

「高等脊椎動物の胚葉分化を特徴づける 分子マーカーの探索及び細胞系譜追跡法を用いた 三胚葉層形成機構の解析」

豊泉龍児¹・茂木和枝¹・松下 晋²・保井考太郎³・宇津木和夫²・竹内重夫¹

1. 神奈川大・理・応用生物、2. 東京女子医大・生物、3. 都神経研 (代表者 竹内重夫)

脊椎動物のからだを構成する組織は、外胚葉・中胚葉・内胚葉に起源をもち、各胚葉から生まれた胚性組織同士が相互作用しながら、成体の器官を構成する組織に分化/成熟していく。成体を構成する様々な組織といえども、元を辿れば3つに色分けされることになる。三胚葉の出現は、見かけ上の均質性を保っていた胚体に、最初に現れる組織の形成、即ち組織特異的な細胞の変化であるとみなしうるので、発生学の最重要問題である分化研究・形態形成研究の最も魅力的な接点となる。

それにも関わらず、正常胚のなかで、どのように中胚葉組織や内胚葉組織が生まれるのか？という問題に関しては、胚性腫瘍細胞の細胞株を用いた分化研究が永年栄えてきたという歴史的な経緯から、大きく立ち後れている。

本研究計画は、総合理学研究所の助成のもとに、正常胚の*in situ*における胚葉形成・胚葉分化の問題に取り組んできたので、その結果について報告する。

今年度は、主に内胚葉の形成に関する*in vitro*の再現系の作出に力を注いだ。

以下の培養条件の検討は 竹内研究室の茂木和枝 (現M1) が竹内の指導のもとで行った。受精卵の入手し易さと組織分取の確実さから、今回はニワトリ胚を実験材料に用いた。

(因みに鳥類胚は、哺乳類に初期発生の様式が酷似していることが知られている。)

1. 内胚葉の組織培養の試み

組織間相互作用 (誘導) の視点で胚葉分化を研究するにあたって、*in vitro*の培養モデルの作出は必須条件となる。その上、組織培養に通常用いられる血清には様々な誘導因子が含まれているので、誘導研究には培養条件の無血清化が要求される。細胞の栄養要求性を少ない因子で満たそうとするので、通常無血清培養は困難であるとされる。

三胚葉形成期のニワトリ胚から最初期の内胚葉の微小组織片を採取し、その長期培養の為の培養条件の検討を行った。既に豊泉らが、ニワトリ胚の三胚葉の起源組織である (胚体にとって最初に形成される上皮である) 胚盤葉上層細胞 (Epiblast) の完全無血清培地による長期培養に成功している ('93, '94動物学会大会 / '94科研奨励(A)報告書)。

RPMI1640高栄養培地にハイブリドーマ培養用の無血清培地補助剤「Mito+™」の原液を0.1-0.2% (v./v.) の割合で加えることで、Epiblastの外植体は1週間にわたる長期培養が可能であった。Mito+™は、Insulin, Transferrin, 亜セレン酸を主成分とする、11種類の栄養成分が配合されたものである。

Epiblastは孵卵開始時には上皮を形成しており、初期内胚葉は孵卵20時間前後で形成されることから、両者の栄養要求性は類似しているのではないかと考え、同じ条件で初期内胚葉の無血清培養を試みた（実験回数7回/例数42）。

内胚葉組織片は、3日以内にtype I collagen またはEHS gelという細胞外基質を塗布した培養皿表面で単層に伸展し、数日間は弱い増殖を示し、1週間の生存をした（図上段）。

このことから、「Mito+を加えた完全無血清培地は、初期内胚葉の組織片の培養液として必要な要件を満たしている」ことが明らかとなった。

組織片は、5日目ごろから、単層に伸展した細胞シート内部で、

- ・索状の細胞集合塊がシートの表層（apical side）に出現
- ・単層のシートの基底側（basal side）が球状に浮き上がる（vacuolization）

という現象が見られた。

しかしながら、こういった現象は一般に「比較的弱い分化状態の反映」と言われる。古典的な漿尿膜上への組織片の移植実験の結果から、「初期内胚葉は自立分化能が高い」とされている。そこで「更に入念な培養条件を与えれば、内胚葉の自立分化能が*in vitro*で再現され、内胚葉がより一層分化した形質を発現する」、という期待が持たれた。

以上の理由から、我々は次に、上記の無血清培養液を用いて「より顕著な組織分化を引き起こす培養条件の検討」を行った。

以下のA, B, Cに大別される 三つの条件を検討した。

A. 初期内胚葉と初期中胚葉との外植体の共培養

ニワトリ胚は黄身が多く卵黄表面で発生が進む端黄卵であるので、三胚葉期には内胚葉層と中胚葉層とが互いに裏打ちし合う構造になっている（理学部News Letter No.4の表紙絵参照）。両者の密接な相互作用が、内胚葉の分化に必須であると考え、上記の無血清培養条件下で、共培養を試みた（実験回数1回/例数2）。

