

論文内容の要旨

申請者氏名 山田 壮平

ハエ、線虫、イヌ、ヒトなどにおいて、上皮組織の損傷修復は、損傷の周囲の細胞で形成されるアクトミオシンリングの収縮や細胞突起の形成によって制御されることが知られている。しかし、脊椎動物の発生研究のモデルであるゼブラフィッシュにおいては、損傷修復に関する報告はなかった。申請者は、ゼブラフィッシュ胚の表皮を上皮組織のモデルとして用い、原腸陥入期胚の表皮にフェムト秒レーザーを照射して1-2細胞にダメージを与えることにより、 $1500\sim 4000\mu\text{m}^2$ の損傷を誘導すると、その傷が約4.5分で修復されることを明らかにした。さらに、Cdc42やMyosin IIなどアクトミオシンの収縮や細胞突起形成に関与する因子を阻害した状況下で、損傷を誘導した場合、傷の修復が6-9分に遅延することから、ゼブラフィッシュ胚の上皮組織においても、アクトミオシンリングや細胞突起形成を介した損傷修復機構が存在することが明らかになった。しかし、どちらの阻害条件でも損傷後1分間の修復には影響は認められず、それ以降の修復が阻害されることが明らかになった。この結果は、アクトミオシンリングや細胞突起の形成は損傷1分後以降の修復を制御するが、損傷から1分以内に起こる修復には関与しないことを示唆している。申請者は、損傷1分以内の修復過程をRapid Reduction Phaseと名付け、その制御メカニズムの解析をおこない、直鎖状にアクチンを重合させるForminの阻害条件下では、Rapid Reduction Phaseが加速することで傷が早く修復され(2.5分)、その一方で、アクチンを分岐させるArp2/3阻害条件では、Rapid Reduction Phaseの速度が低下し、傷の修復が遅れること(7分)が明らかにした。この結果は、ForminやArp2/3によって制御される胚のアクチン重合パターンが、Rapid Reduction Phaseにおける損傷修復を調節していることを示唆している。

損傷直後の修復動態の観察から、Rapid Reduction Phaseは、上皮組織に作用している力が損傷によって解放され、損傷部に向かって周辺の細胞を移動させることに由来している可能性が示唆された。損傷修復過程で作用する力を定量する新しい手法を開発し、コントロール胚でのRapid Reduction Phaseでは0.88kPaの力が発生していることが明らかにした。一方、Formin阻害条件では、作用する力が1.24kPaに増加し、逆に、Arp2/3阻害条件では0.44kPaに低下することを明らかにした。以上の結果から、Rapid Reduction Phaseにおける修復過程には、上皮組織に作用しているkPaオーダーの力が関与しており、その力生成には、ForminやArp2/3によって制御されるアクチンネットワークの状態が関与することが示唆された。したがって、本研究において申請者は、ゼブラフィッシュ胚の上皮組織での損傷修復機構を解明し、さらに損傷修復初期に上皮組織に作用する力が関与することを明らかにした。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 山田 壮平

上皮組織の損傷修復は、生物が外環境の変化や内因的な要因で生じたダメージを受けた細胞や死細胞を、上皮組織の構造を維持したまま除去する生体防御機構の1つであり、その仕組みの理解は、生物学だけでなく、医学的にも重要である。これまでに、ショウジョウバエの初期胚や哺乳類由来の培養細胞を用いた損傷修復に関する研究が盛んに行われ、「アクトミオシンリングの収縮」、「細胞突起による傷の覆い囲み」の2つが損傷修復に関与することが報告されていた。その一方で、ヒトと同じ脊椎動物門に属し、ライブイメージングが容易なゼブラフィッシュにおいては、損傷修復に関する報告はなかった。申請者はその点に着目し、ゼブラフィッシュの初期胚の表皮を上皮組織のモデル系として用い、ライブイメージング技術を駆使して、上皮組織の損傷修復のダイナミクスを解析することによりその機構を解明することを目指した。

ゼブラフィッシュ初期胚は、単層上皮である表皮に覆われているが、申請者は任意の場所、任意のタイミングで胚表皮に損傷を誘導する実験系を確立した。損傷修復のダイナミクスを解析し、ゼブラフィッシュの損傷修復には、2つの制御機構が存在することを明らかにした。①Rapid Reduction Phase の存在：損傷直後から1分程度の間で起こる傷の修復で、上皮組織にかかっていた力が創傷によって解放されたことで、傷が修復される。②Rapid Reduction Phase 後、「アクトミオシンリングの収縮」、「細胞突起による傷の覆い囲み」が開始されることで傷の修復が完了する。

さらに、申請者は、フェムト秒レーザーが誘起する衝撃力を利用することで、損傷修復のときに作用する力の大きさを生体内で定量する方法を確立し、Rapid Reduction Phase では0.88kPa程度の力が作用していることを示した。このことは胚に作用する力を定量した初めての例である。また、直鎖状にアクチンを重合させる Formin を阻害したとき、その力が1.24kPaに増加し、アクチン重合の分岐を制御する Arp2/3 阻害条件では、0.44kPaに減少することを示した。作用する力の大きさと Rapid Reduction Phase の速度は正の相関がすることから、アクチン重合パターンの違いによって作用する力の大きさが変わり、それが Rapid Reduction Phase の速度を制御することが示唆された。

以上のように、本論文は、ゼブラフィッシュ胚での上皮組織の損傷修復機構を明らかにし、その分子機構および、力学機構を解明したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。