

Secondary neurulation から見る 尾部領域の形成機構

下北 英輔

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
(主任指導教員 高橋淑子 教授)

最終提出 2011年 1月 25日

所属 (主指導教員)	分子発生生物学講座 高橋 淑子 教授		
氏名	下北 英輔	提出	平成22年12月21日
題目	Secondary neurulation から見る尾部領域の形成機構		

要旨

尾は現存する多くの脊椎動物に見られる大きな特徴の一つである。進化的に見ると尾は体幹に新たに付加された組織であり、尾の発達によって魚類など水中に住む生物の行動能力が飛躍的に向上した。また、陸上に住む生物においても尾は重要な機能を持ち、チーターは尾を使って走行時にバランスをとり、イヌは感情を表し、サルは物を把握する。近年、尾の形成機構は元々存在した体幹の形成機構と多くの点で異なるという報告が数多くなされている。羊膜類においては、遺伝子欠損マウスの系によって尾の形成に必要な遺伝子が複数報告されている。しかしながら、これらの知見の多くは尾を構成する神経管（脊髄となる）及び中胚葉（骨や筋肉を作る）といった組織の違いを区別することなく解析が為されており、未だ数多くの問題点が存在している。よって、本研究では尾の形成過程の中でも特に Secondary neurulation (SN) と呼ばれる神経管形成現象を解析することによって、新たな視点から尾の形成機構を解き明かしていくことを目的とする。

SN とはヒトを含めた多くの羊膜類の尾部で起こる神経管形成である。一般的に神経管は、上皮シートが折り畳まれるという過程を経て作られることが知られているが、これは体幹部でおこる神経管形成 Primary neurulation (PN) である。一方、SN では、間充織細胞群が集合し、上皮化するという間充織-上皮転換を経て神経管が作られる。このような神経管の明らかな形成様式の違いは、尾の形成機構を理解する上で重要であると考え、SN に注目した。現在のところ、SN に関する解剖学的な知見は複数存在するが、分子レベルでの解析は全くと言っていいほど行われていない。

① 尾の神経管を形成する SN 間充織細胞は後方神経板に由来する

まず、SN を起こす間充織細胞 (SN 間充織細胞) がどこに由来しているのかを調べた。これまでの組織移植による知見から、尾部領域の神経管は後方神経板に由来し、さらにこの領域の細胞は中胚葉にも分化すると考えられてきた。しかしながら、このような移植による方法では、胚の表層に存在する上皮細胞と深層に存在する間充織細胞を区別することが困難であり、正確な由来を表していない可能性があると考えられる。そこで、新たに本論文では PKH (膜リン脂質を染色する) を用いて後方神経板の表層の上皮細胞のみをラベルした。その結果、ラベルされた細胞はこれまでの知見とは異なり、中胚葉には分化せず、

SN を含む神経管へと分化していた。このことから、SN 間充織細胞は後方神経板の表層に存在する上皮細胞 (Pre-SN 細胞) に由来することが明らかとなった。また、Pre-SN 細胞では神経前駆細胞マーカー Sox2 の発現が見られないことから、神経前駆細胞に分化する以前のエピブラスト (多分化能を持つ未分化な細胞) 様である可能性が示唆された。

本論文ではこの結果を元にし、後方神経板をターゲットとしたエレクトロポレーションを行うことによって SN 間充織細胞への遺伝子導入にも成功している。

②尾部における神経管と中胚葉の運命決定機構について

上に示したように尾部の神経管及び中胚葉はともにエピブラスト様の細胞に由来する (中胚葉に関しては過去に示されている)。では、このような未分化な細胞は如何にして神経管又は中胚葉へと運命決定されるのか? この問いに答えるため、SN が進行している細胞において発現している遺伝子を中胚葉になる予定の細胞に発現させた。その結果、転写因子 Pax2 を発現させた場合、本来管構造を作らないはずの中胚葉領域に異所的な管構造が誘導された。また、この異所的な管構造は SN と同様に間充織細胞が上皮化するという過程を経て作られること、及びその上皮化のタイミングが本来の SN と同様であることが分かった。さらには、神経管マーカー Sox2 及び NCAM などが発現していたことから、Pax2 は中胚葉になる予定の未分化細胞を神経系 (SN) へと運命転換させることに十分であることが示唆された。また、Pax2 の下流において転写因子 Tbx6L の発現が抑制される必要があるという結果を得ており、Pax2 及び Tbx6L が中心となって、尾部におけるエピブラスト様の細胞運命が決定されているようである。

③SN 間充織細胞が神経管構造を形成する仕組み

以上に述べたような運命決定を経た後、SN 間充織細胞はどのようにして上皮管構造を作るのであろうか? SN の進行と共に神経管マーカー Sox2 の発現上昇が見られたため、Sox2 は SN の上皮化に関わっているのではないかと考えた。そこで、Sox2 の優勢阻害因子を SN 細胞に導入すると、これらの細胞の上皮化が抑制され、神経管の外側に排除されるという結果となった。これまで、神経管における Sox2 の役割は神経前駆細胞の未分化性の維持であると考えられてきたが、今回の結果から新たに神経管の形態形成にも関与していることが示された。その他、SN と *in vitro* の系において上皮化に重要であることが知られているアクチン細胞骨格制御因子 Rho ファミリー (Rac1 と Cdc42) との関係を優勢阻害因子及び恒常活性因子を用いて調べた。その結果、SN の上皮化には Rac1 のある程度の活性が必要であり、Cdc42 に関しては活性が抑制される必要があることが示された。これらの結果は体節形成における Rho ファミリーの働き (当研究室から報告されている) と一致し、SN と体節が同様な機構によって形成されている可能性を示唆している。

