

ニワトリ発生過程における
眼胞の背腹軸極性の形成と眼胞内領域分化の制御

小林 琢磨
奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 分子発生生物学講座
(高橋 淑子 教授)

平成 21 年 11 月 11 日提出

目次

省略表記一覧	3
<第一部>	
序論	5
結果	7
考察	12
<第二部>	
はじめに	17
結果	19
考察	23
材料と方法	32
謝辞	35
参考文献	36
図表	48

省略表記一覧

AV= anteroventral

AD= anterodorsal

PV= posteroventral

PD= posterodorsal

A- (hemi) cephalon= anterior- (hemi) cephalon

AD- (hemi) cephalon= anterodorsal - (hemi) cephalon

AV- (hemi) cephalon= anteroventral - (hemi) cephalon

NR= neural retina

RPE= retinal pigmented epithelium

PPE= pineal pigmented epithelium

PLE= presumptive lens ectoderm

NCCs= neural crest cells

ISH= *in situ* hybridization

第一部

ニワトリ胚体期の頭部前腹領域の移植により形成される

Second eye における背腹軸極性の形成機構

序論（第一部）

脊椎動物の眼の原基である眼胞は、発生過程において前脳の膨出により形成される。眼胞はやがて遠位部において陥入し、基部はくびれることで杯のような形状の眼杯となる。2層からなる眼杯の内側は将来の神経性網膜（neural retina = NR）となり、外側は将来の非神経性網膜色素上皮（non-neural retinal pigmented epithelium = RPE）となる。また眼杯の腹側には神経や血管などの通り道となる眼裂が形成され、眼杯の腹側基部は間脳と連結して、将来の眼柄となる（Chow and Lang, 2001）。

これら NR、RPE、眼裂、眼柄などの組織は、一見均一な胞状の眼胞における細胞が背腹軸、前後軸、近遠軸に沿って領域特異的に分化することで形作られる。このような眼胞の軸に沿った領域特異性、すなわち軸極性（axial polarity）は転写調節因子やシグナル因子の勾配によってもたらされると考えられている（Peters, 2002; Chow and Lang, 2001; Ohkubo et al., 2002; Wilson and Houart, 2004; Zaki et al., 2003）。

眼胞の極性は、retinal ganglion cells の視蓋への投射パターンとして具体的にみることができる。例えば、眼胞の前側では *BF1/Foxg1*、後側では *BF2/Foxd2* が発現しており（Hatini et al., 1994）、同様に *SoHo1* と *GH6/Hmx1* は眼胞の前側で発現しており（Deitcher et al., 1994; Yuasa et al., 1996; Schulte and Cepko, 2000）、それぞれ前後軸に沿って非対称な発現勾配を示す。また *Tbx5* は眼胞の背側に発現し（Gibson-Brown et al., 1998; Koshiba-Takeuchi et al., 2000; Sowden et al., 2001）、*cVax/Vax2* は眼胞の腹側に発現している（Barbieri et al., 1999; Schulte et al., 1999; Muhleisen et al., 2006）。これらの遺伝子の軸に沿った発現は、*Eph/ephrin* と *DCC/netrin* シグナリングが仲介するのと同様に（Deiner et al., 1997; Birgbauer et al., 2000; Mann et al., 2002; Arvanitis and Davy, 2008）、retinal ganglion cells が中脳の標的へと正確に投射するのを制御し、正常な retinotectal projection map を形成するに必要十分である。

眼胞における極性形成は、分泌性のタンパク質による指向性のある作用によってもたらされているのだろう。例えば、前脳の背側の identity は主に TGF- β /BMP4 と WNTs によりもたらされ、一方、腹側の identity は Shh により、前側、側方の identity は FGF8 によりもたらされると考えられている（Thil et al., 2002; Kuschel et al., 2003; Crossley et al., 2001; Rallu et al.,

2002; Zhang and Yang, 2001; Ohkubo, et al., 2002; Storm et al., 2006; Okada et al., 2008; O'Leary et al., 2007)。また Retinoic acid は BMPs、Shh、FGF8 シグナルを調節することで前脳のパターンニングを制御すると考えられている (Halilagic et al., 2003, 2007; Ribes et al., 2006; Schneider et al., 2001)。これらの細胞外シグナルは、いずれも互いに時空間的、濃度依存的に均衡し、協調して前脳の領域特異化に貢献すると考えられている。

これまで、眼胞における極性がどのように形成されるのか明らかにしようと試みてきた。ニワトリ胚の様々な発生段階の移植によって、眼胞の背腹極性は前脳の背・腹側正中からもたらされるシグナルにより 8~14 体節期の間に次第に決まり、その背腹極性の指向性が乱されると眼杯形成と NR、RPE の領域特異的分化に失敗するということを明らかにした (Uemonsa et al., 2002)。また胚の単離組織の器官培養によって、眼胞の背側が RPE を形成し、RPE は neural crest 由来の間充織細胞がもたらすであろう頭部背側正中からのシグナルによって誘導されることを明らかにした (Kagiyama et al., 2005)。この結果は Fuhrmann らによる報告とも一致する (Fuhrmann et al., 2000)。さらに眼胞の前や腹側、特に眼胞の前腹 1/4 領域が NR を形成するために必要な領域であるということを、胚の眼胞の様々な領域を切除することにより明らかにした (Hirashima et al., 2008)。しかしながら、具体的にどのような細胞外シグナルによって眼胞の極性が決められ、将来背側領域としての RPE や腹側領域としての NR などが特異化されるのかは、未だ完全には明らかになってはいない。

そこで本研究では眼の正常な組織化に必要であると考えられる眼胞の極性形成機構を明らかにすることを目的とし、胚操作が容易であるニワトリ胚を用いて、まず様々な前脳領域の切除、移植実験を行った。

結果（第一部）

頭部前腹領域の移植によって **Second eye** が形成される

眼胞形成期のニワトリ胚の頭部を側方から見ることで眼胞を1つの円として考え、眼胞の前腹 1/4 領域 (anteroventral quadrant (前腹四分円)) を切除して発生させると、眼杯形成が起こらず、眼は NR が無く RPE のみで形成される色素胞 (pigmented vesicle) となる (Hirashima et al., 2008)。この pigmented vesicle は先天性疾患である congenital cystic eye (anophthalmos with cyst とも呼称) のような形態を示す (Mann, 1939)。これは眼胞の腹側の極性を失ったことによる影響の一つの例であると考えられる。そこでまず、眼胞の極性形成機構を明らかにする手がかりを得るために、このような眼形成における形態的变化を指標として、頭部の様々な領域を切除した。

眼胞形成期である St.10 の胚 (stage (St.) according to Hamburger and Hamilton, 1951) の前脳と眼胞を含む片側頭部前背 1/4 領域 (以下 anterodorsal (AD) -hemicephalon と略す) と片側頭部前腹 1/4 領域 (以下 anteroventral (AV) -hemicephalon と略す) を *in ovo* で切除して 3 日間培養した (図 1)。この結果、AD-hemicephalon を切除すると形態的にはほぼ正常な眼を形成するが、AV-hemicephalon を切除すると眼胞の前腹 1/4 を切除した場合より高頻度で pigmented vesicle を形成した (図 1)。またこのとき形成される pigmented vesicle では、ほとんどの場合水晶体が形成されなかった。これらの結果は、AV-cephalon が眼形成、特に腹側領域の形成において何らかの重要な役割を果たしており、また眼胞に腹側領域をもたらす腹側化因子が頭部前腹正中領域から供給されていることを示唆している。

そこで次に、眼胞に腹側極性をもたらすと予想される AV-hemicephalon を単離し、これを別の胚の頭部 AD 領域へと移植した。具体的にはドナーとなる胚の左側 AV-hemicephalon を単離して、これをホスト胚の右側 AD-hemicephalon をあらかじめ除去した部位に、前後軸を変えないようにはめ込むことで移植した (図 2)。この結果、移植された側において眼が過剰に形成され、この 2 つの眼はいずれも NR、RPE、Lens という 3 つの主要な眼の構成組織を伴った“完全な眼”を形成し、形態的に正常であった (図 2)。そこで、移植された AV-hemicephalon の影響によってホスト胚に 2 つめの過剰な眼が形成されたのか、移植された AV-hemicephalon そのものが異所的な 2 つ

めの眼 (“Second eye”) を形成したのか検証するために、ドナーとしてウズラ胚を使用して同様の移植を行った。この結果、移植胚において腹側に形成された眼は、ほぼすべての細胞がホストのニワトリに由来し、背側に形成された眼はほとんどの細胞がドナーのウズラ由来であった (図 2)。ゆえに移植側において形成された 2 つの眼のうち、腹側のものはホスト胚由来の本来の側眼であり、背側のものは移植した AV-hemicephalon そのものによって形成された異所的な Second eye であることが明らかになった。一方、同様に AD-hemicephalon を単離し、これを別の胚の頭部 AV 領域へと移植した場合、移植された側において形態的に小眼、水胞といった異常性を伴うものの、1 つの側眼を形成し、pigmented vesicle や Second eye を形成することはなかった (図 2)。

さらに、移植された AV-hemicephalon のサイズの違いにより形成される眼における移植片の貢献する領域を検証した。ほぼすべての眼胞領域を含む AV-hemicephalon を除去した部位に、別の胚から単離した同じ領域の AV-hemicephalon を移植すると、形成される側眼はほぼドナー由来の細胞で構成された (図 3-I)。一方、眼胞領域を含まない AV-hemicephalon を除去した部位に、別の胚から単離した同じ領域の AV-hemicephalon を移植すると、形成される側眼はほぼホスト由来の細胞で構成された (図 3-II)。AV-hemicephalon を除去すると pigmented vesicle が形成されるはずなのだが、これらの移植結果においてはいずれも pigmented vesicle が形成されることはなかった。また Second eye が形成されることもなく 1 つの側眼が形成された。このことから、移植手術そのものの影響によって Second eye や pigmented vesicle が形成されるのではないと考えられる。

器官培養組織における NR と RPE の形成

Second eye を形成する AV-cephalon が単独で眼形成することが出来るのかどうか検証するために、様々な St で単離した頭部組織の器官培養を行った (図 4)。具体的には眼胞の中心から transverse に切断することで頭部前側 (以下 anterior (A) -cephalon と略す) を得て、また A-cephalon をさらに眼胞の中心から coronal に切断することで AD-cephalon と AV-cephalon を得て、これらの組織を 3 日間培養した (図 4)。この結果、St.10 の胚から単離した A-/AD-cephalon では RPE が形成されるが、AV-cephalon では RPE が形成されないことが明らかになった。この器官培養において A-cephalon と AD-cephalon とで RPE 形成率に差異は無かった。このことから、単離された

AV-cephalon は単独で RPE を形成することができず、移植され宿主胚から何らかの影響を受けることによって RPE を形成することができるようになると言える。

また、胚の発生段階が進行するに従って A-/AD-cephalon での RPE 形成率が上昇し (St.9~11)、AV-cephalon での RPE 形成率が上昇した (St.12~15) (図 4)。さらに St.10-11 の胚の中脳を含む前側の広い領域の頭部を単離し、眼胞の中心から coronal に切断した頭部背側 (dorsal half) と頭部腹側 (ventral half) を器官培養すると、dorsal half のみならず、ventral half においても眼胞の posteroventral に RPE が形成された。これらの結果から、将来の RPE を形成する領域は眼胞の後背 (posterodorsal (PD)) から前腹 (anteroventral (AV)) へと次第にもたらされていると考えられる。

なお、器官培養したそれぞれの頭部組織において、A-cephalon の眼領域では Rx1、Mitf の発現が認められるが、AD-cephalon では Mitf のみ、AV-cephalon では Rx1 のみが発現した。このことは、A-cephalon は NR、RPE の両方を形成することができるが、AV-、AD-cephalon はそれぞれ NR、RPE のみを形成することを示唆している。つまり背と腹とに切り分けられた組織はそれぞれ“完全な眼”を形成することができず、単離された AV-cephalon は宿主胚の頭部 AD 領域に移植されることではじめて RPE と Lens を伴った完全な Second eye を形成することが可能になると考えられる。さらに、このように Rx1、Mitf 発現細胞が眼胞の腹、背側の組織で分離することが可能であるということは、それぞれ頭部の腹、背側領域が含有する Shh、BMP4 などの extraocular signal が、眼胞において他方より優位に (排他的に) 働きかけた結果であることを示唆している。

眼の Posterodorsal-Anteroventral 軸極性

そもそも、眼胞において St.11 より発現を開始する BMP4 は Posterodorsal に偏って発現しており、FGF8 は Anteroventral に偏って発現している (図 5)。

これまでの切除実験の結果から、NR のような眼の腹側領域特異的分化は Anteroventral (前腹側) -cephalon からもたらされ、また器官培養の結果から、RPE のような背側領域特異的分化は Posterodorsal (後背側) -cephalon からもたらされると考えられる。

そこで、眼胞形成期の前後において眼の背腹極性がどのように決定されているのか、より理解を深めるために、眼形成に関連する遺伝子の経時的な発現プ

ロファイリングを *in situ* hybridization によって検証した。眼胞の背、腹側極性マーカーとして *Tbx5*、*Pax2* (Koshiba-Takeuchi et al., 2000; Hirashima et al., 2008)、RPE 前駆細胞マーカーとして *Mitf* (Mochii et al., 1998)、NR 前駆細胞マーカーとして *Rx1* (cRaxL/cRax1) (Sakagami et al., 2003) の発現局在をそれぞれ検証した (図 6)。この結果、*Pax2* は St.9 より眼胞で発現を開始し、眼胞の腹側より前腹側で発現していることが明らかになり、発生が進むに従って次第に眼杯の前腹側と将来の眼柄で発現していることを確認した。*Tbx5* は St.11 より眼胞で発現を開始し、眼胞の背側より後背側で発現していることが明らかになり、発生が進むに従って次第に眼杯の後背側で発現していることを確認した。また、*Rx1* は St.8 より眼胞原基である前脳で発現を開始し、眼胞の腹側よりむしろ前腹側で発現していることが明らかになり、発生が進むに従って次第に眼杯の内側である将来の NR で発現していることを確認した。*Mitf* は St.10 より眼胞で発現を開始し、眼胞の背側より後背側で発現していることが明らかになり、発生が進むに従って次第に眼杯の外側である将来の RPE で発現していることを確認した。

これらの因子はいずれも眼胞形成期に発現を開始し、その発現局在は眼胞の posterodorsal-anteroventral 軸に沿って発現していることから、眼胞の軸性は頭部の軸性から 45 度程度傾いていると考えられる。このため、本研究における移植実験において、移植された AV-hemicephalon はホストの posterodorsal からのシグナルによって Second eye 形成をすることができるのだろう。

Second eye の背腹極性はホスト胚からのシグナルによって再規定される

実際に Second eye の形成過程において背腹軸極性が逆転しているのかどうか検証するために、まず単離した AV-hemicephalon の腹側部分を蛍光色素 (DiI) によって標識した。次にこの AV-hemicephalon をホスト胚の頭部 AD 領域に移植し、その後で *Tbx5* と *Pax2* の発現を経時的に検証した (図 7)。この結果、移植後 20 時間までに、移植された AV-hemicephalon において DiI 標識部位で発現している *Pax2* が次第に消失し、ホスト胚腹側方向に新たに *Pax2* が発現することが明らかになった (図 7)。また移植後 26 時間までに、移植された AV-hemicephalon の本来の腹側において新たに *Tbx5* が発現することが明らかになった (図 7)。これらの結果は、移植された AV-hemicephalon における背腹軸極性が確かに逆転していることを示している。

また、移植された AV-hemicephalon で発現している *Shh*、*FGF8* の発現局在

を経時的に検証した。この結果、AV-hemicephalon において移植時に発現していた *Shh* は、移植後 8 時間ではまだ明瞭に発現を確認できたが、移植後 30 時間までには次第に消失していった。また、AV-hemicephalon において移植時にはまだ眼胞において発現していなかった *FGF8* は、やや anterior 側に傾いて発現を開始し、次第にホスト胚の腹側方向へ発現が変化した (図 8)。これらの結果は移植片における *Shh*、*FGF8* の発現局在が、それぞれホスト胚からの BMP4、Shh などの因子の影響によって消失、変化させられていることを意味する。

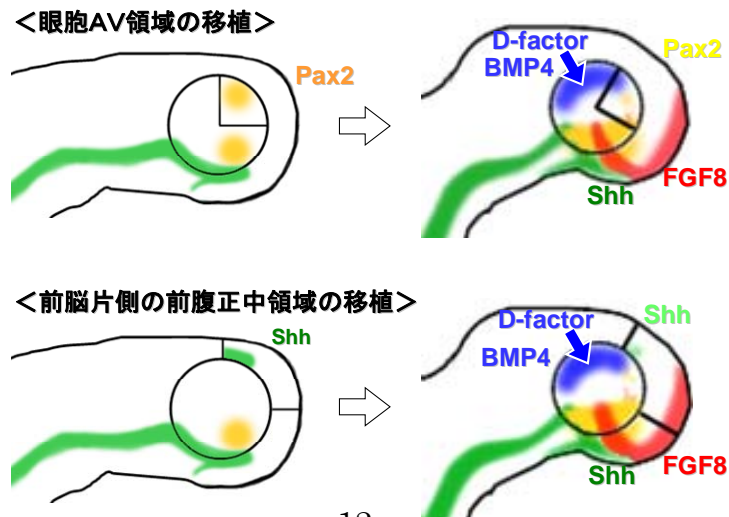
以上の遺伝子の発現局在は、発生が進むにつれて次第に変化しているようだが、この Second eye における背腹の逆転現象は、Second eye 形成過程の途中で次第に背腹軸極性が逆転しているのか、それとも眼形成そのものが一度リセットされ、再度新たな軸極性に従って Second eye 形成を開始しているのか、という疑問が生じた。この疑問を検証するために、Second eye における Lens 形成の開始時期を指標とすることにした。なぜならば眼の発生過程において、Lens 形成と眼胞の形態形成は連動しており、密接な組織間相互作用があることが知られているからである (Hyer, et al., 2003; Yamamoto and Jeffery, 2000; Ashery-Padan et al., 2000; Lang, 2004)。つまり、本研究において AV-hemicephalon を移植することで生じる異所的な Lens 形成は、その後の Second eye の形成において必要不可欠なイベントであると考えられる。そこで、水晶体原基に特異的に発現する *L-maf* の発現を検証した。胚体において St.11 から presumptive lens ectoderm で特異的に発現を開始する *L-maf* は (Ogino and Yasuda, 1998)、St.13 から開始する Lens プラコード形成 (Robinson and Lovicu, 2004) よりも早く発現するので、眼胞からの誘導により頭部外胚葉において Lens の特異化が開始されたことを知るための指標となる。移植片における *L-maf* の発現解析の結果、移植後 8 時間までに、移植された AV-hemicephalon において *L-maf* の発現が確認された (図 8)。このことは移植された AV-hemicephalon において、背腹軸極性が変化する前に Second eye 形成がすでに開始されつつあることを意味する。つまり Second eye はその形成過程の途中で次第に背腹軸極性が逆転していると考えられる。

考察（第一部）

時空間的に限られた条件下でもたらされる眼の背腹軸極性

本研究ではまず、Second eye を形成する AV-hemicephalon の AD 領域への移植において、移植に時空間的な条件があるのかどうか検討された。具体的には、ドナーとなる AV-cephalon を単離する時期、およびホストとなる胚の発生時期や移植部位を変えることで検証した。この結果、ドナーが St.10 より早過ぎても遅過ぎても、St.10 のホストにおいて Second eye を形成しにくく、ホストが St.10 より早過ぎても遅過ぎても、St.10 のドナーから Second eye が形成されにくい傾向があることが明らかになった（[図 9](#)；[統計表参照](#)）。また St.10 で単離した AV-hemicephalon を E3.5 のホスト胚の後頭部である中脳と髄脳境界領域へと移植しても Second eye は形成されなかった（n=0/5）。これらの結果は、ドナー、ホストともに時期領域特異的なシグナルが存在することを示唆する。

次に、St.10 で移植される組織に何の条件があるのかどうか検討された。具体的には、AV-hemicephalon の基部と遠位部を区別して移植した。つまり、前脳片側の前腹正中領域を移植片とし、ホスト胚の前脳片側の前背正中領域を除去した部位へと移植した。また、眼胞 AV 領域を移植片し、ホスト胚の眼胞 AD 領域を除去した部位へと移植した。この結果、を移植しても Second eye は形成されず（n=0/3）、眼胞 AV 領域を移植しても Second eye は形成されなかった（n=0/13）。ゆえに Second eye 形成のためには AV-hemicephalon の基部と遠位部の両方が必要であるといえる。このことから、例えば次のように考えることができる（[下図参照](#)；[説明は次ページ](#)）。



AV-hemicephalon の基部 (Shh) のみの移植では、(内在性の強い BMP4 によって) 背側化しつつある眼胞 AD 領域に異所的な腹側領域 (FGF8) をもたらしることができず、一方、眼胞 AV 領域のみの移植では (まだ FGF8 はこの時期には発現していない)、腹側化因子の供給源としての AV-hemicephalon の基部が (Shh が近くに) 無いために、ホスト胚の背側化因子 (D-factor、BMP4) によりすみやかに背側化されるために Second eye 形成にはいたらないのだろう。

また、AV-hemicephalon を切除すると pigmented vesicle が形成される一方、AV-hemicephalon を除去した部位に別の胚から単離した AD-hemicephalon を移植すると水胞が形成されるなど、異常な形態ではあるが“完全な”pigmented vesicle とはならなかった (図 1、2)。これらの結果は、AD-hemicephalon では完全に AV-hemicephalon の代わりにはならないが、ホスト胚の腹側正中からの Shh の影響をうけることによりわずかに AD-hemicephalon が腹側化したことを意味している。

以上の結果から、Second eye 形成現象は時空間的に限られた条件の移植によってもたらされる現象であり、眼が正常に形成されるためには、頭部の Posterodorsal、Anteroventral からそれぞれ St.10 前後にもたらされる背、腹側化因子を受け場としての眼胞が必要である、あるいは背、腹側化因子としての BMP4、Shh などが眼胞において指向性をもって共作用する時期を経過することにより眼が正常に組織化されることができる。

眼胞の RPE、NR 領域を決めているのは Dorsal-Ventral 軸か Medial-Lateral 軸か

眼胞における RPE、NR 領域は、mediolateral 軸に沿って眼胞の基部と遠位部に形成されるという主張がある (Horsford et al., 2005)。確かに胚体期の形態を観察するに、眼胞は遠位部やや腹側より陥入を開始し、NR に特徴的な肥厚した組織が形成されるように見える。しかしながら、本研究の器官培養における結果は、RPE は背側眼胞から、NR は腹側眼胞から生じることを示した。このことは、おそらく前述の説を積極的に否定するものではなく、眼胞を NR、RPE へと特異化するための因子は確かにそれぞれ extraocular の背、腹側からもたらされ、その結果として眼杯の形態形成がダイナミックに行われることで RPE、NR となる領域がより基部、遠位部にそれぞれ偏っていくのだろう。そして RPE となる領域は、最終的には NR 領域を包み込むように眼杯外周全

体へと広がっていき、球状の眼の原型を形作っていく。つまり、発生の進行に伴って、眼胞の背・腹側部に局在していた領域性が次第に基部・遠位部へと変化するのだろう。

Second eye 形成における背腹軸極性の逆転過程

本研究における Second eye の発生過程は以下のようにまとめることができる（[図 10 参照](#)）。

<上段図>

BMP4 と FGFR 活性は Lens 誘導とその正常な形態形成に必要であり（[Furuta and Hogan, 1998](#); [Wawersik et al., 1999](#); [Faber et al., 2001](#)）、特に FGF8 は *L-maf* を誘導する（[Vogel-Höpker et al., 2000](#); [Kurose et al., 2005](#)）（Lens 誘導の詳細は第 2 部に記述する）。

移植された AV-hemicephalon の Shh によって *FGF8* が眼胞で発現、維持され、ホスト胚の眼胞 PD からの BMP4 とともに移植片に Lens placode が誘導される。異所的な Lens 形成の開始とともに Second eye の形成は開始されると考えられる。

<中段図>

移植片の *Shh* は、おそらくホスト胚からの強い BMP4（あるいは未同定の背側化因子；Dorsal-factor）の作用により次第に抑制される。このため移植片の眼胞において *Pax2*、*FGF8* の発現を維持できず、ホスト胚からの BMP4、Shh の作用により次第に発現局在が変化する。移植片における *Shh* が次第に消失し、*FGF8* の発現局在が変化するため、ホスト胚からの BMP4 によって移植片の眼胞に *Tbx5*、*Mitf*、*Otx2* が誘導されて新たに背側領域が特異化される。

ホスト胚からの D-factor あるいは BMP4 によって、移植片に BMP4 が新たに誘導されると考えられる。しかしながら、移植後何時間で移植片において BMP4 が発現するようになっているのかということについては厳密に検証をしていない。BMP4 を発現する領域がホストとドナーで近接しており区別が困難であるため、今後、まずウズラの AV-hemicephalon をニワトリの頭部 AD 領域に移植する。そして頭部の連続切片を作成し、BMP4 に対する probe で *in situ* hybridization と QCPN 抗体を用いて免疫染色を同一切片において行い、移植されたウズラ細胞における BMP4 の発現時期を経時的に検証する必要がある。

<下段図>

移植片において新たに規定された背腹軸極性に従って RPE と NR が形成されて、結果として本来の背腹軸極性とは逆転した背腹軸極性をもつ **Second eye** が形成されると考えられる。

第二部

BMP4、Shh、FGF8 による

ニワトリ胚眼胞の背腹軸極性の形成機構と領域分化の解析

はじめに (第二部)

