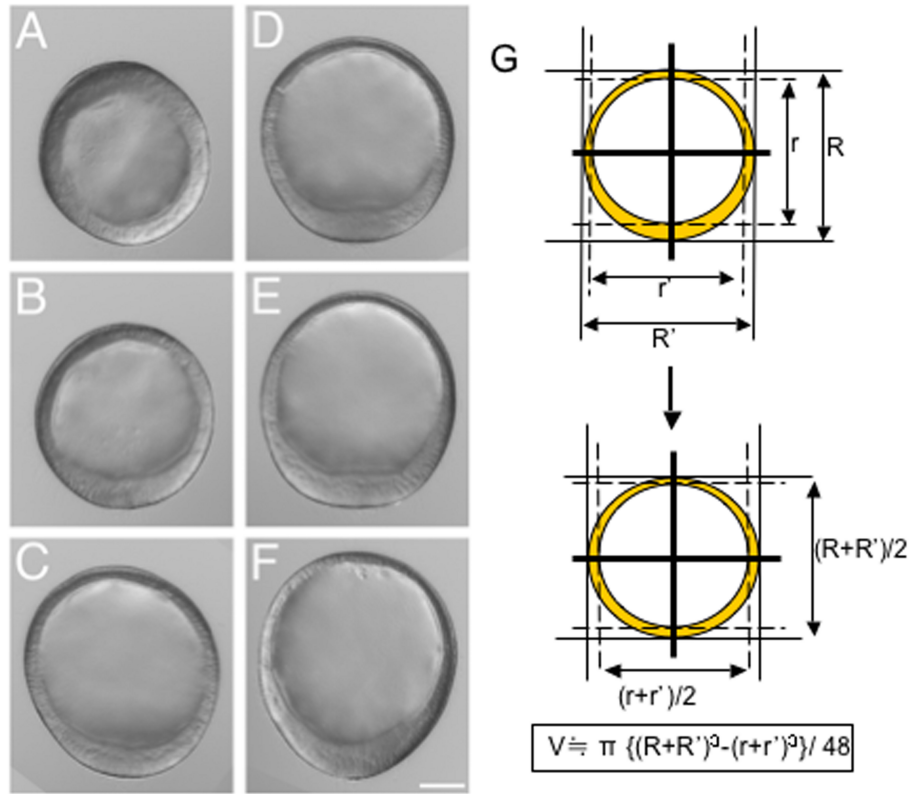


Fig. 3-3. Total cell numbers in individual blastula embryos. A-F: Nomarski microscopic images of live blastula embryos optically sectioned at the median plane. The embryos differ in size. G: Outline of the method used to approximate the size of a hollow sphere structure and the formula for calculating the volume occupied by the epithelial monolayer. H: Graph showing total cell numbers of individual blastula embryos plotted against their volume as calculated in (G). Green dots with lower-case letters correspond to the embryos shown in (A) to (F). Six embryos were tested in four independent batches. Scale bar: 50 μm.

### 3-4 間充織細胞による上皮細胞増殖誘起能の検討

3-3 項で述べたように、バクテリアカウンターを用いることで1個体の胚から構成細胞を計数することが可能となった。この計数系を用い、間充織細胞の上皮細胞への増殖誘起能を解析した。3-1 項に述べたように、胞胚と中期原腸胚はともに単層の上皮シートから構成され、その発生過程は上皮細胞の分裂と変形によって遂行される。もし胞胚の胞胚腔に間充織細胞を顕微注射し、中期原腸胚まで発生を進行させ、その構成細胞数が増加していたら、間充織細胞が上皮細胞に増殖を誘起したと考えることができる。そこで、胞胚の胞胚腔に rhodamine B isothiocyanate-celite (RITC) で標識した 40-50 個の間充織細胞を顕微注射し、個体ごとに中期原腸胚の構成細胞数を計測した (Fig. 3-4, 3-5)。対照実験では、RITC で標識した後期原腸胚由来の同数の上皮細胞を顕微注射した。

Fig. 3-4 はこの実験結果を示している。顕微注射直後、注射された間充織細胞と上皮細胞は、胞胚腔中で凝集塊として観察された (Fig. 3-4A, large arrow; C, arrow)。中期原腸胚まで発生を進行させると、顕微注射された間充織細胞は胞胚腔中で凝集塊を解消し、外胚葉上皮シートならびに内胚葉上皮シートに沿って散在していた (Fig. 3-4B, arrowheads)。一方、顕微注射された上皮細胞は、中期原腸胚期において、凝集塊のまま胞胚腔中に存在していた (Fig. 3-4D)。どちらの場合も、原腸形成は正常に行われた (Fig. 3-4B, D)。また、顕微注射に用いるマイクロニードルを胚に刺しただけのシャムコントロール胚においても、胚の大きさや形態に異常はみられなかった (data not shown)。なお、RITC 標識や顕微注射による異常は、間充織細胞に観察されなかった。

Fig. 3-5 は、3-3 項で述べた1個体解離法を用いて中期原腸胚まで発生を進行させた顕微注射胚の構成細胞数を計測した結果を示している (Fig. 3-5)。間充織細胞を顕微注射された胚の構成細胞数は、上皮細胞を顕微注射された胚ならびにシャムコントロール胚と比べ約 1.3 倍に増加していた (Supplementary Table3-1

