

発生生物学Ⅱ

(8) 細胞凝集と形態形成 (Cell Aggregation and Morphogenesis)

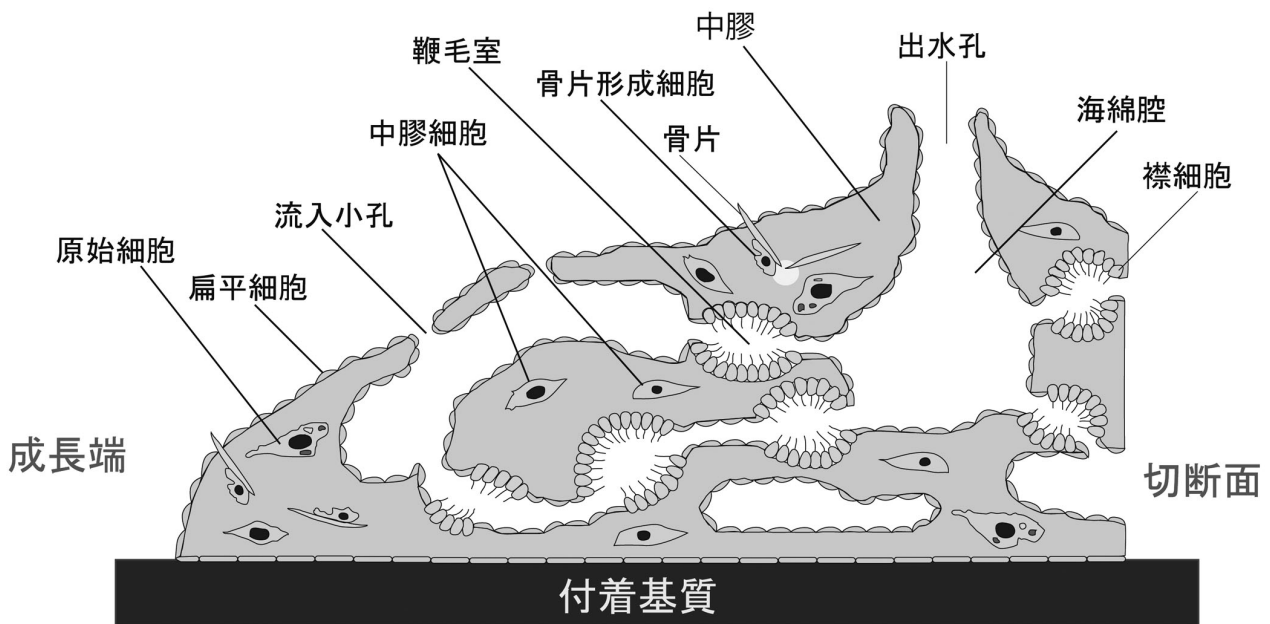
今までに、受精、卵割、囊胚形成、軸の決定について勉強してきた。前後、背腹の軸が決まれば左右の軸は自ずと決まる。軸によって、胚のどの位置にどんな組織や器官を作るかが決められる。この先は、その適正な場所に組織や器官がどのように配置されるか、そして、適正な形の器官がどのように形成されるのかが問題として残る。……組織、器官の形態形成のしくみ

細胞凝集がこの研究に有用な実験系を提供

細胞が凝集するのを発見したのはウィルソン Wilson が 1907 年に海産の赤いカイメン *Microciona* の小片を海水の入った皿に絹布のフィルターを通して押し出すことで、簡単に生きた細胞の浮遊液ができることを見つけた。さらに、驚くべきことに、細胞はバラバラのままではおらず、徐々に再集合して多くの細胞からなる塊になった。この塊の中で、カイメンの組織が再形成され、数日の内に小さなカイメンになった。この驚くべき事実から、適当な条件があれば、解離されたカイメンの細胞は、再び集まりカイメン特異的な多細胞系を再構築する能力を持つことがわかった。