眼胞における背腹軸極性に沿った領域特異性は、それぞれ脳の前、腹側に局在する Shh、FGFs、BMPs のような因子によってもたらされている (Ohkubo et al., 2002; Martinez-Morales et al., 2004; Morcillo et al., 2006)。例えば、Shh を組み込んだウイルスの溶液を注入することで眼胞に作用させると Pax2 の発現領域が拡大し、BMP4 の発現が消失するとされる (Zhang and Yang, 2001)。ただし、この時おそらく実際に Shh を発現して有効に作用するのは眼杯形成期においてであると思われる。また一方、BMP4 をビーズを用いて頭部外胚葉側から眼杯に作用させると Tbx5 の発現領域が拡大する (Behesti et al., 2006)。また、BMP4 を眼胞形成期に神経上皮側からビーズで作用させると Pax2 が消失し、Shh の発現領域が縮小するとされるが、この際 Holoprosencephaly となり、眼形成そのものが異常となる (Golden et al., 1999)。FGF8 を眼胞形成期の眼胞近傍に埋植することで作用させると、異所的な L-maf の発現を誘導するものの、眼胞原基は消失する (Vogel-Hopker et al., 2000)。このように、いずれの因子であっても眼胞形成期の眼胞に直接作用させると様々な表現型をもたらす、眼形成を阻害することで正常に眼が形成しない。また、いずれの因子もノックアウト体ではそもそも頭部形成異常で胎生致死である。発生過程における特定の時期、特定の場所での因子の必要十分性を厳密に示すためにはコンディショナルノックアウト体を作成し、かつレスキューできるかどうか検証する必要がある。つまり、例えばそれぞれの因子の複数のレセプターを同時に眼胞形成期の眼胞でのみ消失させ、かつそれらのレセプターを異所的に共導入すれば正常な眼形成にいたることを示すということであり、これは極めて困難である。そこで本研究においては器官培養の実験系を用いて、それぞれの因子の眼胞形成期における眼胞の背腹極性形成への必要十分性を検証する。

本研究の第一部における器官培養の実験系において、ニワトリ胚より単離された頭部前側領域 (A-cephalon) は形態的に NR、RPE の両方を形成する。しかし、頭部前背側領域 (AD-cephalon) は RPE を形成するが NR を形成せず、一方、頭部前腹側領域 (AV-cephalon) は NR を形成するが RPE を形成しない。そのため、この実験系を用いて詳細な解析を行うことで RPE、NR 形成に関与する因子、つまり眼胞の背腹軸極性の決定を制御していると思われる Shh、

FGF8、BMP4 などの作用を理解するための興味深い知見を得ることができるのではないかと考えた。

分泌因子の機能解析を行うためには、まず、この器官培養の実験系においてそれぞれの単離組織の培養過程において、どのようなことが起こっているのか、あるいは起こっていないのかを明らかにしておく必要がある。そのために、眼形成に関連した遺伝子の発現局在のプロファイリングを行う。このような目的のためには、まだあまり眼形成における働きが明らかになっていない遺伝子の発現を検証するよりも、すでにある程度働きの明らかになっている既知の遺伝子の発現の有無を指標として解析する方が、好ましいと思われる。これにより結果の解釈が容易になることが期待される。加えて、将来、眼胞の背腹軸極性のメカニズムの解明に利用することを考慮すると、眼胞形成期に発現している遺伝子で、かつ眼を構成する各組織の代表的なマーカーとされる遺伝子を検証することが好ましい。

上記のような判断理由から、以下の主要な遺伝子をピックアップした。

眼胞の背、腹側極性マーカーとして *Tbx5*、*Pax2* (Koshiba-Takeuchi et al., 2000; Hirashima et al., 2008)、RPE 前駆細胞マーカーとして *Mitf*、*Otx2* (Mochii et al., 1998; Martinez-Morales et al., 2001; 2003)、NR 前駆細胞マーカーとして *Rx1* (cRaxL/cRax1)、*Chx10* (Sakagami et al., 2003; Rowan et al., 2004; Horsford et al., 2005)、また、眼の master regulatory gene として知られる *Pax6* (Hlder et al., 1995; Chow et al., 1999; Gehring and Ikeo, 1999; Donner and Maas, 2004)、Lens マーカーとして *L-maf*、*δ-crystallin* (Ogino and Yasuda, 1998; Yasuda et al., 1984; Shimada et al., 2003) を検証することにした。

第1部で述べたように眼の軸性は posterodorsal-anteroventral に傾いているが、単離培養した AD-cephalon は眼の背側の特徴を示し、AV-cephalon は眼の腹側の特徴を示す。また、AD-cephalon は BMP4 を発現するが Shh、FGF8 を発現せず、AV-cephalon は Shh、FGF8 を発現するが BMP4 を発現しない。このことから、これらの組織の器官培養は眼胞の背・腹側化候補因子の作用を検証するために生体より単純な実験系として利用できる。つまり端的に言ってしまえば、AD-cephalon は Shh、FGF8 の、AV-cephalon は BMP4 の、それぞれ“コンディショナルノックアウト組織”と考えることができる。このような実験系は、ある組織において特定のシグナル因子の作用を検証する際に、内在性のシグナル因子による作用を考慮することなく、目的の因子による作用をよりわかりやすくするために役に立つだろう。

結果（第二部）

器官培養における遺伝子発現局在の時空間的なプロファイリング

まず、St.10 の胚より単離し、器官培養を行った頭部組織において、眼形成に関連する遺伝子の経時的な発現プロファイリングを行った（[図 11](#)）。

この結果、単離培養した頭部前側領域（A-cephalon）において、検証したすべての遺伝子の発現局在は胚発生過程における発現局在と同様であり、発現パターンから判断すると、形態はいびつではあるが眼胞は陥入して眼杯となり、肥厚した NR、色素の沈着した RPE、楕円形の Lens を備えた眼を形成している。また、単離培養した AD-cephalon において、*Rx1*、*Pax2*、*Chx10* の発現が認められず、一方、単離培養した AV-cephalon において、*Mitf*、*Tbx5*、*Otx2* の発現が認められなかった。さらに AD-、AV-cephalon の両方において、*L-maf*、*δ-crystallin* の発現が認められなかった。以上の結果より、少なくとも今回検証した眼形成関連遺伝子の発現局在と形態的な特徴から判断する限りにおいて、器官培養した A-cephalon では、NR、RPE、Lens という 3 つの主要な眼の構成組織を伴った“完全な眼”が形成されると考えられる。一方、器官培養した AD-cephalon では RPE が形成されるが NR、Lens が形成されず、AV-cephalon では NR が形成されるが RPE、Lens が形成されないことが明らかになった。

さらにこの器官培養において、BMP4 は AD-cephalon に発現するが AV-cephalon に発現せず、Shh と FGF8 は AV-cephalon に発現するが AD-cephalon に発現しないことが明らかになった（[図 12](#)）。厳密には頭部外胚葉で発現している BMP4 が AV-cephalon においては消失し、anterior neural ridge で発現している FGF8 が AD-cephalon においては消失する。

Shh/Hh signaling は腹側から眼胞の背腹軸極性を決定する

AV-cephalon で発現している Shh は眼胞の腹側化因子の候補である。

これまでの知見から前脳腹側正中で発現している Shh は眼胞において *cVax*、*Pax2* の発現領域を広げ、*BMP4*、*Tbx5* の発現領域を狭めることで腹側領域の拡大に関与していることが示唆されている（[Zhang and Yang, 2001](#)）。また Shh のノックアウトマウスでは、中脳、前脳が矮小となり、前脳腹側正中領域に 1 つの眼原基が存在して RPE は形成されるが、cyclopia というより NR、

Lens の正常な組織化に失敗した anophthalmia とも言える形態となる (Chiang et al., 1996)。

これらのことから Hh signaling は正常な眼形成、特に眼の腹側領域の組織化に必要であると考えられる。そこで本研究においてはまず、Shh 発現ベクターを眼胞形成期の胚の眼胞へ *in ovo* electroporation 法 (Momose et al., 1999) により、および単離した頭部組織へ“Gel-patch electroporation 法”により導入することで Shh の作用を検証した (図 13、14)。この結果、様々な表現型を生じて解析が困難であった (詳細は後述の考察参照)。このことから、Shh が導入された細胞やその近傍では“強すぎる”Hh signaling によって本来の働き (前脳腹側正中から分泌される Shh により、眼胞が受ける“マイルドな”Hh signaling による働き) とは異なる挙動を示している可能性が懸念された。そこで Shh を眼胞に“直接的に”作用させるのではなく、“間接的に”作用させることで機能を検証した。具体的には、Shh 発現細胞をフィーダー状として、その上に単離した頭部組織を重ねることにより共培養した (図 15 ; 模式図参照)。この結果、Shh は眼胞背側において異所的に *Pax2* を誘導し、*Tbx5* を抑制することが明らかになった (図 15)。また Shh は眼胞背側において異所的に *FGF8*、*Rx1* を誘導して異所的な NR を形成する一方、Hh signaling を阻害剤 (KAAD) で阻害すると、眼胞では *FGF8* が発現せず、*Pax2* が消失することが明らかになった (図 15)。このことは、すでに眼胞において発現している *Pax2* が抑制されたことを示唆している。以上の結果から、Shh は眼胞の背腹軸極性を腹側から規定する腹側化因子であり、その後の NR 形成に寄与することが明らかになった。なお、Shh は AD-cephalon においては *Tbx5* の発現を抑制しにくいことと (n=3/6)、RPE 形成を阻害しなかった。

FGF8 は RPE 形成を濃度依存的に抑制することで NR 領域をつくる

AV-cephalon で発現する FGF8 は眼胞の腹側化因子の候補である。

そこで本研究においてはまず、眼胞形成期の胚の眼胞近傍に FGF8 soaked beads を埋め込むことで FGF8 の作用を検証した。しかしながら肥大した Lens が形成される一方、眼胞が欠失して眼形成に至らないなど、様々な表現型を生じて解析が困難であり (date not shown)、また、過去にも同様の実験で様々な表現型が報告されている (Vogel-Höpker et al., 2000; Kurose et al., 2005)。そこで改良した器官培養法を用いて FGF8 の局所的な作用を検証した (図 16 ; 模式図参照)。この結果、FGF8 は濃度依存的に *Mitf*、*Otx2* を抑制し、RPE 形成を阻害することが明らかになった (図 16)。このことから、発生過程にお

いて、眼胞腹側で発現している FGF8 は濃度依存的に RPE 形成を阻害することによって NR 領域を保持し、神経分化を促進すると考えられる (Crossley et al., 2001)。単離した AV-cephalon において FGF signaling を阻害剤 (SU5402) で阻害しても RPE を形成しないことから、RPE の形成のためには FGF8 の作用を強く受けなければならないと同時に、頭部背側からもたらされる背側化因子が必要であることが示唆される (図 16)。また FGF8 は *Pax2*、*Tbx5*、*Shh* の発現には影響を与えなかったことから直接的に背腹極性に関与するのではなく、*Shh* の影響下で眼胞の腹側領域の形成に腹側から関与しているのだろうと考えられる (図 16)。

BMP4 は背側から眼胞の背腹軸極性を決定する

AD-cephalon で発現する BMP4 は眼胞の背側化因子の候補である。

前述までの *Shh*、FGF8 の生体における作用の検証の結果から、生体における BMP4 の作用の検証においても様々な表現型を生じて解析が困難になることが予想された。そこで本研究においては、単離した頭部組織の器官培養法を用いて BMP4 の作用を検証した。この結果、BMP4 は眼胞腹側において異所的に *Tbx5*、*Otx2* を誘導し、本来 RPE を形成しない単離培養した AV-cephalon において RPE を形成させることが明らかになった (図 17)。このとき *Pax2*、*FGF8* の発現は対象側と比較して顕著な変化が認められなかった (図 17)。このことは、もともと *Shh* を発現している AV-cephalon における Hh シグナルはそれほど阻害されてはいないことを意味する。また本来 Lens を形成しない単離培養した AV-cephalon において BMP4 は *δ-crystallin* を誘導することが明らかになった (図 17)。以上の結果から、BMP4 は眼胞の背腹軸極性を背側から規定する背側化因子であり、Lens 形成および RPE 形成に寄与することが明らかになった。このことは BMP4 によって AV-cephalon において“完全な眼”が形成されたということの意味している。

In vitro で、異所的な BMP4 と *Shh* によって眼胞の背腹軸極性は逆転する

本研究におけるこれまでの結果から、少なくとも今回解析した遺伝子においては、眼の背側の特徴を示す AD-cephalon において *Shh* を作用させると腹側の特徴が誘導され、腹側の特徴を示す AV-cephalon において BMP4 を作用させると背側の特徴が誘導されるということが明らかになった。しかしながらこれは単にそれぞれ背、腹側組織で欠落している因子の作用が補われた結果に過ぎず、指向性を内包するいわゆる軸極性形成とは異なる現象なのではないか、

という疑問が生じた。

最後に我々は、眼の背腹軸極性は **BMP4** と **Shh** の指向的作用によって形成されるという仮説を、生体において検証したいと考えた。しかしながら、たとえば眼胞の背、腹側からそれぞれ **Shh**、**BMP4** を異所的に作用させたとしても、これらの作用は胚の頭部から絶えず供給されているであろう内在性の **BMP4**、**Shh** のより強い作用によって打ち消されてしまうことが予想された。そこで **St.10** で単離した前側眼胞の背側から **Shh**、腹側から **BMP4** を異所的に作用させることで検証した (図 18 ; 模式図参照)。この前側眼胞においては **Shh** も **BMP4** も発現してはいない。この結果、単離培養した眼胞の背側に眼裂が形成され、腹側に **RPE** が形成された (図 18)。異所的な眼裂形成は、眼胞の陥入による眼杯と眼柄形成の開始を意味し、異所的な **RPE** 形成は眼胞腹側に異所的に *Otx2*、*Mitf* が誘導されたことを意味する。また **Lens** 様構造物も確認できる。

さらにこのとき *Pax2*、*Tbx5* の発現も確かに逆転していることを確認した。つまり、**St.10** の前側眼胞の腹側において、すでに発現している内在性の *Pax2* は異所的な **BMP4** によって抑制され、異所的な **Shh** によって新たに眼胞背側に誘導された。また前側眼胞背側ではまだ発現していない *Tbx5* が異所的な **BMP4** によって眼胞腹側に誘導された。

これらの結果は眼胞において形成されつつある背腹軸極性が、それぞれ異なる極側からの **BMP4** と **Shh** との共作用によって逆転させられたことを意味する。領域特異的分化が進行しつつある細胞の発生運命が変えられたとも言える。このことから、少なくとも本研究で検証された遺伝子発現局在の変化を検証する限りにおいては、眼の背腹軸極性を規定する背、腹側化因子としての **BMP4**、**Shh** の指向的作用が実証された。

考察（第二部）

Shh のレセプターの 1 つである Patched1 (Ptc1) (Marigo et al., 1996, Stone et al., 1996) は、Smoothened (Smo) と結合することでその活性を抑制している。Ptc1 が Shh と結合すると、Smo が解放されて Ptc1 を含む下流の遺伝子の転写を開始する。胚体における Ptc1 の発現局在は Shh の発現局在と近似して重なるものの、前述のとおり Hh-signaling によって Ptc1 それ自身の発現が上昇し、眼胞で異所的に Shh を発現させると Ptc1 の発現局在が拡大することが知られている (Zhang and Yang, 2001)。

BMPs のレセプターは、TypeI として Actr1 (Alk2, Acva2)、Bmpr1a (Alk3)、Bmpr1b (Alk6)、Actr1b (Acvr1b) が、TypeII として Bmpr2、Actr2a (Acvr2)、Actr2b (Acvr2b) などが存在する。BMPs が TypeI、TypeII レセプターに結合することでヘテロダイマーとなったレセプターが細胞内で Smads をリン酸化することで下流にシグナルを伝達する。BMP-signaling について考えるとき、BMPs と少なくとも現在確認されているレセプターたちとの適切なセットを考慮し、かつ、BMPs がレセプターに結合してもシグナルを伝達するとは限らない場合も考慮する必要がある。例えば BMP7 は Alk3/Bmpr2 に結合するがシグナルは伝達しないとされる (Liu et al., 1995; Macias-Silva et al., 1998)。特に BMP4 と Bmpr2 との組み合わせを考えれば、Alk3/Bmpr2、Alk6/Bmpr2 のセットを介してシグナルを伝達するとされ、Alk2/Bmpr2 とは結合しない (Nohno et al., 1995; Rosenzweig et al., 1995)。このセットが形成されシグナルを伝達しうる領域は、眼胞形成期には眼胞の全域やや背側に偏っており、眼杯形成期には眼杯の外周領域であると考えられる (Faber, et al., 2002)。

FGFs のレセプターである FGFR1、FGFR4 は眼胞形成期の眼胞広範に、FGFR3 は眼杯の内側に発現している (Tachibana, unpublished, 1999; Kurose, et al., 2005)。FGF8 は少なくとも FGFR2c、FGFR3c、FGFR4 と結合し、FGFR1b、FGFR1c、FGFR2b とは結合しないと思われる (Pan et al., 2006)。このことだけを考えれば、FGF8 は FGFR4 を介して眼胞に作用することができる可能性がある。

以上のことから、器官培養の実験系において機能解析された、いずれの分泌因子においても眼胞においてそのシグナルを受け取ることが可能であると予想される。

眼の背腹軸極性は時空間、量依存的に適切な Shh、BMP4 の共作用により形成される

Shh と BMP4 の眼胞の背腹軸極性の決定への作用が拮抗的かつ協調的であることと、それぞれの作用が特定の発生段階において効果的であることについて考察したい。

胚体において、眼胞で Shh をウイルスベクターを用いて強制発現すると *cVax* 発現領域が拡大し (Zhang and Yang, 2001)、*cVax* (*mVax2*) を強制発現すると *Tbx5* が抑制される (Schulte et al., 1999)。また眼胞で Shh は *BMP4* の発現を抑制する (Zhang and Yang, 2001)。本研究の器官培養において、A-cephalon において内在性の Shh とともに“過剰に”作用させた Shh は *Tbx5* の発現を抑制するが、AD-cephalon において“異所的に”作用させた Shh は、*Tbx5* の発現をそれほど阻害しなかったことから、このときの Shh シグナルが、*Tbx5* を誘導する *BMP4* を抑制し、あるいはその作用をキャンセルするほど強いものではなかったことを示唆している。つまり、Shh は頭部腹側および眼胞腹側に存在する *cVax* を含む何らかの因子を介することでより高効率で *Tbx5*、*BMP4* を抑制するのだろう。

5E1 は Shh タンパクの N 末 (Shh-N) を認識して結合することで Shh-N の活性を阻害する中和抗体である (Ericson et al., 1996)。Cyclopamine-KAAD は、Hh signaling の transducer である膜貫通型タンパク質の Smoothened (Smo) に結合してその活性を阻害し、同時に Smo が細胞表面にリクルートされるのを抑制することにより Hh signaling pathway を阻害する強力な阻害剤である (Taipale et al., 2000; Frank-Kamenetsky et al., 2002; Chen et al., 2002a; 2002b; Berman et al., 2002; Watkins et al., 2003)。また、本研究で行った extirpation において (図 15)、切除後培養した組織で Shh を発現する細胞が完全に除去されていることを確認した (date not shown)。extirpation により Shh と発現局在が似ている他の Hh family を発現する細胞も除去されていることが予想される (ニワトリでは Indian hedgehog; Vortkamp et al., 1996)。以上のようにそれぞれ Hh signaling 阻害における作用の違いと、図 15 において、5E1、KAAD、extirpation の順にその影響が顕著であったこととは、Hh signaling が濃度依存的に作用していることを示唆している。このことをさらに胚体において、異なる濃度の KAAD soaked beads を前脳の中へ埋め込むことで検証した。この結果、KAAD の濃度依存的に表現型が顕著に

なることが明らかになった (図 19)。また KAAD による影響は St.10 以前において顕著であった。逆に、*in ovo* electroporation によって眼胞に Shh を強制発現させると、*Pax2*、*Tbx5*、*FGF8* の発現が抑制され、眼胞は陥入せず NR を形成しない pigmented vesicle のような形態、あるいは anophthalmia となった (図 13)。これら表現型の違いはおそらく導入領域の違いからもたらされる Shh 発現量の違いによってもたらされていると考えられるが、強すぎる Shh シグナルは NR 形成と眼の正常な組織化を阻害することが明らかになった。cavefish における研究から、強すぎる Hh signaling は水晶体細胞をアポトーシスさせて水晶体を消失させ、結果眼形成に失敗すると考えられているが (Yamamoto et al., 2004)、強すぎる Hh signaling は水晶体形成だけでなく、眼の腹側領域の形成をも阻害するのだろう。また、Shh 強制発現による影響は St10 前後において顕著であり、St.12 以降ではわずかに microphthalmia、coloboma となるだけであった (図 13)。このような Shh の作用の時期による違いは、器官培養の結果においても観察され、Shh による *Tbx5* の抑制作用は St.12 以降の A-cephalon ではそれほど顕著でなく、Hh signaling の阻害による *Pax2*、*FGF8* 抑制作用は St.11 以降の A-cephalon ではそれほど顕著でなかった (date not shown)。以上の結果から、前脳腹側正中より適切な時期に眼胞にもたらされる適切な強さの Shh によって眼胞の腹側領域が特異化されていると考えられる。このように Hh signaling は他の器官形成過程において報告されているように、眼形成過程においても、時間、量的な作用の違いによって異なる形態形成と細胞分化をもたらすと考えられる (Ingham and Fietz, 1995; Yang et al., 1997; Huang et al., 2007; Stamataki et al., 2005; Blaess et al., 2008)。ただし、pre-mature な full-length Shh は細胞内で processing されることで Shh-N となって分泌されるが、この過程で生じる Shh タンパクの C 末が *in ovo* electroporation で導入された細胞内において何らかの作用をしている可能性を否定するものではない。

胚体において、眼胞で BMP4 を過剰に作用させると *Tbx5* を発現する領域が拡大し、*Tbx5* を強制発現すると *Pax2* が抑制される (Golden et al., 1999; Koshiba-Takeuchi et al., 2000)。また胚体において、頭部で BMP4 を過剰に作用させると濃度依存的に *Shh*、*FGF8* の発現が抑制される (Ohkubo et al., 2002)。本研究における器官培養の結果において、確かに BMP4 は眼胞腹側において異所的に *Tbx5* を誘導した (図 17)。このとき AV-cephalon において、*Pax2*、*FGF8* はそれほど顕著に抑制されてはいなかったが、これは用いられ

た BMP4 の濃度が、基部から供給される Shh を抑制し、あるいはその作用をキャンセルするほど濃いものではなかったことを示唆している。つまり BMP4 は頭部背側、眼胞背側に存在する *Tbx5* を含む何らかの因子を介することでより高効率で *Pax2*、*FGF8*、*Shh* を抑制すると考えることができる。

BMP4、Shh の関係について、それぞれの発現局在と眼胞の形態を理由に、眼胞の基部では Shh の影響を強く受けるが、遠位部には届かないために BMP4 が発現できるのだという説がある。しかしながら、BMP4 を発現していない単離した AV-cephalon に KAAD を作用させても眼胞 AV で *Tbx5* を発現しなかった (n=4/4)。*Tbx5* の発現には BMP4 が必要であることから、このとき BMP4 は眼胞で発現していないと考えられる。このことから、腹側正中からの Hh signaling による proximal-distal の濃度勾配だけで BMP4 が自発的に発現し、背腹軸極性が決定するわけではなく、眼胞において BMP4 の発現誘導をもたらす背側因子が存在し、それゆえに RPE、NR 領域は確かに眼胞の背、腹領域にそれぞれ dominant にわかれて形成されると考えられる。

過去の知見と本研究の結果より、BMP4 が背側化因子であることが強く示唆されるが、BMP4 は眼胞周辺の間充織細胞 (peripheral mesoderm) においてわずかに発現がみとめられるものの、眼胞 PD においてより強く発現しており、Fuhrmann ら、Kagiyama らによって存在が示唆された眼胞“外”からの背側化因子とは言い難い。前述のとおり、器官培養の結果から、Shh は BMP4 の発現を抑制するが、Hh signaling を抑制することで BMP4 が誘導されるわけではない。このことから、眼胞 PD に BMP4 を誘導するような上位の背側化因子が存在する可能性、あるいは、peripheral mesoderm からの BMP4 によって眼胞 PD において BMP4 の positive feedback が生じている可能性が想定される。

これまでに述べた本研究の結果とこれまでの他のグループによる研究結果とを総合的に考えて、BMP4、Shh は確かに眼胞の背腹軸極性を決定しており、これらの作用は濃度依存的であり、互いに拮抗的に作用していると考えられる。つまり、眼の背腹軸極性は時空間、量的に適切な Shh、BMP4 の共作用により形成されるといえる。また、Shh、BMP4 によってもたらされる眼胞における背腹軸極性の形成は、前脳からの眼胞の形成開始 (St.8-9) とともに始まり、St.10 前後の眼胞に次第にもたらされ、やがて St.11-12 までには Fix されるのだろう。このような眼胞における軸極性決定時期とは、すなわち、眼において