参照)。30 個体を解離して得られた 1 個体あたりの構成細胞数と、1 個体解離法により得られた 2 つの対照実験中期原腸胚の構成細胞数はほぼ同じであった。

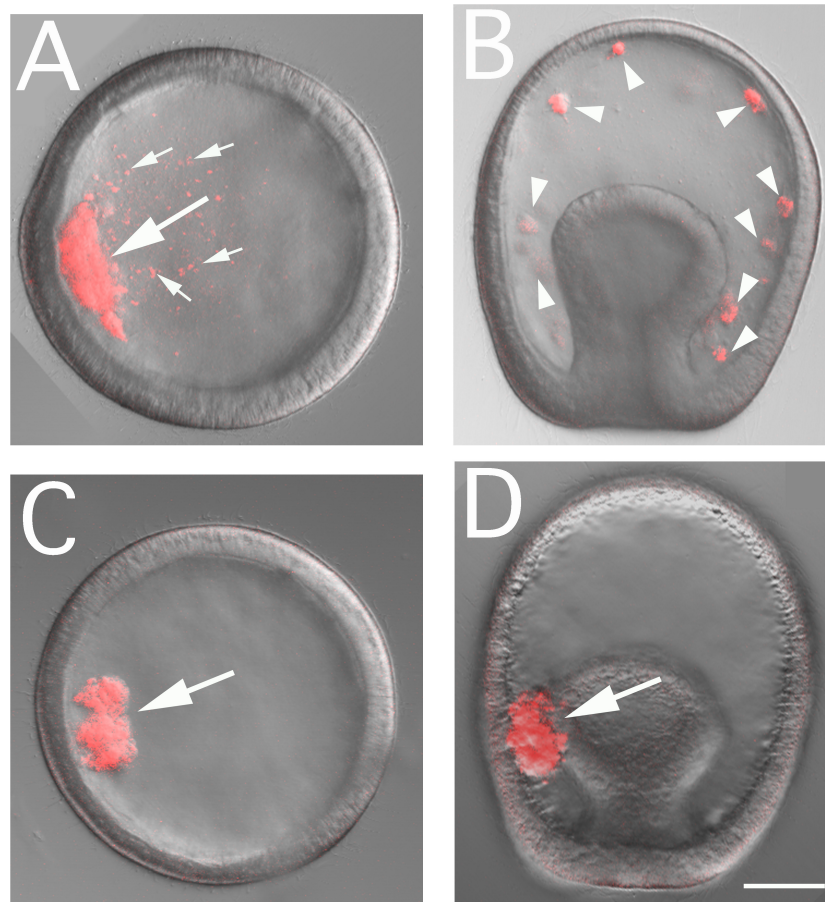


Fig. 3-4. Injection experiments with mesenchyme cells (A, B) or epithelial cells (C, D) in blastula embryos. A, C: Embryos immediately after injection. The 40 - 50 injected mesenchyme or epithelial cells form a similarly sized aggregate (large arrows) that is clearly different from cell debris (panel (A), small arrows). B, D: Embryos 8 hrs after injection. All panels show Nomarski microscopic images merged with fluorescent images of live embryos optically sectioned at the median plane. The injected samples indicated by (B) and (D) are at the mid-gastrula stage. The mesenchyme cells have dispersed throughout the blastocoel (arrowheads in B), whereas the epithelial cells remain in an aggregate (arrow in D). The number of injected mesenchyme cells was determined to be between 40 and 50 cells by analyzing all the optical sections of each embryo. Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ .

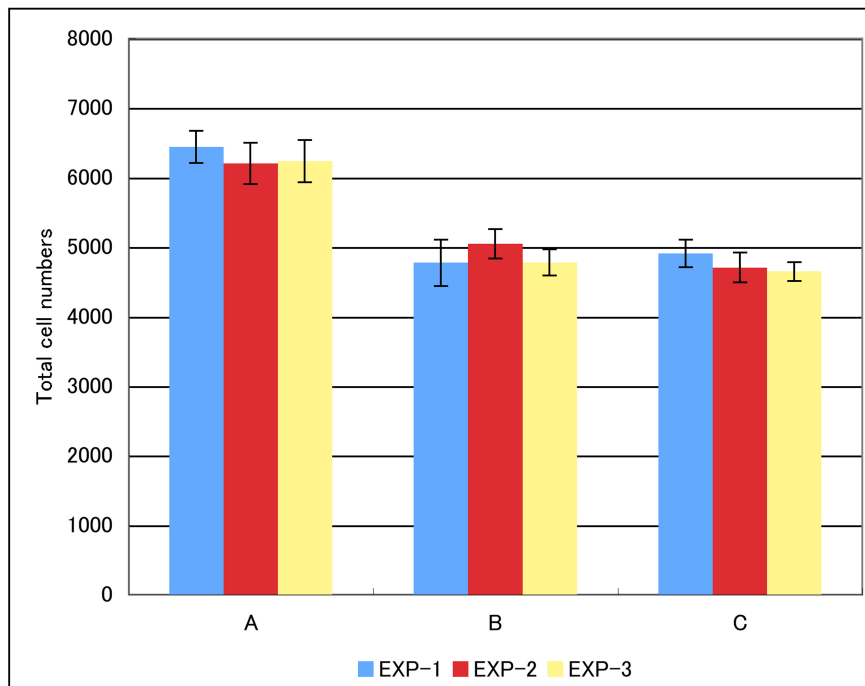


Fig. 3-5. Effect of injection of mesenchyme cells into blastula embryos on total cell numbers at the mid-gastrula stage. The data are displayed as follows: mesenchyme cells injected (A), epithelial cells injected (B), no cells injected (sham control; C). The numbers of injected mesenchyme cells and epithelial cells were almost identical, as shown in Fig. 3-4. In three independent experiments, the total cell numbers shown represent the average of five to eight individual embryos (with standard deviations; bars). Notably, there was a significant increase in total cell numbers at the mid-gastrula stage following injection of mesenchyme cells into blastula embryos (A).

Supplementary Table 3-1. Cell numbers of injected embryos at mid-gastrula stage<sup>a</sup>

	Mesenchyme cells - injected	Epithelial cells-injected	No cells-injected
EXP-1	6440±233	4775±334	4910±199
EXP-2	6205±296	5047±214	4705±214
EXP-3	6236±303	4779±187	4649±136

<sup>a</sup>Mean and s.d. were calculated in five to eight embryos in each experiment.

### 3-5 顕微注射された間充織細胞の細胞分裂の有無

顕微注射された間充織細胞自身が細胞分裂によって数を増し、構成細胞数の増加に関するデータに含まれるのかどうかという問題を調べるために、BrdUを添加した海水中で顕微注射した胞胚を中期原腸胚まで発生を進行させ、抗BrdU抗体とMC5 Mabを用いた二重免疫染色を行った (Fig. 3-6)。その結果、ほとんどの上皮細胞でBrdU陽性シグナルが検出されたが (Fig. 3-6A, B)、高倍率の観察下においても、間充織細胞にBrdU陽性シグナルは検出されなかった (Fig. 3-6C)。

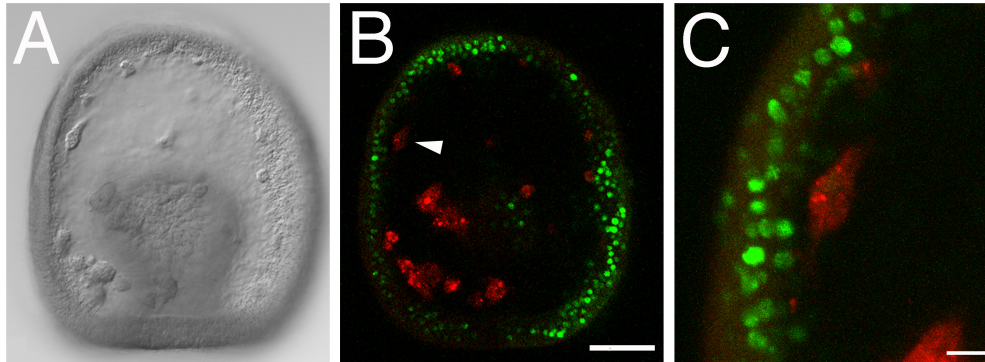


Fig. 3-6. BrdU treatment experiment. A: Nomarski microscopic image of an embryo fixed with PFA at the mid-gastrula stage following injection of mesenchyme cells at the blastula stage. The image shows an optical section at the median plane. B: Fluorescent image of the embryo shown in (A). BrdU-positive signals (green) were only observed in epithelial cells and not in the injected mesenchyme cells (red). C: Higher magnification stack of images from eleven optical sections from the position indicated by the arrowhead in (B). Scale bars: 50  $\mu\text{m}$  in A, B; 10  $\mu\text{m}$  in C.