その結果、4日以内に中胚葉の凝集塊のコアと、それを取りまく内胚葉の単層シートに細胞選別*が生じた。特に中心部分の中胚葉組織は急激な増殖を示した。しかしながら、内胚葉のシートは形態的にすら、あまり変化を示さなかった。増殖による両者の細胞数の違いが5日目ごろから極端になったので、1週間で培養を打ち切った。

*（2種類の組織の接着性の違いによる、各々の選択的集合、両者の分離）

B. 内胚葉外植体のゲル上での培養

組織は、細胞と細胞の分泌タンパク質を成分とする細胞外基質（ECM；extracellular matrix）からなる。細胞培養は通常、培養皿に特定の細胞外基質を薄く塗布して細胞に親和性を持たせた状態で行う。接着依存性細胞は、基質面に接着できないと数時間で死んでしまう。

近年、細胞外基質を薄く塗布した表面で上皮性の組織の外植体を培養すると、基底膜面側（皿の表面に近い側）からの栄養供給が満足に行われなことが原因で、組織の十分な

分化形質の発現を引き出せないことがあることが分かってきた。

この問題の対応策として、次の2点が考え出された。

- ・高濃度の細胞外基質成分に厚いゲル層を形成させ、その上で培養することにより、増殖因子の基底膜面側からの滲入を促進させる。
- ・特定の細胞外基質のみの塗布しても培養細胞の分化が乏しい場合、より*in situ*（生体内）の基底膜に近い成分組成のそれにゲル層(基底膜再構成ゲルと呼ばれる)を形成させて培養基質に用いると、更に良く分化する場合がある。

そこで我々は、EHS肉腫の分泌する基底膜ゲルの一種であるEHS gel上での培養を行った。残念ながら、初期内胚葉にとっては、collagenの塗布表面上での培養とEHS gel上での培養とで、外植体の分化状態に違いは認められなかった（実験回数5回/例数25）。

C. 内胚葉外植体／単細胞のゲルによる包埋培養

組織細胞は、通常自分自身の栄養因子を分泌している。

ゲルで細胞や組織片を包埋して培養（包埋培養）を行うと、自身の分泌する微量の栄養因子が（拡散しにくいので）細胞近傍に留まる。そのため、塗布面やゲル面での培養では分化しなかった組織も分化してくる場合があることが知られている。

そこで、内胚葉組織片の包埋培養を行った。

意外にも、包埋培養によって組織全体が3日前後で大きくダメージを受けてしまった（実験回数2回/例数10）。不健康な細胞は肥大化したり、細胞内に空砲や泡状突起を形成するとされるが、そういったものが認められた。初期胚細胞の細胞寿命が短いために死細胞の発生率が高く、それらが生きている細胞の回りに留まることが原因と思われた。

一般に、タンパク質分解酵素を用いた上皮シートの単細胞への細胞分散は、高度のダメージを伴うとされる。豊泉らは、「カルシウムのみ不含のSpinner's MEM培養液中で、切り刻んだ細胞組織片を5分に一度flashingしながら15-30分放置しする」という、大変穏和な条件で、（不思議なことに）孵卵数時間後のStage XII-XIIIのEpiblastの組織片は単細胞への自発的な解離を示し、分散後の単細胞の大半が培養基質表面（基底膜主成分であるlamininやEHSのゲル上）に生着することを発見した（投稿中）。

そこで、初期内胚葉細胞の起源細胞である初期原条細胞や（上皮層を形成した直後である孵卵0時間の）Stage XのEpiblastをこの方法で単細胞に分散し、EHS gelによる包埋培養を行った。単細胞への分散は良好であったが殆ど翌日に全滅してしまった（それぞれ、実験回数3回/例数5と実験回数1回/例数3）。

上記の分散方法で、初期内胚葉の組織片の単細胞への分散・培養基質面への生着も良好であった（実験回数1回/例数4）。しかしながら、これらはEHS gel上に数時間しか接着せず、翌日には死滅してしまったので、包埋培養の適用は見送ることにした。

上皮組織細胞にとって、細胞間の接触によるcouplingが生存のために必要であることが多いことを考えあわせると、Epiblast以上に上皮化した初期内胚葉細胞は単細胞に分散することで簡単に死滅してしまうと推察している。

