

博士学位論文審査要旨

氏名	秋永 薫			
学位の種類	博士(理学)			
学位記番号	博甲第272号			
学位授与の日付	2021年3月31日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
学位論文の題目	Study on the gut coiling morphogenesis in <i>Xenopus</i> larvae			
論文審査委員	主査	神奈川大学	教授	豊 泉 龍 児
	副査	神奈川大学	教授	泉 進
	副査	神奈川大学	教授	小 谷 享
	副査	神奈川大学	教授	大 平 剛

【論文内容の要旨】

秋永薫氏の執筆した本博士論文は、両生類の代表的なモデル動物であるアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*)の幼生における腸管の形態形成について実験研究を行い、得られた結果について議論した論文である。アフリカツメガエルは実験室内で容易に飼育でき、性腺刺激ホルモンの皮下注射により、年間を通じて必要なタイミングで産卵できるという利点がある。アフリカツメガエルの初期幼生は腹部の表皮や腹筋が透明度が高く、ダイナミックな腸管の形態形成運動が、幼生が生きた状態でリアルタイムに観察できることにも利点もある。そのため、脊椎動物の腸管の形態形成を研究するにあたり、実験動物は無尾目両生類のアフリカツメガエルに焦点をあわせて、これを用いた。

無脊椎動物の消化管は、特に擬体腔類など下等な無脊椎動物においては、口と肛門の区別はあるものの、口から肛門まで消化管が直走する場合が多い。また消化管の頭尾軸に沿った領域化、たとえば食道と胃と腸管との区画化も未分化であったり曖昧であるケースが多い。一方、高等な脊索動物である脊椎動物の消化管については、口と総排泄腔ないし肛門までの間に、領域ごとに明確に分化した消化器官が並ぶ。特に腸管については、消化と吸収の総面積を上げるために、体長の数倍の長さの腸管が、腹腔内にコンパクトに折りたたまれて収納されるように発生することが古くから知られている。この折りたたまれた消化管については、特に無尾目の両生類の場合には、幼生期の初期に腹側から見て反時計回りに、あたかも薔(ぜんまい)のように規則正しい螺旋を描きながらその長さを増しつつ、腹腔内で無駄なく折りたたまれていくことが広く知られている。その極めて精緻なパターン形成は、両生類の神経胚期から尾芽胚期までの *nodal* => *pitx2* カスケードの担う左右非対称性決定の分子機構の下流で、何らかの分子機構が働くことで実現していることが、2000年代の前半から予想されてきた。しかしながら、極めて左右対称な外部形態ならびに内部形態を有する両生類の神経胚から、いかなる器官形成を経て、消化管が左右非対称な巻きの形態形成を実現するかについては不明な点が多かった。

本論文の著者である秋永薫氏は、無尾目アフリカツメガエルの両生類幼生の形成期の幼若な腸管が、捕食の開始時期から、すでに活発な蠕動運動を行うことに着目した。その形態形成期の腸管に含まれる未分化な平滑筋の収縮力が「巻きの形態形成」に関与しているのではないかとの着想を得た。その作業仮説を検証するために、まず平滑筋特異的なアクチン(smooth muscle specific actin; 以下 SM-actin)の、巻きの形態形成期の腸管における分布について、抗 SM-actin モノクローナル抗体を用いた蛍光免疫組織化学的手法で調査した。幼生期初期の腸管は未だ大量の卵黄を有していて、細くなりながら長さを増しつつ巻きの形態形成運動を行うが、最も早く収縮して細くなる十二指腸領域に SM-actin が最初に強く発現することが判った。次いで、腸管のうち、巻きの形態形成の中心になる、いわばぜんまい巻きの核になる領域で SM-actin が強く発現し、巻きの形態形成の

領域全体に SM-actin の発現が次第に拡張していくことが判った。卵黄を含んだ腸管が細くなるのは、SM-actin を発現し actomyosin の相互作用によって腸管が円周方向に括れる力で絞られることが原因であると推察された。そこで、SM-actin の発現について、共焦点レーザー顕微鏡を用いた画像のスタックによる 3D 立体像を構築した。その結果、まず十二指腸領域に横断方向(円周方向)に平滑筋が長軸を向けて配向し、次に腸管の長さ方向に長軸を向けた平滑筋が出現し格子状の模様を腸管平滑筋が形成することが判った。その頃には巻きの形態形成の中心になる領域でも、腸管の円周方向、次いで長軸方向に平滑筋の整然とした配向が生じて、最終的に格子模様を形成することが判った。更に、巻きの形態形成の中心領域においてのみ、この SM-actin 陽性の腸管平滑筋の格子模様が捩れ(torsion)を形成することも判った。その意味としては、腸管平滑筋が整然と秩序だって配向することが腸管の太さを細くして、なおかつ捩れのある異方性(anisotropic)のある力の発生が、ぜんまいのような形状の凝集力のある巻きの形態形成を実現していることを予想させた。細胞内の actomyosin の filament が収縮力を発揮する際には、ATPase である myosin がリン酸化されるプロセスが必須である。リン酸化 myosin を特異的に認識する抗体を用いて、SM-actin の場合と同様に免疫組織化学的手法と共焦点レーザー顕微鏡による観察を組み合わせることで検証した結果、SM-actin に関する観察結果を支持する結果が得られた。即ち、リン酸化 myosin も同様のパターンで分布するので、平滑筋は配向しながら収縮力を発揮することで、腸管の巻きの形態形成を行うとの考えが支持された。