以上のように本論文では、SN 間充織細胞の由来、尾における運命決定の仕組み及び SN の管形成機構という 3 点を述べている。尾の神経管特異的な解析はこれまでほとんど為されておらず、本論文は極めて独創性が高いと自負している。SN を含めた尾の形成にはまだまだ重要な多くの謎が存在し、非常に魅力的な研究対象であることを伝えたい。

序論

尾部は進化的に体幹の末端に付加された組織であり、体幹とは異なるメカニズムによって作られる

尾は現存する多くの脊索動物(脊椎動物)に見られる大きな特徴の一つである。進化的に見ると尾は体幹に新たに付加された組織であり、末端である肛門の後方に付加されたことから肛後尾(Postanal-tail)とも呼ばれる(図1)(Kardong, 2006)。尾の出現は魚類など水中に住む生物の行動能力を飛躍的に向上させ、生存競争を勝ち抜く上での利点となった。また、陸上に住む生物においても尾は重要な機能を持つ。例えば、チーターは尾を使って走行時にバランスをとり、サルは物を把握する。このような尾部は体幹と途切れなく繋がっていることから、形態的には一見一様な組織に見える。しかしながら、尾部と体幹との形成過程において細胞の挙動や関与する遺伝子など多くの相違点が示されており、現在では尾部は体幹と異なる形成メカニズムを経て作られると考えられている(Harvey et al., 2010; Holley, 2006; Stern et al., 2006; Wilson et al., 2009)。このように尾部の形成に関する知見は近年数多く報告されつつある。しかしながら、これまでの知見の多くは尾部全体を解析の対象としており、尾部を構成する神経管(中枢神経系となる)や中胚葉(筋肉や骨などになる)といった組織特異的な解析に関してはほとんど為されていないのが現状である。そこで本論文では、脊椎動物の中でも羊膜類の尾部における神経管形成 Secondary neurulation を主な解析対象とすることによって、新たな視点から尾部の形成機構を解き明かすことを目的とする。

尾部における神経管形成 Secondary neurulation

Secondary neurulation (SN)とは、ヒト、マウス及びニワトリなど多くの羊膜

類の尾部において観察されている神経管形成である(Copp and Greene, 2010; Handrigan, 2003)。一般的に、神経管は上皮細胞によって構成される神経板(上皮シート)が折り畳まれることによって作られることが知られているが、これは体幹で起こる神経管形成 Primary neurulation (PN)である。一方、SNでは、不定形の間充織細胞が規則正しい上皮細胞へと変化する間充織-上皮転換(Mesenchymal to epithelial transition; MET)を経て神経管が作られる(図2)(Catala, 2002; Catala et al., 1995; Colas and Schoenwolf, 2001; Criley, 1969; Griffith et al., 1992)。異なる形成様式によって作られた神経管は後に結合し、頭から尾まで伸びた一本の管構造となる。このような神経管の形成様式の違いは、尾部形成を理解する上で重要であると考えられる。現在のところ、PN に関しては多くの生物種を用いて研究が為されており、形態形成や運命決定に関わる遺伝子が数多く明らかとなっている(Betancur et al., 2010; Stern, 2005; Wallingford, 2006)。一方、SN は、約 70 年前に発見された現象であるが(Holmdahl, 1938; Pasteels, 1937)、報告の多くは組織学的な観察に留まり、分子レベルでの解析はほとんど為されていないのが現状である。

本論文では、SN に関して組織学的な知見の最も多いニワトリ胚を用いている。ニワトリ 2 日目胚では SN が進行中であり、連続横断切片を観察することによってその段階を観察することができる(図 3)(Catala et al., 1995)。図上のレベル 1 では SN を起こす予定の細胞は間充織細胞(以降、SN 間充織細胞と呼ぶ)として存在する。レベル 2 では間充織細胞群が集まり、Medullary code (MC)と呼ばれる凝集体をつくり、さらには背側から腹側にむかって MET が進行する。レベル 3 では MET が終了し神経管として完成する。

その他、ニワトリ胚では PN から SN への移行の位置及び時期が知られており(図 4)、位置に関しては 27 体節レベルが境となる(Le Douarin et al., 1998)。これはニワトリ胚では後足の付け根(頭側)に位置し、ヒトやマウスにおいても

同様な位置で移行することが知られている(Nievelstein et al., 1993; Saitsu et al., 2004)。また、時期に関しては、発生 1 日目では PN が頭側から尾側にかけて進行しており、およそ 1.5 日目(15 体節の時期)において PN が終了し SN へと変移する。そして、3 日目において SN が終了する(Schoenwolf and Smith, 1990)。

その他、SN の形成異常は、二分脊椎症と呼ばれる最も頻度の高い部類にはいる先天的な奇形の原因となる。その割合は 1000 人に 0.5-8 人であり、特に白人などの多い欧米諸国で頻出している(Saitsu et al., 2004)。脊椎二分症を煩った場合、髄圧の低下などにより知的発達の遅れや足が動かなくなるなどの症状がみられ、その他にも多くの合併症を伴うことから、早期の治療を怠れば死に至るケースも見られる。このような医学的な観点からも SN の形成メカニズムの解明が望まれる。

本論文では主に SN に着目した 3 つの課題を検証した。①SN 間充織細胞はどこから来るのか。②尾部を形成するエピブラスト(未分化細胞)の運命(神経管又は中胚葉)はどのようにして決められているのか。③SN 間充織細胞はどのようなメカニズムによって神経管構造を作るのかの 3 点である。以下にこの論文の流れを述べる。