1.の結論として、

「初期内胚葉細胞の1週間の長期にわたる完全無血清培養に成功した。
しかしながら、内胚葉由来の組織の明確な分化を引き起こすには至らなかった。」
.....と言える。

2. 中胚葉細胞・内胚葉細胞の陥入行動の*in vitro* モデルの作出

上皮シートの形成する球面として存在していた動物胚にとって、原腸形成運動と呼ばれる局部からのシートの折れ曲がり、それに伴った閉空間内部に進入する間葉性細胞群（中胚葉）の出現は大きな事件といえるだろう。しかも原腸形成運動は三胚葉性動物全てに、即ちウニやヒトデからヒトまでに共通する現象である。原腸形成時に、中胚葉や内胚葉の細胞は、陥入（ingression）と呼ばれる細胞運動によって、上皮シートから離脱し、潜り込むことが知られている。

ニワトリやヒトの胚では、細胞の陥入行動は原条と呼ばれる領域にほぼ一致して起こる。孵卵数時間後には単層上皮となる胚盤葉上層 Epiblast は、かなり成熟した基底膜に裏打ちされている。従って、三胚葉形成の端緒となる陥入行動は、これを通過しないと達成出来ない。原条期の Epiblast の基底膜は、原条部分で消失していることが、抗-(基底膜構成タンパク)を用いた免疫染色や電顕による組織観察から分かっている。その為鳥類胚の gastrulation における陥入行動は、陥入細胞による基底膜の分解が道を開くものと考えられてきた。この「常識」に対する納得のいく証明は、1989年の Sanders らの報告*を待たなければならなかったと我々は認識している。彼らは初期原条期の原条近傍の Epiblast の微小片を、基底膜ゲル (Matrigel™) 上で培養した。その結果、数日後には伸展した細胞シートの一部の細胞がゲル中に浸潤 (invasion) していた、と報告している。

本計画の目的と関連の深いこの研究に関して、我々は以下の問いに答えられるように実験デザインを更に工夫するべきであろうと考えた。

- ① Epiblast が浸潤能を獲得するのは何時か？ 初期原条が出現する以前か？
- ② 個々の細胞が浸潤能を発揮するのか？ 予定陥入細胞同士の cell-to-cell communication は必要か？
- ③ 血清成分または基底膜ゲルに含まれる成長因子の影響で、人工的に浸潤能が誘導された懸念はないか？
- ④ *in vitro* でも予定中胚葉/内胚葉細胞のみが、浸潤能を発揮するのか？
- ⑤ 浸潤能の獲得は、誘導現象か？ 自立分化か？

* Sanders, E. J. and Prasad, S. (1989). J. Cell Sci. 92, 497-504.

これらの疑問をもとに、無血清培養系で陥入行動の素過程の再現を試み、それに成功した。方法の詳細から述べる。

【方法】

前原条期（初期原条細胞塊の出現前）の明域（胚体域）中央部からEpiblastから単離した単細胞を、**1.**に記した組成の培養液で、完全無血清培養した。ゲルへの浸潤が生じているか否かを、位相差顕微鏡並びに（標本を金蒸着して）走査型電子顕微鏡で観察した。

細胞分散

ガラス針で明域中央部から、200-300 μm 四方のEpiblastを切り出した。小片はパラフィンを溶かし込んだシャーレに移し、その上でガラス針で可能な限り細切した。これをマイクロピペットに吸い込み、浮遊培養用のSpinnerのMEM (Ca^{2+} -free) を200 μl 満たした中に移し、5分に1回ずつflashingしながら15-30分間室温で放置した。こうして得られた接着能を失わない状態の単細胞を培養液中に蒔いた。

培養液

高栄養培地RPMI1640に、Mito+Serum Extender™を0.2%の割合で添加した完全無血清培養液を用いた。この培養液で、Epiblastの組織小片は1週間、最も初期の中胚葉は（少なくとも）4日間培養可能であることを確認している。"Mito+"の主成分であるInsulin, Transferrin, 亜セレン酸をRPMI1640に添加するだけでも、Epiblastの組織片は数日間増殖し、1週間は生存可能であることも確認している。

培養基質

2mg/ml laminin溶液を薄く引き延ばし、37℃で数時間放置し、ゲル化させたものを用いた。lamininは、基底膜の主要な構成蛋白質である。基底膜ゲル並びに type I collagen gelも用いた。