NR、RPE となる領域が特異化される時期であると考えられる。

色素上皮組織の発生は、BMPs、FGFs/FGF signaling の濃度依存的な作用によって制御されている

BMPs は胚体において RPE 形成に必要十分であることが示唆されている (Muller et al., 2007)。また、眼胞で発現している *Mitf* と *Otx1/2* は直接相互作用し、RPE 形成に必要不可欠な転写調節因子である (Mochii et al., 1998; Martinez-Morales et al., 2001; 2003)。一方、FGFs (FGF1、2、19 (マウスの 15)) は NR 形成に必要であり、RPE 形成を抑制する (Pittack et al., 1997; Hyer et al., 1998; Martinez-Morales et al., 2005)。特に FGF8 は眼杯において神経分化を促進することが知られており (Crossley et al., 2001)、胚体において眼胞に異所的に作用させると、*Mitf* を抑制して RPE 形成を阻害し、presumptive RPE 領域に異所的な NR を形成する (Vogel-Hopker et al., 2000)。また、眼胞で発現している *Chx10* によって *Mitf* は抑制される (Rowan et al., 2004)。本研究における器官培養の結果から、FGF8 は *Mitf* ばかりでなく、*Otx2* も抑制し、濃度依存的に RPE 形成を抑制することが明らかになった (図 16)。また、確かに BMP4 によって異所的に RPE が形成されることが示された (図 17)。以上の結果から、眼胞 PD 領域からの BMP4 の作用を受けると、眼胞 AV 領域からの FGF8 の作用を強く受けないこととによって、RPE が形成されることが考えられる。

Hh signaling が、近遠軸に沿って眼胞をパターン化し、RPE 分化を促進することで正常な RPE の組織化に必要であるという報告がある (Perron M et al., 2003; Dakubo GD, et al., 2008)。本研究の器官培養の結果において、Shh によって背側眼胞に FGF8 が誘導されるが、このとき RPE 形成は著しく抑制されることはなかった (図 15、16)。また Shh を眼胞に *in ovo* electroporation によって強制発現すると、眼胞における *FGF8* は抑制され、RPE 形成は抑制されなかった (図 13)。一方、単離培養した AD-cephalon では Shh の発現は認められないが、眼胞背側において RPE が形成された (図 12)。これらの結果から、「Hh signaling が RPE 分化を促進することで RPE 形成に直接必要である」というより、頭部腹側正中で発現している Hh family により、「眼胞の近遠軸に沿って基部ではより強い Hh signaling を受けることで *FGF8* の発現が抑制されるため、RPE 形成を形成することができる」と考えることができる。ただし、単離培養した AD-cephalon において Shh 以外の Hh family 遺伝子が発現している可能性を否定しない。

単離培養した A-、AD-cephalon において、RPE の形成開始とほぼ同時に、異所的な色素上皮組織がしばしば形成された (図 11 ; broken arrows) 。この異所的な色素上皮組織は側眼の RPE とは異なり、頭頂部に形成されることから、便宜的に“pineal pigmented epithelium (PPE) ”と名称をつけた。胚体においてこのような PPE は観察されず、またニワトリ胚において、E15 から松果体の周辺組織においてわずかに色素の沈着が認められるものの、松果体において色素上皮が形成されることは無いことを確認した (date not shown) 。PPE は、単離培養した A-cephalon で 29% (n=5/17) 、AD-cephalon で 53%

(n=10/19) の割合で形成された。また、PPE は A-cephalon に SU5402 を作用させると高頻度で形成され (75%; n=6/8) (図 16; broken arrow) 、逆に A-、AD-cephalon に FGF8 を作用させると形成されなかった (0%; n=0/35、0%; n=0/13) 。つまり PPE は、A-cephalon より AD-cephalon において形成されやすく、FGF8 によって形成が抑制される一方で、FGF signaling を阻害すると高頻度で形成された。単離培養した AD-cephalon において FGF8 は発現しておらず、A-cephalon において、胚体と比較すると anterior neural ridge における FGF8 の発現は弱い (図 12) 。これらの結果は、FGF8/FGF signaling の強さに応じて PPE 形成が抑制されていることを示している。また、単離培養した A-、AD-cephalon において、*BMP4*、*Mitf*、*Otx2* がしばしば頭頂部で発現し (図 11、12) 、*BMP4*、*Otx2* は胚体の頭頂部正中において発現しているが、*Mitf* は発現していない (Crossley et al., 2001; Hirashima et al., 2008; our observations) 。おそらく胚体においては、例えば表皮で発現している FGF2 によって *Mitf* などの発現が抑制されることで PPE が形成されず、単離培養組織においては anterior neural ridge からの FGF8 の作用が弱められるために PPE が形成されやすくなるのだろう。

これらの結果から、RPE や PPE のような色素上皮組織の形成には、BMPs によって誘導され、FGFs/FGF signaling によって抑制されるという共通のメカニズムがある可能性が示唆される。

水晶体誘導因子は背、腹側眼胞の両方からもたらされる

水晶体は眼胞と近接する予定水晶体外胚葉 (presumptive lens ectoderm、以下 PLE と略す) より生じる。PLE は眼胞からの誘導因子により、水晶体を形成することができると考えられた (Spemann, 1901) 。現在このような水晶体

誘導現象は多段的な誘導過程の産物であると考えられている (Chow and Lang, 2001; Fisher and Grainger, 2004; Lovicu and McAvoy, 2005)。発生初期の preplacodal epiblast は、眼胞の無い培養条件下において Lentoid を形成することが可能であるという水晶体自己分化能をもっており、生体では最終的な水晶体誘導段階において眼胞からの因子が必要であると考えられている (Mizuno, 1972; Barabanov and Fedtsova, 1982; Sullivan et al., 2004; Bailey et al., 2006)。このような眼胞からの水晶体誘導因子は、近年 FGFs や BMPs であると考えられている。変異マウスの研究から、FGF receptor 活性 (Faber et al., 2001) と BMP7 (Wawersik et al., 1999) は協調して、水晶体形成に必須な転写調節因子である *Pax6* (Ashery-Padan et al., 2000) の発現を、BMP4 (Furuta and Hogan, 1998) は *Sox2* (Kamachi et al., 1995; Kondoh et al., 2004) の発現を、それぞれ PLE において促進し、水晶体誘導に必要であると考えられている。特に FGF8 は頭部外胚葉において異所的に *L-maf* を誘導することから、水晶体誘導に必要であると考えられる (Vogel-Hopker et al., 2000; Kurose et al., 2005)。本研究においても、水晶体誘導時期以前に眼胞の腹側を切除すると pigmented vesicle が形成されるが (Hirashima et al., 2008)、このとき FGF8 を発現していない pigmented vesicle では Lens が形成されないことを確認した (図 20)。

このように水晶体形成のためには眼胞、あるいはそれに代わる因子が必要である一方で、眼胞の正常な発生のためには水晶体が必要である。例えば、眼胞の陥入と眼杯形成のためには PLE が必要であり (Hyer et al., 2003)、分化しつつある水晶体胞と眼杯との相互作用は機能的に正常な眼が形成されるために必要である (Yamamoto and Jeffery, 2000; Ashery-Padan et al., 2000; Lang, 2004)。

本研究の結果から、単離培養した A-cephalon は Lens を形成するが、AD/AV-cephalon は Lens を形成しないことが明らかになった (図 11)。この結果は、Lens が形成されるためには背、腹側眼胞の両方が必要であることを示唆しており、いわゆる水晶体誘導因子には眼胞の背側からもたらされるものと、腹側からもたらされるものと、大別して 2 種類存在すると考えられる。そこで、水晶体誘導因子として特に眼胞の anteroventral で発現している FGF8 と posterodorsal で発現している BMP4 に注目した (図 5)。また FGF8 は単離培養した AV-cephalon に、BMP4 は AD-cephalon に発現している (図 12)。そこで、単離した AD/AV-cephalon にそれぞれ FGF8/BMP4 を作用させることで δ -crystallin の発現を検証した。この結果、BMP4 により AV-cephalon で

δ -crystallin が発現したことから、Lens が誘導されたと考えられる (図 17)。一方、FGF8 を作用させても AD-cephalon では δ -crystallin が発現しなかった (n=0/14)。これは以下のように考えることができる。FGF8 は ectodermal *Pax6* を抑制することから (Bailey et al., 2006)、恐らく過剰な FGF8 は PLE における *Pax6* を抑制するばかりでなく、眼そのものを欠失させるのだろう。また、neural crest cells (NCCs) は Lens 形成を阻害し、胚体において NCCs を除去すると眼領域以外に過剰な Lens が形成されることが知られている (Bailey et al., 2006)。St.10 で単離された AD-cephalon には、この時期に眼胞の後背側に移動してくる NCCs を含んでいることから (Le Douarin and Kalcheim, 1999; Kagiya et al., 2005; our observation)、Lens を形成しにくい組織であると考えられる。以上の結果とこれまでの他のグループの研究による知見から、Lens は NCCs 非存在下で、眼胞背側からの BMP4 と眼胞腹側からの適切な濃度の FGF8 との共作用により PLE に誘導、形成されると考えられる。ただし、AV-cephalon において FGF8 以外に“眼胞腹側からの水晶体誘導因子”が存在する可能性を否定するものではない。

眼 (側眼) は、Shh、FGF8、BMP4 がお互いに出会う場所に形成される

これまでの過去の知見と、少なくとも本研究の器官培養で解析したかぎりの遺伝子による結果からは、眼の発生過程を概ね以下のように説明することができる (図 21 参照)。

St.9~12 の眼胞形成期に、Shh/Hh signaling によって *Pax2*、*Rx1*、*FGF8* が眼胞 AV で発現し、BMP4 によって *Tbx5*、*Otx2*、*Mitf* が眼胞 PD で発現する。また眼胞 AV において発現する *FGF8* によって *Otx2*、*Mitf* は眼胞 AV で抑制される。St.11 に眼胞と隣接する PLE において、眼胞 PD からの BMP4 と眼胞 AV からの FGF8 によって Lens placode が誘導される。Lens が形成され始めるとともに、眼胞は遠位部腹側から陥入を開始し、眼杯を形成する。E3-3.5 (St.20-21) になると、*Otx2* と *Mitf* を発現している眼杯外側組織は単層の細胞に色素が沈着し始めることで成熟した RPE へと分化していき、*Rx1*、*Chx10* を発現している眼杯内側組織は層状になった細胞から神経軸索が伸長し始めることで成熟した NR へと分化していく。

本研究は第一部において、胚体期の移植により Second eye が生じることを示した。また、Second eye 形成過程において眼の背腹軸極性が逆転している現象を詳細に解析して、Shh、FGF8、BMP4、D-factor などの因子によって眼胞

の背腹軸極性形成が行われていることを示唆した。第二部では、器官培養を用いて実際に Shh、FGF8、BMP4 が眼胞の背腹軸極性の形成に必要十分であることを示した。さらに Shh、BMP4 によって眼胞の背腹軸極性が、確かに逆転することを示した。BMP4、Shh はそれぞれ眼形成に対して阻害的に働いていると考える方が一般的なのかもしれないが、おそらくそれは強すぎるシグナルにおける結果であって、実際には、適切な両方のシグナルが必要なのだろう、両方のシグナルが出会う場所に眼が形成されるのだろう、と考えている。

材料と方法

トリ胚外科操作

ニワトリ、およびウズラ受精卵は孵卵器にて 38 度で培養した。目的の時間培養した受精卵の殻に小窓を開け、胚体を見やすくするために、胚体直下の卵黄に墨汁もしくは黒インクを PBS (137mM NaCl, 2.68mM KCl, 8.09mM Na₂HPO₄, 1.15mM KH₂PO₄) でおおよそ 1 : 4 の割合で希釈して注入した。顕微操作後に受精卵の殻の小窓は、セロハンテープでフタをして孵卵器に戻して培養を続けた。

胚体の顕微操作にはタングステンニードルと小型ナイフを使用した。タングステンニードルは、タングステン線を 1M NaOH 溶液中でアノードとして電解、あるいは熱した亜硝酸ナトリウム中で溶解して作製した。小型ナイフは、錆びにくい鋼材の縫い針（オーステナイト系ステンレス鋼など）あるいは注射針をグラインダーと砥石で研磨し、ワリバシの先に固定することで作製した。

胚体眼胞の除去実験は平島ら (Hirashima et al., 2008) の方法に従い、胚体側頭部から見た眼胞を 1 つの円とみなし、この円の中心から垂直、水平に切ることで眼胞を前後、背腹に切り分けた。胚体頭部の除去実験も同様に眼胞中心から前後、背腹に切り分けることで除去した。胚体前脳の移植実験は、ホスト胚の移植予定領域の組織をあらかじめ除去しておき、シリコンプレート上でドナーとなる胚体から単離した移植片をホスト胚の目的部位にはめ込むことで行った。タングステンニードルと小型ナイフを両手で持ち、ハサミのようにお互いにこすり合わせるように使用すると簡単に綺麗な切断面で組織を切断、単離することができる。

蛍光標識には DiI (Molecular Probe) を使用した。有機溶媒に DiI 顆粒を溶解して作製した DiI 溶液で組織を標識したときには *in situ hybridization* (以下 ISH と略す) の行程で蛍光標識が消えてしまうことがある。DiI 顆粒を組織に埋め込めば蛍光標識が消失しにくいだが、標識時、後に顆粒が砕けることで標識が散乱するリスクと、時にシグナルが広範かつ強すぎて標識部位を認識しにくくなるリスクを伴う。より簡便に目的部位のみを認識するために、ビテリン膜の DiI 漬けを使用した。あらかじめビテリン膜を 5mg/ml DiI/20%DMSO 溶液に 2~3 年漬け込んでおき、このビテリン膜の DiI 漬けを小片にトリミングして、組織の目的部位に埋め込んだ。ビテリン膜の DiI 漬けは ISH の行程で蛍

光標識が消えないために、ISH 後であっても目的部位を蛍光により認識することができる。

RNA プローブおよび ISH

Whole-mount、section ISH は阪上ら (Sakagami et al., 2003)、島田ら (Shimada et al., 2003) の方法に従った。

Digoxigenin 標識 RNA プローブの作成には DIG RNA Labeling Mix (Boehringer / Roche) を用い、T7/T3/SP6 RNA polymerase (Promega) によって RNA 合成した。鋳型として以下の cDNA を使用した。Pax6、L-maf、 δ -crystallin、Otx2、FGF8、Pax2 (仲村博士より供与 (Okafuji, et al., 1999))、Tbx5 (竹内博士、小椋博士より供与 (Koshiba-Takeuchi, et al., 2000))、Chx10 と Rx1 (cRaxL/Rax1) (阪上博士より供与 (阪上博士論文; Sakagami, et al., 2003))、Mitf (餅井博士より供与 (Mochii et al., 1998))、Sox2 (近藤博士より供与 (Kamachi et al., 1995))。cShh は次のプライマーとニワトリ 2 日胚の whole embryo から抽出した RNA を用いて、RT-PCR により 1489bp の断片を得た。5'UTR を含むように設計したこの配列は他の Hh family gene (例えば Indian hedgehog) との相同性が低いために cross-hybridize する可能性は低いと考えられる。

5'-GATTGCTGTCTCCCGACCAA-3'

5'-TAGAGGAGCCGTGAGTACCA-3'

ニワトリ胚組織からの RNA 抽出には ISOGEN (ニッポンジーン) を用いた。組織の 10 倍量の ISOGEN を加え、超音波で破碎した後、ISOGEN の 1/5 倍量のクロロホルムを加え、遠心分離にて水層を回収した。その後、フェノールクロロホルム抽出を行い、イソプロパノール沈殿によって RNA を回収した。なお、RT-PCR には RNA PCR kit ver2.1 (Takara) を用いてプロトコールに従って行った。

脳の器官培養

メンブレンカップ (Millicell-CM, pore size 0.4 μ m, Millipore) にコラーゲンゲル (Type I-P, Nitta zeratin) を滴下し、インキュベーター内に入れて 37 度、15~20 分静置してコラーゲンゲル液をゲル化させた。このコラーゲンゲル上に単離した前脳組織を神経上皮を下にするようにしてのせた。最後にメンブレンカップを 1.5ml/well の培地を入れた 6well-plate にセットし、CO₂ インキュベーターを用いて 37 度で培養した。培地には DALBECCO'S MODIFIED

EAGLES MEDIUM (Nissui) に 10%FBS (Micro) 、4mM L-glutamine (Nacalai tesque)、100U/ml penicillin、100U/ml streptomycin を加えたものを使用した。

遺伝子導入細胞と組織との共培養のために、あらかじめコートされたシャーレで培養した Cos7 細胞に Lipofectamine 2000 Regent (Invitrogen) を用いて GFP、Shh 発現ベクターを導入した。この遺伝子導入細胞を 0.05% trypsin/EDTA (GIBCO) を用いて回収し、培地で 1 度、PBS で 2 度洗ってからコラーゲングル液と氷上で混合した。その後すみやかにメンブレンカップに滴下し、CO₂ インキュベーター内に入れて 37 度、15~20 分静置してコラーゲングル液をゲル化させた。この遺伝子導入細胞を混合したコラーゲングル上に単離した組織をのせ、最後にメンブレンカップを培地を入れた 6well-plate にセットし、CO₂ インキュベーターを用いて 37 度で培養した。

コラーゲングル包埋培養のために、メンブレンカップ上でゲル化させたコラーゲングルの上に単離した組織をのせ、さらにコラーゲングル液を滴下することで組織を包埋して、CO₂ インキュベーター内に入れて 37 度、15~20 分静置してコラーゲングル液をゲル化させた。その後 0.1%BSA-、または FGF8-soaked beads を組織と隣接するように埋め込み、CO₂ インキュベーターを用いて 37 度で培養した。FGF8-soaked beads は、mFGF8 (R&D Systems) を 0.1%BSA 溶液と混合して最終濃度 10、もしくは 100ug/ml とし、これをあらかじめ PBS で 2 回洗った Heparin-acrylic beads (SIGMA) とともに室温で 30 分以上静置することで準備した。0.1%BSA-soaked beads も同様に、0.1%BSA 溶液を用いて準備した。

BMP4-、もしくは KAAD-soaked beads は、20ug/ml hBMP4 (Wako Chemical) もしくは 100uM Cyclopamine-KAAD

(3-Keto-N-(aminoethyl-aminocaproyl-dihydrocinnamoyl)) (Merck Calbiochem) を、あらかじめ PBS で 2 回洗った Affi-Gel Blue Gel (BIO-RAD) とともに室温で 30 分以上静置することで準備した。

SU5402、もしくは 5E1 を単離した組織に作用させるために、あらかじめそれぞれ最終濃度 10ug/ml SU5402 (Merck Calbiochem) 、もしくは 100ug/ml 5E1 (DSHB, Univ. of Iowa City) となるようにコラーゲングル液と氷上で混合し、メンブレンカップに滴下して 37 度、15~20 分静置してゲル化させた。その後、このコラーゲングル上に単離した組織をのせて培養した。

謝辞

本研究で用いたプラスミドは以下の方々から供与していただきました。Pax2 は仲村博士（東北大学）より、Tbx5 は竹内博士（UCSF）と小椋博士（東北大学）より、Chx10 と Rx1 は阪上博士（UCLA）より、Mitf は餅井博士（兵庫県立大学）より、Sox2 は近藤博士（大阪大学）より頂きました。また本研究で用いた抗体は以下の方々から供与していただきました。QCPN 抗体は青山博士（広島大学）より、5E1 は阪上博士（UCLA）より、Mitf 抗体は餅井博士（兵庫県立大学）より頂きました。ありがとうございました。

本研究を進めるにあたり、直接指導していただいた荒木正介教授（奈良女子大学）に深く感謝いたします。修士のときより直接指導してくださった安田國雄学長、高橋淑子教授に深く感謝いたします。またアドバイザー委員として修士の時より指導をしてくださった中島欽一教授、別所康全教授、石田靖雅准教授に深く感謝いたします。

参考文献

Arvanitis, D., and Davy, A. (2008). Eph/ephrin signaling: networks. *Genes Dev* 22, 416-429.

Ashery-Padan, R., Marquardt, T., Zhou, X., and Gruss, P. (2000). Pax6 activity in the lens primordium is required for lens formation and for correct placement of a single retina in the eye. *Genes Dev* 14, 2701-2711.

Bailey, A.P., Bhattacharyya, S., Bronner-Fraser, M., and Streit, A. (2006). Lens specification is the ground state of all sensory placodes, from which FGF promotes olfactory identity. *Dev Cell* 11, 505-517.

Barabanov, V.M., and Fedtsova, N.G. (1982). The distribution of lens differentiation capacity in the head ectoderm of chick embryos. *Differentiation* 21, 183-190.

Barbieri, A.M., Lupo, G., Bulfone, A., Andreazzoli, M., Mariani, M., Fougerousse, F., Consalez, G.G., Borsani, G., Beckmann, J.S., Barsacchi, G., *et al.* (1999). A homeobox gene, *vax2*, controls the patterning of the eye dorsoventral axis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10729-10734.

Berman, D.M., Karhadkar, S.S., Hallahan, A.R., Pritchard, J.I., Eberhart, C.G., Watkins, D.N., Chen, J.K., Cooper, M.K., Taipale, J., Olson, J.M., *et al.* (2002). Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science* 297, 1559-1561.

Birgbauer, E., Cowan, C.A., Sretavan, D.W., and Henkemeyer, M. (2000). Kinase independent function of EphB receptors in retinal axon pathfinding to the optic disc from dorsal but not ventral retina. *Development* 127, 1231-1241.

Blaess, S., Stephen, D., and Joyner, A.L. (2008). Gli3 coordinates three-dimensional patterning and growth of the tectum and cerebellum by integrating Shh and Fgf8 signaling. *Development* 135, 2093-2103.

Canto-Soler, M.V., and Adler, R. (2006). Optic cup and lens development requires Pax6 expression in the early optic vesicle during a narrow time window. *Dev Biol* 294, 119-132.

Chen, J.K., Taipale, J., Cooper, M.K., and Beachy, P.A. (2002). Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothed. *Genes Dev* 16, 2743-2748.

Chen, J.K., Taipale, J., Young, K.E., Maiti, T., and Beachy, P.A. (2002). Small molecule modulation of Smoothed activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14071-14076.

Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K.E., Corden, J.L., Westphal, H., and Beachy, P.A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383, 407-413.

Chow, R.L., Altmann, C.R., Lang, R.A., and Hemmati-Brivanlou, A. (1999). Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate. *Development* 126, 4213-4222.

Chow, R.L., and Lang, R.A. (2001). Early eye development in vertebrates. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 255-296.

Crossley, P.H., Martinez, S., Ohkubo, Y., and Rubenstein, J.L. (2001). Coordinate expression of Fgf8, Otx2, Bmp4, and Shh in the rostral prosencephalon during development of the telencephalic and optic vesicles. *Neuroscience* 108, 183-206.

Dakubo, G.D., Mazerolle, C., Furimsky, M., Yu, C., St-Jacques, B., McMahon, A.P., and Wallace, V.A. (2008). Indian hedgehog signaling from endothelial cells is required for sclera and retinal pigment epithelium development in the mouse eye. *Dev Biol* 320, 242-255.

Deiner, M.S., Kennedy, T.E., Fazeli, A., Serafini, T., Tessier-Lavigne, M., and Sretavan, D.W. (1997). Netrin-1 and DCC mediate axon guidance locally at the optic disc: loss of function leads to optic nerve hypoplasia. *Neuron* 19, 575-589.

Deitcher, D.L., Fekete, D.M., and Cepko, C.L. (1994). Asymmetric expression of a novel homeobox gene in vertebrate sensory organs. *J Neurosci* 14, 486-498.

Donner, A.L., and Maas, R.L. (2004). Conservation and non-conservation of genetic pathways in eye specification. *Int J Dev Biol* 48, 743-753.

Ericson, J., Morton, S., Kawakami, A., Roelink, H., and Jessell, T.M. (1996). Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell* 87, 661-673.

Faber, S.C., Dimanlig, P., Makarenkova, H.P., Shirke, S., Ko, K., and Lang, R.A. (2001). Fgf receptor signaling plays a role in lens induction. *Development* 128, 4425-4438.

Fisher, M., and Grainger, R.M. (2004). Lens induction and determination. In *Development of the Ocular Lens*, F.J. Lovicu and M.L. Robinson, eds. Cambridge University Press, 27-47.

Frank-Kamenetsky, M., Zhang, X.M., Bottega, S., Guicherit, O., Wichterle, H., Dudek, H., Bumcrot, D., Wang, F.Y., Jones, S., Shulok, J., *et al.* (2002). Small-molecule modulators of Hedgehog signaling: identification and characterization of Smoothed agonists and antagonists. *J Biol* 1, 10.

Fuhrmann, S., Levine, E.M., and Reh, T.A. (2000). Extraocular mesenchyme patterns the optic vesicle during early eye development in the embryonic chick. *Development* 127, 4599-4609.

Furuta, Y., and Hogan, B.L. (1998). BMP4 is essential for lens induction in the mouse embryo. *Genes Dev* 12, 3764-3775.

Gehring, W.J., and Ikeo, K. (1999). Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet* 15, 371-377.

Gibson-Brown, J.J., S, I.A., Silver, L.M., and Papaioannou, V.E. (1998).

Expression of T-box genes Tbx2-Tbx5 during chick organogenesis. *Mech Dev* 74, 165-169.

Golden, J.A., Bracilovic, A., McFadden, K.A., Beesley, J.S., Rubenstein, J.L., and Grinspan, J.B. (1999). Ectopic bone morphogenetic proteins 5 and 4 in the chicken forebrain lead to cyclopia and holoprosencephaly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2439-2444.

Halder, G., Callaerts, P., and Gehring, W.J. (1995). New perspectives on eye evolution. *Curr Opin Genet Dev* 5, 602-609.

Halilagic, A., Ribes, V., Ghyselinck, N.B., Zile, M.H., Dolle, P., and Studer, M. (2007). Retinoids control anterior and dorsal properties in the developing forebrain. *Dev Biol* 303, 362-375.

Halilagic, A., Zile, M.H., and Studer, M. (2003). A novel role for retinoids in patterning the avian forebrain during presomite stages. *Development* 130, 2039-2050.