① Secondary neurulation を起こす間充織細胞の由来

SN 間充織細胞はどこから来るのか?これまでの組織移植による知見では、尾部領域の神経管はステージ 8 胚の後方神経板に由来し、さらにこの領域の細胞は中胚葉にも分化すると考えられてきた(中胚葉細胞は他にも原条と呼ばれる領域に由来することが知られている)(Diez del Corral and Storey, 2004; Le Douarin, 2001; Le Douarin et al., 1998; Sawada and Aoyama,

1999)。しかしながら、このような移植による方法では、胚の表層に存在する上皮細胞と深層に存在する間充織細胞を区別することが困難であり、正確な由来を表していない可能性があると考えられる。そこで、本論文では PKH 溶液 (レポーター分子を細胞膜に結合させ標識する) を用いて胚表層の神経板細胞のみをラベルした。その結果、後方神経板は SN 間充織細胞を含む神経管のみに分化し、中胚葉には分化しないことを示した (図 7)。さらに、後方神経板の中でも基底膜の Laminin が存在しないひし形の領域 (Pre-SN 領域) に SN 間充織細胞が由来することも示している (図 6,7)。

また、Pre-SN 領域をターゲットとしてエレクトロポレーションを行った結果、遺伝子導入された細胞は PKH の場合と同様に SN 間充織細胞を含む神経管になることを示した (図 8)。エレクトロポレーションでは、胚の表層の細胞のみに遺伝子が導入されると報告されており (Nakaya et al., 2008; Yoshino et al., 2011)、この結果は PKH の結果と同様に神経板表層の細胞は神経管にのみ分化するということを支持している。

以上より、SN 間充織細胞は後方神経板の表層に存在する Laminin なしの Pre-SN 領域に由来することが明らかとなった。また、これらの結果を元にしてステージ 8 胚における Pre-SN/PN 及び原条 (予定中胚葉) の運命地図を作成した (図 9)。

②尾部を形成する尾部エピブラスト (Pre-SN 及び原条) の運命の分岐について

上で示した Pre-SN 領域の分化性質を調べた結果、神経前駆細胞マーカー転写因子 Sox2 の発現が見られなかった (Rex et al., 1997; Takemoto et al., 2006) (図 7L)。このステージにおける Sox2 の発現は神経系への分化が決定したことを意味していることから (Darnell et al., 1999; Papanayotou et al.,

2008; Stern, 2005)、Sox2 を発現していない pre-SN 細胞は神経系への運命が決定していないエピブラストの未分化性を維持した細胞であると考えられる。エピブラストとは、胚葉に分化する以前の細胞であり、外胚葉(神経系)、中胚葉、内胚葉の 3 胚葉へと分化できる多分化能を有している組織のことを指す(Keller, 2005; Stern, 2004)。また、中胚葉を生み出す原条の細胞も、胚内に潜り込む以前はエピブラストであると考えられていることから(Keller, 2005)、尾部を構成する神経管及び中胚葉は共にステージ 8 胚に存在するエピブラスト様の細胞 (Pre-SN 領域と原条を合わせて『尾部エピブラスト』と呼ぶ) に由来していることを意味する。

では、尾部エピブラストの運命はどのようにして決められているのか? この問いを検証するため、本論文では SN が進行している細胞において発現する遺伝子 (GEISHA: <http://geisha.arizona.edu/geisha/> などを用いて調べた) を中胚葉になる予定の原条細胞に強制発現させるという実験を行った。

そこで、注目したのが転写因子 Pax2 である。Pax2 とは 3 つの DNA 結合ドメイン (ペアードドメイン、ホメオドメイン及びオクタペプチドドメイン) を持つ転写因子であり、転写活性化及び転写抑制化の両方の機能を持つことが知られている (Goode and Elgar, 2009; Lang et al., 2007)。また、Pax2 は脳、眼及び耳などの形成過程において発現し、Pax2 欠損マウスではこれらの器官の形成異常が見られる (Goode and Elgar, 2009)。その他、脊椎動物においては Pax2 と重複した機能をもつ Pax5 及び Pax8 の存在が知られており (ニワトリでは Pax8 の存在が明らかとなっていない)、マウスの腎臓形成では Pax2 と Pax8 両方の遺伝子を欠損させて始めて明瞭な表現系が現れることが報告されている (Bouchard et al., 2002)。

本論文ではまず、Pax2 を原条 (予定中胚葉細胞) に発現させると中胚葉領域に異所的な神経管が形成されることを示した (図 10)。次にこの異所的な神経管は SN と同様に MET を経て形成されること及び MET のタイミングが

本来の SN と同様であることを示している (図 11)。さらには、Pax2 が転写活性を介して SN を誘導しているという結果を得た (図 12)。

次に、中胚葉 (未分節中胚葉) において発現することで知られる転写因子 Tbx6L に注目した。Tbx6L (Tbx6-like の略) は、T-box 型のアミノ酸配列を持ち、マウス Tbx6 と同様に未分節中胚葉において発現することから命名された転写因子である (Knezevic et al., 1997)。しかしながら、アミノ酸レベルにおいてヒトやマウスの Tbx6 とニワトリ Tbx6L は大きく異なることから (Lardelli, 2003)、現在のところ Tbx6 と Tbx6L が機能的に同等であるかは定かではない (ニワトリにおいて、マウス Tbx6 と同様な遺伝子は見つかっていない)。本論文では、Pax2 によって誘導される SN において Tbx6L の発現が抑制されていること及び Tbx6L の発現を抑制することが SN を引き起こすために必要であることを示した (図 14)。