※ 当時、この事実はカイメンが下等な動物であることの証拠と見なされ、生命の本質的な現象で発生学上重要な発見とは考えられなかった。

カイメンの構造



この再凝集したカイメンの細胞が、いったいどのようにして再構成を行うのか？

- 凝集塊の中で多能性を持つ幹細胞が急激に増殖して種々の組織を作る。
- 凝集塊の中で細胞が一度脱分化して、あらためて再分化し種々の組織を構築する。
- カイメンを構築しているいろいろな細胞は、解離後もそれぞれの特質を失うことなく、もとの特徴的な配列を取り戻すように集合し並び変わって個体を再構成する。

C が、現在広く認められており、この考え方では、カイメンの細胞はそれぞれの機能的、

形態的な特性に従って、互いを識別し、選択的に会合し、選別する能力（**組織特異性**）を持つことを前提とする。

ガルツォッフ Galtsoff (1925) がカイメン細胞に選択的な自己識別と選別が出来ることを示した。属が異なり色が違う2種のカイメン (*Microciona* 赤と *Haliclona* 黄色) の細胞浮遊液を混ぜ合わせた（色でそれぞれの細胞が区別できるように）。細胞が凝集するときは、最初は両種の細胞は一緒の凝集塊を作るが、まもなく2種の細胞は分離し別々の凝集塊となって、それぞれ赤色、あるいは黄色の細胞だけを含むようになる。この様な分類学的特性に基づく選別を**分類群特異性**と表す。細胞は分類群特異性で別の凝集塊に分かれた後も、凝集塊の中で動き続け、その結果、別々の型の細胞は次第に入れ替わり組織別に選別され、カイメンの骨組みが再びできあがる。

※カイメン類で見つかった組織特異性や分類群特異性など細胞による識別は、免疫における個体特異性、即ち自己・非自己認識の研究にも発展した。

カイメンで見つかった細胞の再凝集と再構築による形態形成は、カイメンだけのものではなく全ての動物の形態形成で起こっている現象である。1943年に Holtfreter が両生類の囊胚（原腸胚）の細胞は pH10 の塩溶液に浸すと解離し、pH 7 に戻すと再集合してしっかりした塊に戻ることを見つけたことで、細胞凝集は形態形成を解析する良い実験系となった。

ウニにおける細胞凝集実験

1900年 Herbst がウニの桑実胚や原腸胚をカルシウム欠如人工海水に入れると、単細胞に解離すること、これにカルシウムを加えるか、解離細胞を正常海水に戻すと、解離した細胞は再び接着し、しばしば胚に似た構造を造ることを見つけた。

1962年 Giudice ウニの胞胚や原腸胚から解離細胞を調整し、再凝集させた凝集塊が正常な胚の形になり、活発な幼生まで分化することを見いだした。

1970年 Giudice & Mutolo は2種のウニの初期胚から得られた解離細胞を混合し、カイメンと同じように、最初是一緒の細胞塊を造るが、やがてそれぞれの種の細胞塊を形成することを発見。さらに、Spiegel & Spiegel (1975) は細胞同士の最初の接触は糸丈仮足 (filopodium) によって行われるが、異種間では糸丈仮足を互いに伸ばさない傾向があり、初期の接触時に既に**分類群特異性**が示されている可能性が示唆された。（同じ属の異なる種の間ではまだ行われていないので、これらの間に分類群特異性が示されるかどうかはわからない）

ウニの16細胞期には動物極側の中割球と植物極側の大割球、そして小割球が出来る。中割球は主に外胚葉を形成し、大割球は内胚葉を、そして、小割球は一次間充織になる。ウニ胚の解離細胞を遠心によって、3種の割球を分離することに成功 (Pucci-Minafra etc. 1968; Hynes & Gross 1970) したので、これらの3タイプの割球を分離して、再集合、再構成の実験をしたらどうなるか？

一種類の割球だけでは完全な胚はできず、本来その割球が造る部分しかできなかった。一方、三種類を全て含む凝集塊からは完全な胚が生じた (Spiegel & Spiegel, 1975)。