### 3-6 “過剰な数”の間充織細胞の顕微注射による後期形態形成への影響

次に、顕微注射する間充織細胞数が後期形態形成過程においてどのような影響をもたらすかという問題を検討した。顕微注射する間充織細胞の数を、3-4項で上皮細胞の増殖を誘起した40-50個（“適度な数”, Fig. 3-7A-C）から、その3-4倍にあたる150-200個（“過剰な数”, Fig. 3-7D-F）に増やし胞胚に顕微注射を行い、ビピンナリア幼生（受精72時間）になるまで発生を進行させた。対照実験胚には、3-4項で用いたシャムコントロール胚を用いた（Fig. 3-7G-I）。“適度な数”の間充織細胞を顕微注射された胞胚を後期原腸胚（受精42時間）、続いてビピンナリア幼生まで発生させた場合、各発生段階において正常に形態形成運動が遂行されただけでなく、対照実験胚と比べて胚体は大きくなっていた（Fig. 3-7B, C vs H, I）。一方、“過剰な数”の間充織細胞を顕微注射された胚の発生では、間充織細胞の凝集塊は解消されるが、後期原腸胚において原腸は外胚葉に向かって傾倒し始め、外胚葉上皮シートで生じる凹凸も形成されなかった（Fig. 3-7E）。ビピンナリア幼生になると、口、消化管（食道、胃、腸）、体腔囊、繊毛帯は形成されたが、特に食道領域はビピンナリア幼生の正中線上に配置できず、側方外胚葉への傾倒が顕著であった（Fig. 3-7F）。これらの幼生は、シャムコントロール幼生と比べて小さかった（Fig. 3-7F, I）。どちらの実験においても、顕微注射されたレシピエント胚由来の間充織細胞は胞胚腔中に移入し、顕微注射された間充織細胞と共存していた。

これらの実験で得られたビピンナリア幼生に対して、バクテリアカウンターを用いて1個体の構成細胞数を計測した（Fig. 3-8）。その結果、“適度な数”の間充織細胞を顕微注射された胞胚由来のビピンナリア幼生の構成細胞数は、シャムコントロール胚由来のビピンナリア幼生と比べて約1.3倍に増加していた（Supplementary Table3-2 参照）。一方、“過剰な数”の間充織細胞を顕微注射された胞胚由来のビピンナリア幼生では、シャムコントロール胚由来のビピンナリ

ア幼生と比べ、構成細胞数に大きな差は見られなかった (Supplementary Table3-2 参照)。

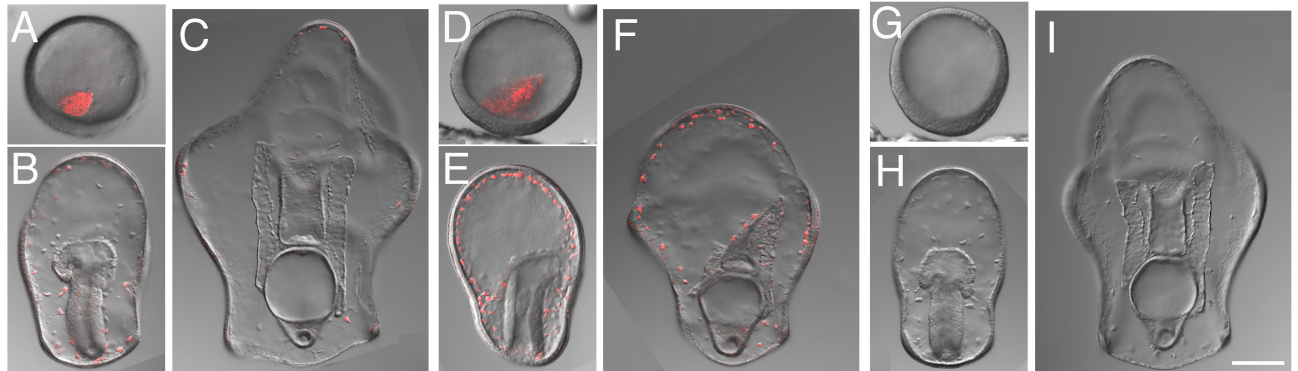


Fig. 3-7. Effects of injection of mesenchyme cells on later morphogenesis. A-C: Developmental stages in an embryo injected at the blastula stage with 40 – 50 mesenchyme cells (moderate cell number). D-F: Developmental stages in an embryo injected at the blastula stage with 150 - 200 mesenchyme cells (excess cell number). G-I: Developmental stages in an embryo sham injected (control) at the blastula stage. All panels show the Nomarski microscopic images merged with fluorescent images of live samples optically sectioned at the median plane. Developmental stages are as follows: blastula stage (just after mesenchyme cell injection; A, D); late-gastrula stage (one day after injection; B, E); 3-day-old bipinnaria larva (two days after injection; C, F). Although the image in (E) does not appear to have a four-fold increase in mesenchyme cells compared to (B), this is simply a chance effect of optical sectioning. Notably, the embryos displayed variable morphogenetic phenotypes depending on the numbers of injected mesenchyme cells. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ .

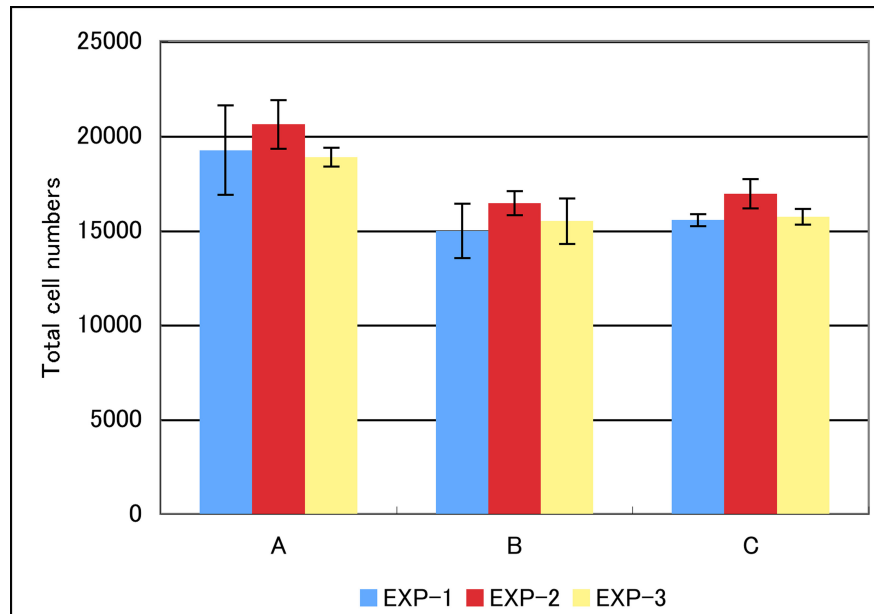


Fig. 3-8. Effect of mesenchyme cell injection into blastula embryos on total cell numbers of 3-day-old bipinnaria larva. The data are displayed according to the numbers of mesenchyme cells injected: 40 - 50 mesenchyme cells (moderate cell number; A); 150 - 200 mesenchyme cells (excess cell number; B); no cells injected (sham control; C). In three independent experiments, the total cell numbers represent the mean of six single larvae (standard deviation; bar). Notably, total cell numbers in larvae derived from embryos injected with the excess number of mesenchyme cells at the blastula stage were similar to those of the sham controls.