これらの尾部の解析によって得られた結果は、外胚葉 (神経管) 又は中胚葉という発生過程における最も大きな運命の違いが Pax2 及び Tbx6L を中心として制御されていることを意味している。

③ SN 間充織細胞が神経管構造を形成する仕組み

SN ではランダムに存在する SN 間充織細胞が規則正しい神経上皮細胞へと変わる (図 3, 5, 8)。このような MET は SN の他にも腎臓や乳腺及び体節などの形成過程においても起こることが知られている。しかしながら、現在のところ生体内における MET の解析はあまり進んでいない (Bryant and Mostov, 2008; Chaffer et al., 2007; Takahashi et al., 2005)。本論文では、まず SN の MET の進行と共に転写因子 Sox2 の発現上昇が見られたため (図 15A)、Sox2 は SN の形態形成に関わっているのではないかと考え、検証を行った。

Sox2 は、HMG と呼ばれる DNA 結合ドメインを有する転写因子であり、Sox1

及び Sox3(いずれも Sox2 と同様な機能を持つと考えられている)と合わせて SoxB1 ファミリーと呼ばれている。SoxB1 ファミリーは共に神経系において広く発現し、神経分化に寄与している(Bylund et al., 2003)。その中でも特に Sox2 の発現位置と神経前駆細胞の存在位置が様々な胎生期で一致することから、Sox2 の発現をして神経前駆細胞とみなされている(Papanayotou et al., 2008; Uchikawa et al., 2003)。また、Sox2 はエピブラストから神経系への分化に必要であることがカエルを用いた PN の研究によって報告されており(Kishi et al., 2000)、神経管を形成した後においては、Sox2 は神経前駆細胞の未分化性の維持に働くことが示されている(Graham et al., 2003)。

本論文では、SN における Sox2 の役割を調べるために、SoxB1 ファミリー全てを優勢阻害する分子として知られている Sox3HMG-EnR(Sox3 の HMG ドメインに転写抑制ドメインである Engrailed ドメインを付加したもの)(Bylund et al., 2003)を用いて検証を行った。その結果、Sox3HMG-EnR を導入された SN 間充織細胞は神経管の周囲へと排除され、さらには上皮極性の形成をも阻害された(図 15)。これまで中枢神経系における Sox2 の解析は数多く為されているが、今回の結果から新たに神経管の形態形成においても必要であることが示された。

次に、細胞の形態変化や移動に重要であることで有名なアクチン細胞骨格制御因子 Rho ファミリー(Rac1 と Cdc42)に注目した(Jaffe and Hall, 2005)。これまでの知見において、イヌ腎臓細胞由来の MDCK 細胞では Rac1 及び Cdc42 の働きが上皮化に必要であることが示されている(Martin-Belmonte et al., 2007; O'Brien et al., 2001)。しかしながら、当研究室から報告した体節研究における結果は、Cdc42 の機能阻害は逆に上皮化を進めることを示している(Nakaya et al., 2004)。そこで、SN の MET における Rho ファミリーの役割はどうであるかを検証した。

本論文では、体節研究の際に用いられた Rho ファミリー(Rac1 及び Cdc42)

の優勢阻害型及び恒常活性型を用いて実験を行った。その結果、SN の MET には Rac1 の適度な活性が必要であり、Cdc42 に関しては活性が抑制される必要があることを示した(図 16)。これらの結果は体節形成における Rho ファミリーの働きと一致していることから、SN と体節が同様な機構によって形成されている可能性を示唆している。考察では、細胞の形態に注目し、なぜ MDCK 細胞と SN(体節)細胞とでは必要な Rho ファミリーの働きが異なるのかについて述べている。

最後に、これまでの実験によって MET を阻害された細胞がその後どうなるのかを調べた。その中でも、優勢阻害型 Rac1 を導入した 3 日目胚を観察したところ、驚くべきことに遺伝子導入された細胞は神経提細胞様へと変化していた(図 17)。数ある神経提細胞研究においても神経提細胞への分化に関わる Rho ファミリーはカエルにおける RhoV の必要性について報告されているのみである(Guemar et al., 2007)。このことから、今回の研究から偶然得られた優勢阻害型 Rac1 による神経提細胞への誘導はオリジナリティーの高い研究へと発展する可能性を秘めている。

以上のように本論分では、尾部の神経管を作る細胞の由来、尾部を形成する未分化細胞の運命分岐メカニズム及び SN における形態形成という 3 点の解析を行っている。これらの研究を通して、尾部形成の更なる謎や発展性が見えてきたことから、それらについて考察で詳しく述べたい。

