

四肢パターン形成過程における細胞間認識の分子機構の解析 Analysis of cell-to-cell recognition mechanism in limb pattern formation

和田直之 川崎医科大学 医学部 分子生物学教室 助手

Naoyuki WADA Reserch associate, Department of Molecular Biology, Kawasaki Medical School.

In the developing limb bud, mesenchymal cells aggregate into suitable position, and form skeletal pattern of the limb. In this study, I analyzed the mechanism of cell-cell recognition in limb pattern formation, and focused the EphA family of tyrosine kinase receptors and their cell-surface ligands, the Ephrin-A family. These molecules can interact each other, and regulate cell migration in various developmental systems. In the chick limb bud, strong expression of Ephrin-A2 protein is observed in the proximal to middle region of limb bud, but very faint in the distal region. This expression pattern seems to be complementary to that of EphA4 receptor, because its expression is restricted in the distal mesenchyme of the limb bud. Overexpression of Ephrin-A2 in the limb mesenchymal cells changed cell affinity, and induced skeletal malformations in the autopod region. These results suggest that Ephrin-A2 is involved in limb pattern formation with regulating of cell affinity in the limb bud.

1. 研究目的

脊椎動物の四肢を構成する組織は一定のパターンで分布している。組織パターンは、組織の前駆細胞が四肢原基(肢芽)の一定の場所に移動し、そこで分化して形成される。パターン形成過程にはさまざまな分泌性蛋白質や転写因子が関与することが報告されているが、どのようにして細胞の移動場所を指定・制御するのかについての報告は少ない。本研究では、細胞の移動制御に関わる分子と組織形態との関連を調べる目的で、四肢の発生過程に注目して解析した。

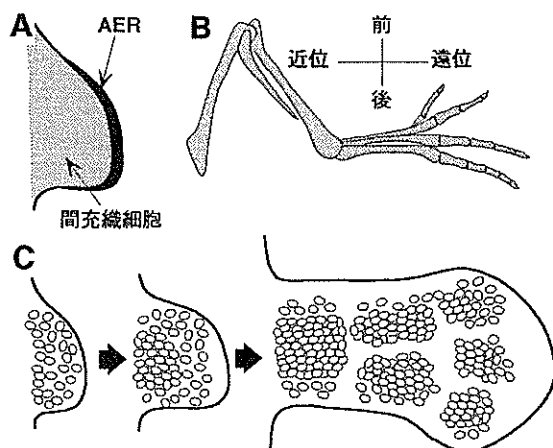


図1. A, 孵卵4日胚の肢芽の模式図。B, 孵卵10日目のトリ胚の後肢骨格パターン。C, 肢芽の発生と間充織細胞の凝集の関連を示す図。遠位では複数の部位に凝集する。

四肢の原基(肢芽)を構成する未分化間充織細胞は、発生過程で凝集して軟骨に分化する。このとき近位では一カ所に凝集するが、遠位になるほど複数の領域に分かれて凝集し、骨格のプレパターンを形成する(図1)。筋や神経はこのパターンに対応して配置されるので、間充織細胞の凝集パターン形成は四肢の組織パターン全体に重要な意味を持つ。細胞の集合や移動調節には、細胞間の相互認識や親和性(affinity)を司る分子群が関与することから、これらに焦点をあてて解析した。

細胞間認識に関与する分子として、受容体型チロシンキナーゼのEphAと、その膜結合型リガンドのEphrin-Aに注目した。これは、両者が隣接する細胞上で相互作用すると接触性反発作用が誘起され、細胞の移動制御や組織の区画化が行われることが、様々な系で報告されているためである。本研究では、四肢発生過程にもEphAとEphrin-Aの相互作用が関与することを仮定し、トリ胚肢芽を用いて分子の発現や機能を解析した。

2. 研究経過

2-1. 肢芽で発現するEphrin-A, EphA

(1) 既知のEphrin-A, EphAの発現パターン

免疫染色法を用いて、肢芽で発現するEphAやEphrin-A蛋白質の分布を調べた。

① 方法 ニワトリ受精卵を解卵し、発生段階を追って胚を固定した(4% paraformaldehyde-PBS, 2時間)。微細操作を行った胚についても同様に固定した。前処理(脱水、漂白、再水和)の後、胚を一次抗体と反応させた。洗浄の後、ペルオキシダーゼ標識した抗マウス抗体と反応させ、さらにDAB-H₂O₂溶液中で発色させ、抗体結合部位を検出した。一次抗体には抗ニワトリEphA3, EphA4, Ephrin-A2, Ephrin-A5抗体(いずれもマウス由来; 熊本大学・田中英明教授より分与)を用いた。