Supplementary Table 3-2. Total cell numbers of injected embryo at bipinnaria stage<sup>a</sup>

	moderate numbers	excess numbers	no cells
EXP-1	19225±2368	14953±1442	15533±312
EXP-2	20593±1295	16426±636	16920±783
EXP-3	18858±497	15480±1205	15707±412

<sup>a</sup>Mean and s.d. were calculated in six experimental larvae in each experiment.

### 3-7 “過剰な数”の間充織細胞の顕微注射による繊維状 ECM 成分への影響

3-6 項で述べたように、“過剰な数”の間充織細胞を胞胚に顕微注射し、ビピンナリア幼生まで発生を進行させると、外、内胚葉の上皮シートは正常に形態形成運動を遂行できなかつた (Fig. 3-7E, F)。第 2 章の考察でも述べたように、上皮シートに見られる形態形成運動は胞胚腔中に存在する繊維状 ECM 成分 (4H11 繊維) の分布パターンと密接に関与している (Kaneko et al., 2005)。そこで、4H11 繊維を認識するモノクローナル抗体 (4H11 Mab) を用い、3-6 項で行った 3 つの実験群から得られたビピンナリア幼生に対して免疫染色を行い、4H11 繊維の分布パターンを解析した。“適度な数”の間充織細胞を顕微注射された胞胚由来のビピンナリア幼生の 4H11 繊維の分布パターンは、シャムコントロール胚由来のビピンナリア幼生と何ら違いは見られなかつた (Fig. 3-9A, C)。一方、“過剰な数”の間充織細胞を顕微注射された胚由来のビピンナリア幼生では、胞胚腔中において 4H11 繊維が存在しない領域が観察された (Fig. 3-9B; asterisk)。また、4H11 繊維が欠如した領域には、間充織細胞は存在していなかつた (Fig. 3-9B)。この 4H11 繊維が欠如する表現型は、“過剰な数”の間充織細胞を顕微注射されたすべての実験サンプルで観察された。

これらの実験サンプルに対して、口領域に存在する 4H11 繊維の分布パターンを詳細に解析した。“適度な数”の間充織細胞を顕微注射された胚由来のビピンナリア幼生の口領域の形態は、V 字状の口辺繊毛帯で特徴づけられ、その上部に開口領域がある (Fig. 3-9D)。この周辺に位置する食道と口側外胚葉上皮の間の 4H11 繊維は細かなメッシュ構造を示した (Fig. 3-9E)。一方、“過剰な数”の間充織細胞を顕微注射された胚由来のビピンナリア幼生は、口辺繊毛帯が楕円形を呈し、開口領域はきわめて狭かつた (Fig. 3-9F)。さらに、口と胃を結ぶ食道は典型的な管状構造を示さずつぶれていた (data not shown)。この二つの実験群を比較すると、“過剰な数”の間充織細胞を顕微注射した実験群では、4H11 繊

維は顕微注射された間充織細胞が存在している領域において、高密度に凝縮していた (Fig. 3-9G)。4H11 繊維の凝縮パターンは、すべての“過剰な数”の間充織細胞による顕微注射実験サンプルにおいて観察された。

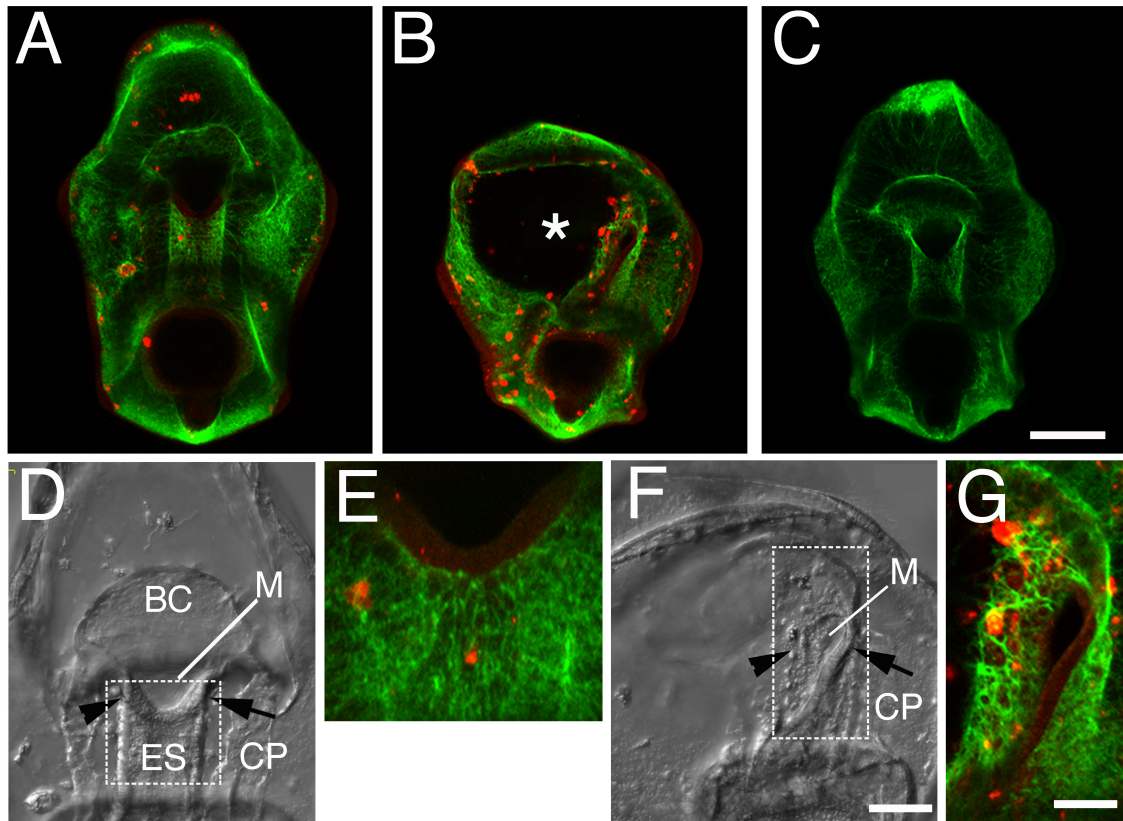


Fig. 3-9. 4H11 fibers in embryos that had been injected with different numbers of mesenchyme cells. A-C: 4H11 Mab immunofluorescence microscopic images of PFA fixed 3-day-larvae that received the moderate number (A), excess number (B) or no (C) mesenchyme cells. Injected mesenchyme cells (red) are present within the 4H11 fibers. Notably, the blastocoelic space of the embryos in group (B) lacked 4H11 fibers (asterisk). D, F: Nomarski microscopic images of the anterior portion of (A) and (B). The adoral ciliary band forms a V-shaped mouth. The arrow and arrowhead point to the adoral ciliary band on the left and right sides, respectively. BC, the buccal cavity; M, the mouth; CP, the coelomic pouch; ES, the esophagus. E, G: The positions of 4H11 fibers are enclosed in the dotted rectangles in panels (D) and (F). In panel (G), it is notable that the 4H11 fibers not only display a severely condensed morphology, but also that many injected mesenchyme cells are located within the fibers. Photos in panels (A) to (C) and (E) and (G) are shown as stacked images consisting of 10 or 25 optical sections taken using a confocal microscope at the same laser intensity, respectively. Scale bars: 100  $\mu\text{m}$  in A-C; 50  $\mu\text{m}$  in D, F; 25  $\mu\text{m}$  in E, G.