Hamburger, V., and Hamilton, H.L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 88, 49-92.

Hatini, V., Tao, W., and Lai, E. (1994). Expression of winged helix genes, BF-1 and BF-2, define adjacent domains within the developing forebrain and retina. *J Neurobiol* 25, 1293-1309.

Hirashima, M., Kobayashi, T., Uchikawa, M., Kondoh, H., and Araki, M. (2008). Anteroventrally localized activity in the optic vesicle plays a crucial role in the optic development. *Dev Biol* 317, 620-631.

Horsford, D.J., Nguyen, M.T., Sellar, G.C., Kothary, R., Arnheiter, H., and McInnes, R.R. (2005). Chx10 repression of Mitf is required for the maintenance of mammalian neuroretinal identity. *Development* 132, 177-187.

Huang, X., Litingtung, Y., and Chiang, C. (2007). Region-specific requirement

for cholesterol modification of sonic hedgehog in patterning the telencephalon and spinal cord. *Development* 134, 2095-2105.

Hyer, J., Kuhlman, J., Afif, E., and Mikawa, T. (2003). Optic cup morphogenesis requires pre-lens ectoderm but not lens differentiation. *Dev Biol* 259, 351-363.

Ingham, P.W., and Fietz, M.J. (1995). Quantitative effects of hedgehog and decapentaplegic activity on the patterning of the *Drosophila* wing. *Curr Biol* 5, 432-440.

Kagiyama, Y., Gotouda, N., Sakagami, K., Yasuda, K., Mochii, M., and Araki, M. (2005). Extraocular dorsal signal affects the developmental fate of the optic vesicle and patterns the optic neuroepithelium. *Dev Growth Differ* 47, 523-536.

Kamachi, Y., Sockanathan, S., Liu, Q., Breitman, M., Lovell-Badge, R., and Kondoh, H. (1995). Involvement of SOX proteins in lens-specific activation of crystallin genes. *EMBO J* 14, 3510-3519.

Kondoh, H., Uchikawa, M., and Kamachi, Y. (2004). Interplay of Pax6 and SOX2 in lens development as a paradigm of genetic switch mechanisms for cell differentiation. *Int J Dev Biol* 48, 819-827.

Koshiba-Takeuchi, K., Takeuchi, J.K., Matsumoto, K., Momose, T., Uno, K., Hoepker, V., Ogura, K., Takahashi, N., Nakamura, H., Yasuda, K., *et al.* (2000). Tbx5 and the retinotectum projection. *Science* 287, 134-137.

Kurose, H., Okamoto, M., Shimizu, M., Bito, T., Marcelle, C., Noji, S., and Ohuchi, H. (2005). FGF19-FGFR4 signaling elaborates lens induction with the FGF8-L-Maf cascade in the chick embryo. *Dev Growth Differ* 47(4), 213-223.

Kuschel, S., Ruther, U., and Theil, T. (2003). A disrupted balance between Bmp/Wnt and Fgf signaling underlies the ventralization of the Gli3 mutant telencephalon. *Dev Biol* 260, 484-495.

Lang, R.A. (2004). Pathways regulating lens induction in the mouse. *Int J Dev*

Biol 48, 783-791.

Le Douarin, N.M., and Kalcheim, C. (1999). The neural crest, Second Edition. Cambridge University Press.

Liu, F., Ventura, F., Doody, J. and Massagué, J. (1995). Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the twokinese receptor model to the BMPs. Mol Cell Biol 15, 3479-3486.

Lovicu, F.J., and McAvoy, J.W. (2005). Growth factor regulation of lens development. Dev Biol 280, 1-14.

Macias-Silva, H. P., Tang, S. J., Buchwald, M. and Wrana, J. L. (1998). Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2. J Biol Chem 273, 25628-25636.

Mann, F., Ray, S., Harris, W., and Holt, C. (2002). Topographic mapping in dorsoventral axis of the Xenopus retinotectal system depends on signaling through ephrin-B ligands. Neuron 35, 461-473.

Mann, I. (1939). A case of congenital cystic eye. Trans Ophthalmol Soc Aust 1, 120-124.

Marigo V, Davey RA, Zuo Y, Cunningham JM, Tabin CJ. (1996). Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor. Nature 384, 176-179.

Martinez-Morales, J.R., Del Bene, F., Nica, G., Hammerschmidt, M., Bovolenta, P., and Wittbrodt, J. (2005). Differentiation of the vertebrate retina is coordinated by an FGF signaling center. Dev Cell 8, 565-574.

Martinez-Morales, J.R., Dolez, V., Rodrigo, I., Zaccarini, R., Leconte, L., Bovolenta, P., and Saule, S. (2003). OTX2 activates the molecular network underlying retina pigment epithelium differentiation. J Biol Chem 278, 21721-21731.

Martinez-Morales, J.R., Signore, M., Acampora, D., Simeone, A., and Bovolenta, P. (2001). Otx genes are required for tissue specification in the developing eye. *Development* 128, 2019-2030.

Mizuno, T. (1972). Lens differentiation in vitro in the absence of optic vesicle in the epiblast of chick blastoderm under the influence of skin dermis. *J Embryol Exp Morphol* 28, 117-132.

Mochii, M., Mazaki, Y., Mizuno, N., Hayashi, H., and Eguchi, G. (1998). Role of Mitf in differentiation and transdifferentiation of chicken pigmented epithelial cell. *Dev Biol* 193, 47-62.

Momose, T., Tonegawa, A., Takeuchi, J., Ogawa, H., Umesono, K., and Yasuda, K. (1999). Efficient targeting of gene expression in chick embryos by microelectroporation. *Dev Growth Differ* 41, 335-344.

Muhleisen, T.W., Agoston, Z., and Schulte, D. (2006). Retroviral misexpression of cVax disturbs retinal ganglion cell axon fasciculation and intraretinal pathfinding in vivo and guidance of nasal ganglion cell axons in vivo. *Dev Biol* 297, 59-73.

Muller, F., Rohrer, H., and Vogel-Hopker, A. (2007). Bone morphogenetic proteins specify the retinal pigment epithelium in the chick embryo. *Development* 134, 3483-3493.

Nohno, I. T., Saito, T., Hosokawa, K., Noji, S., Wolsing, D. H. and Rosenbaum, J. S. (1995). Identification of a human type II receptor for bone morphogenetic protein-4 that forms differential heteromeric complexes with bone morphogenetic protein type I receptors. *J Biol Chem* 270, 22522-22526.

Ogino, H., and Yasuda, K. (1998). Induction of lens differentiation by activation of a bZIP transcription factor, L-Maf. *Science* 280, 115-118.

Ohkubo, Y., Chiang, C., and Rubenstein, J.L. (2002). Coordinate regulation and synergistic actions of BMP4, SHH and FGF8 in the rostral prosencephalon

regulate morphogenesis of the telencephalic and optic vesicles. *Neuroscience* 111, 1-17.

Okada, T., Okumura, Y., Motoyama, J., and Ogawa, M. (2008). FGF8 signaling patterns the telencephalic midline by regulating putative key factors of midline development. *Dev Biol* 320, 92-101.

Okafuji, T., Funahashi, J., and Nakamura, H. (1999). Roles of Pax-2 in initiation of the chick tectal development. *Brain Res Dev Brain Res* 116, 41-49.

O'Leary, D.D., Chou, S.J., and Sahara, S. (2007). Area patterning of the mammalian cortex. *Neuron* 56, 252-269.

Pan Y, Woodbury A, Esko JD, Grobe K, Zhang X. (2006) Heparan sulfate biosynthetic gene *Ndst1* is required for FGF signaling in early lens development. *Development* 133, 4933-4944.

Perron, M., Boy, S., Amato, M.A., Viczian, A., Koebernick, K., Pieler, T., and Harris, W.A. (2003). A novel function for Hedgehog signalling in retinal pigment epithelium differentiation. *Development* 130, 1565-1577.

Peters, M.A., and Cepko, C.L. (2002). The dorsal-ventral axis of the neural retina is divided into multiple domains of restricted gene expression which exhibit features of lineage compartments. *Dev Biol* 251, 59-73.

Pittack, C., Grunwald, G.B., and Reh, T.A. (1997). Fibroblast growth factors are necessary for neural retina but not pigmented epithelium differentiation in chick embryos. *Development* 124, 805-816.

Rallu, M., Machold, R., Gaiano, N., Corbin, J.G., McMahon, A.P., and Fishell, G. (2002). Dorsoventral patterning is established in the telencephalon of mutants lacking both *Gli3* and Hedgehog signaling. *Development* 129, 4963-4974.

Ribes, V., Wang, Z., Dolle, P., and Niederreither, K. (2006). Retinaldehyde dehydrogenase 2 (RALDH2)-mediated retinoic acid synthesis regulates early

mouse embryonic forebrain development by controlling FGF and sonic hedgehog signaling. *Development* 133, 351-361.

Robinson, M.L., and Lovicu, F.J. (2004). The Lens: Historical and Comparative Perspectives. In *Development of the Ocular Lens*, F.J. Lovicu and M.L. Robinson, eds. Cambridge University Press, 3-26.

Rosenzweig, B. L., Imamura, T., Okadome, T., Cox, G. N., Yamashita, H., ten Dijke, P., Heldin, C.-H. and Miyazono, K. (1995). Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 7632-7636.

Rowan, S., Chen, C.M., Young, T.L., Fisher, D.E., and Cepko, C.L. (2004). Transdifferentiation of the retina into pigmented cells in ocular retardation mice defines a new function of the homeodomain gene *Chx10*. *Development* 131, 5139-5152.

Sakagami, K., Ishii, A., Shimada, N., and Yasuda, K. (2003). RaxL regulates chick ganglion cell development. *Mech Dev* 120, 881-895.

Schneider, R.A., Hu, D., Rubenstein, J.L., Maden, M., and Helms, J.A. (2001). Local retinoid signaling coordinates forebrain and facial morphogenesis by maintaining FGF8 and SHH. *Development* 128, 2755-2767.

Schulte, D., and Cepko, C.L. (2000). Two homeobox genes define the domain of *EphA3* expression in the developing chick retina. *Development* 127, 5033-5045.

Schulte, D., Furukawa, T., Peters, M.A., Kozak, C.A., and Cepko, C.L. (1999). Misexpression of the *Emx*-related homeobox genes *cVax* and *mVax2* ventralizes the retina and perturbs the retinotectal map. *Neuron* 24, 541-553.

Shimada, N., Aya-Murata, T., Reza, H.M., and Yasuda, K. (2003). Cooperative action between *L-Maf* and *Sox2* on *delta-crystallin* gene expression during chick lens development. *Mech Dev* 120, 455-465.

Sowden, J.C., Holt, J.K., Meins, M., Smith, H.K., and Bhattacharya, S.S. (2001). Expression of *Drosophila omb*-related T-box genes in the developing human and mouse neural retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 3095-3102.

Spemann, H. (1901). Über Korrelationen in der Entwicklung des Auges. *Verh Anat Ges* 15, 61-79.

Stamatakis, D., Ulloa, F., Tsoni, S.V., Mynett, A., and Briscoe, J. (2005). A gradient of Gli activity mediates graded Sonic Hedgehog signaling in the neural tube. *Genes Dev* 19, 626-641.

Stone, D. M., Hynes, M., Armanini, M., Swanson, T. A., Gu, Q., Johnson, R. L., Scott, M. P., Pennica, D., Goddard, A., Phillips, H., Noll, M., Hooper, J. E., de Sauvage, F., and Rosenthal, A. (1996). The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature* 384, 129–134.

Storm, E.E., Garel, S., Borello, U., Hebert, J.M., Martinez, S., McConnell, S.K., Martin, G.R., and Rubenstein, J.L. (2006). Dose-dependent functions of *Fgf8* in regulating telencephalic patterning centers. *Development* 133, 1831-1844.

Sullivan, C.H., Braunstein, L., Hazard-Leonards, R.M., Holen, A.L., Samaha, F., Stephens, L., and Grainger, R.M. (2004). A re-examination of lens induction in chicken embryos: in vitro studies of early tissue interactions. *Int J Dev Biol* 48, 771-782.

Tachibana, A. 修士論文, 1999.

Taipale, J., Cooper, M.K., Maiti, T., and Beachy, P.A. (2002). Patched acts catalytically to suppress the activity of *Smoothed*. *Nature* 418, 892-897.

Theil, T., Aydin, S., Koch, S., Grotewold, L., and Ruther, U. (2002). Wnt and Bmp signalling cooperatively regulate graded *Emx2* expression in the dorsal telencephalon. *Development* 129, 3045-3054.

Uemonsa, T., Sakagami, K., Yasuda, K., and Araki, M. (2002). Development of

dorsal-ventral polarity in the optic vesicle and its presumptive role in eye morphogenesis as shown by embryonic transplantation and in ovo explant culturing. *Dev Biol* 248, 319-330.

Vogel-Hopker, A., Momose, T., Rohrer, H., Yasuda, K., Ishihara, L., and Rapaport, D.H. (2000). Multiple functions of fibroblast growth factor-8 (FGF-8) in chick eye development. *Mech Dev* 94, 25-36.

Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G.V., Kronenberg, H.M., and Tabin, C.J. (1996). Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 273, 613-622.

Watkins, D.N., Berman, D.M., Burkholder, S.G., Wang, B., Beachy, P.A., and Baylin, S.B. (2003). Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature* 422, 313-317.

Wawersik, S., Purcell, P., Rauchman, M., Dudley, A.T., Robertson, E.J., and Maas, R. (1999). BMP7 acts in murine lens placode development. *Dev Biol* 207, 176-188.

Wilson, S.W., and Houart, C. (2004). Early steps in the development of the forebrain. *Dev Cell* 6, 167-181.

Yamamoto, Y., and Jeffery, W.R. (2000). Central role for the lens in cave fish eye degeneration. *Science* 289, 631-633.

Yamamoto, Y., Stock, D.W., and Jeffery, W.R. (2004). Hedgehog signalling controls eye degeneration in blind cavefish. *Nature* 431, 844-847.

Yang, Y., Drossopoulou, G., Chuang, P.T., Duprez, D., Marti, E., Bumcrot, D., Vargesson, N., Clarke, J., Niswander, L., McMahon, A., *et al.* (1997). Relationship between dose, distance and time in Sonic Hedgehog-mediated regulation of anteroposterior polarity in the chick limb. *Development* 124, 4393-4404.

Yasuda, K., Nakajima, N., Isobe, T., Okada, T.S., and Shimura, Y. (1984). The nucleotide sequence of a complete chicken delta-crystallin cDNA. *EMBO J* 3, 1397-1402.

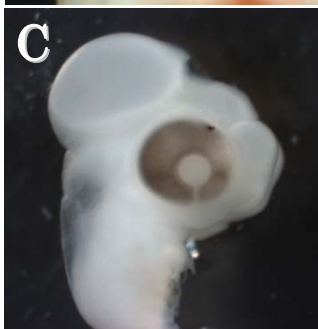
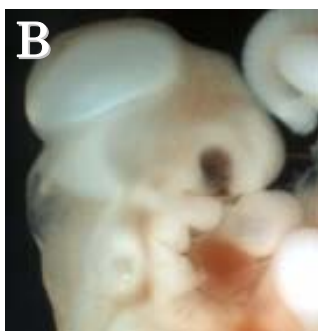
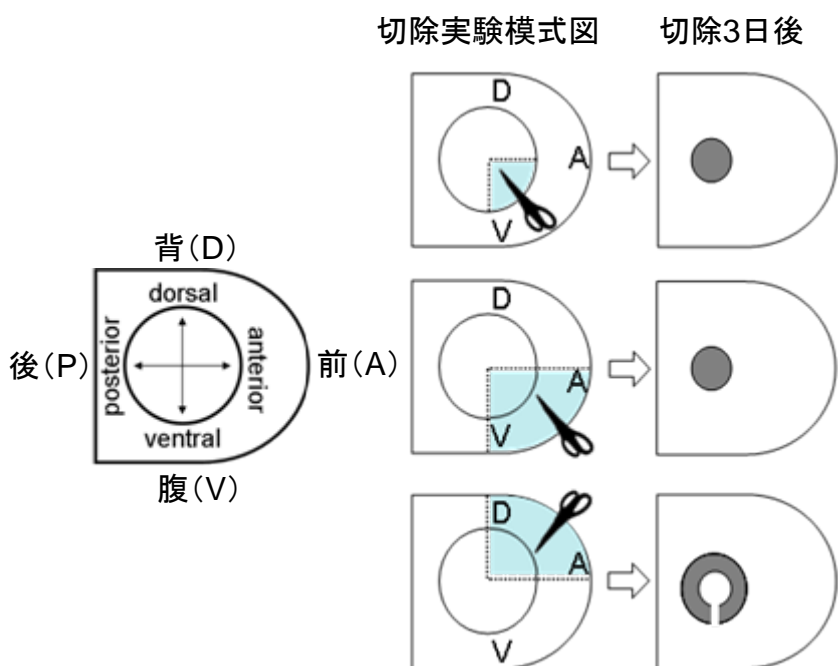
Yuasa, J., Hirano, S., Yamagata, M., and Noda, M. (1996). Visual projection map specified by topographic expression of transcription factors in the retina. *Nature* 382, 632-635.

Zaki, P.A., Quinn, J.C., and Price, D.J. (2003). Mouse models of telencephalic development. *Curr Opin Genet Dev* 13, 423-437.

Zhang, X.M., and Yang, X.J. (2001). Temporal and spatial effects of Sonic hedgehog signaling in chick eye morphogenesis. *Dev Biol* 233, 271-290.

A

側頭から見たニワトリ胚St.10



D

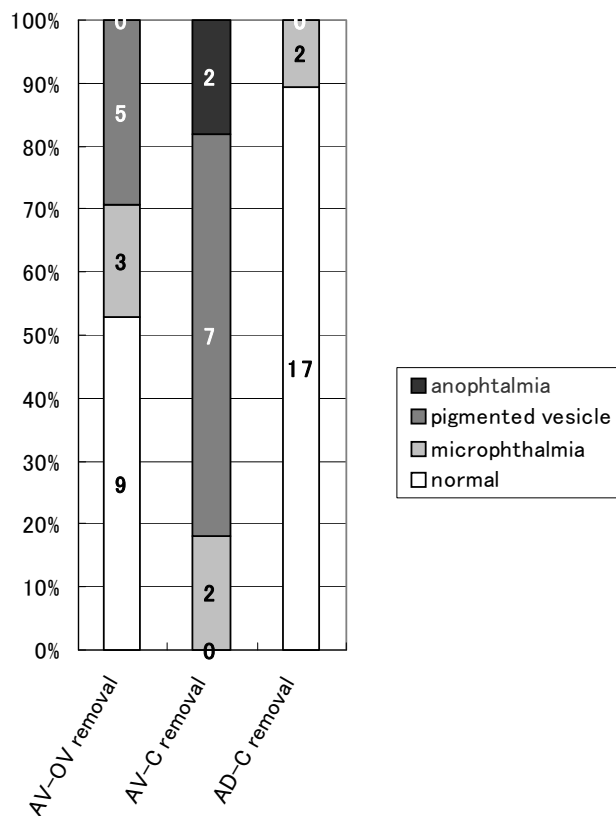


図1 眼の腹側領域は頭部anteroventral(AV)領域から形成される

(A-C) St.9-11の眼胞AV領域(AV-OV)または頭部AV/AD領域(AV-C/AD-C)を、それぞれ眼胞の中心から前後、背腹に切り分けるように*in ovo*で切除し、その後約3日間培養した(A)。この結果、AV-OVを切除すると約30%が、AV-Cを切除すると約65%がpigmented vesicleとなった(B)。AD-Cを切除しても眼は正常に形成された(C)。(D)切除実験の結果の統計表。

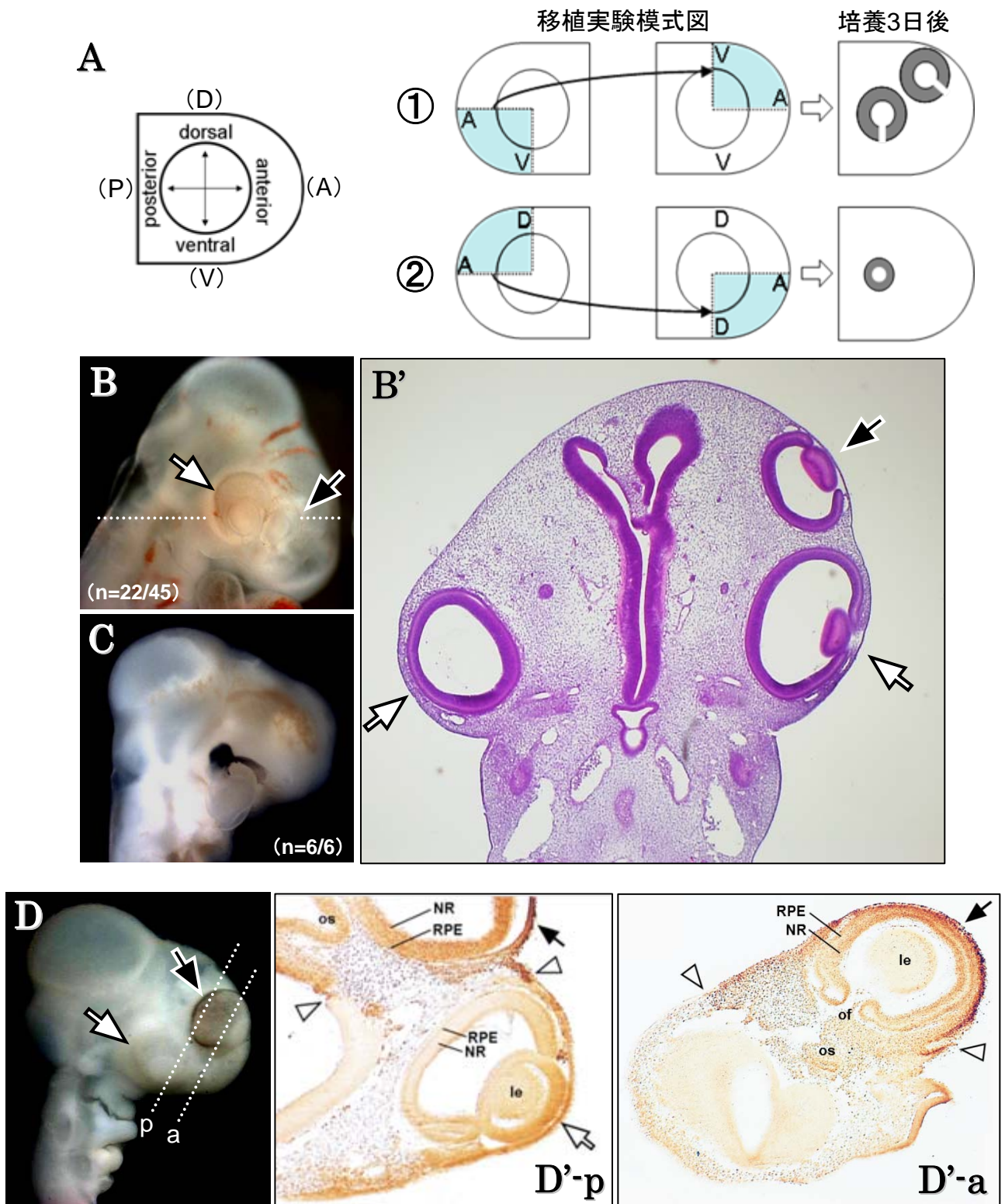


図2 頭部AV領域の移植によりSecond eyeが形成される

(A-C) St. 10の頭部AV領域を単離し、これを別の胚の頭部AD領域を取り除いた部位へと*in ovo*で移植した(A-①)。同様の方法で、頭部AD領域を単離し、これを別の胚の頭部AV領域を取り除いた部位へと移植した(A-②)。その後移植胚を約3日間培養した。この結果A-①の移植胚は移植側に形態的に正常な2つの眼が形成され(B, B': Bにおける白点線部の切片のHE染色)、A-②の移植胚は移植側に形態は異常だが1つの眼が形成された(C)。(D)ドナーとしてウズラ胚、ホストとしてニワトリ胚を用いてA-①の移植を行った。この結果移植側に形成された2つの眼のうち、背側の眼はほぼウズラ細胞(QCPN+)で構成され、腹側の眼はほぼニワトリ細胞(QCPN-)で構成されていることが明らかになった(D'-p: Dにおけるposterior(p)部の切片のQCPN免疫染色、D'-a: Dにおけるanterior(a)部の切片のQCPN免疫染色)。(黒/白矢印 = Second eye/ホスト胚の眼、白矢頭 = ドナーとホストの境界、NR=neural retina, RPE=retinal pigmented epithelium, le=Lens, of=optic fissure, os=optic stalk)