② 結果と考察 免疫染色法により、Ephrin-A2, Ephrin-A5, EphA4の発現が観察されたが、EphA3は観察されなかった。EphA4とEphrin-A2が特徴的なパターンで発現していたので以下に示す(図2)。

EphA4蛋白質は、肢芽の初期段階では遠位間充織で強く発現し(図2A)、肢芽が伸長すると自脚(手、足)を形成する領域で発現していた(図2B, 矢印)。また近位では肢芽と体幹の境界領域および背側中央部の間充織で帯状の発現が認められた。これに

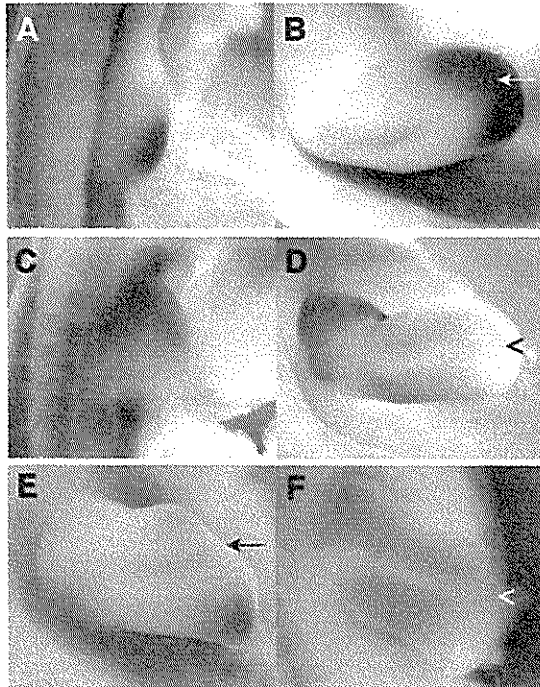


図2. 肢芽におけるEphA4 (A, B), Ephrin-A2 (C, D)の発現と、AER除去の効果 (E, EphA4; F, Ephrin-A2)

対し、EphA4のリガンドの一つ・Ephrin-A2蛋白質は初期肢芽には肢芽全体の間充織で発現していた(図2C)が、肢芽の伸長に伴い肢芽遠位での発現が低下し、特に自脚形成域ではごく弱い発現しか観察されなかった(図2D, 矢じり)。一方、近位間充織での発現は維持されていたが、背側中央部では低下していた。このように、EphA4とEphrin-A2は肢芽内部でほぼ相補的に発現していることがわかった。

ついで、肢芽遠位での両分子の発現と肢芽先端部外胚葉(AER)との関連を調べた。肢芽の伸長にはAERが必要で、AERを除去すると肢の遠位の構造が欠損する。AERを除去した結果、EphA4の発現は低下した(図2E, 矢印)が、Ephrin-A2の発現は維持された(図2F, 矢じり)。したがって、肢芽遠位での両者の発現制御にはAERが必要であると考えられた。

以上のように、Ephrin-A2とEphA4は肢芽の近遠軸に沿って互いに相補的に発現することから、それぞれ近位または遠位の組織パターン形成に関与する可能性が考えられた。また、Ephrin-A2とEphA4は相互作用できるので、両者の発現境界では反発作用が誘起されることが予想される。これにより細胞凝集時の細胞の移動部位やその方向が制限され、一定のパターンが形成されると考えられる。

(2) 新規Ephrin-Aの単離の試み

マウス胚肢芽では、より多くのEphrin-A分子の発現が報告されている。トリ胚から新規Ephrin-A分子を単離する目的で、トリのゲノムDNAを用いてゲノムサザンハイブリダイゼーションを行った。

① 方法 ニワトリ胚より抽出したゲノムDNAを、複数の制限酵素で別々に処理し、それぞれを電気泳動してメンブレン上に転写した。転写したDNA断片を、標識したEphrin-A2遺伝子と55℃で16時間ハイブリダイズさせた。洗浄ののち、メンブレン上に残った標識DNAを化学的に検出し、Ephrin-A2遺伝子とハイブリダイズした遺伝子の有無を検討した。

② 結果と考察 上記手法により、Ephrin-A2遺伝子がハイブリダイズしたと判断できるバンドが最低三本確認できた。このことはニワトリゲノム中には既報告のEphrin-A2や-A5以外に新規Ephrin-Aが存在することを示唆している。

2-2. Ephrin-A2と四肢パターン形成

(1) Ephrin-A2の過剰発現と骨格パターン

Ephrin-A2は肢芽近位の間充織で発現し、遠位での発現は弱かった。そこで、遺伝子操作により肢芽遠位でEphrin-A2を異所的に発現させ、ここから形成される組織パターンを調べることににより、正常な四肢発生過程でのEphrin-A2の機能を検討することを試みた。Ephrin-A2の異所的な発現にはトリレトロウイルスベクターのRCASを用いた。

