

論 文 内 容 要 旨

From the primitive streak to the somitic mesoderm: labeling the early stages of chick embryos using *EGFP* transfection

(原条から体節中胚葉へ: 初期発生段階のニワトリ胚の *EGFP* 遺伝子導入による標識)

Anatomical Science International, 2018, in press.

主指導教員：青山 裕彦 教授

(医歯薬保健学研究科 解剖学および発生生物学)

副指導教員：内匠 透 客員教授

(理化学研究所 神経・精神病態制御学)

副指導教員：菅野 雅元 教授

(医歯薬保健学研究科 免疫学)

范 海明

(医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻)

序論

中胚葉は原始線条において形成される。体節中胚葉は骨や筋の原基であり、発生由来について時空間的な解析がなされてきた。Sawada & Aoyama (1999) は、ニワトリおよびウズラ胚で、原条の各領域を DiI 標識し、その発生運命を追跡した。その結果、発生段階が進むにつれ原条はより尾方の体節を形成することが分かった。しかし、DiI による標識は頭側の境界は明瞭であったが、尾側に向かうにつれ徐々に消失した。これは二通りに説明できる。一つはある時期の原条は特定の体節を産み出す。もう一つは、その時期の原条は、実際にはもっと尾方の体節まで産み出しているのだが、胚の細胞分裂により最初に標識された DiI がだんだん希釈されてしまい尾方のものは検出不可能になってしまった。今回、この二つの可能性のいずれが正しいかを調べるために、著者は *EGFP* 遺伝子を、導入細胞内でゲノムに組み込まれ永続的に発現し続けるシステムを用いて原条の細胞に導入しその発生を追跡した。その結果、各発生段階の原条は、それぞれ、特定のレベルより尾方の体節を形成することが再確認できた。また、いずれの発生段階で標識しても、体節中胚葉の標識は 4.5 日胚において尾芽にまで達しており、さらに、二次神経管も標識されていた。今回標識した、原条の予定体節領域における、神経系や中胚葉の共通の前駆体である体軸幹細胞の存在について議論する。

材料と方法

卵殻内のニワトリ胚で、原始線条の予定体節領域に限局して遺伝子導入を行った。*EGFP* 遺伝子 (pT2K-CAGGS-*EGFP*) をトランスポゼース (pCAGGS-T2TP9) と共に、エレクトロポレーション法により導入した。これにより、*EGFP* 遺伝子はトランスポゾンとしてゲノムに組み込まれ、導入細胞が永続的に標識できるようになった。

結果

頭側原条に *EGFP* 遺伝子を導入すると体節中胚葉が標識された

EGFP 遺伝子を頭側原条にエレクトロポレーションで遺伝子導入したのち、8 時間後に観察すると *EGFP* の発現は頭側原条にのみ見られた。エレクトロポレーションによる傷害の有無を調べるため、導入後、すぐに固定し組織検査した。遺伝子導入領域を切片で見ると、上皮の欠損は見られなかった。この結果から、遺伝子導入された細胞は胚盤葉上層の上皮のみと考えられた。

遺伝子導入 8 時間後 *EGFP* 陽性細胞はすでに陥入していた

原条の背側上皮細胞に *EGFP* 遺伝子を導入することで体節中胚葉を標識した。導入の 8 時間後に確認すると、*EGFP* 遺伝子が頭側原条にのみ発現された。切片では、胚盤葉上層の上皮ではなく、すでに陥入した原条内部に *EGFP* 陽性細胞が見られた。胚盤葉上層細胞は標識後、速やかに

陥入したことを示している。

より遅い発生段階の原条は、より尾方の体節中胚葉を形成した

HH 発生段階 6 から 8 体節期 (HH 発生段階 9) までの各発生段階で頭側原条に *EGFP* 遺伝子を導入した。2.5 日胚に達したところで *EGFP* の発現を蛍光実体顕微鏡で観察し、標識された最も頭側の体節番号を記録した。標識する発生段階がより後期になるにつれ、標識体節の頭側の境界はより尾方のものとなった。すなわち、発生段階が進むにつれ、原条はより尾方の体節を形成することが再確認できた。この結果は以前に行った DiI の標識実験と一致している。

どの発生段階で標識しても尾芽まで標識され、二次神経管も標識された

各発生段階で頭側原条に *EGFP* 遺伝子を導入し、4.5 日胚になるまで孵卵を続けた。導入遺伝子は最も頭側の境界から最尾部までほぼ同程度に発現しており、すべて尾芽まで達していた。尾芽領域の横断切片では、体節中胚葉細胞と共に神経管にも *EGFP* 陽性が認められた。この尾芽から形成される神経管は二次神経管と考えられるので、それを明らかにするために、ヘンゼン結節に *DsRed* を、頭側原条に *EGFP* を導入した。25 体節期まで孵卵し、横断切片で観察すると、*DsRed* の発現は腹側神経管で見られ、*EGFP* の発現は体節中胚葉と背側神経管で見られた。また、*EGFP* の発現した背側神経管の頭側境界は第 27 体節位であった。これらのことから、頭側原条から形成された神経管は二次神経管と認められる。

考察と結論

体節中胚葉は原条の頭側部に由来する。DiI 標識による先行研究では、標識された頭側境界は明瞭であったが、尾側に向かうにつれ徐々に消失していった。今回、*EGFP* 遺伝子により、HH 発生段階 6 から 8 体節期の各発生段階で逃走原条を標識しその発生を追跡したところ、発生により後期に標識するとより尾方の体節が標識された点は先行研究と同じであったが、標識細胞が体節の頭側境界より尾方の全て、さらには尾芽に至るまで確認できた。これは以前の DiI 標識実験では DiI が細胞分裂により希釈されたため、最後まで追跡できなかったことを示している。さらに、体節中胚葉と共に二次神経管も標識されたが、これは、今回の標識では体軸幹細胞も標識されたためであると考えられる。