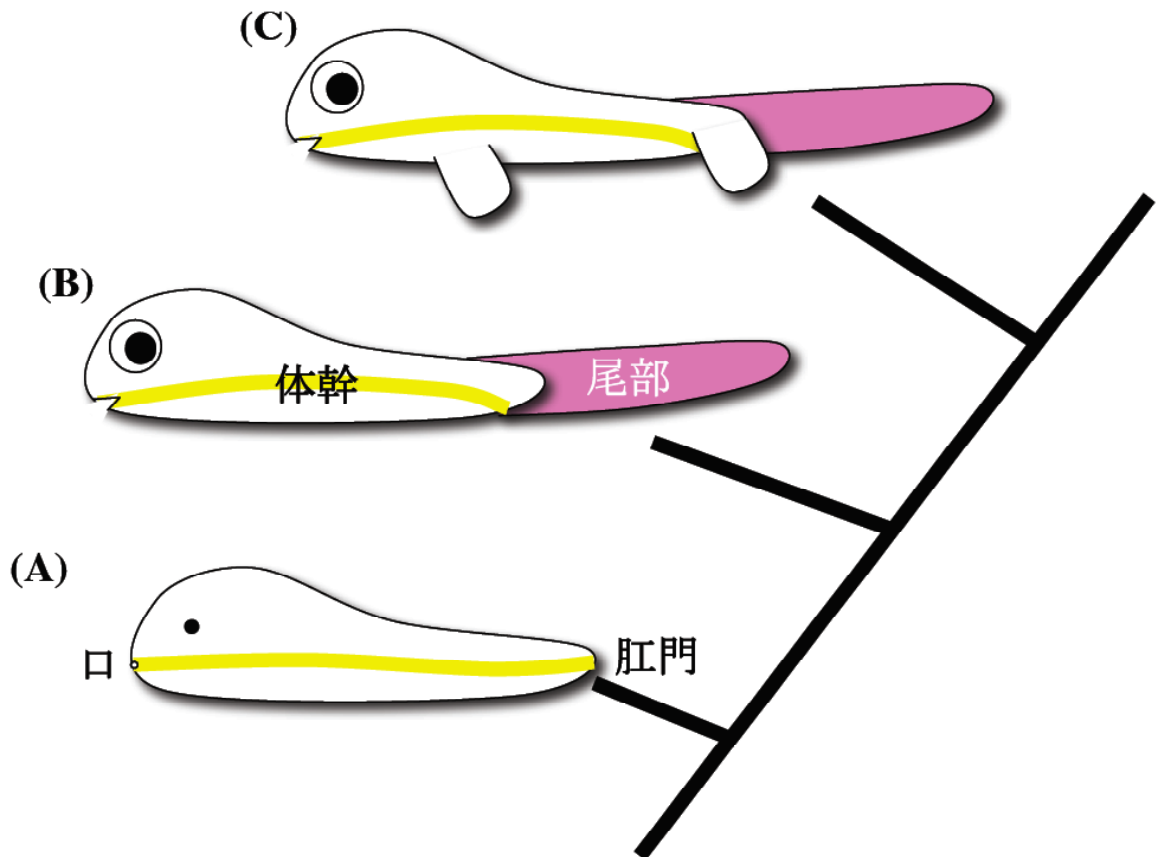
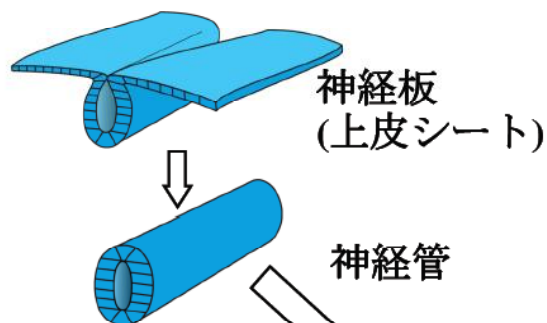


図1. 進化的に尾部は体幹の末端に付加された組織である

(A) 太古の生物は体の末端が口と肛門であった。(B) 後に体幹の後方に尾部が付加された。(C) 更に、手足の原基が付け加わることによって現在の四足動物の原型が作られた。(Kargon, 2006: 改変)

(A) Primary neurulation (PN)



(B) Secondary neurulation (SN)

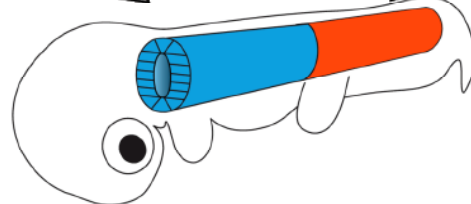
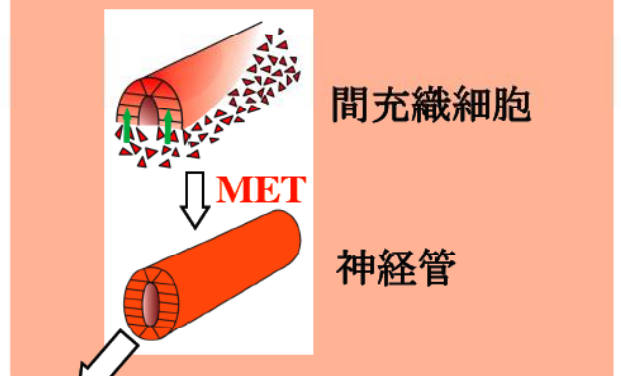


図2. 尾部における神経管形成Secondary neurulation

(A) 体幹で起こる神経管形成Primary neurulationでは、神経板（上皮シート）が折り畳まれて、神経管が形成される。(B) 尾部においては、間充織細胞が上皮化する間充織-上皮転換 (MET) を経て、神経管が形成される。この尾部における神経管形成Secondary neurulation (SN) はヒトやマウス及びニワトリなどの羊膜類において観察されている。(Copp and Greene, 2010; Handrigan, 2003 : 改変)