これにより、胚の再構成が、脱分化と再分化によるものでないことを示し、むしろ、異なった型の細胞は、解離される前の特質を失うことなく、凝集塊の中で空間的に選別され、選択的に再会合して、特異的な多細胞性の骨組みを再構成し、正常胚の形を作り上げている可能性を示唆した。

両生類における細胞凝集

前述のように Holtfreter が両生類の胚の解離方法を見つけているので、Townes & Holtfreter (1955) は胚の3胚葉に由来した細胞を種々の組合せで凝集させたものを詳しく調べた (図57)。

再凝集した細胞は徐々に選別をはじめ、細胞の型に従って空間的に分離することが明らかになった。即ち、外胚葉細胞は凝集塊の外側に広がり、内胚葉細胞は内部に移動し、中胚葉細胞はその中間に位置した。また、ある実験では、1個の胞胚全体を完全に無秩序な細胞の山にしても、この混ざり合った細胞が再凝集して正常な胚の構造を再生し、時には完全な胚を形成することすらあった。

以上の結果から、両生類の初期胚の細胞は、解離、再集合を通じてその細胞の型特性を失わない。即ち、細胞凝集塊における胚構造の再構築は、細胞が型に従って選別され、空間的に配置される結果、再び特定の胚葉、部域が形成される。これは正常胚でも基本的には同様のことが起きていると考えられる。この細胞の運動と構築を決定するのは選択的細胞親和性であると考えられた (左図)。

両生類の分類群特異性

Townes & Holtfreter はイモリ *Triturus* の胚の外胚葉とサンショウウオ

Amblystoma の中胚葉と内胚葉の細胞を混ぜ合わせて、分類群特異性に基づく選別が起きるかどうかを調べた (イモリとサンショウウオでは細胞の大きさが違うので容易に区別がつく)。

ところが、別々の凝集塊はつくらず、イモリの細胞が外胚葉で、サンショウウオの細胞は内胚葉と中胚葉のキメラ

胚が出来た。さらに、この系でサンショウウオの外胚葉細胞も一緒に混ぜたら、外胚葉がイモリとサンショウウオの細胞が混ざった胚が形成された。

即ち、外胚葉細胞間の分類学的な差違よりも、組織の同一性が優先し、形態形成における親和性と会合性を決めるのに、より決定的な役割を果たしている。つまり、両生類では分類群特異性よりは組織特異的な細胞認識が種を越えて行われると言える。

これまでの実験は、in vitro の実験であるが、in vivo でも選択的細胞認識が起きていることが示された。両生類の原腸胚の種々の胚葉から細胞を解離し、胞胚腔に注入すると、注入された細胞は宿主胚の同種の細胞と結合することが確かめられた (Boucaut, 1974)。つまり、細胞は胚の中でも、生体外の細胞凝集塊の中での選別と同様の選択的親和性を示した。

