

重力実験のためのウニの幼生骨格系間充織の培養の検討

お茶大 清本正人 宇宙研 黒谷明美 東大 江口星雄 お茶大 山口守

The culture condition of larval skeletogenic mesenchyme cell for the gravity experiment

Masato Kiyomoto, Akemi Izum-Kurotani, Hoshio Eguchi, Mamoru Yamaguchi

Marine and Coastal Research Center, Ochanomizu University Kouyatsu, Tateyama, Chiba
294-0034

E-Mail: kiyomoto.masato@ocha.ac.jp

Abstract: Sea urchin and other echinoderm animals have calcitic endoskeleton. In sea urchin embryo, skeletogenesis starts at late gastrula stage and then the spicules grow up to larval skeletons. The skeletogenic cells are called primary mesenchyme cells derived from micromeres at 16-cell stage. We already reported a promotive effect of hypergravity on skeletogenesis in the culture of the skeletogenic cells with low concentration of horse serum. For the culture of skeletogenic cells, micromeres isolated by sucrose gradient are used. In this study, we examined more simple method to isolate skeletogenic cells. In calcium deficient seawater, embryos developed without cell adhesion and failed to form blastura. At the time of hatching, most cells were dispersed but mesenchyme cells attached on the substrate. By the gentle stream, dissociated cells were removed and mesenchyme cells left on the bottom were used for the culture. These mesenchyme sometimes contained not only skeletogenic cells but also secondary mesenchyme cells. This isolation method is simple and possibly is useful to improve a procedure of the gravity experiment.

Key words; skeletogenic cells, sea urchin, horse serum, calcium, hypergravity

ウニを含む棘皮動物は炭酸カルシウムからなる内骨格を持つ。ウニの幼生の骨片（幼生骨格）は、16細胞期の小割球に由来する一次間充織細胞によって形成される。骨片細胞だけを培養することが可能であり (Okazaki, 1975; Kiyomoto & Tsukahara, 1991)、無脊椎動物の生物石灰化（バイオミネラリゼーション）のモデルとして、各種重力環境の及ぼす影響がこのウニ小割球の培養系を使って調べられている。これまでに、過重力環境により形成される骨片の数が増加すること、骨片形成に関わる過程の中で Ca^{2+} の取り込みに過重力が影響している可能性、骨片基質タンパク質の発現に過重力は影響していない事が報告された (Imai *et al.*, 2006; Kiyomoto *et al.*, 2007)。

骨片細胞を単離するための操作は、ショ糖密度勾配を使う方法 (Kitajima & Okazaki 1980, Kitajima & Matsuda 1982) や細胞の接着性の違いを利用する方法 (Katow & Hayashi 1985, Etensohn & McClay 1987) などがあるが、いずれも煩雑である。重力実験の手順をより簡便にするために、少ない手順で簡単に単離できないか、カルシウム欠如海水を使って検討した。

【材料と方法】

実験にはバフンウニ *Hemicentrotus purcherrimus*

を使用した。10mM塩化アセチルコリンもしくは0.5 M KCl を割腔内に注射し配偶子を採取した。受精卵はカルシウム欠如海水中で発生させた。発生の過程は、倒立顕微鏡に取り付けたタイムラプスビデオで撮影した。間充織細胞の培養には、濾過滅菌した海水に抗生物質と馬血清を加えた海水を使用した。培養した間充織細胞の抗体染色では、10%ホルマリン海水で固定後、海水で洗ってから、一次間充織細胞に特異的なモノクローナル抗体 P4 と FITC で標識した2次抗体を使って染色した。

【結果と考察】

受精卵をカルシウム欠如海水中で培養すると、卵割は進行するが、細胞間の接着ができないうちに、胞胚の形をとることができず、解離した状態の細胞が増えていった。受精後12時間の正常胚がふ化する頃には、受精膜が破れたので、ふ化酵素の分泌は正常なタイミングで起こるようである。受精膜が破れることで、中の細胞は外に流れだし、そのほとんどはシャーレの底に広がって散らばった。一部の細胞は塊をつくり、シャーレの底に張り付いた。解離して広がった細胞は、遊離したままなので、ピペットで新しいカルシウム欠如海水を静かに吹き付けると、洗い流されるのに対し、細胞の塊は底に張り付いたまま残った (Fig. 1)。この塊を作る細胞は、

その後シャーレの底を遊走した。その形態や挙動から間充細胞と考えられる。胞胚壁を構成する細胞の形態形成には、細胞接着が必須であり、細胞接着にはカルシウムイオンが必要である。一方で、胞胚壁から卵割腔内へと移入する間充細胞は、その細胞機能の維持にカルシウムイオンは不要のようで、カルシウム欠如海水中でも時間通りに発生するようである。