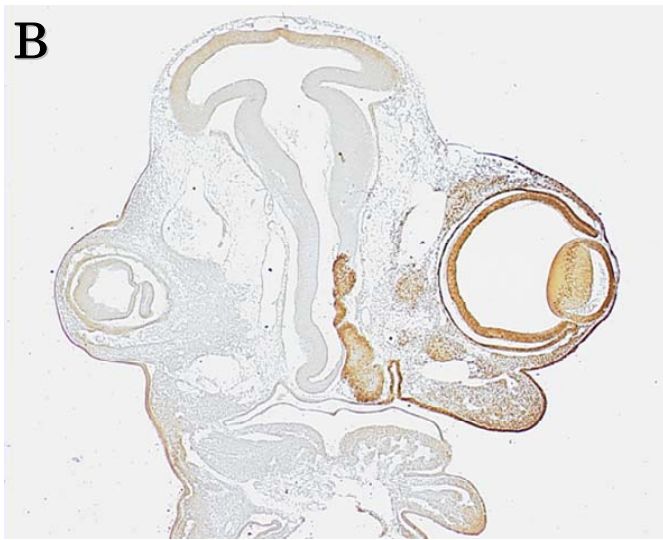
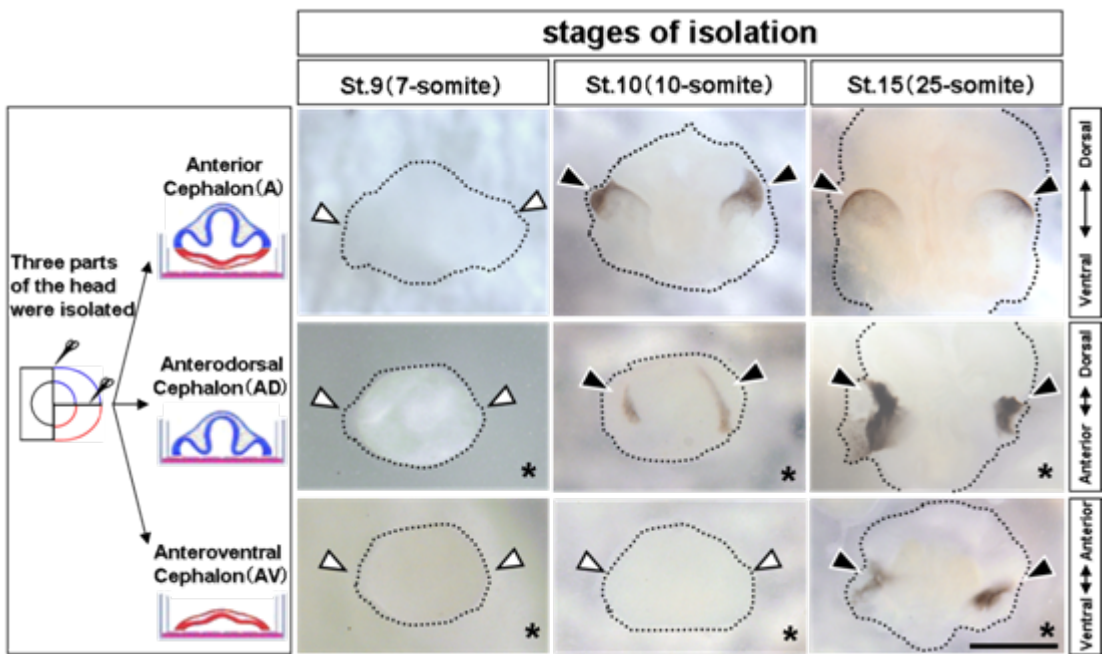


図3 AV hemicephalon移植領域の検証

ドナーとなるウズラ胚からAV hemicephalonを様々な大きさに単離し、ホストとなるニワトリ胚のAV hemicephalonを移植片と同じ大きさと取り除いた部位へと移植した。その後、約3日間培養して切片を作製しQCPNで免疫染色をした結果を示す。(I,A,B)眼胞の中心を含む、大きい領域を移植した(模式図参照)。この結果、移植側に形成された側眼は1個であった(A,B;それぞれ異なる胚)。また、間充織はドナー由来細胞(QCPN+)とホスト由来細胞(QCPN-)とが混合して形成されたが、側眼のNR、RPE、Lensはほぼドナー由来細胞によって構成された。(白矢頭=ドナーとホストの境界)(II,C,D)眼胞の中心を含まない、腹側基部を移植した(模式図参照)。この結果、移植側に形成された側眼は1個であった(C,D;DはCの拡大図)。また、間充織はドナー由来細胞(QCPN+)とホスト由来細胞(QCPN-)とが混合して形成されたが(D;矢印)、側眼のNR、RPE、Lensはほぼホスト由来細胞によって構成された。

いずれにしても、移植操作そのものによりSecond eyeが形成されることはなかった。

A



B

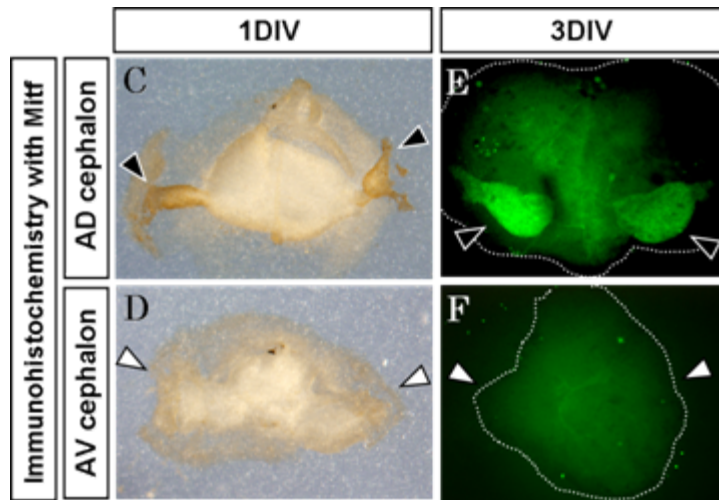
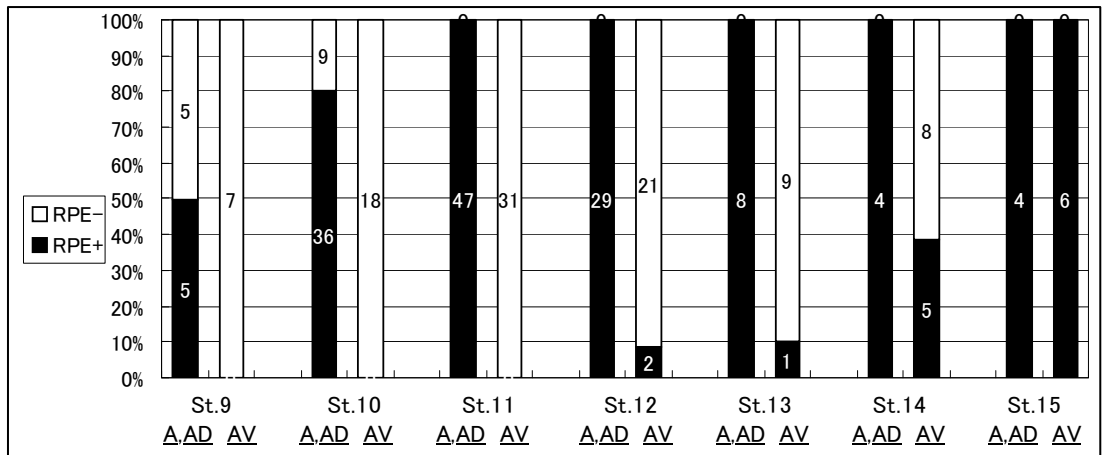


図4 単離頭部組織の器官培養におけるRPE形成検証

(A) 様々な発生段階の胚体から、頭部前側(A)、頭部前背側(AD)、頭部前腹(AV)組織をそれぞれ単離し、それぞれを3日間器官培養した。この結果、St.10から単離した頭部AVからはRPEが形成されなかった。(黒組織=RPE、*=同一胚から単離した頭部ADとAV、黒/白矢頭=RPE+/-、scale bar=500 μ m) (B) 単離した頭部組織の器官培養におけるRPE形成率の統計グラフを示す。頭部A、ADではSt.9-11にかけて次第にRPE形成率が高くなり、頭部AVではSt.12-15にかけて次第にRPE形成率が高くなる。(C-F) St.10で同一胚から単離した頭部AD、AVを1、3日間(1、3DIV)器官培養した。その後、RPE前駆細胞マーカーのMitfの抗体で免疫染色を行った結果、頭部ADではMitf+だが(C、E)、頭部AVではMitf-であった(D、F)。(黒/白矢頭 = Mitf+/-、E、Fの露光時間は同じである)

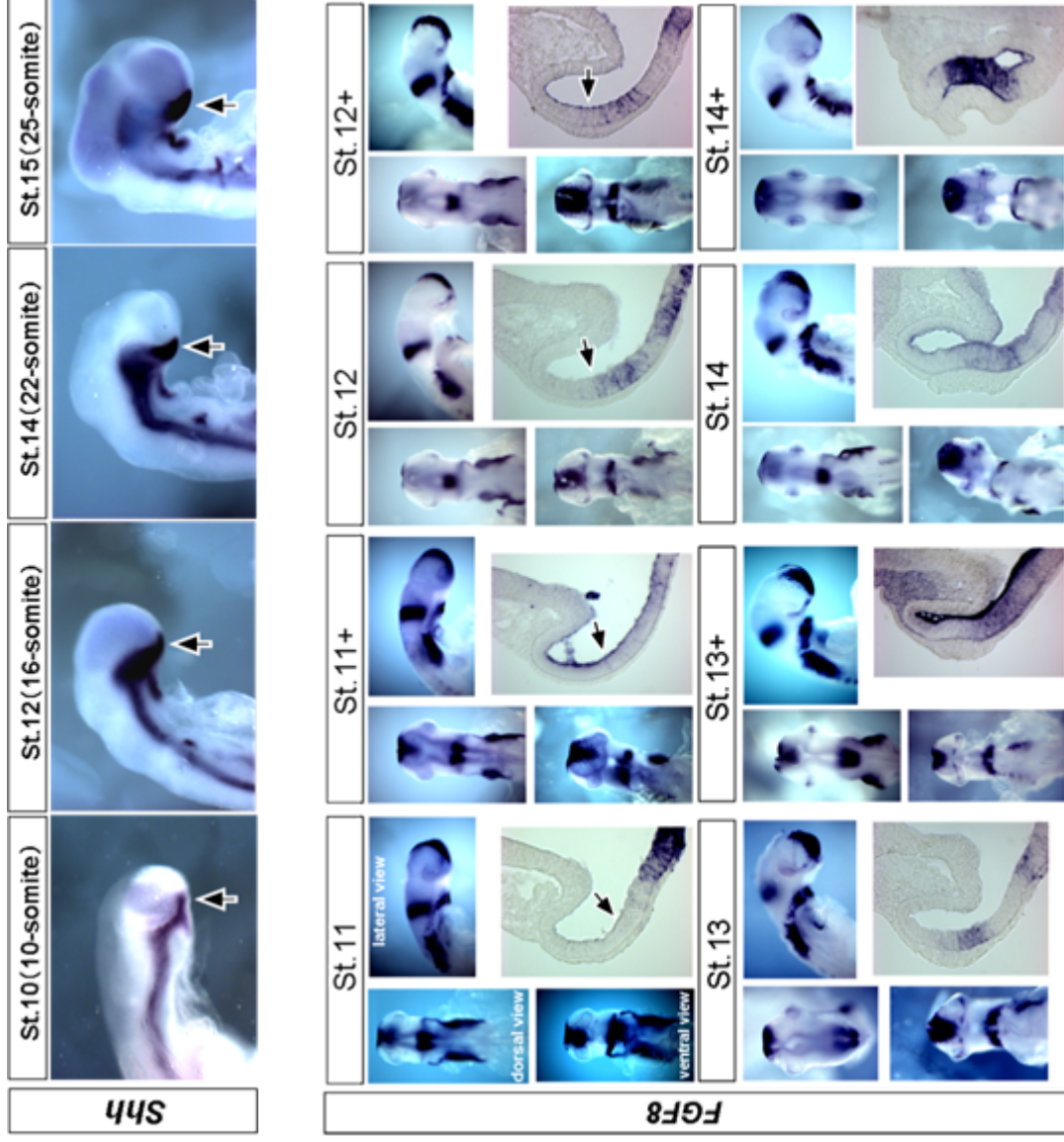


図5(1/2) 発生過程における**Shh**、**FGF8**、**BMP4**の経時的な発現プロファイル

*Shh*は前脳腹側正中に発現しており(矢印)、*FGF8*は眼胞のanteroventralに発現しており、特にSt.11~13にかけて眼胞基部anteroventralから眼胞側方中心へと発現が拡大していくようである(矢印)。(切片はいずれも頭部をposterodorsal-anteroventral方向に切断したものの)。

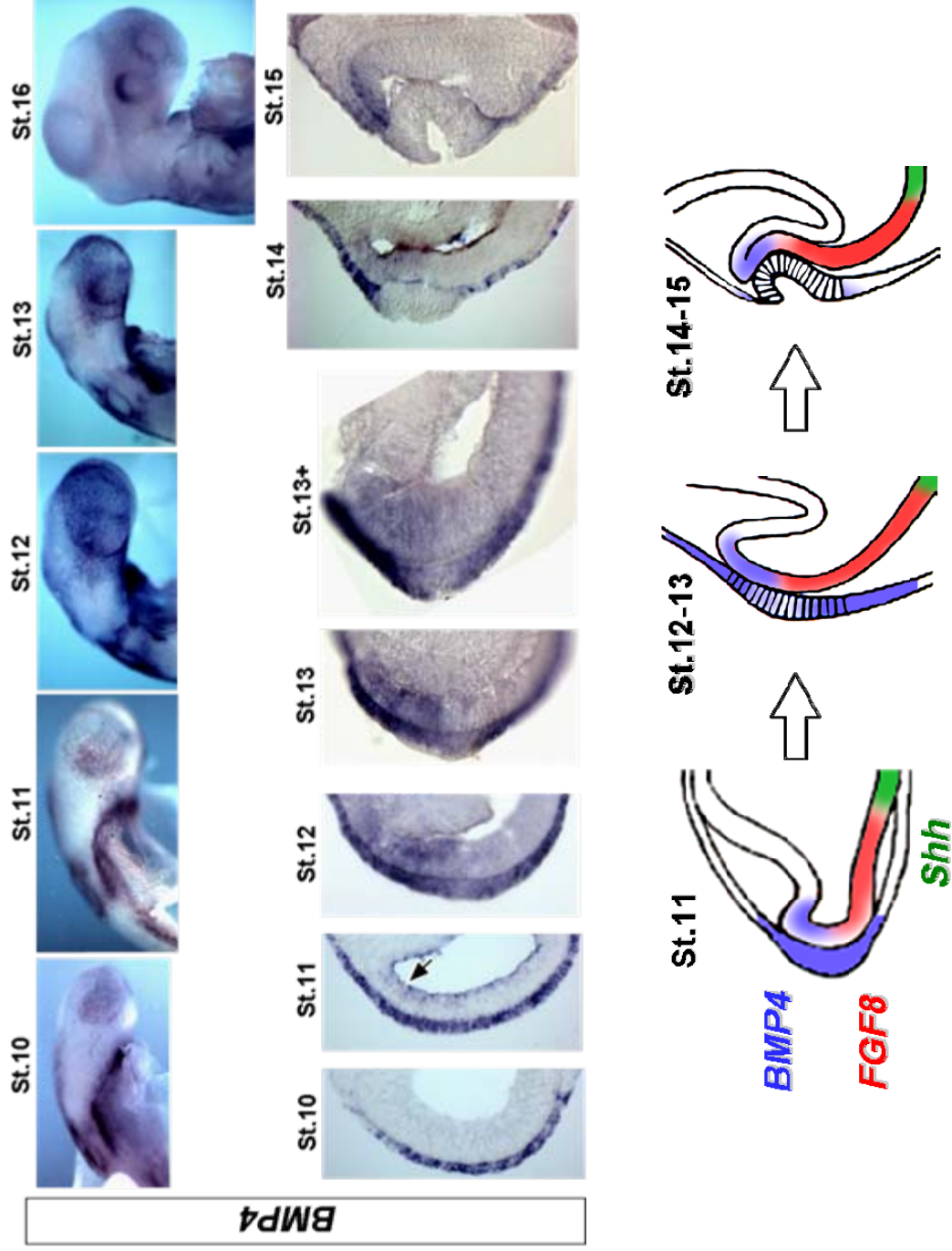


図5(2/2) 発生過程における*Shh*、*FGF8*、*BMP4*の経時的な発現プロファイル

*BMP4*は眼胞のposterodorsalにSt.11から発現を開始する(矢印)。*BMP4*、*FGF8*はそれぞれ眼胞のposterodorsal、anteroventralに発現しており、特に側方のLens placodeの中心に近接する眼胞の背、腹側にそれぞれわかれて発現している(模式図)。(切片はいずれも頭部をposterodorsal-anteroventral方向に切断したものの)。

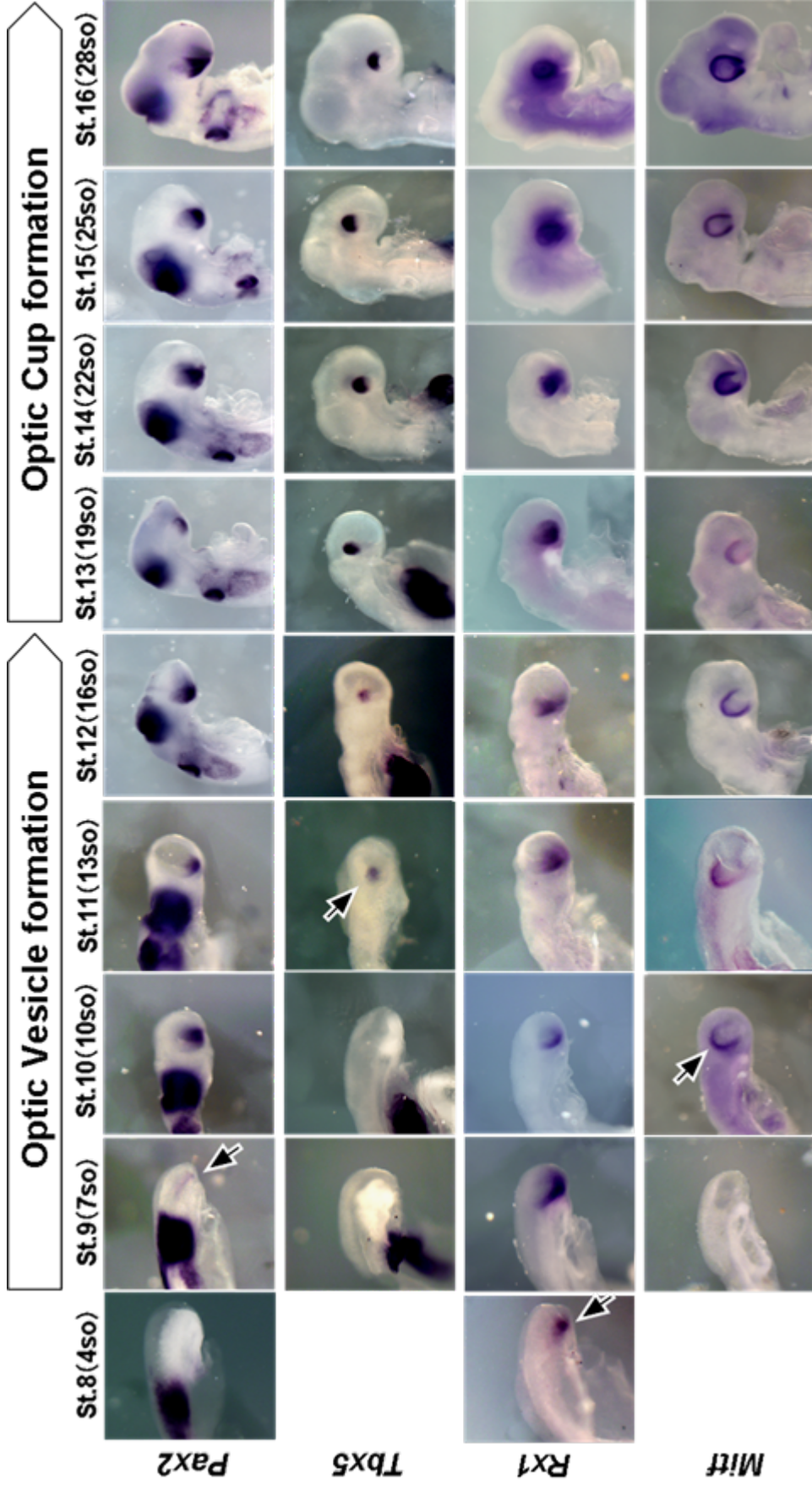
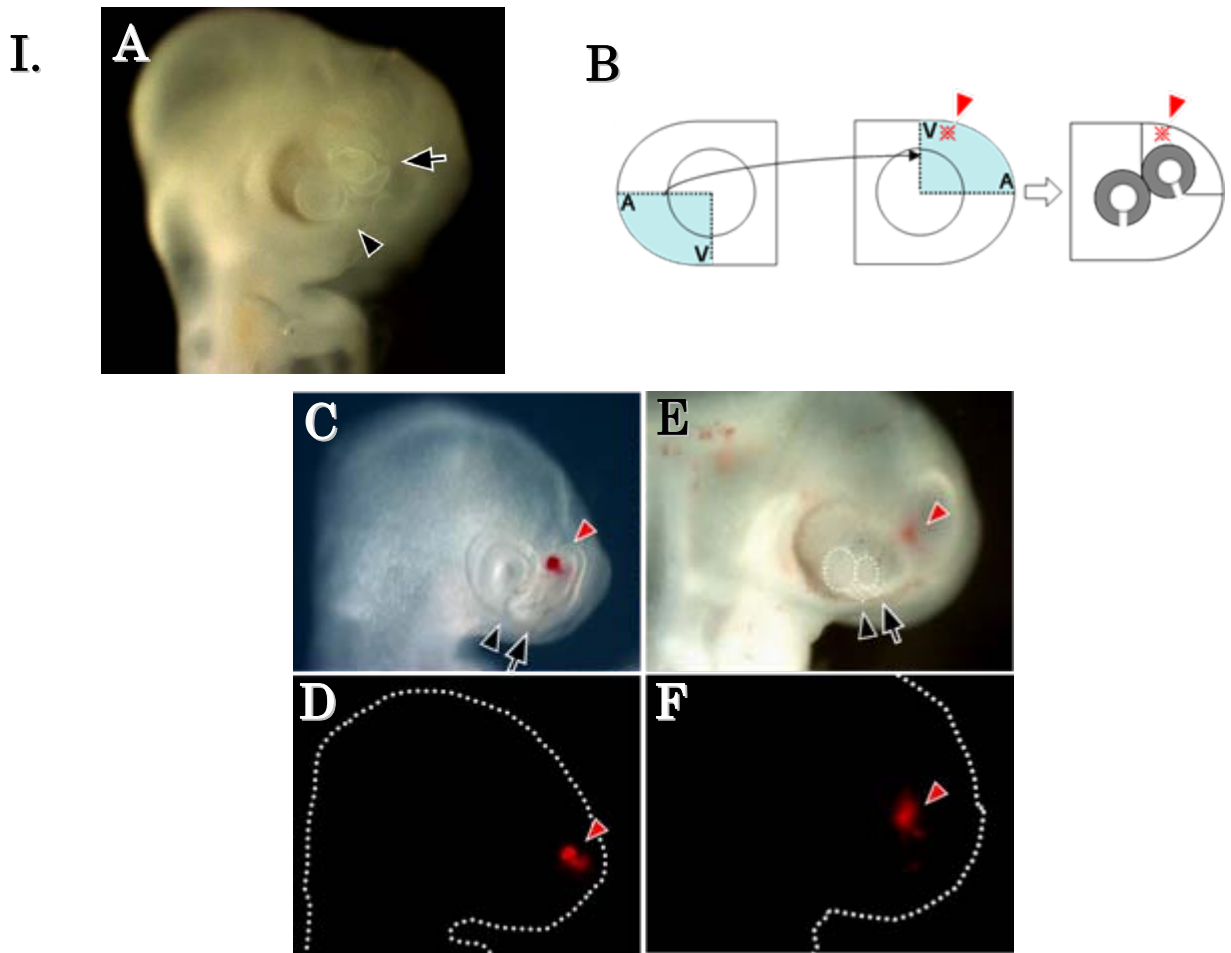


図6 発生過程におけるPax2、Tbx5、Rx1、Mifflの経時的な発現プロファイル

Pax2、Tbx5、Rx1、Mifflの発現局在をwhole-mount *in situ* hybridizationによって検証した。この結果、Pax2はSt.9より眼胞で発現を開始し(矢印)、眼胞の腹側より前腹側で発現していることが明らかになり、発生が進むに従って次第に眼杯の前腹側と将来の眼杯の眼柄で発現していることを確認した。Tbx5はSt.11より眼胞で発現を開始し(矢印)、眼胞の背側より後背側で発現していることが明らかになり、発生が進むに従って次第に眼杯の後背側で発現していることを確認した。また、Rx1はSt.8より眼胞原基である前脳で発現を開始し(矢印)、眼胞の腹側よりむしろ前腹側で発現していることが明らかになり、発生が進むに従って次第に眼杯の内側である将来のNRで発現していることを確認した。MifflはSt.10より眼胞で発現を開始し(矢印)、眼胞の背側より後背側で発現していることが明らかになり、発生が進むに従って次第に眼杯の外側である将来のRPEで発現していることを確認した。



II.