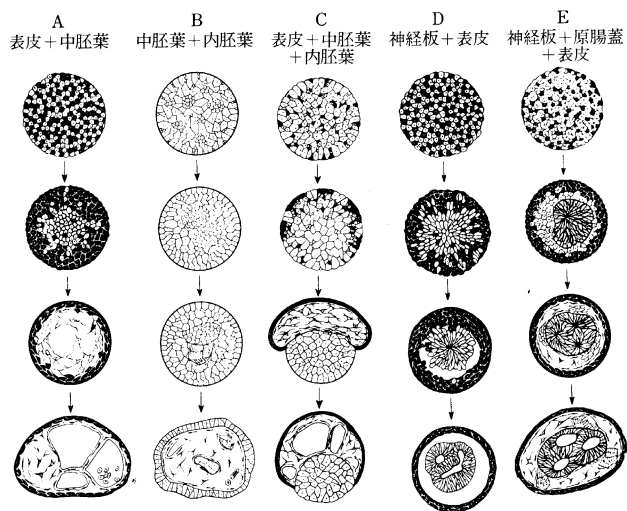


図 8.5 両生類の胚細胞の凝集塊における選別、空間的分離および再構築。(A) 表皮細胞 (黒) と中胚葉細胞の組み合わせ; 表皮細胞の外側への移動と、中胚葉細胞の内側への移動が起こり、中胚葉細胞は、間充織、体腔、血球を形成する。(B) 中胚葉細胞と内胚葉細胞との組み合わせ; 中胚葉細胞は凝集塊の中央に集中し、間充織と筋肉を形成する。内胚葉細胞は、この場合外側に位置する。(C) 表皮細胞 (黒)、中胚葉、内胚葉細胞の組み合わせ; 中胚葉と内胚葉細胞を外胚葉細胞が取り囲むように選別される。(D) 表皮細胞 (黒) と神経板細胞との組み合わせ; 外側に表皮、中心部に神経組織、その間に間充織が分離する。(E) 表皮 (黒)、神経板、原腸蓋 (中軸中胚葉) 細胞の組み合わせ; 中央に神経組織が位置し、それを体節と間充織が取り囲み、外側に表皮層がくるように配置される (Townes と Holtfreter 1955より改変)

鳥類・ほ乳類の細胞凝集

両生類の細胞凝集実験ではほとんどが神経胚以前の初期胚の胚葉からの細胞に限られていたが、高等脊椎動物では、多くの実験が後期胚の組織・器官の細胞を用いて行われた。これによって、細胞認識と選択的細胞親和性の概念が発生段階後期の胚細胞の挙動にも当てはまるかどうか調べることができた。

★細胞の解離

カイメン、ウニ、両生類で用いられた解離方法は鳥類・ほ乳類では使えなかった。しかし、数種類のタンパク分解酵素 **protease** (特にトリプシン **trypsin** は広く有効であった) を用いることで解離が起これ、細胞浮遊液を得ることができた (Moscona 1952, 1961, 1963)。

種類によって、酵素を変えようまくいくことがある。後期の胚の組織ではコラーゲン繊維が細胞を網目状にとりまいているものがあり、トリプシンとコラゲナーゼ **collagenase** を一緒に作用させると細胞浮遊液を得ることができる場合もある。細胞を解離するために用いた酵素が異なる場合は細胞表面に異なった影響を与え、その後の細胞の行動が違ってくる可能性があるため比較する場合は要注意。

★細胞凝集

静置培養法(Moscona, 1952) : 解離した胚細胞を培養液に浮遊させ培養皿に入れると、細胞は底に沈み、やがて、集合して塊となり凝集塊を作る。

この方法で、細胞が自律的に集合して多細胞体を形成することが、ニワトリ、マウスの胚細胞で明らかにされた。

旋回培養法(Moscona, 1961) : 細胞浮遊液をフラスコ内で静かに旋回させる。

細胞の衝突頻度をコントロールできる。

接着力が回転運動による剪断力より強ければ接着できる。

つまり、定量的な情報がえられる。実際、発生段階の異なる種々の組織からとった細胞は、それぞれ他と異なる特徴的な凝集パターンを示した。

糸状仮足

鳥類やほ乳類の細胞の凝集には、ウニの時と同様に糸状仮足が重要な役割をしている。ウニ胚細胞の凝集でもみられるが、ニワトリ、マウスの胚細胞の凝集でも糸状仮足がたくさん伸長して接触し、引き合って接着する。

糸状仮足を伸長させないようにタンパク合成阻害剤を加えると、細胞の凝集も抑制される。

発生の進んだ胚や成体の組織からとった解離細胞は、糸状仮足をほとんど出さず、凝集して塊をつくらない。つまり、細胞表面の性質は胚発生に伴い明らかに変化し、発生の一定時期を過ぎると糸状仮足を出さず凝集塊を造らない。in vivo では、糸状仮足は初期胚の空間的配列、形態形成運動時に出現する。

ニワトリ、マウスの胚細胞は解離しても再集合でき、凝集塊の中では細胞はみずから再配置して、もとの特徴的な組織の型を再構成する能力がある。つまり以下の二つの特異性が存在し、形態形成に関与している。

