

無尾類の変態 - 幼生から成体への組織再編の仕組みの研究 及び甲状腺攪乱物質を検出するための魅力的生物過程 -

吉里 勝利

広島大学

広島で開催された今回の第 5 回内分泌攪乱化学物質問題に関する国際シンポジウムは、ある意味で非常にユニークです。すなわち、シンポジウム主催者が公式に甲状腺軸に対する攪乱物質の影響をテーマとして選択していることです。

この午後のセッションでは、3 つのミーティングが行われます。最初は、カエル研究のグループミーティングです。甲状腺ホルモンは、ご存じの通り、オタマジャクシからカエルへの変態で非常に重要な役割を果たしています。2 番目のセッションは、哺乳動物のグループです。甲状腺ホルモンは哺乳動物の発生においても大きな役割を果たします。これらの 2 つのセッション後に、カエルの研究者と哺乳動物の研究者が一同に会したセッションを行います。ぜひ、これらの非常に興味深い重要なセッションに通しでご参加ください。最初に、私は両生類の変態について簡単にご紹介します。

これはアフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)の変態です。非常に若いオタマジャクシには前肢がなく、そして非常に大きい尾と前部の体部構造を持っています。ステージ 60 において、オタマジャクシは変態のいわゆる極相に入ります。ここでは活発に成長している後肢が見えます。また、前肢も見えます。このオタマジャクシは依然として良く発達した尾を維持しています。従って、これはある意味で前部はカエルですが、後部はまだオタマジャクシです。

ステージ 63 では、既に後肢が十分に発達しており、良く発達した前肢がありますが、小さな尾がまだ残っています。これが無尾類の変態のおおまかなプロセスです。このプロセスは非常に興味深く、現在では、甲状腺ホルモンがこのプロセスを制御していることが広く認められています。トリヨードチロニン (T_3) はこのような構造です。ステージ 55 以前のオタマジャクシでは血漿中に甲状腺ホルモンを検出することはできませんが、このステージから甲状腺ホルモンの濃度が急速に上昇し、変態が完了すると、再び甲状腺ホルモンが検出できなくなり、甲状腺ホルモンが変態過程を制御していることを示唆しています。

この示唆は容易に実証できます。若いオタマジャクシを甲状腺ホルモンで処理すると、これらの若いオタマジャクシは変態を開始します。次に、幼生から成体への組織再編の仕組みの研究と甲状腺攪乱物質を検出するための魅力的な生物過程に関する最近のデータをご紹介します。時間が短いので、「カエルを用いた甲状腺攪乱物質の検出」というトピックを取り上げたいと思います。こちらのトピックは、先ほどお伝えしました 3 つ目のセッションでお話します。私の名前は吉里です。

甲状腺ホルモンと甲状腺ホルモン受容体は重要な分子で、変態プロセスを制御しています。科学者は甲状腺ホルモンと甲状腺ホルモン受容体との関係について一般にこのような図式と考えています。ここに甲状腺ホルモン反応性の遺伝子があります。プロモーター領域には甲状腺ホルモン反応因子の TRE があります。この TRE に対して、レチノイン酸受容体と甲状腺ホルモン受容体のヘテロダイマーが付き、リガンド (T_3) を待ち受けています。

T_3 がない場合は、このエレメントは下流の遺伝子の発現を抑制するよう作用します。しかし、甲状腺ホルモンがこのエレメントに結合すると、このように逆の作用が起こります。下流の遺伝子が転写されます。これは現在一般にこのような図式であると考えられています。

この関係は米国のグループが最近開発した遺伝子導入カエルを利用して容易に視覚化することができます。雌と卵子、雄と精子核がありますが、これらの精子核に適当なプラスミド DNA を導入します。ご覧のとおり、その TRE 甲状腺ホルモン反応性エレメントをもつプロモーターの下流に、リポーター遺伝子として、EGFP 遺伝子を繋ぎます。この遺伝子を導入して、遺伝子導入カエルが得られます。

これが(*Xenopus*)の甲状腺ホルモン受容体 $\beta A1$ で、ここがそのプロモーター領域です。この赤い領域に私が言っているリポーター遺伝子があります。これは、明視野顕微鏡で見たステージ 49 の遺伝子導入オタマジャクシです。蛍光顕微鏡では、蛍光発光が見えません。少しステージが進んでも、まだ蛍光発光は