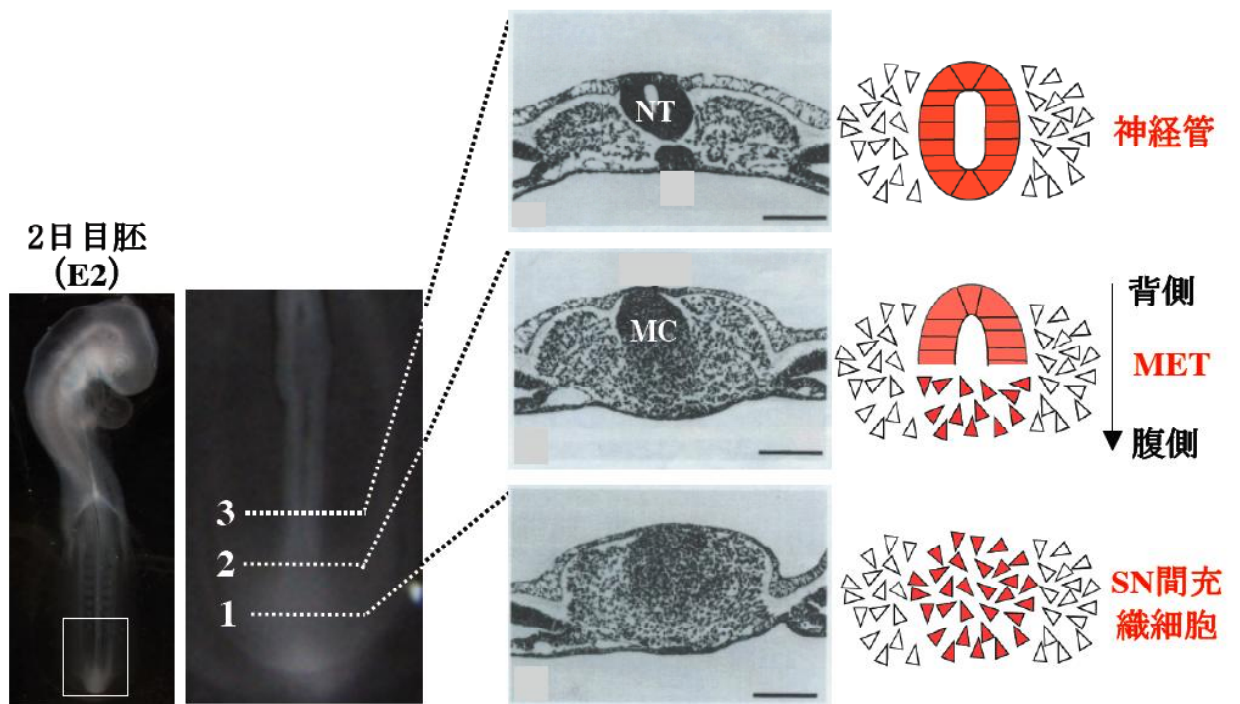


図3. ニワトリ胚におけるSecondary neurulationについて

ニワトリ胚において、SNは2日目胚 (Embryonic days 2 :E2) の尾部先端で進行中である。ニワトリ胚では頭側から発生が進行するので、連続横断切片を作製することによって、SNの過程を観察することが可能である。(1) では、SNを起こす予定の細胞は間充織細胞 (SN間充織細胞) である。(2) の段階になると、細胞が正中に集合し、Medullary code (MC) と呼ばれる凝集体を作る。それに伴い、背側から腹側に向かってMET (上皮化) が進行する。(3) では、METが終了し上皮管構造である神経管 (Neural tube:NT) となる。(Catala et al., 1995: 改変)