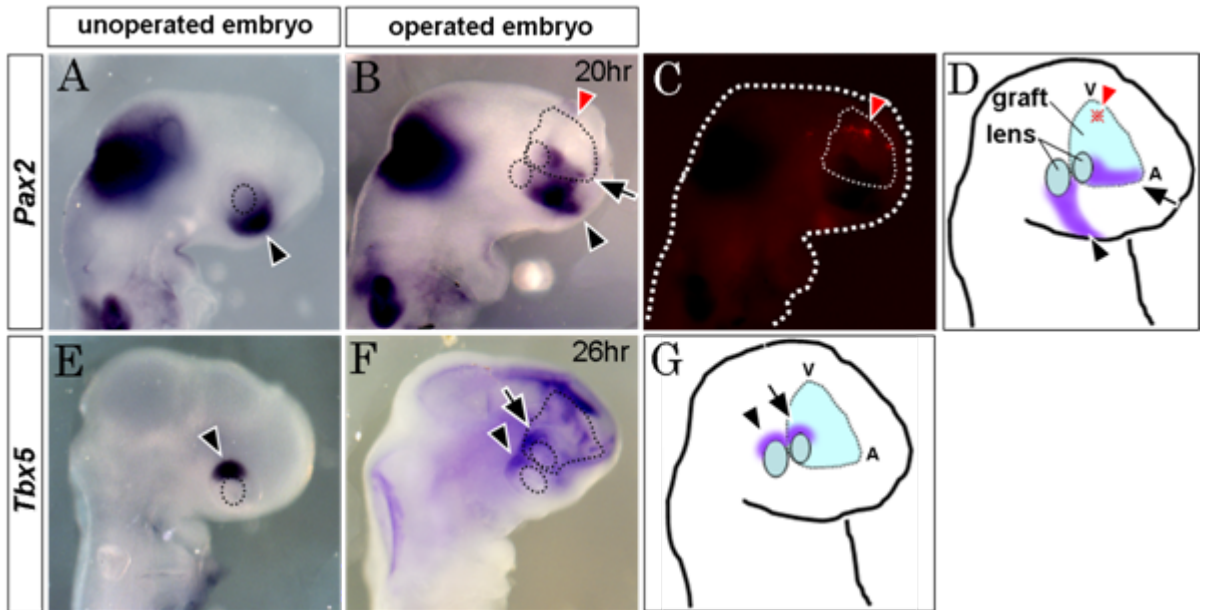


図7 Second eyeの背腹軸極性は逆転する

(I.A-F) 単離したAV hemicephalonをホスト胚頭部AD領域へ移植するとSecond eyeが形成される。このSecond eyeの眼裂はいつもホスト胚同様に腹側に形成された(A)。Second eyeの背腹軸が逆転しているのか確かめるために、移植片の腹側を標識してから移植した(B)。移植約1、2日後(C,E)、確かにSecond eyeの眼裂が標識とは逆位置に形成されていた。(D,FはそれぞれC,Eの蛍光写真、矢印=Second eyeの眼裂、黒矢頭=ホスト胚の眼裂、赤矢頭と*=標識位置、模式図の記号A/V=移植片のanterior/ventral位置)

(II.A-G) I.Bのように移植後、経時的にPax2、Tbx5の発現局在を検証した。移植後20時間までに標識部位で発現しているPax2は消失し、新たにホスト胚腹側で発現した(B-D)。移植後26時間までにTbx5は新たにホスト胚背側で発現した(F,G)。(矢印/黒矢頭=移植片/ホストのシグナル、赤矢頭と*=標識位置)

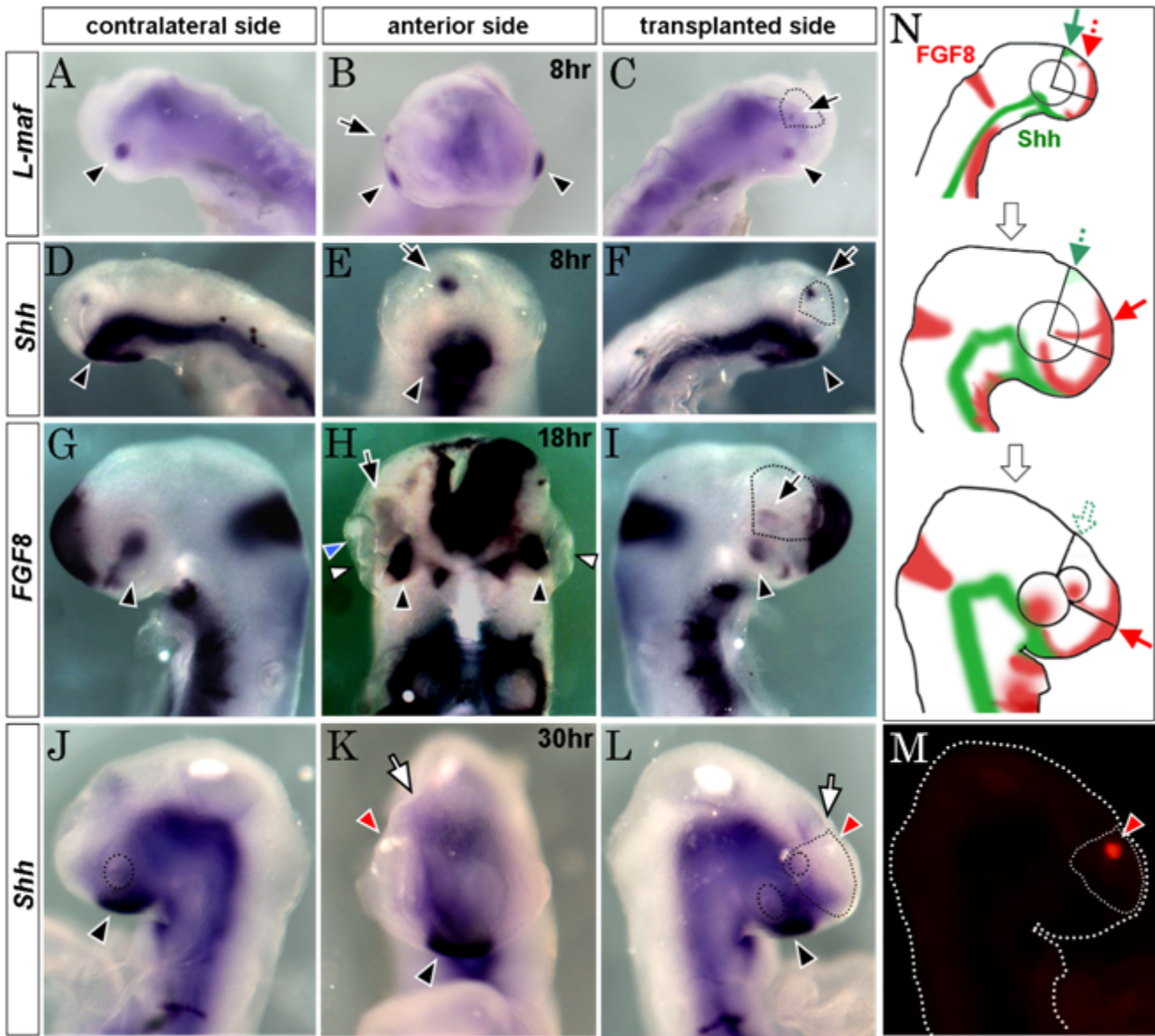


図8 異所眼の形成過程において背腹軸極性は次第に逆転する

Second eyeが形成される移植実験において、経時的に*L-maf*、*FGF8*、*Shh*の発現局在を検証した。(A-C)移植後8時間までに異所的な*L-maf*が発現した(黒矢印)。(D-F、J-M)移植後8時間では*Shh*は移植片に発現しているが(D-F; 黒矢印)、30時間までに次第に消失した(J-M; 白矢印)。(G-I)移植後18時間の*FGF8*。*FGF8*は次第に発現局在が変化していった(N; 模式図参照)。

(黒/白矢印=移植片のシグナル+/-、黒矢頭=ホスト胚のシグナル、青/白矢頭=移植片/ホストのLens pit、赤矢頭=移植前に標識した移植片本来の腹側部位、点線=移植片のおよその予想位置)

0→12	-	10→10	+++
0→7	-	10→10	+++
6→6	-	10→10	+
6→E3.5	-	10→13	+++
6→E3.5	-	10→13	+++
6→E3.5	-	10→14	-
7→10	+	10→16	-
7→10	+	11→11	+
7→12	+	11→11	+++
7→14	-	11→13	+++
7→E3.5	-	11→14	+
8→8	-	11→15	+++
8→8	+++	12→11	+++
9→11	-	13→10	+++
9→11	-	13→13	-
9→13	+++	13→13	+++
9→15	-	13→13	+++
9→15	-	14→12	+++
9→8	+++	15→12	-
9→9	-	15→15	+++
10→8	-	16→16	+
10→10	-	19→13	-
10→10	-	19→13	-
10→10	-	19→13	-
10→10	-	19→13	+++
10→10	+++	19→13	+
10→10	+++	22→22	+

図9 AV hemicephalon移植実験によるSecond eye形成の結果表

ドナーとなる胚からAV hemicephalonを単離し、ホスト胚のAD hemicephalonを取り除いた部位へと移植した後、約3日間培養してSecond eyeを形成した結果を示す。数字は体節期を示し、矢印は移植された方向を意味する(例:“7→12”=7体節期の胚のAV hemicephalonを12体節期の胚のAD領域へ移植。“0”=St.6の0体節期。E3.5=3.5日胚)。“+++”=明瞭なSecond eyeを形成したもの。“+”=異所的なRPE、NR、Lens様構造物を形成するものの明瞭なSecond eye形成には至らなかったもの。“-”=異所的な眼構成組織を形成せず、異常が認められないもの、また、移植組織とホスト胚の組織とが結合して1つの眼を構成する“合成眼”となったものを含む。

移植後に死亡した胚、移植側とは反対側の眼形成に異常を生じた胚、頭部以外の形態形成に異常を生じた胚、RPE形成時期以前に回収した胚の結果は示していない。

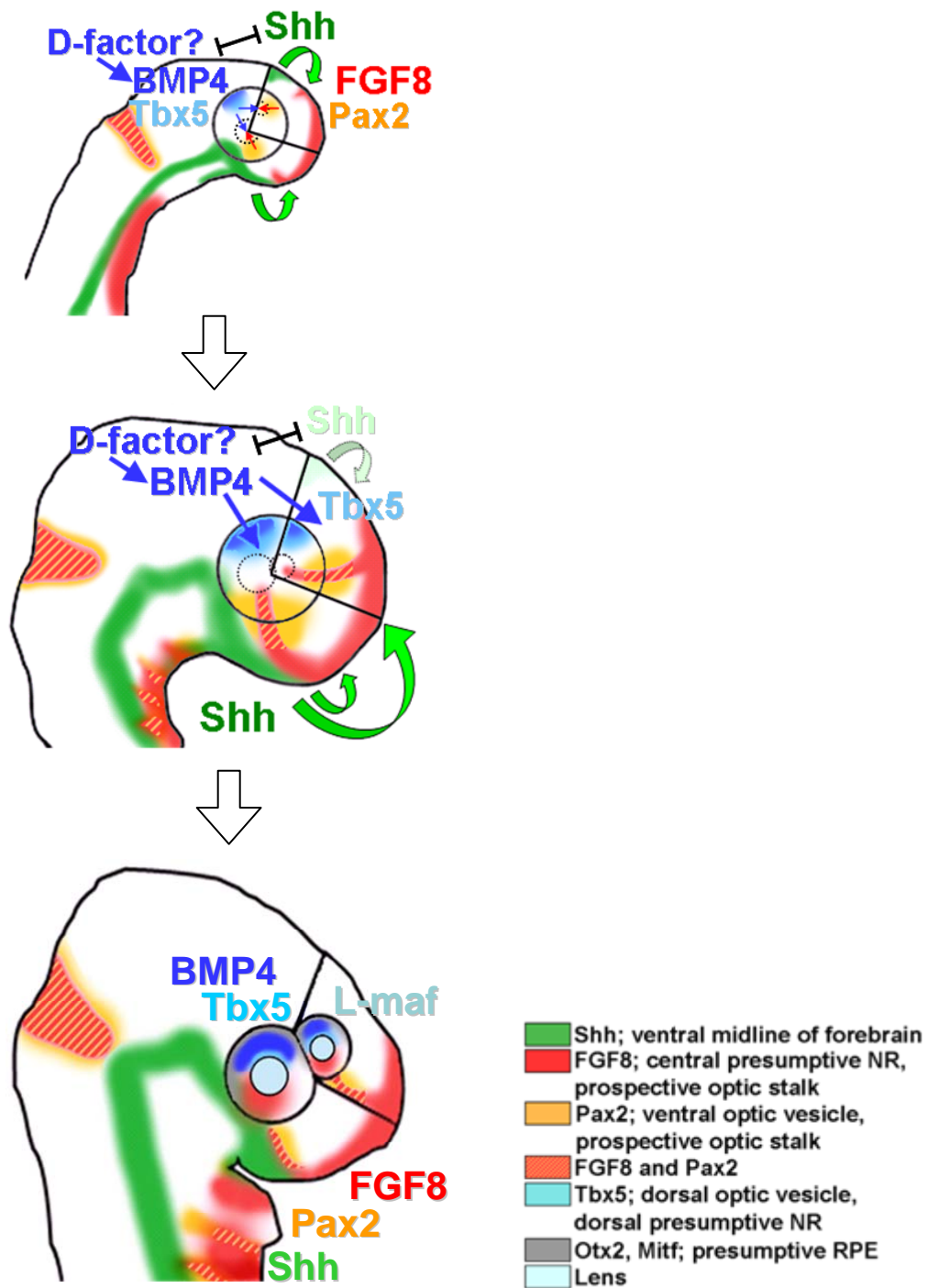


図10 Second eyeの発生過程における分泌因子の作用機序のモデル

<上段図>ドナーとして移植されたAV-hemicephalonのShhにより移植片の眼胞にFGF8が発現し、ホスト胚の眼胞後背からのBMP4とともにLens placodeが誘導される。

<中段図>移植片のShhは、おそらくホスト胚からの強いBMP4の作用により次第に抑制される。このため移植片の眼胞においてPax2、Rx1、FGF8の発現を維持できず、ホスト胚からのBMP4、Shhにより次第に発現局在が変化する。また新たに移植片の眼胞にTbx5、Mitf、Otx2が誘導されて背側領域が特異化される。

<下段図>移植片において新たに規定された背腹軸極性に従ってRPEとNRが形成され、本来の極性とは逆転したSecond eyeが形成される。

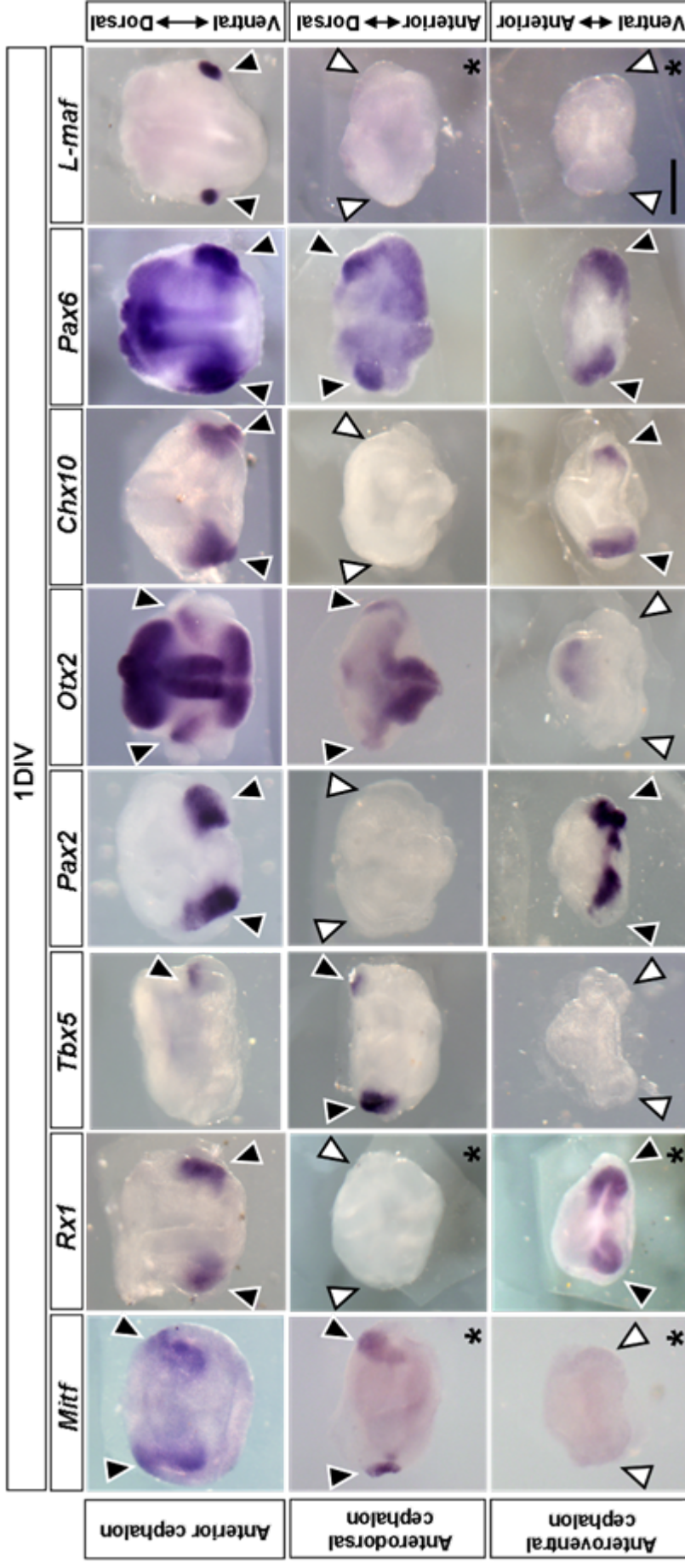


図11(1/2) 単離頭部組織の器官培養における遺伝子発現プロファイルング(1日間培養)

単離した頭部前側(anterior cephalon)、前背(anterodorsal cephalon)、前腹(anteroventral cephalon)をそれぞれ1日間器官培養した。その後、Pax2、Tbx5、Rx1、Mitf、Otx2、Chx10、Pax6、L-mafの発現局在をwhole-mount *in situ* hybridizationにより検証した。この結果、単離培養した頭部前側において、検証したすべての遺伝子の発現局在は胚発生過程における発現局在とほぼ同様であった。また、単離培養した頭部前背において、Rx1、Pax2、Chx10の発現は認められず、一方、単離培養した頭部前腹において、Mitf、Tbx5、Otx2の発現は認められなかった。さらに頭部前背、前腹の発現は認められなかった。(黒/白矢頭=シグナル+/-、* =同一胚から単離した頭部前背と前腹、scale bar=200μm)

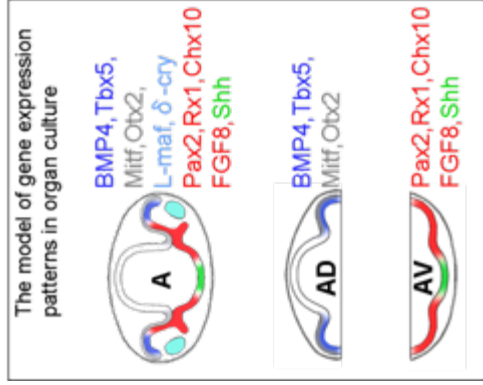
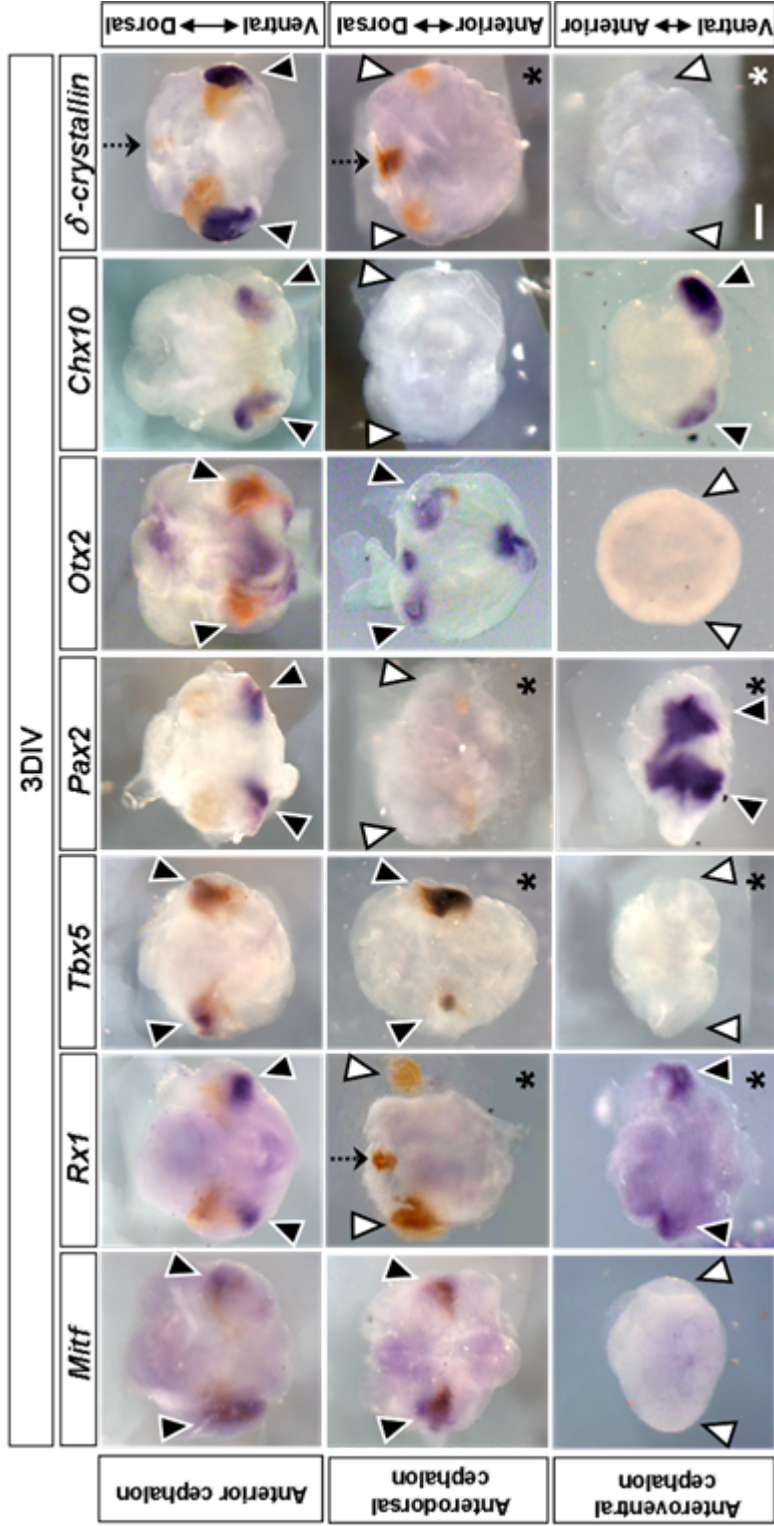


図11(2/2) 単離頭部組織の器官培養における遺伝子発現プロファイルリング(3日間培養)

単離した頭部前側(A)、前背(AD)、前腹(AV)をそれぞれ3日間器官培養した。その後、Pax2、Tbx5、Rx1、Mitf、Otx2、Chx10、 δ -crystallinの発現局在を whole-mount *in situ* hybridizationにより検証した。この結果、1日間培養したものと同様の結果であった。さらに頭部AD、AVの両方において δ -crystallinの発現は認められなかった。以上の結果より、頭部前側は眼を形成するが、AD、AVはそれぞれ背側、腹側領域を形成するが、眼は形成しないことが明らかになった(模式図参照)。(黒/白矢頭=シングナル+/-、破矢印=pineal pigmented epithelium(PPE)、* =同一胚から単離したADとAV、scale bar=200 μ m)

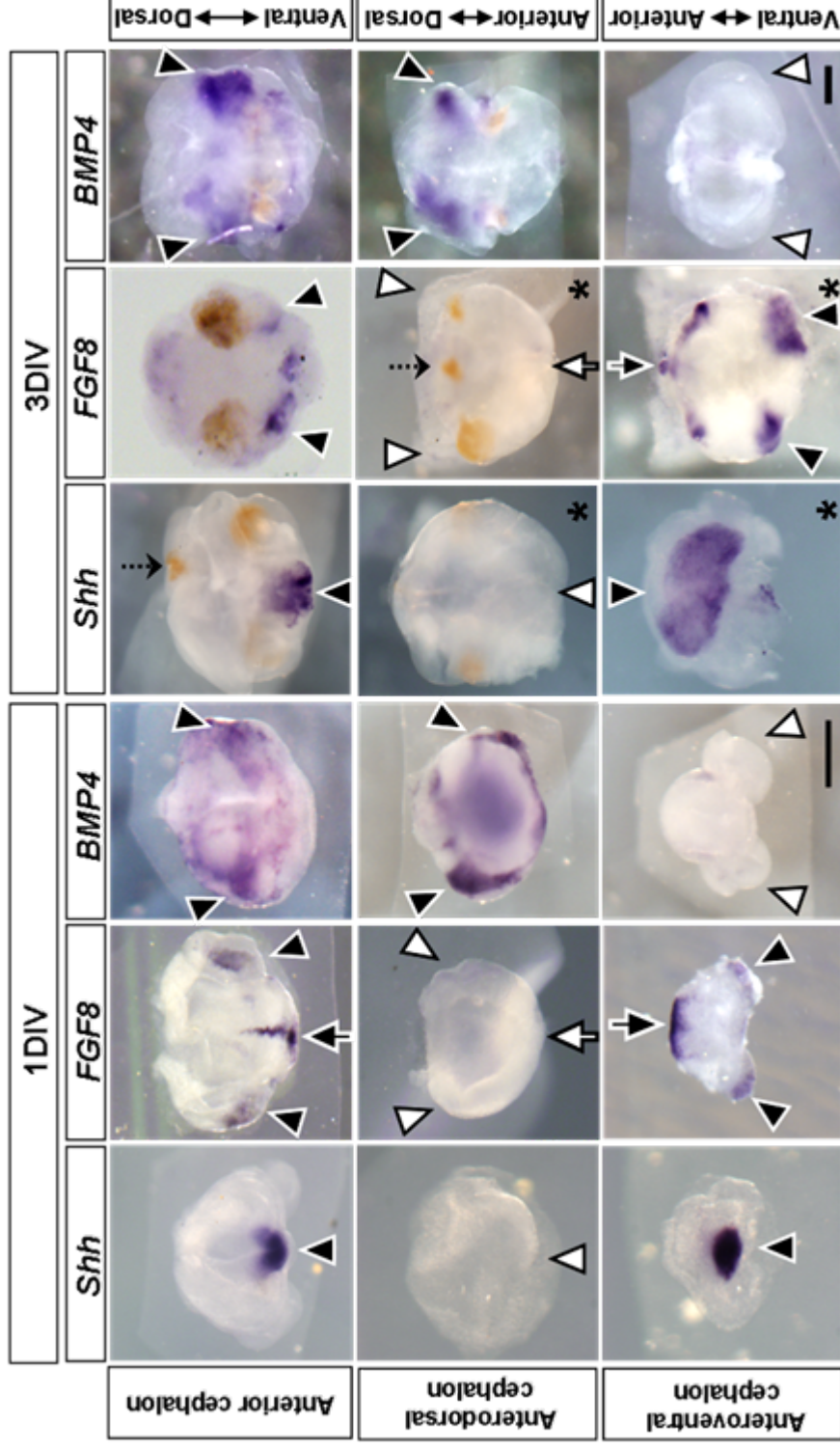


図12 単離頭部組織の器官培養におけるShh、FGF8、BMP4の発現プロファイル

単離した頭部前側、前背(AD)、前腹(AV)組織を1、3日間器官培養した(1、3DIV)。その後、Shh、FGF8、BMP4の発現局在を whole-mount *in situ* hybridizationにより検証した。この結果、ShhとFGF8は頭部AVIに発現するが頭部ADに発現せず、BMP4は頭部ADに発現するが頭部AVIに発現しないことが明らかになった。(黒/白矢印=anterior neural ridgeにおけるFGF8+/-、黒/白矢印=シグナルレール/-、茶組織=RPE、破矢印=PPE、*=同一胚から単離したADとAV、Scale bars=200μm)