### 3-8 考察

第3章では、間充織細胞を胞胚期の胞胚腔中に顕微注射することにより、間充織細胞の新たな形態形成機能として、上皮細胞に対する増殖誘起能について検証した。得られた結果の要点は、(1)40-50個の間充織細胞を顕微注射された胞胚を中期原腸胚ならびにビピンナリア幼生まで発生を進行させると、その構成細胞数が対照実験群と比べて約1.3倍に増加すること (Fig. 3-5, 3-8)、(2)上皮細胞を顕微注射した胚ならびにシャムコントロール胚では、中期原腸胚、およびビピンナリア幼生における構成細胞数は、それぞれ4,600-5,000個、15,000-17,000個であったこと (Fig. 3-5, 3-8)、(3)顕微注射された間充織細胞は、レシピエント胚の胞胚腔中で細胞分裂をしないこと (Fig. 3-6) である。これらの結果は、間充織細胞が上皮細胞に対して増殖誘起能を有していることを示している。

本研究では、形態形成における重要な現象の1つである上皮—間充織相互作用に着目して解析を行った。本章で用いた実験系は、間充織細胞の上皮細胞への増殖誘起能を解析するために、(1) 顕微注射の実験に胞胚を用いる、(2) 細胞数を定量するためにバクテリアカウンターを用いるという二つの特徴を有している。胞胚は、非常に単純な構造であり、単層の上皮シートからなる球状の形を特徴とする (Fig. 3-1)。中期原腸胚に到達するまでに、胚はアポトーシスやネクロシスをほとんど行わず (Fig. 3-2)、細胞数を増加させながら発生する。この胞胚から中期原腸胚の発生段階では、間充織細胞が存在せず、上皮細胞のみから構成されることから、本解析系は間充織細胞の増殖誘起を検討する実験の場として有効であった。また、バクテリアカウンターを用いることにより、1個体からその構成細胞を計数することが可能になった (Fig. 3-3)。1個体の計測系から導きだされた構成細胞数は、Dan-Sohkawa and Satoh (1978)らが押しつぶし法で報告した構成細胞数と差はなかった (Dan-Sohkawa and Satoh, 1978)。

形態形成運動において、間充織細胞が上皮細胞に対して増殖誘起を行い、正常に器官形成を遂行させることを示した報告はいくつかある。それらは、膵臓 (Bhushan et al., 2001)、肝臓 (Matsumoto et al., 2008)、皮膚 (Ming Kwan et al., 2004)、唾液腺 (Yamamoto et al., 2008)、歯 (Fukumoto et al., 2006) であり、脊椎動物の器官形成の研究で提示されていた。本研究では、間充織細胞がイトマキヒトデの形態形成過程において上皮細胞に対し増殖を誘起したことを証明した。これは、後口動物の無脊椎動物で初めて明らかにされた。ヒトデは系統進化的に脊椎動物へ繋がる後口動物の基部に位置していることから、本研究で得られた間充織細胞の上皮細胞に対する増殖誘起機能は、間充織細胞の進化的意義を理解する上でも非常に興味深い。

本研究から得られた定量解析の結果から、上皮細胞の増殖誘起を行う間充織細胞の機能として、二つの側面が考えられる。一つは、1個の間充織細胞が持つ上皮細胞への増殖誘起能に関してである。約50個の間充織細胞を顕微注射された胞胚が中期原腸胚期になる時点で、その構成細胞数は対照実験胚より約1,500個増加していた (Fig. 3-5)。従って、胞胚から中期原腸胚の発生過程において、間充織細胞1個あたり約30個の上皮細胞の増殖を誘起したと考えられる。同様に胞胚からビピンナリア幼生の発生過程においては、間充織細胞1個あたり約90個の上皮細胞が増殖した (Fig. 3-9)。この解析から、初期の発生過程において、間充織細胞はかなりの数の上皮細胞に対して増殖を誘起していると推測される。しかしながら、この結果は、培養間充織細胞の顕微注射実験から得られたものであり、胞胚腔中に移入した間充織細胞を直接的に移植したわけではないため、正常発生において間充織細胞が同様の数の上皮細胞の増殖を誘起しているかどうかはわからない。

次に、顕微注射した間充織細胞の数について言及する。“過剰な数”の間充織細胞を顕微注射された胞胚では、以降の発生段階において上皮細胞の増殖誘起

が見られなかった (Fig. 3-8)。この実験胚において、胞胚由来の間充織細胞は正常に移入し、胞胚腔中に存在していた (Fig. 3-7)。これらの結果から、形態形成過程において、上皮細胞に対して正常に増殖を誘起するためには、胞胚腔中に存在する間充織細胞の数と上皮細胞の数の比率が重要であると考えられる。一方、胞胚腔中に存在する繊維状 ECM である 4H11 繊維の異常分布によって引き起こされた形態異常は興味深い (Fig. 3-7)。胞胚腔中に 4H11 Mab を導入すると、本研究から得られたような 4H11 繊維の存在しない空間が現れることが報告されている (Kaneko et al., 2005)。この 4H11 繊維は、外胚葉壁、ならびに内胚葉壁で生じる上皮シート運動のための柔軟な基質として働いていると考えられている (Kaneko et al., 2005)。本研究では、“過剰な数”の間充織細胞の顕微注射により、4H11 繊維が正常なメッシュ構造をとることができず、高密度に濃縮されていた (Fig. 3-9E, G)。また、この濃縮された 4H11 繊維内に、顕微注射された間充織細胞が存在していた (Fig. 3-9G)。これらの事実から、顕微注射された間充織細胞が 4H11 繊維を高密度に濃縮したため、4H11 繊維は正常なメッシュ構造をとることができず、形態形成過程における上皮シートの運動が抑制された結果、上皮細胞の増殖誘起がなされなかったと予測される。以上、上皮細胞の増殖は、適正な数の間充織細胞と、胞胚腔中に存在する 4H11 繊維が相互作用することによって制御されていることが示唆される。

第 3 章では、イトマキヒトデの形態形成過程において、間充織細胞が上皮細胞の増殖に対して支持的な機能を担っている可能性を示唆できた。現時点では、原腸先端部から出現してくる間充織細胞がどの程度上皮細胞の増殖誘起に関わっているか、発生過程のどの時期に機能しているのか判明していない。これらを含め、本研究から形態形成の実質的な側面に関して二つの重要な問題も提起される。一つは、イトマキヒトデの発生過程において、原腸先端部から出現してくる間充織細胞は、胚体が成長するために上皮細胞の増殖に胚体の至る所で関与しているのか、あるいは特異的な器官形成にのみ関与しているのかという