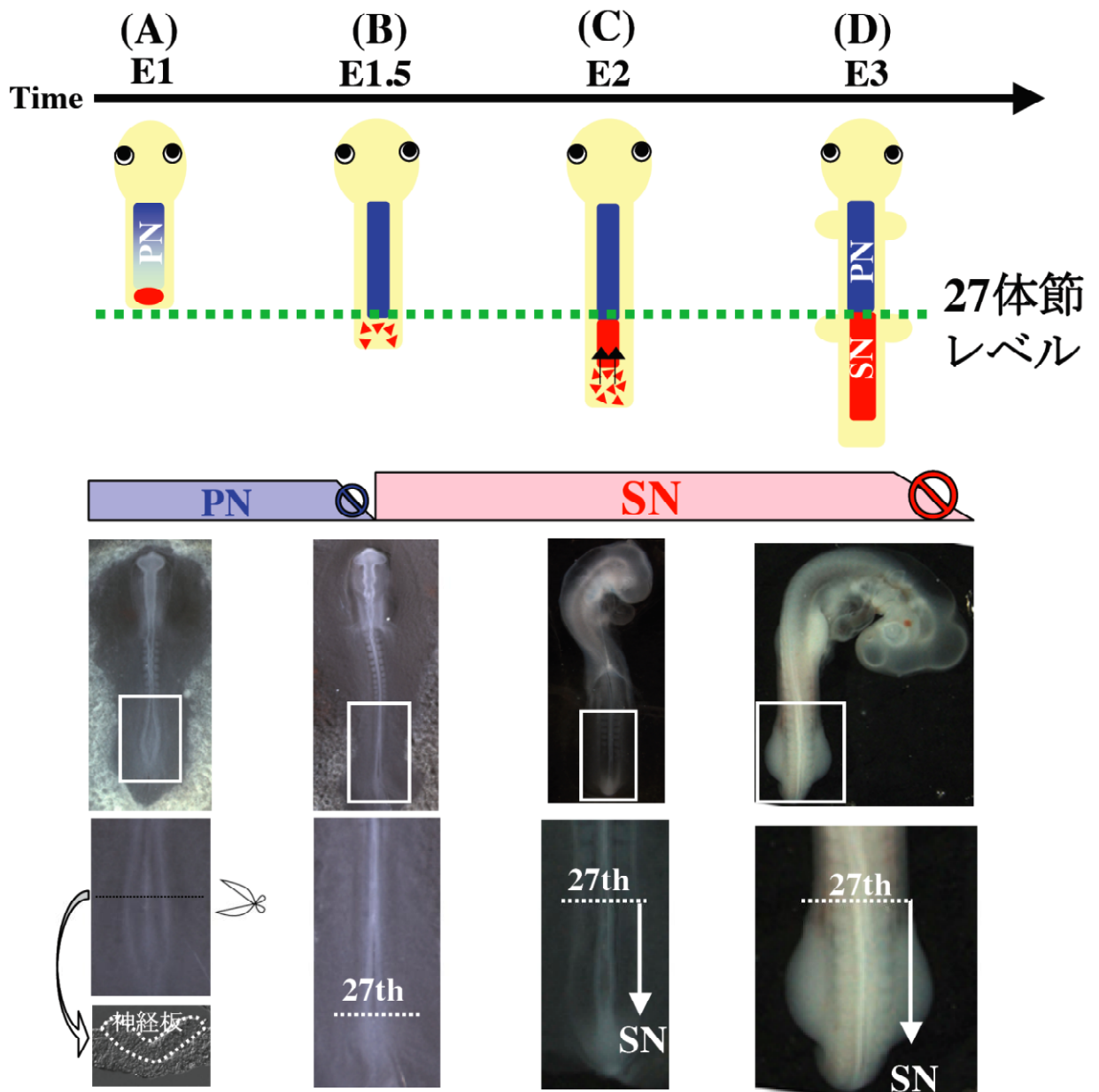


図4. ニワトリ胚におけるPNからSNへの移行の位置及び時期

(A) E1では、PNが進行中であり神経板が折り畳まれている（下段）。(B) E1.5ではPNが終了し体幹の神経管が完成する。体幹神経管の末端がおよそ27体節レベルに該当する。(C) E2ではSNが進行中であり、27体節レベルより尾側の神経管はSNを経て形成される。(D) E3ではSNが終了し、尾部の神経管が完成する。27体節レベルは後足の付け根（頭側）に位置する。27th (27体節レベル) (Le Douarin et al., 1998; Schoenwolf and Smith, 1990 : 改変)

材料と方法

ニワトリ胚

ニワトリ有精卵は城山鶏園より購入した。それぞれの有精卵を 38.5℃、湿度 100%の条件下でインキュベートし、各実験に適した発生段階の胚を得た。本論文中に記す発生ステージは、Hamburger-Hamilton の発生段階表 (Hamburger and Hamilton, 1951)に従った。

PKH26 細胞ラベリング

PKH26 Red Fluorescent Cell Linker mini kit (Sigma; MINI26-1KT)を用いて細胞ラベルを行った。溶液の調合は説明書に従い、PKH26 と DiluteC を 1 対 2 の割合で混ぜたものを用いた。1 mm のガラスキャピラリーをプーラー (Narishige; PC-10) で引き伸ばしたものを使って、空気圧により溶液を stage7-8 のニワトリ胚 (ref) のヘンゼン結節付近へと付着させた。

免疫蛍光染色

サンプルは 4% PFA を用いて、4℃で一晩固定した。10 μ m の凍結切片を作製し、ブロッキングには 1%Blocking reagent (Roche)/PBS を用いた。各一次抗体は、以下の希釈倍率で使用し、4℃で一晩抗体を反応させた; 抗 Laminin 抗体 (マウス由来、DSHB、3H11、1/500)、抗 Fibronectin 抗体 (マウス由来、Sigma、F614、1/500)、抗 N-Cadherin 抗体 (マウス由来、Sigma、C2667、1/300)、抗 ZO-1 抗体 (ウサギ由来、Zymed、40-2200、1/100)、抗 NCAM 抗体 (マウス由来、DSHB、5e、1/500)、抗 E-cadherin 抗体 (マウス由来、BD Transduction Laboratories、1/300)、抗 Sox2 抗体 (ヤギ由来、R&D Systems、AF2018、1/100)。PBS で洗浄後、それぞれの免疫動物に適した二次抗体 (Alexa 568 または 647, Molecular probes)を 500 倍希釈で使用し、室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、FluorSave reagent (Calbiochem)で封入した。

aPKC の染色には TSA 法を用いた。上と同様の凍結切片を 3% H_2O_2 /TNT に 30 分間反応させ、TNT で洗浄した。ブロッキングを行い、抗 aPKC (ウサギ由来、Santa Cruz、1/300) と反応させ、TNT で洗浄後、抗 IgG-HRP-conjugated 抗体 (ロバ由来、Amersham Biosciences、NA934V、1/300)と反応させた。TNT で洗浄後、TSA plus Cy3 system (Perkin Elmer)

溶液を室温で 5 分間反応させた。TNT で洗浄後、FluorSave reagent(Calbiochem)で封入した。

光標識された切片は、Apoptome (Carl Zeiss)を搭載した蛍光顕微鏡 AxioPlan2 (Carl Zeiss)、または AxioImager (Carl Zeiss)で観察し、CCD カメラ AxioCam (Carl Zeiss)を用いて画像を取得した。

DAB 染色

上と同様の凍結切片を 3% H_2O_2 /TNT に 30 分間反応させ、PBS で洗浄した。ブロッキングには 1%Blocking reagent (Roche)/PBS を用いた。各一次抗体は抗 GFP 抗体(ウサギ由来、Clontech, 1/1000)と反応させ、PBS で洗浄後、0.08%DAB/PBS (0.48 μ m のフィルターに通し、30% H_2O_2 を 1/7000 の以上加えたもの)と室温で約 5 分間反応させた。PBS で洗浄後、FluorSave reagent(Calbiochem)で封入した。