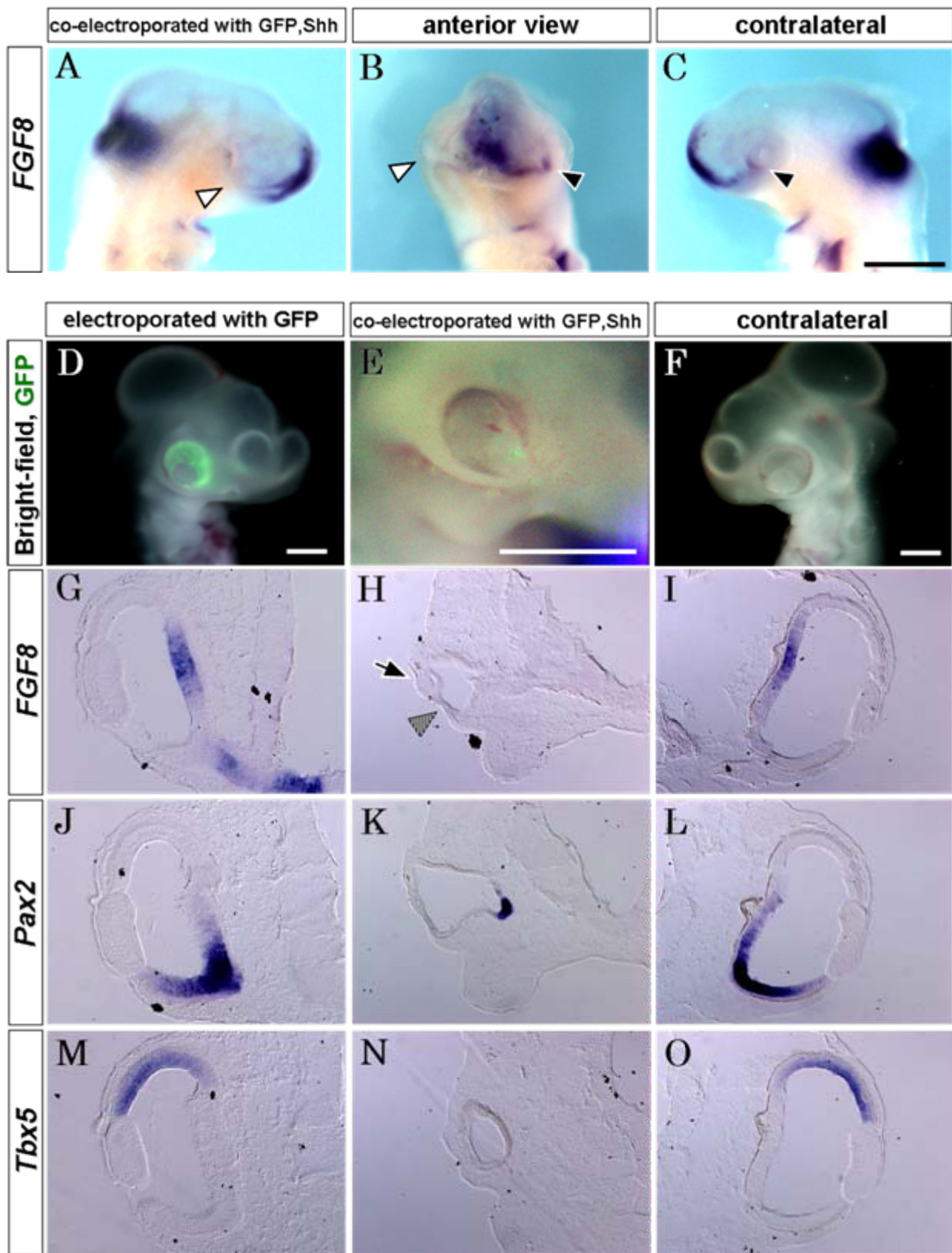


図13(1/2) *in ovo* electroporation with Shh

St.10で眼胞にShh発現ベクターを*in ovo* electroporationにより導入した。(A-C)20時間後、whole-mount *in situ* hybridizationによってFGF8の発現を検証した。Shh導入側の眼胞は陥入せず、眼杯形成をしなかった。また眼胞におけるFGF8の発現はほとんど認められなかった。(黒/白矢頭=FGF8+/-、scale bar=500 μ m) (D-O)GFPまたはGFP、Shh導入後、約2.5日間培養した(DまたはE、F、E、Fは同一胚)。G、J、MはDの、H、K、NはEの、I、L、OはFの、それぞれ連続凍結切片のSection *in situ* hybridizationの結果を示す。Shh導入側の眼は陥入せず、またNR形成せずにpigmented vesicleのような形態となった(E)。またLensは正常に形成されず、極小のLentoidを形成した(H; 矢印)。FGF8の発現はわずかであり(H; 斜線矢頭)、Tbx5の発現は認められない(N)。(all scale bars=500 μ m)

electroporated GFP	St.9	St.10	St.11	St.12	St.13	St.14
normal	0	6	5	4	3	1
some dysplasia	0	0	0	1	0	0
anophthalmia	0	0	0	0	0	0
co-electroporated GFP,Shh	St.9	St.10	St.11	St.12	St.13	St.14
normal	0	6	3	1	0	0
some dysplasia	0	5	5	3	0	0
anophthalmia	1	2	2	0	0	0

(some dysplasia = microphthalmia, pigmented vesicle, coloboma)

図13(2/2) *in ovo* electroporation with Shh (補足表)

St.10で眼胞にGFPまたはGFP、Shhを*in ovo* electroporationにより導入後、約2.5日間培養した結果をまとめた表。表中“St.”は導入したSt.を意味する。St.12でShhを導入した結果の“some dysplasia”には pigmented vesicleを含まない。

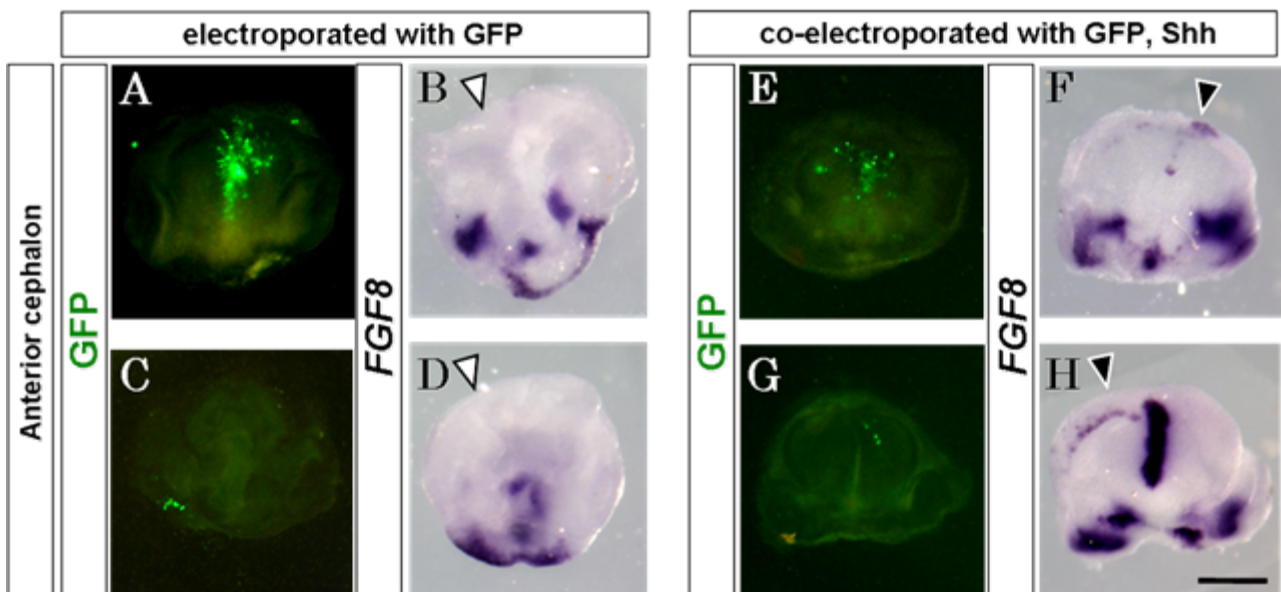
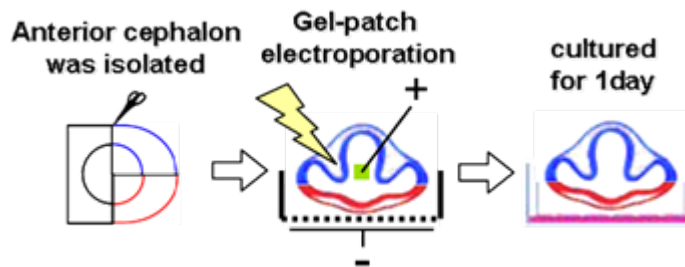
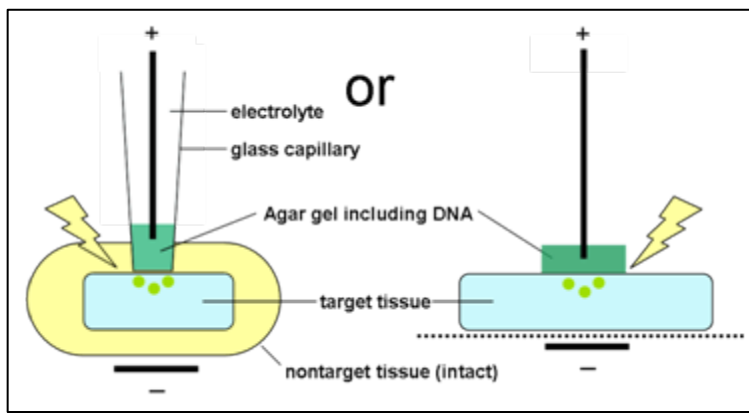


図14 Gel-patch electroporation with Shh

Gel-patch electroporation 法とは、DNA溶液をゲル化し、これを組織にあてがい、またはキャピラリーにつめてから電荷をかけることで遺伝子を導入する方法である(模式図上段参照)。St.10の胚から頭部前側を単離し、前脳側の神経上皮にGel-patch electroporationによって遺伝子を導入してから器官培養した(模式図下段参照)。(A-D)GFP導入細胞の量、部位に関わらず、頭部背側でFGF8は発現せず(B,D; 白矢頭)、胚体では発現しているanterior neural ridge (ANR)のFGF8は消失する。(E-H)Shhを導入すると、頭部背側において異所的なFGF8が誘導された(F,H; 黒矢頭)。ANRに広くShhを導入すると、Shh導入細胞に近接するANRのFGF8は消失したが(F)、Shh導入細胞が少なくANRからわずかにずれていると、ANRのFGF8は維持されていた(H)。(scale bar=200 μ m)

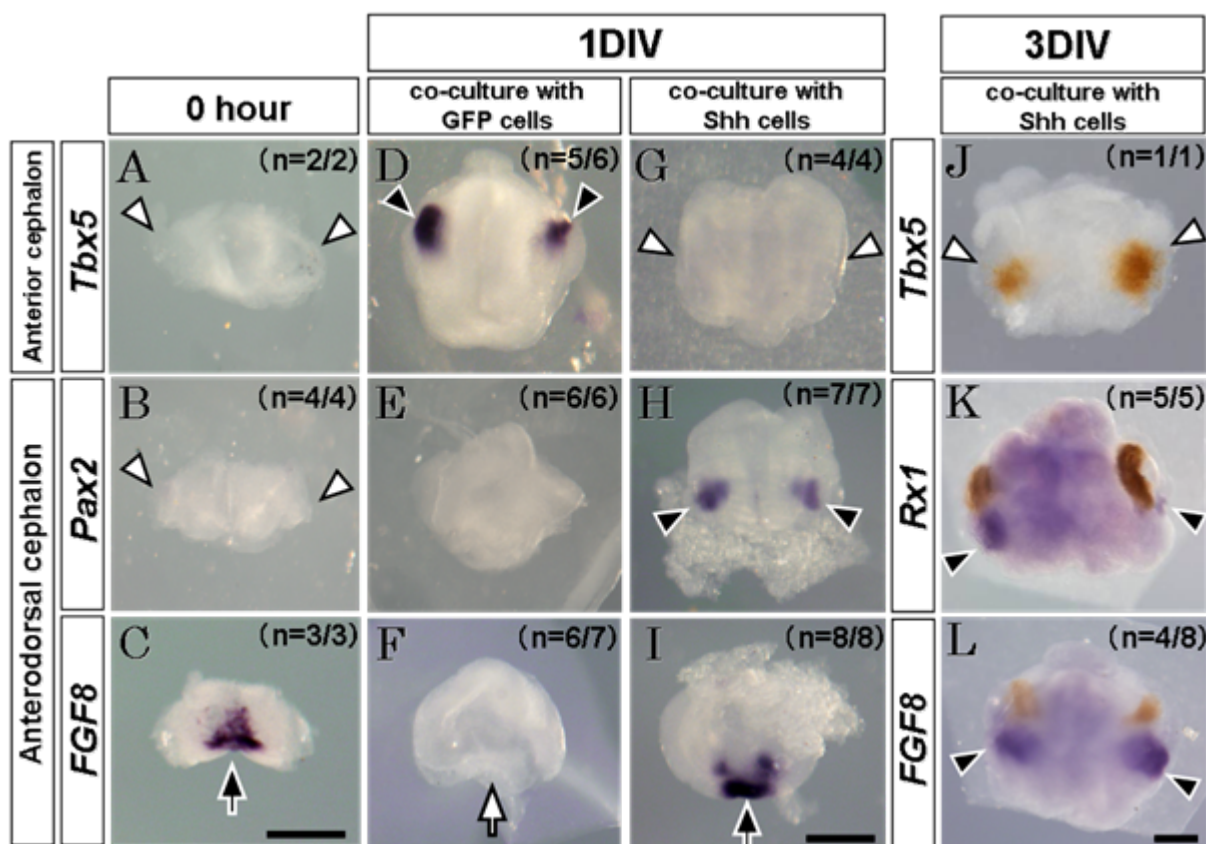
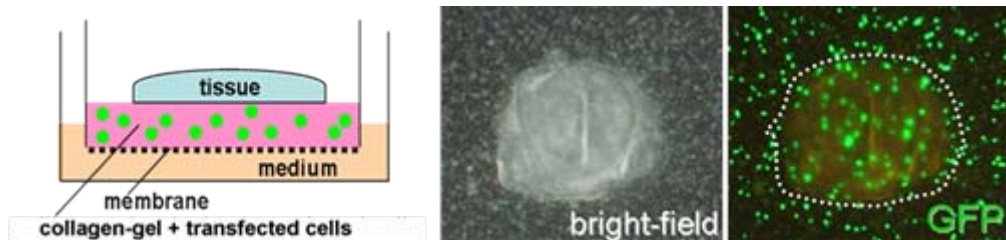


図15(1/2) 単離頭部組織の器官培養におけるShhの機能解析

分泌因子を効率よく長期間持続的に培養組織に作用させるために、遺伝子導入した細胞をコラーゲンゲルに練り込み、その上に組織を重ねて共培養した(模式図)。単離した組織の直下にまんべんなく敷かれた遺伝子導入細胞を、GFPの発光により確認できる。

(A-L) St.10で単離した頭部組織を遺伝子導入細胞と1、3日間(1、3DIV)共培養した。頭部前側をShh発現細胞と共培養すると、眼領域において*Tbx5*は抑制された(A,D,G,J)。同様に、単離した頭部前背(AD)で、眼胞背側に異所的に*Pax2*が誘導され(B,E,H)、anterior neural ridgeにおいて消失するはずの*FGF8*が維持され(C,F,I)、培養を続けると眼胞背側に異所的に*FGF8*、*Rx1*が誘導された(K,L)。(黒/白矢印=anterior neural ridgeにおける*FGF8*+/-、黒/白矢頭=シグナル+/-、茶組織=RPE、all scale bars=200 μ m)

extirpation

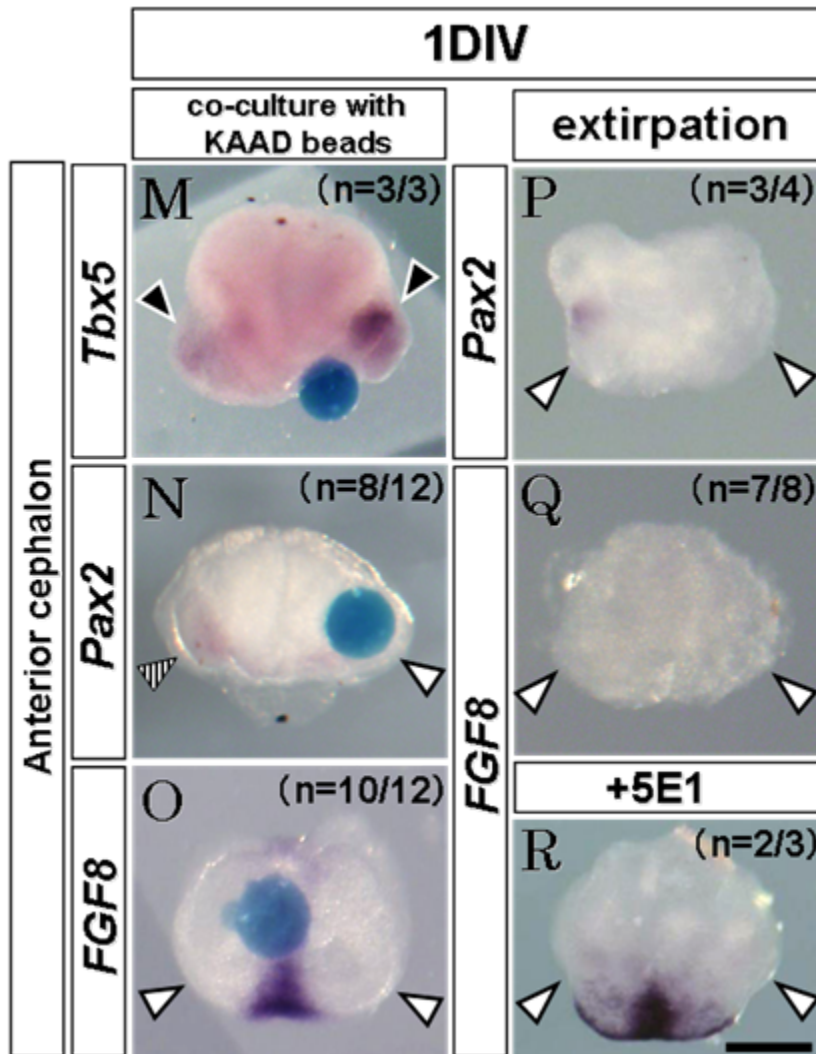
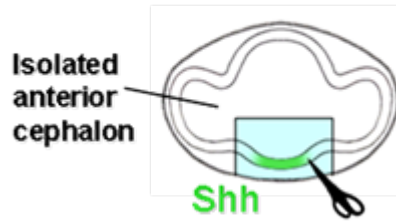


図15(2/2) 単離頭部組織の器官培養におけるShhの機能解析

(模式図) Extirpationの方法。単離した頭部前側組織からShh発現領域である腹側正中を切除した。

(M-R) St.10で単離した頭部前側において、Hh signalingをKAAD、5E1またはextirpationで阻害すると、Tbx5の発現領域は眼胞腹側まで広がり(M)、眼胞においてPax2、FGF8は抑制された(N,O,P,Q,R)。(黒/斜線/白矢頭=シグナル+/effective/-、scale bar=200µm)

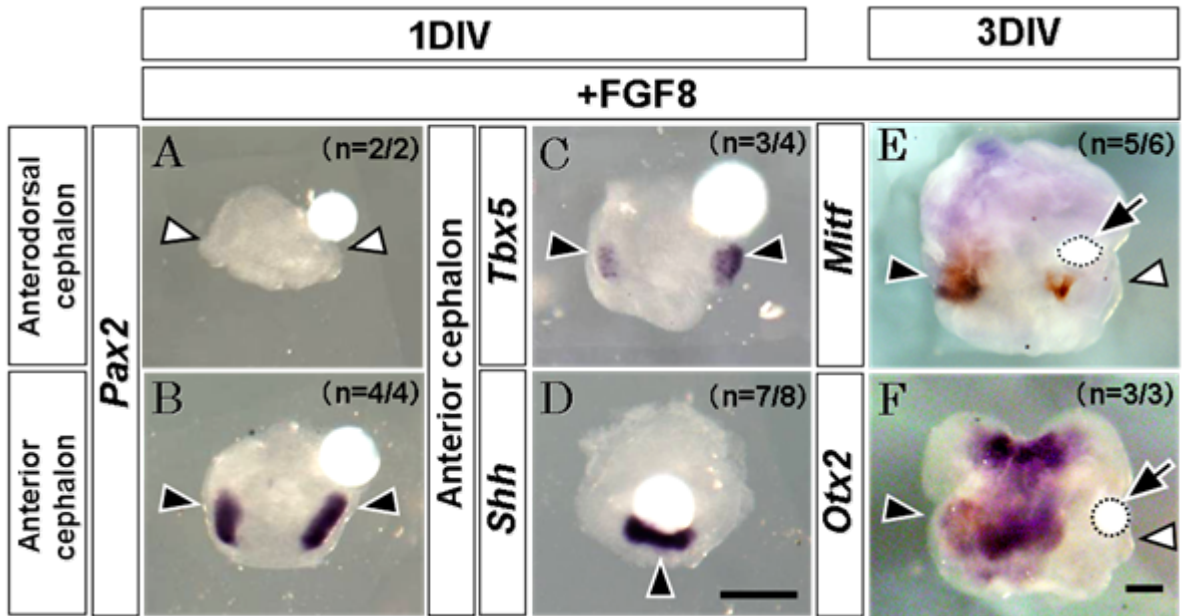
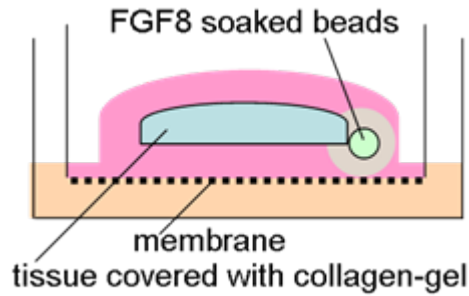


図16(1/2) 器官培養におけるFGF8の機能解析

St.10の胚から頭部前側、頭部ADを単離し、コラーゲンゲルに包埋してからFGF8-soaked beadsを組織近傍に埋め込み、1、3日間(1、3DIV)培養した。

(A-D)10 μ m/ml FGF8-soaked beadsにより、*Pax2*、*Tbx5*、*Shh*の発現局在に変化はなく、また異所的なFGF8によって眼胞背側に*Pax2*は誘導されなかった。(E,F)10 μ m/ml FGF8により*Mitf*、*Otx2*は抑制され、RPE形成は抑制された。(矢印=beads、黒/白矢頭=シグナル+/-、茶組織=RPE、scale bars=200 μ m)