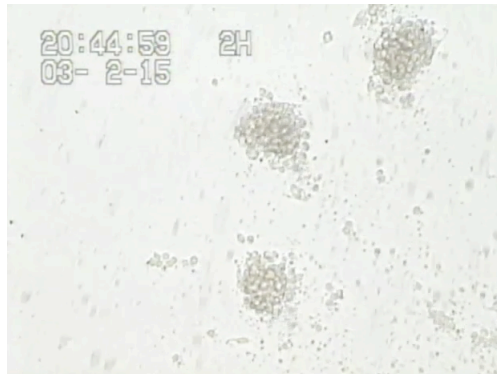


Fig.1 Isolated mesenchyme cells after the culture in calcium deficient seawater. Dissociated cells were removed by gentle stream and only attached mesenchyme cells were left.

この細胞塊を馬血清を含む海水で培養すると、一部の細胞は骨片を形成した。しかし、骨片細胞（一次間充細胞）だけでなく、色素細胞や割腔細胞といった二次間充細胞も現れた。細胞塊の細胞が遊走したところを、骨片細胞に特異的な抗体で染色したところ、ほとんどが骨片細胞の場合と(Fig. 2)、多くの染色されない細胞を含む場合があった。宇宙実験のために使う骨片細胞の単離培養の観点からは、できるだけ二次間充細胞を含まないように細胞を単離できた方がよい。原腸陥入に先立って卵割腔に移入する一次間充細胞（骨片細胞）に対して、非骨性の二次間充細胞は原腸胚期に出現する。解離細胞を洗い流す操作を、二次間充細胞が出現するよりも前の時期に行うことで、一次間充細胞の純度をあげることができるかもしれない。

カルシウム欠如海水中での胚の培養により間充細胞を単離する方法は、従来のショ糖密度勾配や細胞の接着性の違いを使った方法にくらべ、簡便な操作で間充細胞を単離でき、その培養により骨片形成を観察することができた。骨片細胞の純度をあげることにより、重力実験のための細胞の調整方法として有効なものになると考えられる。

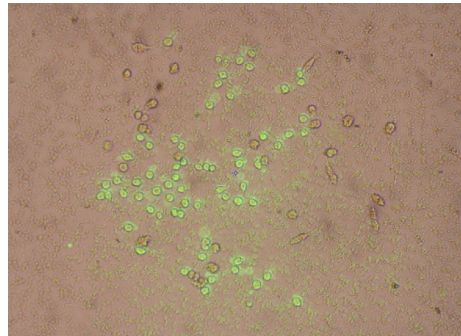


Fig.2 Most of isolated mesenchyme cells were stained by skeletogenic cell specific antibody. Some non-specific cells were secondary mesenchyme cells.

参考文献

- 1) Ettensohn CA and McClay DR, A new method for isolating primary mesenchyme cells of the sea urchin embryo. *Exp. Cell Res.*, 168, pp. 431-438 (1987)
- 2) Imai M, Izumi-Kurotani A, Eguchi H, Yamaguchi M and Kiyomoto M., The effect of hypergravity on the spicule formation in the culture of sea urchin micromeres and embryos. *Space Utilization Research* 22, pp. 238-240 (2006)
- 3) Katow H and Hayashi M, Role of fibronectin in primary mesenchyme cell migration in the sea urchin, *J. Cell Biol.*, 101, pp. 1487-1491 (1985)
- 4) Kitajima T and Okazaki K, Spicule formation in vitro by the descendants of precocious micromere formed at the 8-cell stage of sea urchin embryo. *Develop. Growth Differ.*, 22, pp. 265-279 (1980)
- 5) Kitajima T and Matsuda R, Specific protein synthesis of sea urchin micromeres during differentiation. *Zool. Mag.*, 91, pp. 200-205 (1982)
- 6) Kiyomoto M, Izumi-Kurotani A, Eguchi H, Yamaguchi M., The effect of hypergravity on the spicule formation in the sea urchin development. *Space Utilization Research* 23, pp. 332-334 (2007)
- 7) Kiyomoto M and Tsukahara J, Spicule formation-inducing substance in sea urchin embryo. *Develop. Growth Differ.*, 33, pp. 443-450 (1991).
- 8) Okazaki K, Spicule formation by isolated micromeres of the sea urchin embryo. *Amer. Zool.*, 15, pp. 567-581 (1975)