

## 第3回 ヒトデ胚の再構築

再生とは、身体の部分が切除された後、もとのように部分が形成されてくる生命現象である。多くの動物は再性能を有しており、トカゲの尾、イモリのレンズ、ヒトデの腕、ヒトの肝臓など枚挙に遑がない。この項では、ヒトデ胚を用いた細胞機能の研究において、再生と似て非なる、そしてより強烈な印象を与えるかもしれないヒトデ胚の再構築について言及する。再構築は自然界では生じず、人為的な実験系でのみ再現可能となる。具体的には、ヒトデ原腸胚を個々の細胞にまで解離後、凝集させると、正常発生とは一見異なった様式で発生が進行し、正常な形態を持った遊泳する幼生が構築されてくる（図1、図2参照）。キャッチャーに表現すれば、身体をいったん細胞にまでバラバラにして、再び身体を作らせるということになる。この再構築実験系の価値は、正常発生過程に存在する形態形成メカニズムを浮き彫りにするだけでなく、胚細胞が領域運命を可塑的に変更できる可能性を解析できることである。それぞれの研究例を書いておきたい。

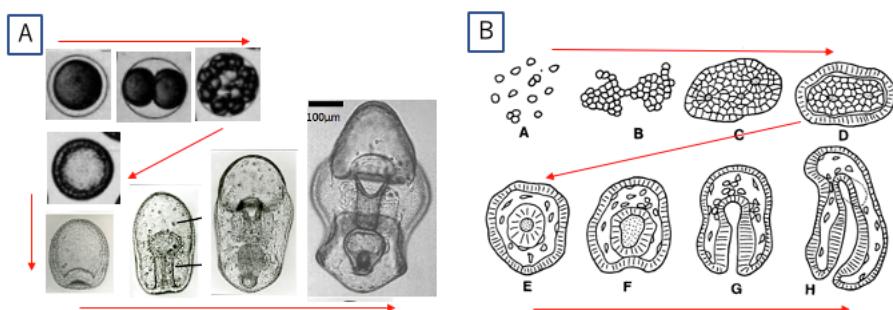


図1 イトマキヒトデの正常発生過程(A)と再構築過程(B)。矢印は発生過程の流れを示している。

前者の研究例のキーワードは、細胞選別。細胞選別は、複数の細胞種からなる器官において、それぞれの細胞が互いを識別し、同種細胞どうしは接着することにより、器官内で同じ位置を占めるためのメカニズムとも捉えられている。細胞選別現象の研究の歴史は古く、1912年のカイメンの凝集実験に端を発する。紫色と橙色の2種のカイメンを個々の細胞にまで解離して混合したところ、それぞれの色の細胞どうしで接着が生じ、紫色と橙色の凝集塊が形成されることが観察されていた。その後、カイメンのような原始的な動物だけでなく、カエルやニワトリ胚の細胞を材料に用いた実験においても細胞選別の報告がなされ、動物細胞には、互いを識別する能力が普遍的に備わっていることが分かってきた。ヒトデ胚の再構築研究では、原腸胚後期に生じる予定胃細胞とそれ以外の胚体構成細胞の選別について報告した。選別の可否を示すためには、目的の細胞を生きた状態で標識しなければならなかった。予定胃細胞は、紫外光で蛍光を発する1,8-ANSと呼ばれる物質で標識でき、再構築過程での追跡観察も可能であった（図2A）。観察の結果、解離された細胞集団の中に蛍光を持った細胞が混じっている状態から（図2B、C）凝集塊中にそれらが混在し（図2D、E）、

原腸形成を経て、開口後に完成する消化管の胃の中に標識細胞が配置することが見出された(図2F)。本研究の価値は、動物個体の器官レベルで細胞選別が明示された点にあり、NHKの「驚異の小宇宙人体」というTV番組でも紹介された。最近、初期原腸胚の再構築において、外胚葉と中内胚葉の細胞間でも選別が生じることを明らかにしている(この解析結果については、次回の“細胞の意思”において取り上げる)。

二つ目の研究例紹介をする前に、再構築研究から明らかになった正常発生過程での形態形成メカニズムの存在についても書いておきたい。

ヒトデの正常発生では、原腸先端部が予定食道域に沿って後方側に膨出することにより、体腔囊が形成される(“腸体腔型”形成と呼ばれる)。再構築胚における体腔囊形成を観察したところ、“腸体腔型”形成に限らず、胞胚腔に散在した体腔囊細胞が食道側方に凝集することによっても生じることが見出された(こん様式は“裂体腔型”形成と呼ばれる)。この結果から、体腔囊が常に食道の側方域に形成されるのは、原腸先端部が、前方に向かわずに、食道側方部に沿って後方に膨出していくよう誘導する位置情報シグナルが、食道から出されている可能性を示すことができた。

さて、二つ目に挙げた胚領域の運命変更についての話に移る。再構築実験下における予定胃細胞の選別は、細胞分化の結果を変えずに然るべき位置に配置するように、予定胃細胞の運命を全うさせた。この様な状況は、胚体を構成する全ての細胞において生じているのだろうか？内胚葉と対比される外胚葉の口領域の細胞において、このテーマにチャレンジすることにした。口に着目した理由は、再構築幼生には、複数の肛門が形成されることは珍しくないが、口は必ず1つだけしか形成されない事実に鑑みている。もし外胚葉でも限定された器官を形成するには、内胚葉の予定胃細胞と同様に細胞選別が強力に支配すると思われる。そうは言っても、内胚葉に比べて、より広い面積の上皮シートである外胚葉中に予定口細胞だけが集まることができるだろうか？もし別の領域の細胞が口領域に配置するのなら、それらの細胞は領域運命を変えている可能性が浮かび上がる。