① 方法 Ephrin-A2遺伝子を組み込んだRCASを、トリ胚繊維芽細胞に導入した。この細胞を大量培養し、培養上清中に分泌されたEphrin-A2導入ウイルスを回収し、遠心にて濃縮した。濃縮したウイルスを肢芽形成領域にマイクロキャピラリーを用いて注入・感染させ、発生させて、形成された軟骨を調べた。

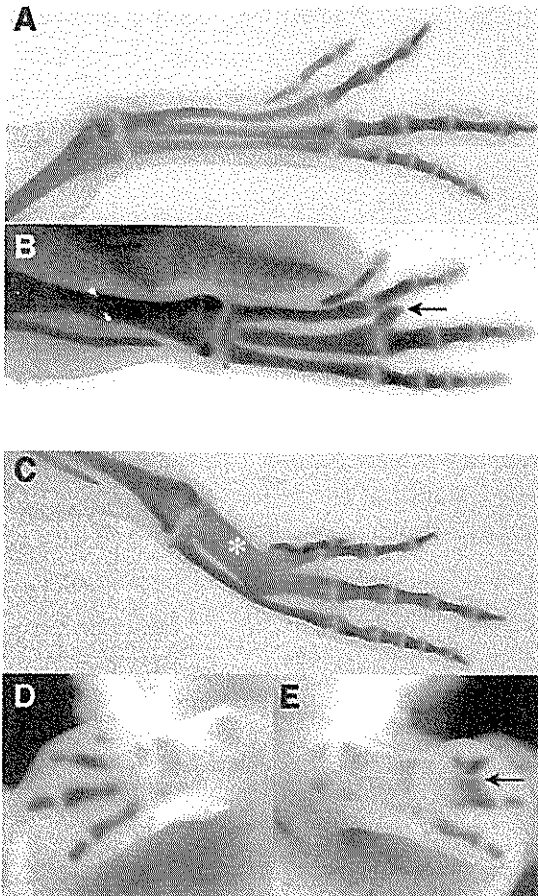


図3. Ephrin-A2の過剰発現によって形成された骨格パターンの例。A-C, 10日胚; D-E, 7日胚。A, Dは対照

② 結果と考察 Ephrin-A2過剰発現肢芽を発生させた結果、遠位構造である自脚の軟骨パターンに変化を持つ個体が観察された(図3)。形成されたパターンの例として、過剰指(骨)の形成(図3B, 矢印)や、中足骨や指の融合(図3C, *印)、分節(関節)形成位置のずれなどが観察された。同様の変化は、軟骨形成初期に合成される細胞間マトリックスのAggrecanの発現によっても観察され、指間での異所的な発現(図3E)や、発現の遅れなどが見られた。一方、軟骨パターン形成に関与する分泌性蛋白質や転写因子の発現には変化がなかった。そのため、Ephrin-A2の過剰発現は間充織細胞の移動能や凝集能を直接変化させ、これにより異所的な凝集塊の形成や凝集時期の変化が生じた可能性が考えられた。

一方、柱脚や輻脚などの近位骨格には骨格の変化は観察されなかった。正常肢芽ではEphrin-A2は近位で多く発現している(図1D)ため、過剰発現させても強い効果が現れにくいと考えられる。

(2) Ephrin-A2の過剰発現と細胞親和性の変化

(1)の結果をもとに、Ephrin-A2の過剰発現による細胞の状態変化を調べる目的で、細胞間の親和性に及ぼす効果を解析した。

① 方法 (1)-①と同様にしてEphrin-A2-ウイルスを肢芽領域に感染させて発生させた。48時間後に固定し、免疫染色法によって肢芽内でのEphrin-A2過剰発現細胞の分布を観察した。対照にはアルカリフォスファターゼ(AP)遺伝子を組み込んだウイルスを用い、AP発現細胞の分布を調べた。一方、ウイルスを感染させた間充織細胞を調製し、非感染細胞と混合して培養した。培養開始後3時間と24時間で固定し、Ephrin-A2発現細胞またはAP発現細胞の分布を調べた。

② 結果と考察 肢芽内で、Ephrin-A2過剰発現細胞は斑状または帯状に集合していた(図4A, 矢印)。AP発現肢芽では細胞の集合は観察されず、個々の発現細胞は分散していた(図4B)。そのため、Ephrin-A2の過剰発現により間充織細胞の親和性が変化し、過剰発現細胞が集合したことが考えられた。