次に薬理的な手法を生きた幼生全体(wholemout 幼生)に適用することで、腸管の形態形成に及ぼす影響について調査した。myosin II ATPase の特異的な阻害剤である、Blebbistatin に、巻きの形態形成直前の幼生を浸漬して数日間飼養した。その結果、左右非対称な反時計まわりの巻きの形態形成は消失するか減弱していた。一方、巻きの左右性が消失した処理個体でも、背腹に沿った腸管の左右相称な蛇行は、浸漬処理によっても温存される場合が多かった。即ち、actomyosin の収縮の阻害は、腸管の巻きの形態形成を低減ないし消失させたのである。この Blebbistatin には、S 体と R 体の 2 つの鏡像異性体がある。哺乳類の actomyosin の収縮は、S 体のみで阻害されることが知られている。2 つの鏡像異性体のそれぞれを用いて初期幼生を浸漬飼養したところ、S 体のみが巻きの形態形成の減弱効果を示した。従って、Blebbistatin の特異的な効果はツメガエル幼生の actomyosin の収縮阻害であることが強く示唆された。Blebbistatin 存在下で飼育した幼生の腸管は、SM-actin 幼生平滑筋細胞の格子状の配向性が乱れていたことも、巻きの形態形成が actomyosin 依存的であるとの結果の解釈を支持する。

ツメガエル胚の器官形成期である尾芽胚期には、エネルギー供給のための卵黄小板を全身に大量に保持しており、表皮の傷口修復能力も高い。これに着目した島根大学名誉教授の猪原節之介氏のグループは、尾芽胚を前半部と後半部に二つに切り分けても、それぞれの半胚が数日間生存しつづけることを報告している。この古典的研究にヒントを得て、秋永薫氏は、尾芽胚の(i) 頭部のみを切断して心臓領域を含めて胴尾部を飼養、(ii) 頭部と心臓領域の双方を除去して胴尾部のみを飼養、(iii) 頭部と心臓領域、尾部の三者を除去して、胴部中央領域のみを飼養、の 3 種類の外植体を作成して数日間飼養し、それぞれにおける腸管の形態形成を観察した。その結果、(i)の外植体の腸管の巻きの形態形成は正常幼生に準じるほど良好であったので、中枢神経系の支配無しに腸管が巻くことが判った。また、(ii)の形態形成は(i)ほどではなく、血液の循環が巻きの形態形成に必要であることが示唆された。但し、(iii)の外植体も、一部個体では、巻きの形態形成の中心領域の腸管形態が再現された。そこで秋永氏は、腸管のみを単離培養して、腸管の形態形成の外植体(組織片)培養モデルを作出できるのではないかと考えて、これに取り組んだ。

ツメガエルの体液浸透圧を考慮して哺乳類用の炭酸ガス非依存培地を 70%の濃度に希釈し、腹腔内で腸管がその他の組織領域と明瞭に剥離する発生段階 41 の個体から腸管を切り出して、上記培養液中で気相下で培養した。発生段階 41 は腸管は未だ巻きの形態形成を示す前の発生段階である。1 日間培養した結果、単離腸管は培養液中で高効率で発生段階 43 に相当する初期の巻きの形態形成までを示すことが判った。そのことから、腸管の巻きのメソッドは、少なくとも発生段階 41 までに腸管の内部情報として包含されることが判った。即ち、腸管の巻きの形態形成は、他の組織との組織間相互作用がなくても、発生段階 43 のそれまでは腸管自律的に達しうることが実証された。