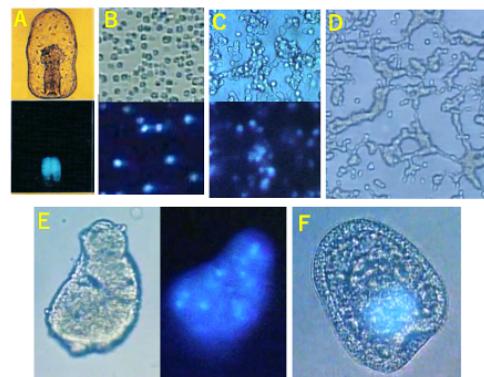


図2 予定胃を蛍光標識された原腸胚の再構築。(A)材料胚、(B)解離直後、(C)3h後、(D)6h後、(E)20h後、(F)3日後。予定胃細胞は、いったんバラバラになった後に、再構築中の胚体に内部に取り込まれ、最終的には元と同じ位置に戻る。(A)は縮小して示している。

### 予定口領域を標識した後期原腸胚からの再構築

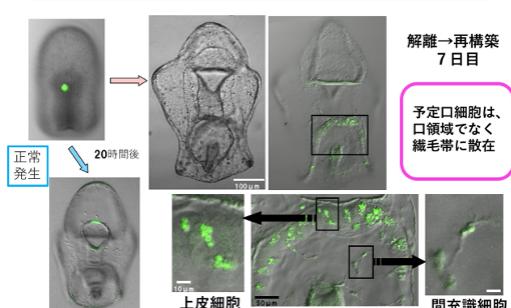


図3 再構築過程におけるcaged化合物で標識した予定口域の細胞の配置変化。標識された予定口域細胞は正常発生過程では、唇に相当する領域に留まっているが、再構築幼生では口域に無く、より後方の纖毛帯領域に配置している。間充纖細胞にみられる蛍光シグナルは、再構築過程で死んだ標識細胞を間充纖細胞が貪食したことによるのかもしれない。

最初に予定口域だけを標識すべく、caged 化合物を顕微注射した受精卵を発生させ、紫外光のスポット照射をとおして、任意の発生時期に、任意の領域を標識するシステムを作成した。並行して、旋回培養を利用した1個体からの再構築胚作製法も考案した（1個体からの再構築は構成細胞の比率が正常発生の個体と一致するという利点もある）。図3は予定口域を標識した後期原腸胚を示している。これを材料として得た再構築幼生において、標識細胞は口領域には存在せず、口・反口領域の境界となる外胚葉の纖毛帯領域に組み込まれていた（纖毛帯では多くの神経細胞が分化し、幼生の身体を覆う神経ネットワークの基点となっていく）。この実験結果から、再構築幼生で形成された口は、もともと予定されていた口領域の細胞でなく、どこか外胚葉の別領域からやってきたことになる。言い換えれば、再構築下の外胚葉では、少なくとも一部の細胞は自身の領域運命を変更させていると捉えられる。

その後、再構築過程で領域運命が可塑的に変更される現象は、次に示す実験でも確認できた（図4）。先ず、アクチビンという生理活性物質中でヒトデ胚を処理すると、口領域が著しく拡大することを見出した（処理胚は、ダブルベルのような形をした胴体部が広範に口域化した幼生になる）。アクチビン処理は不可逆的であり、アクチビンを取り除いても、決して広範な口域化は元に戻らない。このアクチビン処理胚を再構築してみた。驚くべきことに、再構築されてきた幼生はアクチビン処理の呪縛から解き放たれるように、正常な形態の幼生に見られる口領域が狭い範囲だけに限定された再構築幼生となった。この事実は、再構築過程で細胞の領域運命が口側から反口側に変更されたことを示している。別の言い方をすれば、正常発生での不可逆的な領域変更を再構築することにより解除できることになる。これを受けて、再構築過程で発現する遺伝子群を網羅的に解析した。その中で、再生医療の主役として注目されている iPS 細胞の作成過程で細胞運命をリプログラムさせる一部の遺伝子が、ヒトデ胚再構築系でも発現していることも分かつてきた。再生医療研究において、大きな目標の一つに掲げられている3次元構築された器官形成に向け、ヒトデ胚の再構築実験系から有益な知見を発信できる可能性を強く感じた。

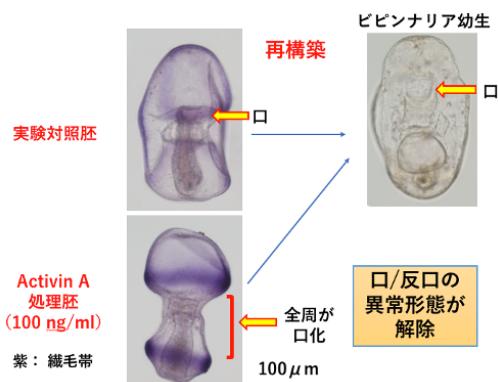


図4 アクチビン処理胚の再構築。実験対照の口域は狭いが、アクチビン処理胚では胴体の周りが全周にわたり口域化している。アクチビン処理効果は不可逆的で、アクチビンを除去しても全周口は元に戻らない。ところが、このアクチビン処理胚を再構築させると、実験対照胚のように口が小さくなる。