このことを検証するために、Ephrin-A2過剰発現細胞と正常細胞(Ephrin-A2低発現)とを混合して

培養を行い、細胞の分布を調べた。培養開始後3時間では過剰発現細胞は分散していたが(図4C)、培養開始後24時間では集合し、正常細胞とは選別していた(図4E)。一方、APを発現させた細胞では選別や集合は観察されなかった(図4F)。

以上の結果は、Ephrin-A2の過剰発現により細胞間親和性は変化し、低発現細胞との間で選別・集合が起こることを示している。したがって、図3に示した骨格形態やパターンの変化は、細胞親和性の変化が原因となっていると考えられる。

3. 研究成果

① 遺伝子操作と培養系を組み合わせた実験から、間充織細胞はEphrin-A2の発現量に応じた親和性を有

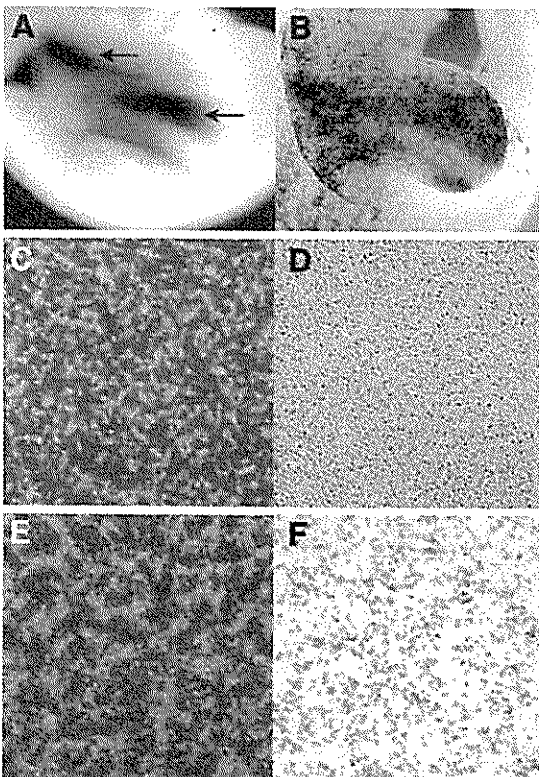


図4. Ephrin-A2と細胞親和性の変化。A, Ephrin-A2過剰発現細胞の肢芽内での分布。矢印は集合した過剰発現細胞; B, Aの対照。AP発現細胞は集合しない; C-E, 培養系でのEphrin-A2過剰発現細胞の分布。C, 培養後3時間。過剰発現細胞(白点)は均一に分布する; D, Cの明視野像; E, 24時間。過剰発現細胞は集合する; F, Eの対照。AP発現細胞(黒点)は24時間後でも集合しない。

することがわかった。正常発生過程においても、Ephrin-A2の発現量に依存した細胞親和性が生じ、肢芽内での移動や凝集が調節されると推察される。この結果は、Ephrin-AやEphAが発現する他の発生系にも摘要できると考えられる。

② 上記①の成果と合わせ、四肢の骨格パターンや個々の骨格形態が、間充織細胞の持つ親和性の違いにより決定される可能性を示した。

4. 今後の課題と発展

細胞が集合した原因として、Ephrin-A2の過剰発現により接着性が促進された可能性と、低発現細胞との反発作用が促進された可能性が考えられる。この点については、より細胞生物学的な視点からの解析が必要であり、相補的に発現するEphA4の関与や、既知の接着分子なども考慮しながら実験を進める必要がある。また本研究では骨格パターンに重点をおいたが、今後、筋や神経・血管など他の組織パターン形成についても同様の解析を進めることにより、細胞親和性と組織形成の関連をより一般的な形で議論できると考えられる。

他方、Ephrin-A2を過剰発現させた肢芽から、異所性軟骨や融合を持つ肢骨格が形成された結果は、細胞親和性の変化が多指症や合指症の原因となりうることを示唆している。マウスやトリの多合指となる系統(変異)では、肢芽間充織の接着性に変化があることが指摘されている。现阶段では、これらの変化とEphrinやEphを含むさまざまな接着関連分子との関連は明瞭ではないが、上記の系統を用いた解析により関連性が明らかになると考えられる。これにより、ヒトにおける同様の疾患を、細胞認識や接着性など細胞の性質変化という観点から捉えていくことができるのではないかと考えられる。

5. 発表論文リスト

Wada, N., Tanaka, H., Ide, H. and Nohno, T. Ephrin-A2 regulates position specific cell affinity and skeletal pattern formation in the chick limb bud. (準備中).