この有用な新規開発の培養系を用いて、上述の myosin II ATPase 阻害剤である Blebbistatin や、フィラメント状アクチン(F-actin)のネットワーク形成を阻害する CK-666、myosin light-chain

kinase(MLCK)阻害剤の ML-9、筋収縮を正に制御する細胞内カルシウム結合分子 calmodulin (CaM)の antagonist であり CaM kinase ひいては MLCK の阻害剤となる W-7 の 4 つの薬剤を投与しつつ、発生段階 41 の幼若な腸管を 1 日間培養した。これら 4 薬剤はいずれも単離腸管外植体の巻きの形態形成を低減したり無効化する作用があることが判った。従って、腸管内の actomyosin の収縮を阻害すると、腸管は巻きの形態形成が抑えられると云える。即ち、上述の wholemount 幼生の Blebbistatin 投与群で腸管の巻きの低減したことについては、標的は腸管それ自体であることが強く示唆された。

最後に、上記の秋永氏独自の腸管外植体の培養系を用いて、更に解析を掘り下げた。細胞間コミュニケーション分子である Wnt リガンドによるシグナル伝達系は、初期胚の形態形成や器官形成、細胞分化に影響を与えることが知られており、腸管にも Wnt 経路のリガンドや受容体、下流のエフェクター因子群が発現していることが知られている。そこで、Wnt リガンドの分泌を阻害する阻害剤である Wnt-C59 存在下で腸管外植体を培養したところ、腸管の巻きの形態形成が抑制されることが判った。Wnt 経路阻害剤のひとつである cardionogen-1 の投与下での培養でも、腸管の巻きの形態形成は抑制された。

以上の結果を総合して、無尾目両生類の腸管の巻きの形態形成には、腸管平滑筋が高度に時空間的に制御された形で秩序だって配向しつつ、その細胞内の SM-actin を含んだ actomyosin の収縮力を発揮することが必要であることが強く示唆された。また、腸管の巻きの形態形成は少なくとも発生段階 41 以降は腸管自律的な活動であることが判った。

【論文審査の結果の要旨】

本博士論文は、無尾目両生類のモデル動物であるアフリカツメガエルの腸管の形態形成について、*in vivo*での wholemount の幼生における SM-actin 陽性平滑筋の分布の精査や阻害剤投与実験と、*in vitro*での外植体培養系を用いた解析の双方を組み合わせて、幼若な腸管平滑筋が巻きの形態形成に関与することを実証した論文である。

現在、キイロショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、ニワトリなどのモデル動物で、それぞれ独立に腸管の形態形成運動の分子機構が研究されている研究状況がある。キイロショウジョウバエの後腸のループ形態形成の系では、腸管上皮の細胞の再配列が腸管の左右非対称な屈曲を主導するとの研究結果があり、その影響で、脊椎動物においても腸管の形態形成は上皮が主導していると考えられる研究グループもある。本論文はその予測を必ずしも積極的に否定するものではないが、腸管平滑筋の配向や収縮力の発揮がなければ腸管のぜんまい巻きの達成できないことを多角的に実証しており、「腸管上皮主導説」の不備を突いている。従って、ショウジョウバエ腸管研究から敷衍されて主流となっている「腸管上皮主導説」や、ニワトリ腸管の形態形成で唱えられている「腸間膜主導説」に再考を迫る、いわば腸管平滑筋が主役となる巻きの形態形成も考えられるとの重要なエビデンスを突きつけている博士論文となっている。何よりも腸管平滑筋の時空間的に統御された格子形成やその *anisotropic* な捩れの存在を発見したことは揺るぎなく、脊椎動物の腸管の正常発生に、全く新しい記載をもたらしたことはインパクトが大きい。加えて、*in vitro*での腸管外植体の培養手技手法の開発はありそうでなかったもので、発生段階 41 で独自の手技で切り出すという絶妙の工夫がなければ、培養系の開発は難しかったであろう。そして初期幼生腸管の巻きの自律性をクリアに *in vitro*で立証できたことは予想外の成果であり素晴らしい。

近年は、腸管上皮幹細胞を ES 細胞や iPS 細胞から高効率に分化誘導して organoid (器官様組織構造物)を作る手法が日進月歩で開発されている。その先に、腸管平滑筋と貼り合わされた、より高度な人工腸管の開発の時代がくるであろう。本博士論文の重要性は、無尾目両生類において、腸管が精巧に折りたたまれる仕組みの一端を明らかにしただけに留まらない。本博士論文は、マウスやヒトなど哺乳類を含めた脊椎動物全般の腸管の形態形成の分子機構の解明にあたり、腸管平滑筋の関与に着目するという重要な研究の方向性をエビデンスベースで開拓した研究といえる。秋永薫氏は、本博士論文の内容について、Elsevier 社の学術雑誌 *Zoology* に第一著者として英語論文を出版した。

以上の論文審査結果から、本博士論文の執筆者である秋永薫氏が精深な学識と高度な研究能力を十分に備えていることを審査員全員が認め、合格と認定した。