

## 論文内容要旨

An in vitro model of region-specific rib formation in  
chick axial skeleton: Intercellular interaction  
between somite and lateral plate cells

(ニワトリ中軸骨格における部域特異的肋骨形成の  
培養系モデル: 体節細胞と側板細胞の細胞間相互作用)

Mechanisms of Development, 159,

Article number: 103568, 2019.

主指導教員: 池上 浩司 教授

(医系科学研究科 解剖学及び発生生物学)

副指導教員: 酒井 規雄 教授

(医系科学研究科 神経薬理学)

副指導教員: 相澤 秀紀 教授

(医系科学研究科 神経生物学)

松谷 薫

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

肋骨は心臓や肺など重要な臓器を入れる胸郭を構成する。肋骨の欠損、融合、変形、短縮は、Ellis-van Creveld 症候群などの先天性疾患でみられ、肺の成長や呼吸機能を障害する胸郭不全症候群を引き起こす。肋骨は発生学的には一時的に出現する体節と呼ばれる中胚葉組織に由来し、哺乳類と鳥類では胸部の体節のみから部域特異的に肋骨が生じる。体節は正中にできる中胚葉性の脊索の外側に形成される分節状の細胞集団であり、さらにその外側には側板が形成される。体節の腹内側は間葉化し椎板へと変化し、背外側は上皮構造を維持したまま残り皮筋板になる。椎板の一部が肋骨の原基に、皮筋板は肋間筋などの体幹筋や真皮の原基になる。ウズラとニワトリのキメラ胚を用いた研究から、胸部では体節由来の細胞が集団となって側板に侵入し、先端の細胞が分散して側板細胞と混ざることが示されている。この体節由来の細胞が分化して肋骨を形成する。胸部の体節を頸部や腰部に実験的に移植すると肋骨が形成されるが、形成された肋骨は本来のものより短くなる。また、後肢領域の側板を胸部へ移植すると、肋骨の一部が欠失し、形成された肋骨も短くなる。これらの先行知見は側板には部域性があり、肋骨形成を部域ごとに制御している可能性を示唆している。しかしながら、肋骨の形成メカニズムや疾患における形成異常の機序については未解明な点も多い。側板が示す肋骨形成能あるいは肋骨形成誘導能の部域性についても、細胞レベルでの研究は十分になされていない。

本研究では、体節細胞が側板と接触した際の挙動を詳細に解析するため、培養系モデルを確立した。培養系モデルでは、細胞接着性マイクロパターン基板を用いることで、由来の異なる細胞同士を様々な組み合わせで一細胞ずつ接触させることに成功した。体節に由来する椎板と皮筋板、および側板をニワトリ胚より単離し、2種類の組織片を細胞接着性の線状（10  $\mu\text{m}$  幅）マイクロパターンの両端にそれぞれ静置した。移植片から遊走してきた細胞が接触する前後1時間、合計2時間にわたってタイムラプス撮影を行った。得られたタイムラプス画像から10分ごとの細胞移動速度を求め、その速度分布についてクラスター解析を行い、細胞の挙動を分析した。

胸部の椎板細胞が胸部の側板細胞と接触すると、椎板細胞の速度は接触前の34%（接触前  $1.36 \pm 0.23 \mu\text{m}/\text{min}$ ；接触後  $0.46 \pm 0.15 \mu\text{m}/\text{min}$ ；ともに  $n=11$ ）にまで低下したが、依然として、前方への遊走を継続した。一方、腰部の側板の細胞と接触すると、胸部の椎板細胞は後退した（接触前  $1.56 \pm 0.37 \mu\text{m}/\text{min}$ ；接触後  $-0.55 \pm 0.22 \mu\text{m}/\text{min}$ ；ともに  $n=11$ ）。クラスター解析からも胸部の椎板細胞は、胸部の側板細胞との接触によって速度を低下させながら前進を継続すること、腰部の側板細胞との接触によって後退することが示された。一方、胸部の皮筋板細胞は胸部の側板細胞との接触後に後退した。また、細胞の形態にも差異がみられた。胸部の椎板細胞は胸部の側板細胞との接触前後でその長さに有意な変化がなかったが、腰部の側板細胞との接触により長さが接触前の  $76.9 \pm 10.4\%$ （ $n=11$ ）に有意に短くなった。

以上の培養系モデルにおける一細胞挙動解析より、肋骨原基となる胸部の椎板細胞は本来肋骨を形成する部位である胸部の側板細胞を押しつけて前進できること、肋骨を形成しない部位である腰部の側板細胞と接触すると押し戻されること、が明らかになった。側板細胞との接触による椎板細胞の形態変化も、腰部の側板細胞との接触により胸部の椎板細胞の前進が阻まれたことと合致する。これらの結果からすると、肋骨の形成される胸部において、移動した椎板細胞が側板に接触した時、側板細胞はそれら椎板細胞の側板への侵入に応じる挙動をとり、椎板細胞はその移動を続けると考えられる。胸部側板細胞には体節細胞との細胞間相互作用による肋骨形成誘導能があることが示唆される。胸部皮筋板細胞が胸部側板細胞との接触後に後退した現象は、胚発生における胸部皮筋板と胸部側板との関係とは矛盾しているように見える。胚内では、椎板細胞が間葉化して個々に移動するのに対して、皮筋板細胞は細胞間接着を保って集団で移動しており、一細胞の移動と接触を解析する本研究の培養系モデルでは皮筋板細胞の挙動が生体内と異なっている可能性がある。皮筋板細胞集団と側板細胞との多対一の相互作用については今後の更なる研究が待たれる。

以上のとおり、マイクロパターン基板を用いて確立した培養系モデルにより、側板には部域性があり、組織や細胞から放出される液性因子ではなく、胸部側板細胞と体節細胞との直接的な細胞間相互作用が、胸部にのみ肋骨が形成される仕組みに寄与している可能性が示された。