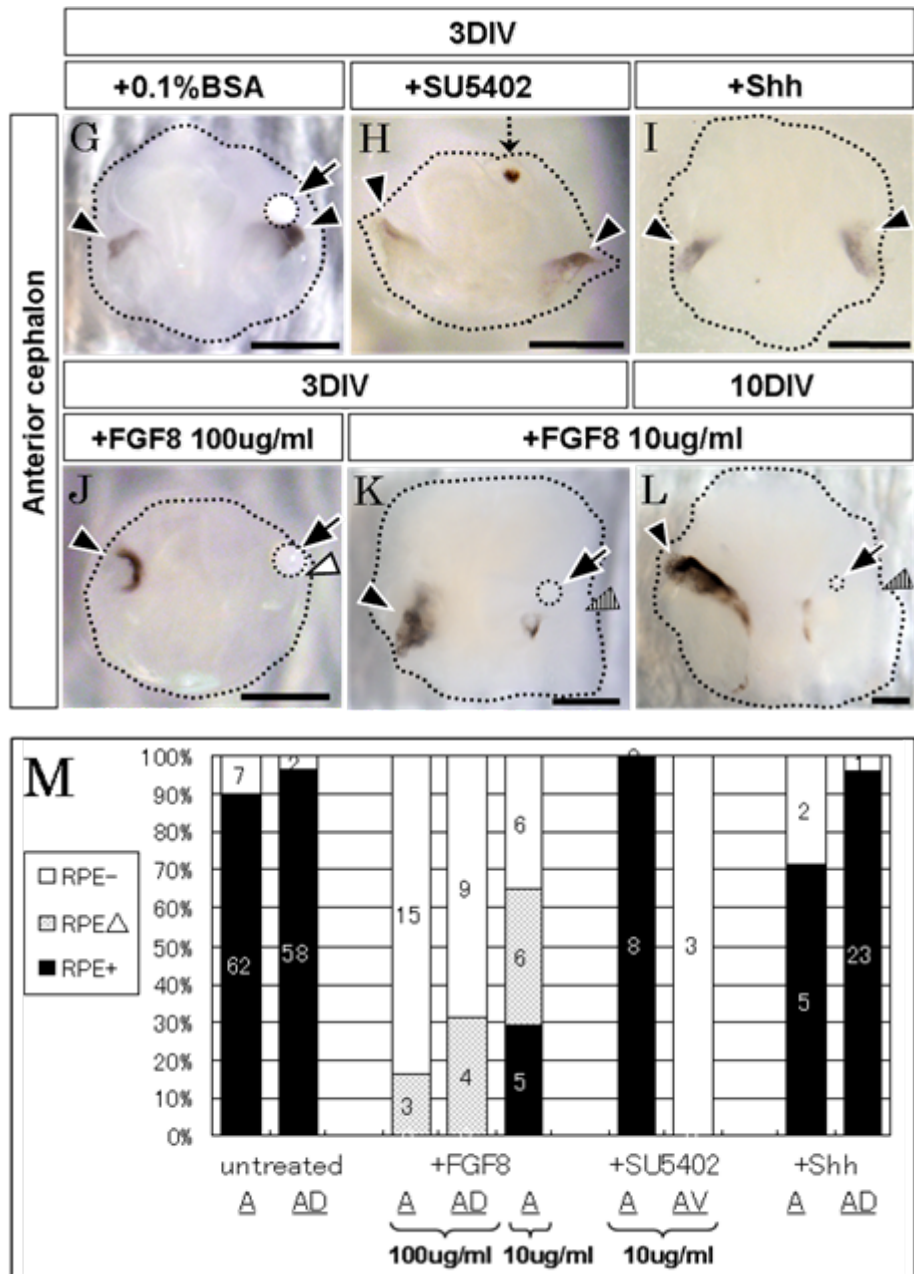


図16(2/2) 器官培養におけるFGF8の機能解析

(G-M) St.10の胚から頭部前側、頭部ADを単離し、コラーゲンゲルに包埋してから10または100μg/ml FGF8-soaked beadsを組織近傍に埋め込み、3日間(3DIV)培養した(J,K)。この結果、FGF8は濃度依存的にRPE形成を抑制し(J,K,M)、一度RPE形成に失敗すると培養を続けても再びRPEが形成されることはなかった(L)。

単離培養した頭部前側のRPE形成率は約90%である(M)。これが、FGF signalingをSU5402で阻害するとRPE形成率は上昇するが(H,M; 100%)、SU5402により頭部AVにRPEが形成されることはなかった(M)。また、Shh発現細胞と共培養すると頭部前側でRPE形成率が約70%に低下するものの(I,M)、異所的なShhによって頭部ADでRPE形成率が変化することはなかった(I,M)。

(矢印=beads、破矢印=PPE、Mの表中記号A/AD/AV=anterior/anterodorsal/anteroventral-cephalon、黒/斜線/白矢頭=RPE+/effective(Δ)/-、scale bars=500μm)

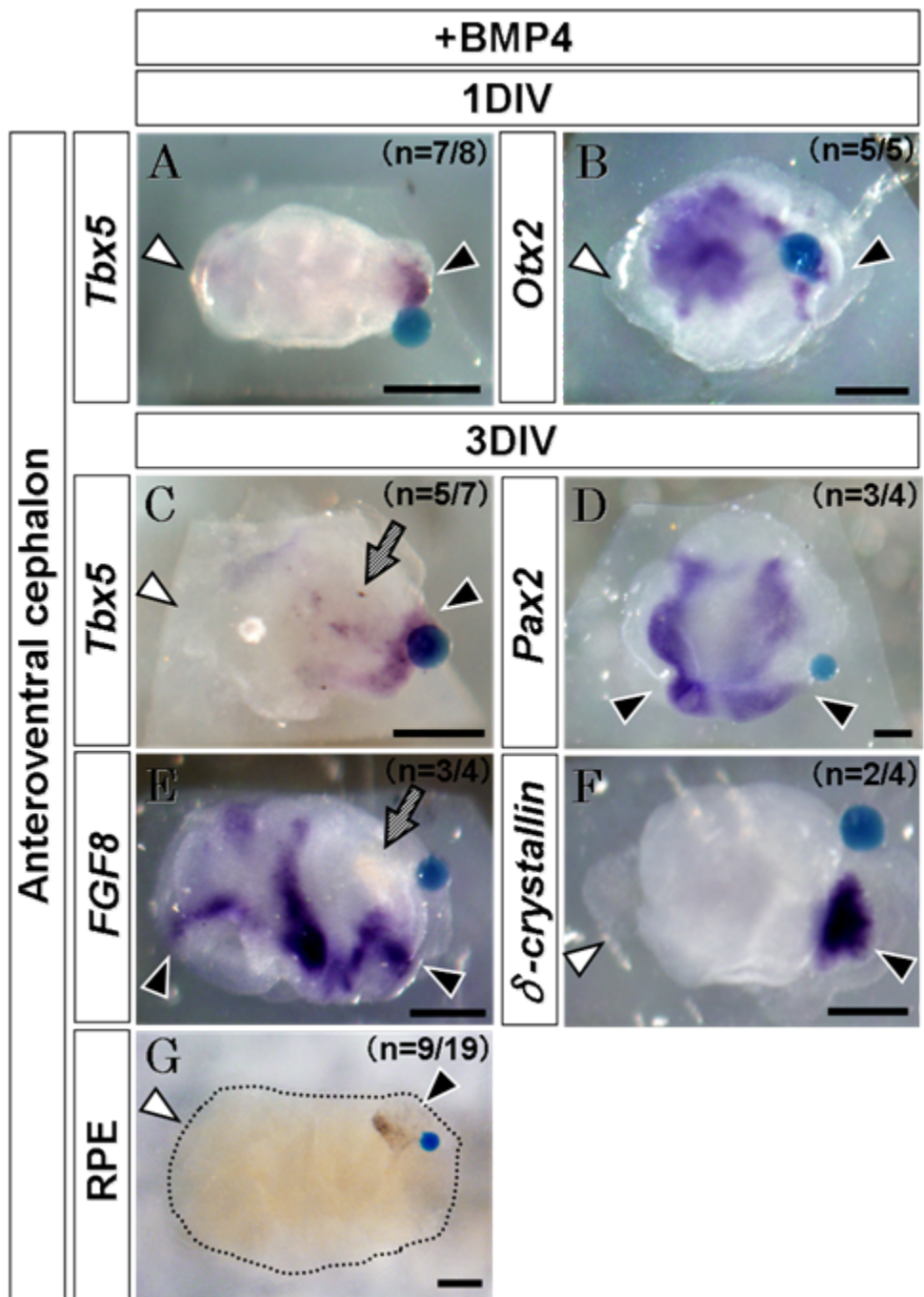


図17 器官培養におけるBMP4の機能解析

St.10の胚から頭部AVを単離し、20 μ m/ml BMP4-soaked beadsを片側眼胞近傍に置いて1、3日間(1,3DIV)器官培養を行った。(A-C)BMP4により眼胞腹側に異所的な*Tbx5*、*Otx2*が誘導された。(D,E)BMP4により*Pax2*、*FGF8*の発現にはそれほど影響は認められなかった。(F)BMP4により δ -*crystallin*が誘導された。(G)BMP4により異所的にRPEが形成された。*in situ* hybridizationの行程で脱色されているが(C,E)においてもRPE形成が認められた(斜線矢印は茶色に脱色された色素顆粒(RPE)を指す)。(黒/白矢頭=シグナル+/-、茶・黒組織=RPE、all scale bars=200 μ m)

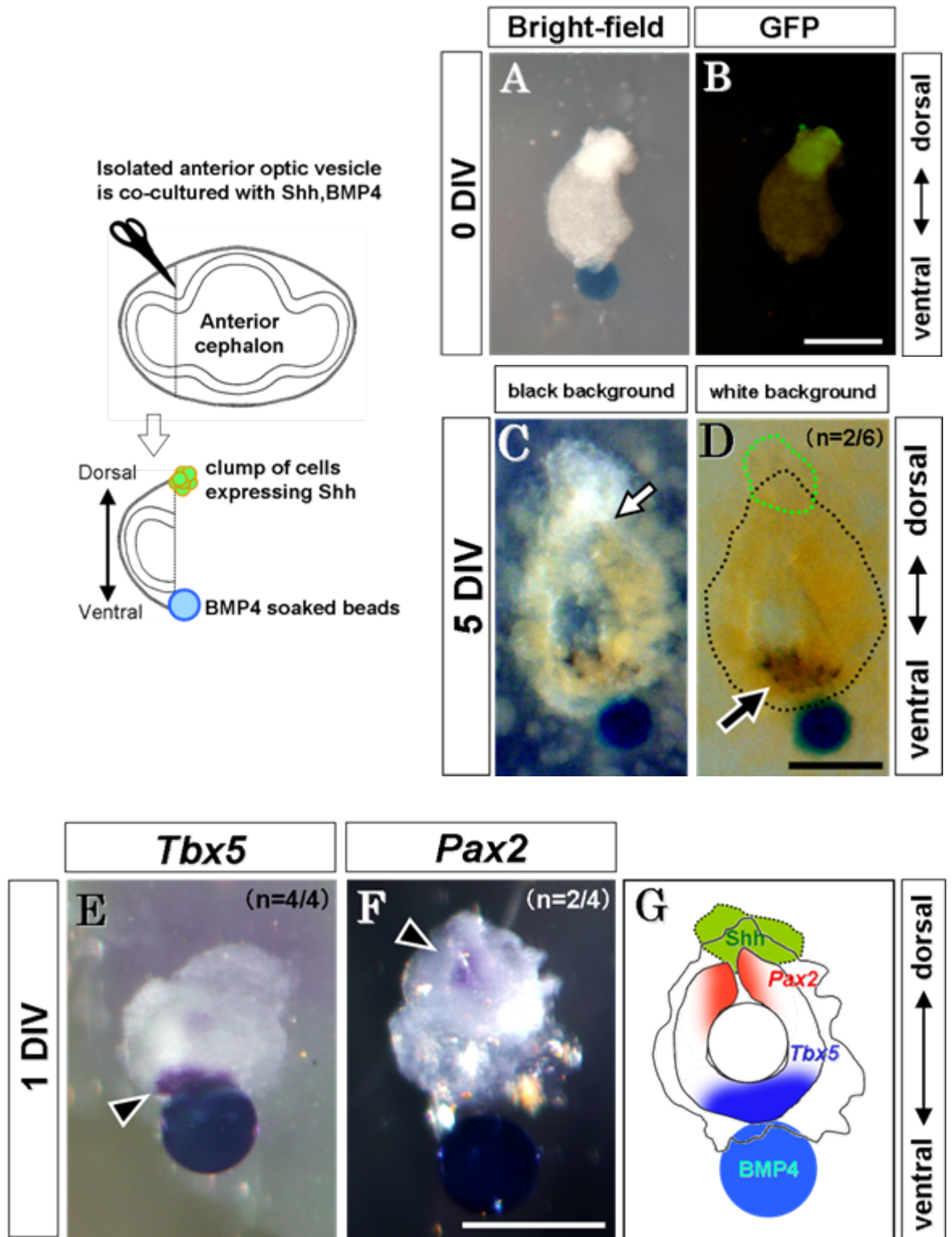
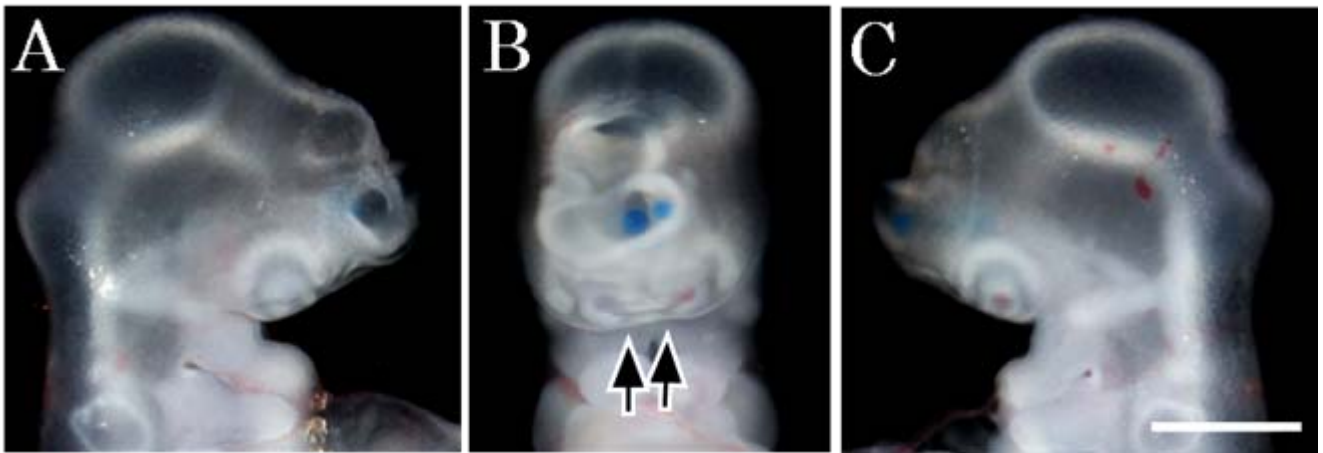


図18 異所的なShhとBMP4の指向的作用により、眼胞の背腹軸極性は逆転する

(A,B) St.10で単離した前側眼胞の背側にShh発現細胞塊を、腹側にBMP4-soaked beadsを近接しておいて培養した(上段模式図)。Shh発現細胞塊は、共導入してあるGFPの発現により視認できる(B)。(A,Bは同一視野)(C,D)培養5日後(5DIV)、眼胞は培養条件下で眼を形成し、腹側にRPEが形成され(D;黒矢印)、本来腹側に形成されるoptic fissureが背側に形成された(C;白矢印)。(C,Dは同一視野、n=2/6:残りの4サンプルのうち、1つはRPE形成が広範であり、2つはRPE形成しなかったため、極性が逆転しているのかどうか明瞭に判断できなかった。また1つは本来の背腹軸に従ってRPEを背側に形成した。)

(E-G)培養1日後(1DIV)、眼胞は培養条件下で眼杯を形成し、腹側に*Tbx5*が発現し(E;矢頭)、背側に形成されたoptic fissureにおいて*Pax2*が発現した(F;矢頭、n=2/4;残りの2サンプルは発現が広範であったため、極性が逆転しているのかどうか明瞭に判断できなかった)。

(all scale bars=200 μ m)



100uM KAAD	St.9	St.10	St.11	St.12	St.13	St.14
normal	0	2	3	2	5	0
some dysplasia	0	2	1	3	0	1
contiguous eye	0	0	0	0	0	0
cyclopia	0	0	0	0	0	0
1mM KAAD	St.9	St.10	St.11	St.12	St.13	St.14
normal	0	1	1	0	0	0
some dysplasia	0	1	0	0	0	0
contiguous eye	2	4	0	0	0	0
cyclopia	0	0	0	0	0	0

(some dysplasia = microphthalmia, pigmented vesicle, coloboma)

図19 *In ovo* KAAD implantation

前脳胞にKAAD-soaked beadsを複数個埋め込み*in ovo*で培養した。(A-C) St.10で施術後約1.5-2日、左右の眼がお互いに近接し、腹側正中へと著しく偏って形成される“contiguous eye”となった胚を示す(矢印=腹側から陥入しつつあるLens vesicle)。また終脳形成が不全であり、Holoprosencephalyとなる。この後、さらに発生を続けるとRPEは形成される。(A) right lateral view, (B) anterior view, (C) left lateral view, scale bar=500μm)

表は施術したSt.ごとの結果を示す。St.11以降の“some dysplasia”にpigmented vesicleは含まない。

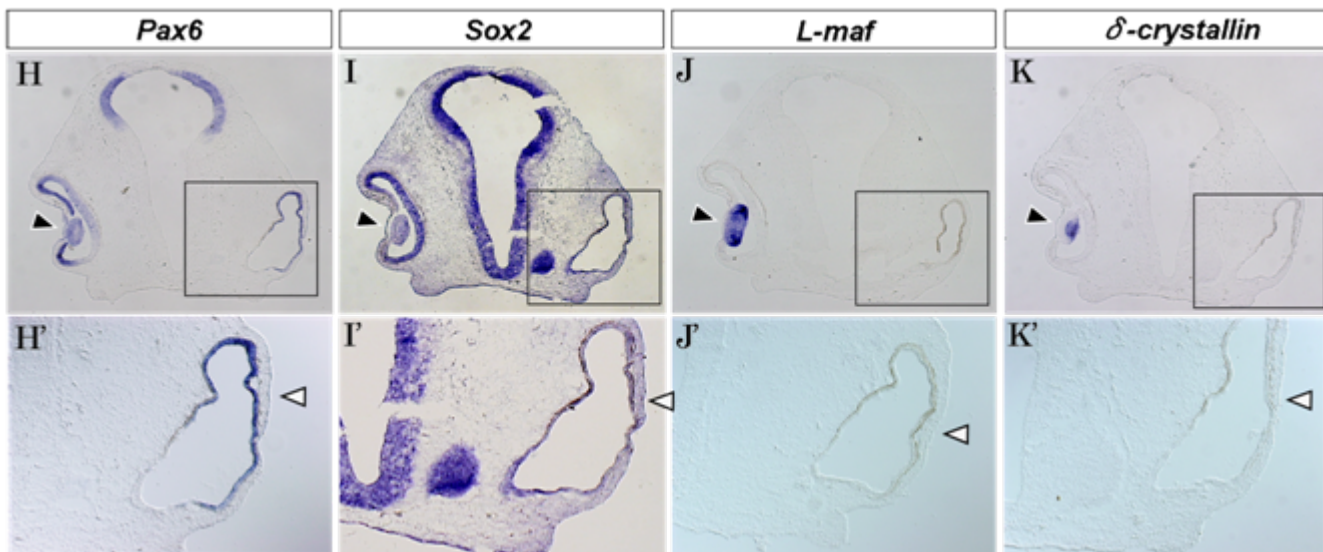
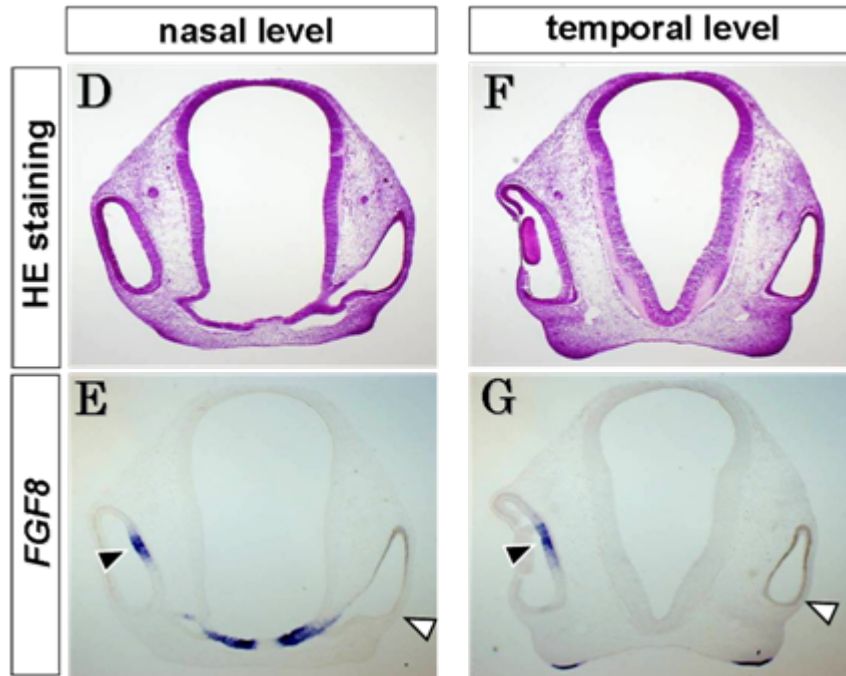
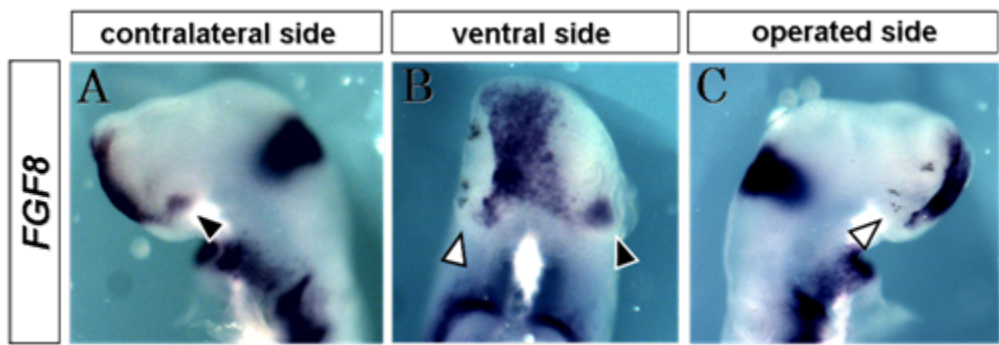
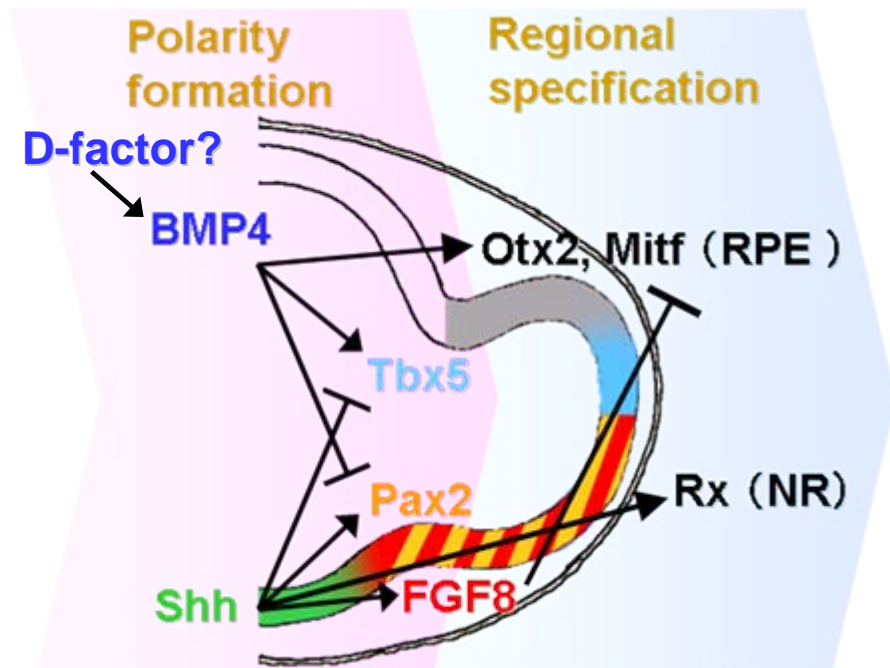


図20 水晶体の形成されないPigmented vesicle

St10で眼胞腹側を切除するとpigmented vesicle (PV)になることがあるが、このPVを形成した胚において、水晶体が形成されないことがある。(A-C)眼胞腹側を切除して約半日後、切除側でFGF8の発現は認められなかった。(D-G)切除約2日後、切除側はPVを形成し、このPVにおいてFGF8が再び発現することはなかった。(D-Gは同一胚の凍結連続切片、D,Eはnasal levelの連続切片、F,Gはtemporal levelの連続切片)(H-K)眼胞腹側切除後約2日、切除側で形成されたPVIにおいてhead ectodermに*Pax6*、*Sox2*、*L-maf*、 δ -*crystallin*の発現は認められなかった。(H-Kは同一胚の凍結連続切片、H'-K'はそれぞれH-Kの拡大図)(黒/白矢頭=シグナル+/-)



- Shh; ventral midline of forebrain
- FGF8; central presumptive NR, prospective optic stalk
- Pax2; ventral optic vesicle, prospective optic stalk
- FGF8 and Pax2
- Tbx5; dorsal optic vesicle, dorsal presumptive NR
- Otx2, Mitf; presumptive RPE

図21 眼の発生過程における分泌因子の作用機序のモデル

眼胞形成期にShhによりPax2、Rx1、FGF8が眼胞腹側に発現し、BMP4によりTbx5、Otx2、Mitfが眼胞背側に発現することで眼胞の背腹軸極性が決定する。眼杯形成期にOtx2とMitfを発現している眼杯外側組織は、単層の細胞に色素が沈着し始めることで成熟したRPEへと分化していき、Rx1、Chx10を発現している眼胞内側組織は、肥厚し、層構造となって成熟したNRへと分化していく。