ありません。ここでは、オタマジャクシはほぼカエルになっており、短い尾がここにあります。蛍光顕微鏡で背側と腹側を見ると、ここでは蛍光発光を見ることができます。

これは非常に若いステージ 56 のオタマジャクシです。これらのオタマジャクシは変態からは程遠いところにいます。我々は、これらのオタマジャクシを、甲状腺ホルモンを含む水の中に維持しました。そのときの濃度はこれです。0 日目は、蛍光発光はありません。3 日目も蛍光発光はありません。これは 5 日後の後肢と尾の部分です。オタマジャクシは蛍光発光するようになりました。ここが腹側と背側の画像です。

オタマジャクシの変態について、次のような疑問点を考えてみたいと思います。ここに完全なオタマジャクシがあります。体の各部がカエルに形を変えるのですが、尾域は成体構造に変わることはできません。その代わりに、尾域のすべての細胞がアポトーシスを迎えます。従って、これは、体部と尾部という非常に対照的な領域に依存した変態です。私の疑問は、なぜ尾域はカエルの構造に形を変えないかということです。この疑問については、皮膚を利用した研究が非常に有用です。

この矢印の左側には、既に成体の皮膚、正確に言えば前成体期の皮膚があります。右側は、まだ幼生の皮膚で、厚いコラーゲン層があります。前成体の領域のコラーゲン層と表皮の間には小さな結合組織の領域があります。しかし、幼生の領域にはこのような結合組織がありません。

前生体皮膚のコラーゲン層の上部表面にはリン酸カルシウムの厚い結晶が含まれているのを我々は発見しました。これはアリザリンレッド S で簡単に染色することができます。この染色は、注目した領域が前成体期の皮膚領域か幼生の領域かを判断するに非常に有用です。領域がこの染料で赤く染まれば、前成体期の領域です。

このような簡単な方法で、成体の領域と幼生の領域が分かります。我々は成体の領域と幼生の領域の間に、皮膚変換中心と呼ばれる活性中心が作用していると仮定しました。染色を行うと、前成体期の皮膚領域の形成を追っていくことができます。食用カエルのオタマジャクシのステージ 1 では、体部が幼生の皮膚で均等に覆われており、カルシウム沈着は全くありません。次に側腹部の一部に、赤く染色される箇所が現れます。ここでは、これら側腹部が前成体期の性状を示すようになります。

この前成体領域は成長しながら、最初は背側へ、次に腹側へと拡大していきませんが、尾部へは進みません。そこで、今度は皮膚の領域特異的な変態について、次のような問題を提起することができます。皮膚の変換中心は、なぜ尾部へ侵入していかないのでしょうか。

これを調べるために非常に有用な分子プローブがあります。最初に、アフリカツメガエル幼生角質 *Xenopus Larval Keratin* (XLK) を紹介します。これは、幼生の表皮細胞に特異的に発現します。幼生の皮膚を免疫組織化学的に染色したときの基底細胞に着目してください。点線は基底膜を表しています。基底膜上には、ご覧のとおり XLK があり幼生の細胞を表しています。ステージ 54 でも幼生の細胞が見られます。

変態の直前になっても、多くの幼生細胞があります。変態の極相の中央にあたるステージ 60 では、組織学的に識別可能な成体の基底細胞が見られます。ご覧の通り、この抗体に対する染色は全くありません。一方、*Xenopus Adult Keratin* (XAK) は、成体の表皮細胞の識別に非常に有用です。これらは、*Xenopus Adult Keratin C*、略して XAK-C による染色が見られない若いオタマジャクシです。ステージ 58 では基底膜上に XAK-C 陽性の細胞が少しあります。これらの陽性細胞はオタマジャクシの成長に伴って増加します。成体の皮膚では基底膜上に典型的な XAK-C 陽性基底細胞があります。

我々は XAK-C プロモーターと GFP を含むプラスミドを利用して遺伝子導入オタマジャクシを得ました。成体では、予測通り、体全体に非常に強い蛍光発光が見られ、体の前部、中間部、末端部が非常に良く発光します。また、免疫組織化学染色では赤く染色された XAK-C 陽性細胞が基底膜上に見られます。

我々の研究および他の科学的文献から、表皮の発生についてこのような図式を描くことができます。XAK-A1 に陽性を示す胚基底細胞があり、幼生になると表皮細胞は先ほど申し上げたとおり、XLK 陽性で、変態期には、XAK-C 陽性細胞が典型的な成体基底細胞と共に現れます。

文献および我々自身の研究から、このような胚の皮膚から成体皮膚への変換を制御している因子として次のものを考えています。最初に、BMP4 が外胚葉細胞から胚表皮への変換で重要な役割を果たし、次に、FGF-10 が胚表皮から幼生表皮への変換で重要な役割を果たします。