細胞型特性 : 外胚葉、中胚葉、内胚葉とそれぞれにある。

組織特異性 : 同一胚の組織の解離細胞と一緒に浮遊させて凝集塊を造らせると、最初は無差別に接着するが、まもなく組織ごとの選別がおこり、別々の塊となり、特異的な構造を造る。

組織特異性と分類群特異性(Moscona, 1957, 1962)

	ニワトリ	マウス	
①	軟骨細胞	軟骨細胞	キメラの軟骨組織を形成
②	腎臓	軟骨細胞	別々に集合
③	皮膚	皮膚	キメラの皮膚を形成

①と③の組み合わせではキメラの軟骨組織やキメラの皮膚が出来たが、②の場合は別々に集合した。つまり、鳥類・ほ乳類でも両生類と同様に、分類群特異性より組織特異性が優先する。

細胞選別現象

同じタイプの細胞同士が、最終的な粘着を行って、同じ細胞群の部分形成する。再集合塊の中でこれらの部分がそれぞれ占める位置は、組み合わせごとにそれぞれ特徴的に決まっています、一つの同心円状になる。

以上の現象を説明するために3つの理論が提唱された。前提として、細胞の持つ運動性と粘着性は活性化しているとする。

まず、ランダムな運動で説明するには無理がある。同じ種類の細胞は質的に特異的な粘着を行うとすると細胞選別は起こるが位置は決まらない。

細胞選別についての3つの理論

①走化性説

主に Stefanelli によって主張された。解離細胞は再集合塊の中の代謝産物の濃度に反応して、そのもっとも濃度の高いところに向かって、或いは逆にそこから離れてというように濃度勾配に沿って移動する。

或いは、ある種の細胞が一つの物質を産生し、これに対してそれと同種の細胞が集まってくる。

※問題点：各種の細胞の分布が完全に一様である理想的な条件下では、この仮説は成り立つが、部分的な小集合ができると中心部の濃度が必ずしも一番高くなるとは限らない。3タイプ以上の細胞の集合塊では同心円に分かれにくい。

②タイミング説

Curtis によって提唱された。解離に使用した薬品や培養液の成分によって、細胞の表面は修飾されるとして、細胞表面が回復されるタイミングによって、外層から内側へと集合塊ができる。そして、より早く回復する細胞層が最外層にくる。

外・中・内胚葉を使って解離細胞を作り、3胚葉の解離細胞を混合すると外胚葉が一番

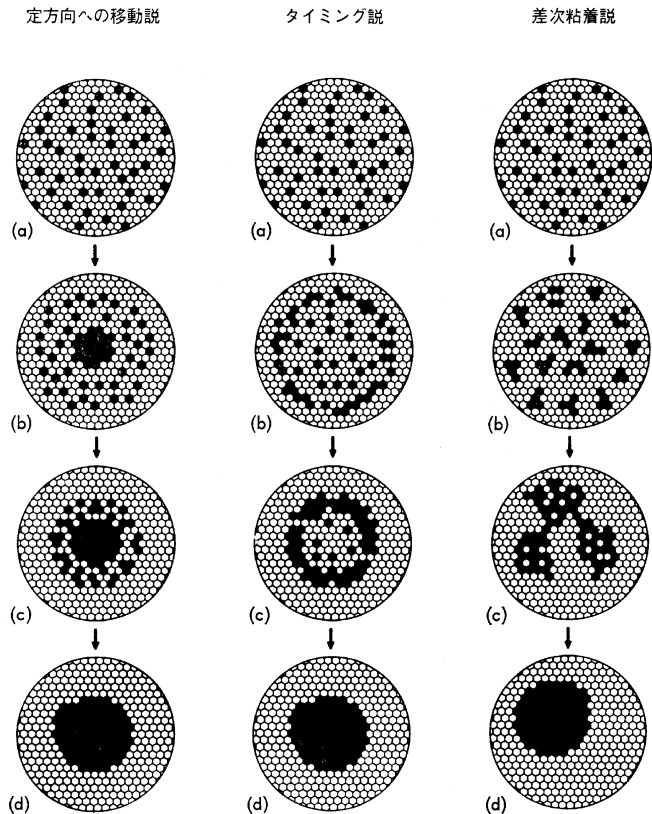


図 7・5 定方向への移動(走化性)説、タイミング説、差次粘着説のそれぞれの理想状態での選別過程の模式図。(Steinberg, "Cell Membranes in Development", Academic Press, N. Y., p. 321.)

