

四肢微小集積培養系におけるパターン形成のメカニズム

京都大学大学院医学研究科 生体構造医学講座 形態形成機構学部門
三浦 岳

1. バックグラウンド

四肢の形態形成は発生生物学の中で非常に研究の盛んな分野で、前後軸、近遠位軸、背腹軸それぞれに関して関連する遺伝子が同定されつつあります。しかし、それとは別に、理論生物学の分野で、四肢の軟骨のパターンが形成される際に、一定の周期を持って形成される、という性質がある事が古くから指摘されてきました。(図1) 反応拡散系をベースにした数理モデルがいくつか作られてきましたが、この実験的な検証はほとんど行われていない状態でした。我々はこの周期性を残した *in vitro* の細胞培養系として四肢間葉細胞の微小集積培養に着目しました。

2. 微小集積培養系

微小集積培養系とは、発生途中の胚の四肢の組織を分離してきて、一度酵素処理で細胞レベルまでバラバラにしてから、再び高密度で培養する系のことです。これによって、一部の細胞は軟骨に分化し、一部の細胞は線維芽細胞のまま留まるのですが、その軟骨になる細胞群が幅が200 μm 程度の縞模様を形成します(図2)。これは、実際に生体内で指を形成する際の軟骨原基の幅と非常に近いので、古くからこのパターンと実際の軟骨形成のパターンとの関連が示唆されていました。

3. 二つのモデル

この培養系における形態形成について、これまで二つの理論モデルが提唱されてきました。一つは反応拡散系で、もう一つは細胞選別です。反応拡散系は、二種類の仮想的な分子の相互作用によってほぼ均一な初期条件から周期的なパターンが形成される、と言うものです。もう一つは細胞選別で、これは培養の開始時に既に軟骨になる細胞が決定されていて、それらの接着性の違いによってクラスターができ、transient にパターンが形成される、と言うものです。それぞれについてそれを支持する実験的な証拠があるのですが、これらの比較は行われていませんでした。

4. モデルの比較

そこで我々はまず、モデルの用いている因子を実際に実験的に変化させる事によって、パターンの周期性(もしくは、クラスターのサイズ)を変化させる事ができるかどうか検証しました。その結果、ゲルの中に包埋する事によって拡散係数を変化させるとパターンの平均幅が短くなる(図3)のに対し、細胞接着、細胞運動を変化させてもパターンに変化は見られませんでした。このことから、これらの二つのモデルの中では、反応拡散系の方がメカニズムとしてより確からしい事がわかりました。

5. TGF β 2 は activator の働きをしている?

次に我々は、反応拡散系の分子実体として、TGF β 2という増殖因子が activator の役割を果たしているのではないかと仮定し、この分子が activator の必要条件をみたしているかどうか検証しました。その結果、TGF β 2がこの培養系で

1. 軟骨の存在する部位に局在すること
2. 軟骨分化を促進する事
3. 自らの産生を促進する事
4. 局所的に投与すると、側抑制を引き起こす事(図4)

がわかりました。このことから、TGF β 2がこの培養系内において activator の役割をはたしてTGF β 2が実際の生体内でも軟骨の形成部位に局在する事、生体内で局所的に投与すると異所性の軟骨をつ

くる事などから、培養系だけでなく生体内でも同様の働きをしている事が予想されます。

参考文献：

Miura, T., M. Komori, et al. (2000). A novel method for analysis of the periodicity of chondrogenic patterns in limb bud cell culture: correlation of in vitro pattern formation with theoretical models. *Anat Embryol* **201**: 419-428.

Miura, T. and K. Shiota (2000). The extracellular matrix environment influences chondrogenic pattern formation in limb bud micromass culture: experimental verification of theoretical models of morphogenesis. *Anat Rec* **258**: 100-107.

Miura, T. and K. Shiota (2000). TGFβ2 acts as an "activator" molecule in reaction diffusion model and is involved in cell sorting phenomenon in mouse limb micromass culture. *Dev Dyn* **217**: 241-249.

Newman, S. A. (1996). Sticky fingers: Hox genes and cell adhesion in vertebrate limb development. *BioEssays* **18**(3): 171-174.

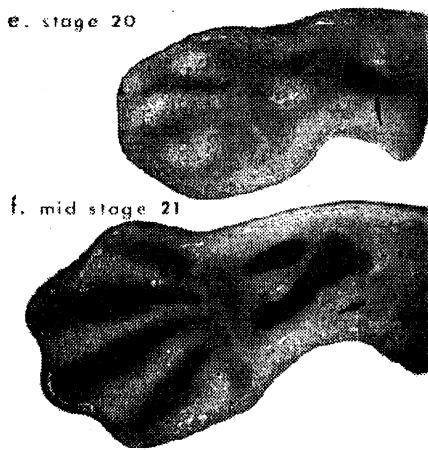


図 1：マウス四肢の発生

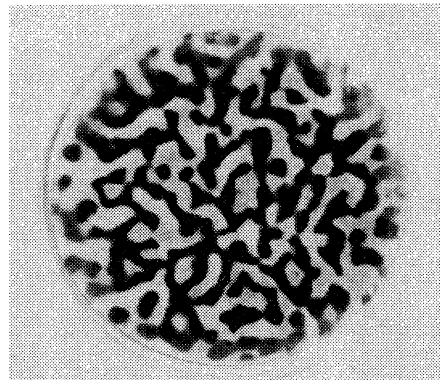


図 2：培養系における軟骨パターン

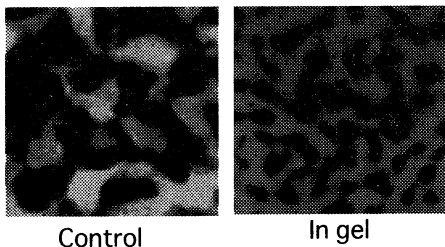


図 3：拡散係数の変化によるパターンの変化

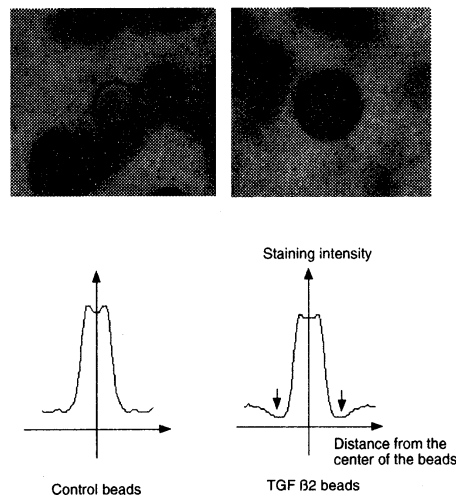


図 4：TGFβ2による側抑制効果