次の疑問は、どのような因子が幼生表皮から成体表皮への変換を制御するかということです。我々は前成体基底細胞が血小板由来成長因子 A を強く発現していることに気がきました。そして、これらの基底細胞の下には未成熟な 2 次結合組織があり、そこにはこの分子の受容体 PDGFR- α を集中的に発現する線維芽細胞があり、PDGF の信号伝達が幼生から成体表皮の変換に重要な役割を果たしていることを示唆しています。

この仮説を検証するため、我々は背部から皮膚を切除し、T₃ を添加、または無添加で培養しました。培養の 0 日目は、すべての細胞が XLK は陽性で、XAK-C は陰性です。T₃ を加えた場合、9 日ですべての細胞が XAK-C 陽性となり、幼生表皮が成功裏に成体基底細胞に変換していることを示唆しています。このとき、XLK 陽性細胞はありません。一方、T₃ を加えていないと、XLK 陽性細胞が存在し、XAK-C 陽性細胞はわずかしかなりません。これらは前成体基底細胞です。なぜならこれらの細胞も XAK-C 陽性だからです。

次に、この過程における PDGF 信号伝達の機能を明らかにするため、我々は 2 つの信号伝達の阻害実験をしました。1 つは tyrphostin AG1296 で、もう 1 つの阻害剤はこの受容体の細胞外ドメイン(ECD)です。幼生皮膚の培養液にこれらの 2 つの阻害剤を加えました。

これは T₃ のみのコントロールです。阻害剤 AG1296 を加えると、成体表皮への変換はありません。また、受容体の組換え型細胞外ドメインを加えた場合も同様に変換がありません。また、これら阻害剤は、移動などの線維芽細胞の活性化を効果的に抑制します。AG も組換え型 ECD も同様の作用があります。皮膚変換中心では、幼生基底細胞は前成体基底細胞に変換するために何らかの間葉因子を必要とします。また、前のスライドでご覧いただいたように、活性化した前成体基底細胞により PDGF-A が作られ、そして、受容体と結合すると、線維芽細胞がこの PDGF-A で活性化されます。また、我々の予備研究では、FGF が甲状腺ホルモンと共に前成体基底細胞に刺激するもう 1 つの間葉因子であることを示唆しています。前成体基底細胞は、最終的に、哺乳類のように、顆粒細胞、有棘細胞、角化細胞などに分化する成体基底細胞に変わります。

最初の問題に戻ります。我々は体部を赤で、尾を白で示しました。皮膚変換中心は皆さんもう良く分かっていると思います。問題は、この中心は尾域へ進むことができないのですが、なぜでしょうか。

体部と尾領域の間には非常に強い障壁があります。現在我々が考えているのは、Hox 遺伝子が障壁を作る役割を果たしているのではないかということです。例えば、体部、尾の前方部分、尾の後方部分の 3 つから皮膚を採取して、RT-PCR でこれらの領域の Hox-D11 の発現濃度を測定すると、この濃度は色によって、体部から尾に向かってそれぞれ、弱い、中等度、強い Hox-D11 の発現が表されます。Hox-C12 はどうでしょうか。この領域の濃度はさらに明確です。確認できない、弱い、そして尾では強い発現です。また、A13 では、尾の後方部分のみが非常に陽性です。

in situ ハイブリダイゼーション実験は、体部の線維芽細胞は Hox 遺伝子-A13 を発現していないことを示しています。しかし、尾域では、Hox-A13 陽性細胞がありました。そこで、我々は Hox 遺伝子、尾の後方部分の Hox と前方部分の Hox がこの障壁を作る何らかの役割を担っていると推定しました。

この図は、幼若なオタマジャクシの皮膚、体部、尾部です。基底膜上のすべての細胞は黄色で示されています。すなわち幼生細胞です。これらには全く違いがありません。しかし、間葉コンパートメントに唯一の違いを観察できます。これらの細胞は、異なる Hox 遺伝子を発現しています。ピンクの細胞と青い細胞です。

オタマジャクシの発生のある時期に、体部に皮膚変換中心が出現します。そしてこの中心で表皮と間葉の間で活発な相互作用が起き、ピンクの細胞がある範囲で体全体に移動します。しかし、この地点ではピンクの細胞が見えません。そのため、中心は、これを越えて進むことはできません。これが我々の最新の仮説です。ご静聴ありがとうございました。