外側に、続いて中胚葉、そして内胚葉が中心部に同心円状に集合塊を形成する。従って、外胚葉が一番早く、内胚葉が一番遅く細胞表面の回復が起こるとした。一方、回復が一番遅いと思われる内胚葉を他の胚葉より6時間前に解離しておき、外胚葉と中胚葉の解離細胞と混合すると、内胚葉が一番外側に、続いて外胚葉、中心に中胚葉が集合塊を形成した。この事実から、この説を強く支持した。

※問題点：この説ではほぼ同心円に並ぶはずだが、実際には内部の細胞塊が偏ったものもある。さらに、次の実験でも矛盾が出てきた。外胚葉と内胚葉の解離細胞を混合すると外側に外胚葉細胞塊、内部に内胚葉細胞塊の球が出来る。一方、外胚葉組織と内胚葉組織のシートを張り合わせて培養するとやはり、外胚葉が外側に、内胚葉が内側になり、再凝集と同じ球が出来る。従って、この現象の説明がつかない。

③差次粘着説

Steinberger (1964)によって主張された。細胞のランダムな運動と、粘着性の量的な差だけで選別が起こるという説。

A^*A 、 B^*B 、 A^*B を A と B のそれぞれの細胞間の粘着力を表すとする時、 $A^*A > A^*B > B^*B$ かつ $A^*B < 1/2(A^*A + B^*B)$ なら A 細胞は内部で集合塊を形成して、B 細胞は外部に集まる。この説が正しければ、以下のことが成り立つ。

$A^*A > B^*B$ かつ $B^*B > C^*C$ なら $A^*A > C^*C$ となり、C 細胞塊は A 細胞の外側に集まる。

実際にこのとおりになり、一つのヒエラルキー（階層構造）を組み立てることが出来る。

※問題点：Roth & Weston (1967)の実験で、肝臓細胞 (L) と網膜神経細胞 (N) の解離細胞を混合するとそれぞれの組織の細胞同士が集合塊を造り、肝臓細胞が内側になるので、肝臓細胞の方の粘着性が高いはずだが、それぞれの接着の安定性を調べると、同種の細胞の接着は異種の細胞との接着より安定していた。 $L^*L > N^*N$ で、かつ $L^*L > L^*N$ 、 $N^*N > L^*N$ であった。

細胞の接着に関与する物質

(a) 細胞接着因子：カイメンで見つけられた。

酸性プロテオグリカン：分類群特異性を示し、異種のカイメン細胞には有効でなかった。

(b) ニワトリ、マウス トリプシン処理で解離するからタンパク質と考えられて、事実幾つかのタンパク質の接着因子が見つかったが、組織特異的で網膜細胞から採れたのは網膜細胞の集合しか促進しなかった。脳からは脳だけであった。脊椎動物から見つかった接着分子で現在注目されているのが**カドヘリン (cadherins)**と呼ばれる細胞表面に発現している分子である。2つのタイプがある。

1) Classic cadherins:

- ① E-cadherin (epithelial cadherin) 胚や成体の上皮細胞に現れる。
- ② P-cadherin (placental cadherin) 胎盤形成時に胎盤と子宮の細胞に発現。
- ③ N-cadherin (neural cadherin) 囊胚期の中胚葉細胞に現れる。中枢神経形成中の細胞に多く発現する。
- ④ EP-cadherin (C-cadherin) *Xenopus* の割球の接着に発現し、囊胚の陥入運動にも必要。

2) **Protocadherins**: *Xenopus* の囊胚形成時の脊索と他の中胚葉組織との分離に必要な分子。

P-cadherin の細胞表面に発現する量が異なる 2 種類の cell lines を用いて、Steinberger の説を検証した実験が有る (Steinberger & Takeichi, 1994)。