問題である。他の一つは、間充織細胞が正常な胚発生過程において、どのような分子メカニズムで上皮細胞の増殖誘起を引き起こしているかという問題である。

## 材料と方法

### 実験動物、受精ならびに発生

第2章のようにイトマキヒトデ *Asterina pectinifera* を採集、飼育し、受精卵を得た。受精卵は人工海水 (ASW) で発生させ、胞胚ならびに中期原腸胚を得た。

### 間充織細胞と上皮細胞の単離

顕微注射実験に用いた間充織細胞は、Kaneko et al. の方法に従って培養下に単離した (Kaneko et al., 1995)。基質上に培養した間充織細胞を ASW で洗浄後、培養液 (cultured medium, CM; 4% (v/v) new-born calf serum/ ASW) 中に dimethyl sulfoxide (DMSO) で溶解した rhodamine B isothiocyanate-celite (RITC) を添加し、20°C で 2 時間インキュベートした (Ettensohn and McClay, 1988)。ASW で洗浄後、ラバーポリスマンを用いて基質から剥がした間充織細胞をエッペンチューブに回収し、卓上遠心機で 1 分間遠心後、上清を捨て、顕微注射を行う直前まで氷上に置いた。一方、顕微注射に用いた上皮細胞は以下のようにして作成した。上記のように RITC を含んだ ASW 中で、受精 36-40 時間の原腸胚を 20°C でさらに 6-10 時間発生させた。ASW で洗浄後、Kaneko et al. の方法を用いて上皮細胞のみを回収した (Kaneko et al., 1990)。

### 顕微注射

両面テープをスペーサーとして 2 枚のカバーガラスを利用した顕微注射用チャンバー中 (Kaneko et al., 2005) に、レシピエントとなる胞胚を保持した。マイ

クロニードルは、内径  $\phi$  800  $\mu\text{m}$  のガラス管 (Drummond Scientific Co.) をプレー (PN-3, Narishige) で牽引することにより準備した。続いてマイクロニードルの針先が  $\phi$  15-20  $\mu\text{m}$  になるように研磨した (EG-40, Narishige)。その後、マイクロフォーシ (MF-9, Narishige) を用いてマイクロニードルに狭窄部をつけ、顕微注射用のマイクロニードルとした。これをマニピュレーター (Narishige) に装着した後、RITC で標識した間充織細胞あるいは上皮細胞を別チャンバーに準備し、マイクロニードルで吸引後、胞胚の胞胚腔中に顕微注射した。顕微注射時に、マイクロニードルを通過する間充織細胞や上皮細胞を計数した。シャムコントロール実験は、胞胚にマイクロニードルを刺すことだけで行った。これらのサンプルは、2 ml の ASW を入れた 24 ウェルマルチプレート (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) に 1 個体ずつ入れ、20°C で中期原腸胚あるいはビピンナリア幼生まで発生させた。

### 構成細胞数のカウント

実験で用いたサンプルの構成細胞を、以下の二つの方法を用いて計数した。一つ目は、第 2 章で述べた方法により、30 個体の胞胚ならびに中期原腸胚から一個体あたりの構成細胞を計数した。他の方法では、次に示す方法で、1 個体の胚あるいは幼生の構成細胞数を計測した。1 個体の胚ならびに幼生を DMET (第 2 章参照) で洗浄後、1 個体ずつ 2  $\mu\text{l}$  の DMET 中に置き換えた。その後、マウスピペットにセットした Sigmacote (Sigma) で表面をコートしたマイクロニードルを用いて、実験サンプルを個々の細胞まで解離した。続いて、バクテリアカウンター (#A161, Sunlead Glass Corporation) を用い、位相差顕微鏡 (CK2, Olympus) 下で解離細胞を計数した。どちらの方法においても、3 つの親バッチを材料として用い、平均ならびに標準偏差を算出した。

## BrdU 処理

最終濃度 5  $\mu\text{M}$  となるように 10  $\mu\text{M}$  BrdU (Sigma) 原液を添加した ASW 中で、間充織細胞を顕微注射した胞胚を飼育し、20°C で中期原腸胚まで発生を進行させた。その後、後述の方法で固定後、抗 BrdU 抗体を用いて染色した。

## 固定ならびに染色

胚ならびに幼生は、4% (w/v) PFA/ ASW を用いて室温で 20 分、あるいは 4°C で 24 時間固定した。PBST で洗浄後、冷アセトン (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) を用いて、-20°C で 20 分間の後固定を施し、PBST で 10 分間 5 回洗浄した。Fig. 3-1 の実験では、200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RNase A (Boehringer Mannheim) 中で、上述の方法で固定した胞胚と中期原腸胚を 37°C で 20 分間インキュベートし、細胞質中に存在する RNA を除去した。PBST で洗浄後、0.165  $\mu\text{M}$  fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識 phalloidin (Sigma) と 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  propidium iodide (PI, Sigma) を含んだ PBST 中で、30 分間、室温で上記サンプルをインキュベートした。Fig. 3-6 の実験で核内に取り込まれた BrdU の検出には、第 2 章で述べた方法を用いた。一方、Fig. 3-9 の実験における ECM 成分 (4H11 繊維) の染色は、4H11 モノクローナル抗体を用いて行った (Kaneko et al., 2005)。具体的には、間充織細胞を注射しビピンナリア幼生まで発生させたサンプルを上記の方法で固定後、Zenon<sup>TM</sup> Alexa Fluor 488 mouse IgG<sub>2a</sub> labeling kit (Molecular Probes) を用いて標識した 4H11 精製抗体中で、室温で 30 分間インキュベートした。すべてのサンプルは染色後、PBST を用いてよく洗浄した。

## 共焦点レーザー顕微鏡観察ならびに画像処理

生きた胚ならびに染色したサンプルは、第2章で述べた方法で観察した。

## 第 4 章

### 総括および今後の展望

## 4-1 総括

本研究では、棘皮動物ヒトデの一種であるイトマキヒトデを材料に、外、中、内胚葉を構成する単層上皮シートと間充織細胞間の相互作用に着目して、間充織細胞はどのように形態形成に関与するのかという問題の解明を目指した。

第2章では、間充織細胞のマーカーとして MC5 Mab を用い、原腸胚中期からブラキオラリア幼生期までを広範な発生期間における間充織細胞の時空間的配置、ならびに原腸胚中期からビピンナリア幼生期までの間充織細胞の数の増加に関して研究を行った。その結果、中期原腸胚期の原腸先端部から胞胚腔中へ移入を開始する間充織細胞は、後期原腸胚期に形成される口、体腔囊領域に、一過的に高い密度で分布し、胚体に不均一に分布することが判った。また、ビピンナリア幼生期以降では、繊毛帯と成体原基が発達する領域を中心として、間充織細胞は不均一な分布パターンを取るだけでなく、伸長するビピンナリア腕やブラキオ腕の先端領域にも多数存在することが見出された。一方、間充織細胞の数の定量的解析の結果から、少なくとも初期ビピンナリア幼生期までは、間充織細胞の数は全構成細胞数の約1%に維持されて増加しているだけでなく、種々の形態形成運動と連関してその増加率が変化することを示すことができた。これに加え、間充織細胞自身は細胞分裂を行わないことも明らかにした。