【結果】

8時間後には単細胞はゲルに潜り始め、16-24時間後には単細胞の半数は浸潤し、ゲルに穴を掘り進んで、その底や穴の側壁に付着した状態で存在していた（図下段、実験回数4回/例数19）。しかしながら、1日を経過しても浸潤を認められない細胞も半数存在した。1.-C.に記した基底膜ゲルを用いた場合、単細胞の多くは2日間は生着した。不思議なことに、type I collagen ゲル上でEpiblastの単細胞を培養した場合、全く細胞の浸潤は観察されなかった（実験回数4/例数13）。陥入した後の、初期中胚葉細胞は、穴を掘らず 同じゲルの上を匍匐運動した（実験回数3/例数8）。上述のように、内胚葉細胞は単離すると大半が1晩で死滅してしまったので、単細胞レベルでの浸潤能の測定は困難であった。

以上の結果は、単純ながら豊富な含意を持っている。
(理学部News Letter 表紙解説から以下3行転載)

- ・ 陥入する(予定の)細胞自身が、基底膜を溶かす能力を持っている。
- ・ 基底膜を溶かす為に、周りの細胞のサポートは必要ない。
- ・ 浸潤能は、特定の時期を過ぎると失われる

本実験系に関する今後の展開として、次の二つを主に考えている。

1.
陥入行動を起こした細胞群は予定中胚葉/内胚葉細胞と一致するののかについて、表面抗原に対する特異抗体を用いて判定したいと考えている。(現在実験中)
2.
カエルの原腸胚細胞を用いた場合、同様な解離単細胞によるゲルへの浸潤が生じるのかを調べたいとも考えている。何故ならば、カエル胚では、動物局側の細胞のシートの面積の増大による物理的な外力が、陥入運動の主な駆動力になると考えられているからである。そのため、浸潤による陥入メカニズムは余り想定されていない。
カエル原腸胚の細胞が浸潤行動を起こした場合、発生学の教科書の説明を書き換えるだけの大きな結果となりうる。

2.の結論として、

「三胚葉形成における最初の細胞運動である 陥入行動の、培養モデルを作出した。
実験結果は、Epiblastから中胚葉細胞や内胚葉細胞が陥入する現象は細胞浸潤のメカニズムによるとの説を強く裏付けた。」

.....と言える。

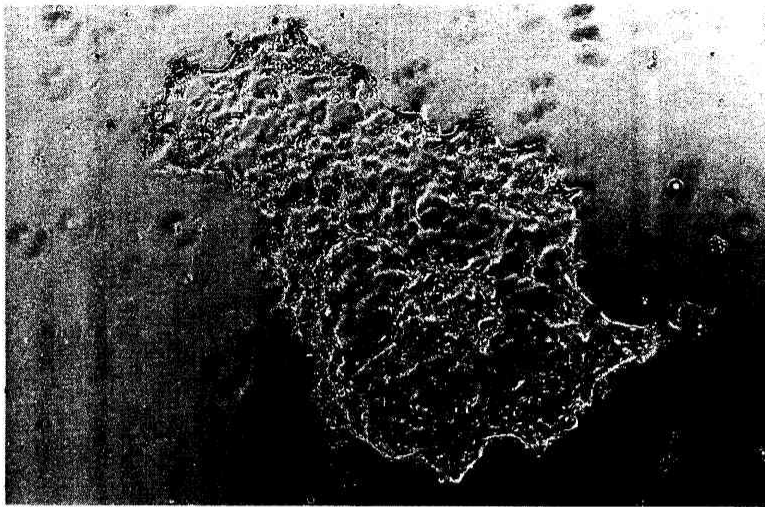
総論

高等有羊膜類の三胚葉形成について、ニワトリ胚を材料に、2つの実験を行った。初期内胚葉細胞の長期培養並びに、胚葉形成の初動をなす陥入行動の培養モデルを完全無血清培養条件下で成功した。

今後は、これらの成果もとに、正常胚内での細胞行動/分化を常に意識しながら、分化マーカーを駆使して胚葉形成の研究を推進していきたいと考えている。

- 謝辞 -

本研究に様々な助言を下された、日本動物学会会員の諸氏並びに応用生物科学科教員各位にこの場を借りて御礼申し上げます。



【図の説明】

- 上段 -

ブタ臍由来のtype I collagenを薄く塗布したプラスチック培養皿上で培養した、ニワトリ胚の発生段階5の初期内胚葉シート。培養6日目。大部分が単層に伸展して生育しているが、所々水泡化して接着面から浮き上がっている部分があることに注意。

倍率 X15倍。

- 下段 -

マウスEHS肉腫由来の基底膜ゲル上で培養した、ニワトリ胚Epiblastの単細胞。Eyal-Giladi & Kochavの発生段階XIIIの予定胚体域中央のEpiblastを単細胞に分散、培養1日後に固定を行い、標本を金蒸着し、走査型電子顕微鏡で観察した。細胞がゲルを溶かし、かつ接着しながら潜り込んでいるのが分かる。

倍率 X2000倍。