第3章では、「間充織細胞が上皮細胞に対して増殖誘起能を持っているか？」という問題を検証した。40-50個の間充織細胞を顕微注射された胞胚を、中期原腸胚、ならびにビピンナリア幼生まで発生を進行させると、その構成細胞数は対照実験と比べて約1.3倍に増加していた。この実験結果から、間充織細胞は上皮細胞の増殖を誘起する能力があることを証明できた。一方、150-200個の間充織細胞を胞胚に顕微注射した場合、上皮細胞の増殖は誘起されず、ビピンナリア幼生の形態が異常になることを見出した。この形態異常は、胚体内に存在する間充織細胞数が過剰になったことにより、繊維状ECMが高密度に凝縮したために生じたことが明らかになった。以上の結果から間充織細胞は、繊維状ECM

成分と協調的に作用しながら、上皮細胞の増殖誘起に関与していることを示唆できた。

第1章の Table 1-1 で言及したように、イトマキヒトデの発生過程において、外、中、内胚葉の単層上皮シートが膨出、陥入、切離、融合、肥厚、扁平化などの変形と細胞増殖によるサイズ増加を生じながら器官形成は進行する。第2章と第3章の研究結果から、これらの変形様式のうちのいくつかは、間充織細胞からの相互作用の実体として以下のように理解できるようになった。原腸胚後期に生じる口や体腔嚢形成では、各胚葉を構成する上皮シートの一部が自律的に陥入、切離、融合などの変形を生じ、これに伴って生じる ECM の主成分である 4H11 繊維の高密度な凝集に多数の間充織細胞が反応し、凝集した 4H11 繊維の解消に関与する。一方、ビピンナリア幼生期以降に形成される繊毛帯、成体原基、ビピンナリア腕やブラキオラリア腕に対しては、これらの領域に多数の間充織細胞が配置され、その上皮細胞増殖誘起能が発揮され、単層上皮シートである各器官のサイズ増加に関与する。なお、繊毛帯と成体原基器官形成における上皮シートの変形様式を肥厚化と捉えることができるが、間充織細胞が、直接的に上皮細胞が立方化するように分化させているのか、あるいは間充織細胞の上皮細胞増殖誘起の結果、上皮シートが二次的に肥厚化したのかは判らない。このように、系統進化的に原始的なイトマキヒトデの場合、間充織細胞が単層上皮シートと積極的に相互作用すること介して、器官を構成する単層上皮シートの変形が生じ、胚や幼生の身体の形態が形成されていくと考えられる。

## 4-2 今後の展望

現在、第2章で用いた MC5 Mab の抗原分子 (MC5 分子) に着目して、間充織細胞の形態形成における分子レベルでの機能解析を進めている。培養下に単離された間充織細胞の cDNA ライブラリーから単離された MC5 遺伝子の構造解析

の結果から、MC5 分子は新規な膜結合型 astacin 属メタロプロテアーゼであることが判明していた。予備的に行った MC5 遺伝子のモルフォリノオリゴの顕微注射による MC5 遺伝子の翻訳阻害実験では、実験対照と比較してビピンナリア幼生の身体のサイズが小さく、その構成細胞数も減少していることを見出している (Hamanaka et al., 2010b)。一方、MC5 mRNA の顕微注射により MC5 分子を過剰発現させると、モルフォリノオリゴの顕微注射の場合とは逆に、幼生の身体のサイズは大きくなり、構成細胞数も増加する (Hamanaka et al., 2010b)。なお、両実験においてビピンナリア幼生の見かけの形態に違いはなかった。これらの実験事実から、間充織細胞に発現している MC5 分子は、第 3 章で検証した間充織細胞の上皮細胞増殖誘起に関与する機能分子である可能性は非常に高い。将来的には、MC5 分子の分子作用メカニズムの解明が重要な研究テーマになると考えている。

最近、MC5 遺伝子のモルフォリノオリゴにより身体のサイズを減少させたビピンナリア幼生に餌を与えて飼育し続けても、ブラキオラリア腕およびビピンナリア腕が形成されず、ブラキオラリア幼生へ発生が進行しないことを見出した。このビピンナリア幼生のサイズの減少と発生への停止は、原腸胚に顕微注射した clodronate を含んだリポソームを間充織細胞に貪食させ、ビピンナリア幼生の身体から多くの間充織細胞を欠如させる試みにおいても観察された。「間充織細胞により誘起される上皮細胞の増殖が、成体に変態する最後の発生段階であるブラキオラリア幼生への発生進行の重要な鍵となっているか？」という問題は、間充織細胞の存在意義を理解する上で非常に興味深い。これに加え、clodronate を含んだリポソームにより、間充織細胞の大多数を欠如させたビピンナリア幼生では、神経細胞の分化は生じるが、神経細胞の分布パターンが乱れていた。第 2 章で考察した間充織細胞と神経細胞間に生じる相互作用の実体として、神経細胞が多数配置される繊毛帯領域において、間充織細胞は上皮細胞の増殖誘起だけでなく、神経細胞のネットワーク形成にも重要な役割を担っている可能性も考えられる。イトマキヒトデを用いた上皮—間充織相互作用の今

後の研究から、多細胞動物の形態形成に関する新たな発見を通して、系統進化的な視点も含め、動物の形態を深く洞察できるようになることを期待したい。

## 参考文献

- Abed M, Crawford BJ. 1986. Ultrastructural aspects of the mouth formation in the starfish *Pisaster ochraceus*. *J Morphol* 188:239-250.
- Barros C, Hand GS, Jr., Monroy A. 1966. Control of gastrulation in the starfish, *Asterias forbesii*. *Exp Cell Res* 43:167-183.
- Bhushan A, Itoh N, Kato S, Thiery JP, Czernichow P, Bellusci S, Scharfmann R. 2001. Fgf10 is essential for maintaining the proliferative capacity of epithelial progenitor cells during early pancreatic organogenesis. *Development* 128:5109-5117.
- Byrne M, Barker M. F. 1991. Embryogenesis and larval development of the Asteroid *Patiriella regularis* viewed by light and scanning electron microscopy. *Biol Bull* 180:332-345.
- Byrne M, Cisternas P. 2002. Development and distribution of the peptidergic system in larval and adult *Patiriella*: comparison of sea star bilateral and radial nervous systems. *J Comp Neurol* 451:101-114.
- Crawford BJ, Chia FS. 1978. Coelomic pouch formation in the starfish *Pisaster ochraceus* (Echinodermata: Asteroidea). *J Morphol* 157:99-120.
- Crawford BJ, Abed M. 1983. The role of the basal lamina in mouth formation in the embryo of the starfish *Pisaster ochraceus*. *J Morphol* 176:235-246.

- Crawford BJ. 1990. Changes in the arrangement of the extracellular matrix, larval shape, and mesenchyme cell migration during asteroid larval development. *J Morphol* 206:147-161.
- Dan-Sohkawa M, Satoh N. 1978. Studies on dwarf larvae developed from isolated blastomeres of the starfish. *Asterina pectinifera*. *J Embryol Exp Morphol* 46:171-185.
- Dan-Sohkawa M, Tamura G., Mitsui H. 1980. Mesenchyme cells in starfish development: effect of tunicamycin on their differentiation, migration and function. *Dev Growth Differ* 22:495-502.
- Ettensohn CA, McClay DR. 1988. Cell lineage conversion in the sea urchin embryo. *Dev Biol* 125:396-409.
- Fukumoto S, Miner JH, Ida H, Fukumoto E, Yuasa K, Miyazaki H, Hoffman MP, Yamada Y. 2006. Laminin alpha5 is required for dental epithelium growth and polarity and the development of tooth bud and shape. *J Biol Chem* 281:5008-5016.
- Furukawa R, Takahashi Y, Nakajima Y, Dan-Sohkawa M, Kaneko H. 2009. Defense system by mesenchyme cells in bipinnaria larvae of the starfish, *Asterina pectinifera*. *Dev Comp Immunol* 33:205-215.
- Hamanaka G, Matsumoto M, Imoto M, Kaneko H. 2010a. Mesenchyme cells can function to induce epithelial cell proliferation in starfish embryos. *Dev Dyn* 239:818-827.

- Hamanaka G, Matsumoto M, Hoshi M, Kaneko H. 2010b. Studies on function of the MC5 molecule that is a novel membrane-type metalloproteinase of astacin family during morphogenesis of the starfish, *Asterina pectinifera*. In: Harris, Boettger, Walker, Lesser, editor. Echinoderms: Durham. Taylor & Francis Group. 457-462.
- Kadota J, Nakajima, Y., Dan-Sohkawa, M., Kaneko, H. 2001. Further study on a membrane-molecule expressed in embryonic mesenchyme cells of the starfish, *Asterina pectinifera*. Dev Growth Differ 43Suppl.:S132.
- Kanatani H. 1969. Induction of spawning and oocyte maturation by L-methyl-adenine in starfishes. Exp Cell Res 57:333-337.
- Kaneko H, Takaichi S, Yamamoto M, Dan-Sohkawa M. 1990. Acellularity of starfish embryonic mesenchyme cells as shown in vitro. Development 109:129-138.
- Kaneko H, Kawahara Y, Dan-Sohkawa M. 1995. Primary culture of mesodermal and endodermal cells of the starfish embryo. Zoolog Sci 12:551-558.
- Kaneko H, Kawahara, M., Okamoto, M., Dan-Sohkawa, M. 1997. Study on the nature of the starfish larval muscle cells in vitro. Zool. Sci. 14:287-296.
- Kaneko H, Okai M, Murabe N, Shimizu T, Ikegami S, Dan-Sohkawa M. 2005. Fibrous component of the blastocoelic extracellular matrix shapes epithelia in concert with mesenchyme cells in starfish embryos. Dev Dyn 232:915-927.

- Kominami T. 1984. Allocation of mesendodermal cells during early embryogenesis in the starfish, *Asterina pectinifera*. J Embryol Exp Morphol 84:177-190.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
- Matsumoto K, Miki R, Nakayama M, Tatsumi N, Yokouchi Y. 2008. Wnt9a secreted from the walls of hepatic sinusoids is essential for morphogenesis, proliferation, and glycogen accumulation of chick hepatic epithelium. Dev Biol 319:234-247.
- Miguchi Y, Takata H, Doihara T, Miyawaki K, Shimokawa T, Hamada F, Kobayashi N, Matsuda S. 2010. Morphological maturation level of the esophagus is associated with the number of circumesophageal muscle fibers during archenteron formation in the starfish *Patiria (Asterina) pectinifera*. Biol Bull 219:12-16.
- Ming Kwan K, Li AG, Wang XJ, Wurst W, Behringer RR. 2004. Essential roles of BMPR-IA signaling in differentiation and growth of hair follicles and in skin tumorigenesis. Genesis 39:10-25.
- Murabe N, Hatoyama H, Komatsu M, Kaneko H, Nakajima Y. 2007. Adhesive papillae on the brachiolar arms of brachiolaria larvae in two starfishes, *Asterina pectinifera* and *Asterias amurensis*, are sensors for metamorphic inducing factor(s). Dev Growth Differ 49:647-656.

- Murabe N, Hatoyama H, Hase S, Komatsu M, Burke RD, Kaneko H, Nakajima Y. 2008. Neural architecture of the brachiolaria larva of the starfish, *Asterina pectinifera*. J Comp Neurol 509:271-282.
- Nakajima Y, Kaneko H, Murray G, Burke RD. 2004. Divergent patterns of neural development in larval echinoids and asteroids. Evol Dev 6:95-104.
- Quintin S, Gally C, Labouesse M. 2008. Epithelial morphogenesis in embryos: asymmetries, motors and brakes. Trends Genet 24:221-230.
- Reimer CL, Crawford BJ. 1997. Isolation and characterization of an endodermally derived, proteoglycan-like extracellular matrix molecule that may be involved in larval starfish digestive tract morphogenesis. Dev Growth Differ 9:381-397.
- Tamura M, Dan-Sohkawa M, Kaneko H. 1998. Coelomic pouch formation in reconstructing embryos of the starfish *Asterina pectinifera*. Dev Growth Differ 10:567-575.
- Yamamoto S, Fukumoto E, Yoshizaki K, Iwamoto T, Yamada A, Tanaka K, Suzuki H, Aizawa S, Arakaki M, Yuasa K, Oka K, Chai Y, Nonaka K, Fukumoto S. 2008. Platelet-derived growth factor receptor regulates salivary gland morphogenesis via fibroblast growth factor expression. J Biol Chem 283:23139-23149.

## 謝辞

本研究を進めるにあたり常に温かく御指導、御高配を賜りました慶應義塾大学理工学部准教授、松本緑博士、慶應義塾大学文学部教授、金子洋之博士、放送大学教授、星元紀博士に謹んで感謝の意を表します。

また、終始適切な御助言を賜りました慶應義塾大学文学部准教授、倉石立博士、ならびに同助教、古川亮平氏、実験の場所を快く提供して下さった慶應義塾大学日吉生物学教室の先生方にも心から感謝いたします。

慶應義塾大学理工学部教授、太田克弘博士には、胚体の近似法ならびに統計解析を行う上で御助言を賜りました。階層生物学研究ラボ責任研究員、団まりな博士には、生物学のみならず様々なことを学ばせてもらいました。また、実験材料であるイトマキヒトデの採集にご協力をいただきました他大学の研究者の皆様、臨海実験所および漁協の皆様にも深く感謝いたします。

2006年の夏に出会い、研究のみならず常に私のことを気遣って下さった Brown University, Department of Molecular and Cellular Biology & Biochemistry 教授、Gary M. Wessel 博士にも感謝いたします。

研究生活を共に過ごし、多くの面で支えてくださいました慶應義塾大学理工学部発生生殖生物学研究室ならびに DECI Lab の諸先輩方、同期、後輩、すべての関係者の方に深く感謝いたします。

最後に、中学から私立に通い、2年間も浪人した上に、博士課程においても在学延長を2回も申請したドラ息子にも関わらず、常に支えてくれた両親、家族に深く感謝いたします。

平成 23 年 3 月