発現ベクター

ニワトリ Pax2(当研究室の嘉新さんによって)、ニワトリ Tbx6L(当研究室の渡邊さんによって)、dn-Rac1、ca-Rac1、N-WASP-CRIB、ca-Cdc42(当研究室の仲矢さんによって) は pTRE-EGFP 又は pTRE-DsRed (Clontech)に挿入されたものを用いた。ヒト Pax3 及びマウス Pax5 は当研究室に保管されていたプラスミドを用いてサブクローニングを行い、pTRE-DsRed の MluI-EcoRV サイトへ挿入した。また、tkEGFP-N1、tkDsRed-N1(大阪大学の近藤寿人先生からの提供)、pCAGGS-EGFP、pCAGGS-DsRed 及び pCAGGS-M2 を用いた。

以下の6種のクローニングに関しては、個別に記す。

① トリ Pax6

トリ Pax6 は、GenBank #X70475 を参照した(ORF 1.3 kbp)。ニワトリ 4 日目胚の体幹部から精製した cDNA をテンプレートとし、以下のプライマーセットを使って、KOD (TOYOBO)を用いて PCR 反応を行い、pTRE-DsRed の MluI-EcoRV サイトに挿入した。

Forward primer; aaaaACGCGTatgcagaacagtcacagcggcgt

Reverse primer; ccggGATATCtactgtaatcttgccaatactgagaca

②③Sox3HMG-EnR 及び Sox3HMG-VP16

トリ Sox3HMG ドメインは、GenBank #U12467 を参照した(ORF 0.2 kbp)。ニワトリ 4 日目胚の体幹部から精製した cDNA をテンプレートとし、以下のプラ

イマーセットを使って、KOD (TOYOBO)を用いて PCR 反応を行い、MluI-XhoI の切断部位を付加した。

Forward primer; aaaaACGCGTatgtcggaccaggaccgggtg

Reverse primer; aaaaCTCGAGccggggccggtatttga

ハエ Engrailedドメインは、GenBank # M10017 を参照した(ORF 0.9 kbp)。当研究室に保存されていたプラスミド をテンプレートとし、以下のプライマーセットを使って、KOD (TOYOBO)を用いて PCR 反応を行い、XhoI-NheI の切断部位を付加した。

Forward primer; aaaaCTCGAGgccctggaggatcgctgc

Reverse primer; aaaaGCTAGCctaggatcccagagcagattt

VP16ドメインは、GenBank #U89963 を参照した(ORF 0.2 kbp)。当研究室に保存されていたプラスミド をテンプレートとし、以下のプライマーセットを使って、KOD (TOYOBO)を用いて PCR 反応を行い、XhoI-NheI の切断部位を付加した。

Forward primer; aaaaCTCGAGgcccccccgaccgatgtc

Reverse primer; aaaaGCTAGCctaccaccgtactcgtcaat

これらの DNA 断片を pTRE-DsRed の MluI-NheI サイトに挿入した。

④⑤Pax2-EnR 及び Pax2-VP16

トリ Pax2 は、GenBank #NM_204793 を参照した(ORF 1.1 kbp)。当研究室に保存されていたプラスミド をテンプレートとし、以下のプライマーセットを使って、KOD (TOYOBO)を用いて PCR 反応を行い、MluI-XbaI の切断部位を付加した。

Forward primer; ttttACGCGTatggatatgcaactgcaagg

Reverse primer; aattTCTAGAgtggcggtcataggcagc

ハエ VP16ドメインは、上と同様に XhoI-NheI の切断部位を付加した。

Forward primer; atatTCTAGAgccctggaggatcgctgc

Reverse primer; aaaaGCTAGCctaggatcccagagcagattt

Engrailedドメインは、上と同様に XhoI-NheI の切断部位を付加した

Forward primer; aaaaTCTAGAgcccccccgaccgatgtc

Reverse primer; aaaaGCTAGCctaccaccgtactcgtcaat

これらの DNA 断片を pCAGGS の MluI-NheI サイトに挿入した。

⑥トリ Sox2

トリ Sox2 は、GenBank #NM_205188 を参照した (ORF 0.9 kbp)。当研究室に保存されていたプラスミド をテンプレートとし、以下のプライマーセットを使って、KOD (TOYOBO) を用いて PCR 反応を行い、MluI-EcoRV の切断部位を付加した。

Forward primer; aaaaACGCGTatgtacaacatgatggaacc

Reverse primer; ggggGATATCtcacatatgtgatagaggagtg

in situ hybridization 用 RNA プローブ作製

RNA プローブ作製に必要な cDNA 断片を含むプラスミドを、T3/T7 RNA polymerase 認識配列を含むプライマーを用いて PCR で増幅し、増幅産物をテンプレートとした。これらを鋳型とし、Digoxigenin (DIG) ラベルされた dNTP (Roche)、または DNP ラベルされた dNTP (Perkin Elmer) 存在下で RNAPolymerase を 37°C で 3 時間反応させた。反応系は以下の通りである。

T3/T7 polymerase を用いた反応系 (1 サンプル/20 μ l)

- 10x DIG-labeled dNTP mix (Roche) 2.0
- 5x transcription buffer including DTT (STRATAGENE) 4.0
- RNase Inhibitor (TAKARA) 0.5
- H₂O 10.5
- cDNA テンプレート (1.0 g/l) 2.0
- T3/T7 RNA polymerase (STRATAGENE) 1.0

Whole-mount および切片を用いた in situ hybridization

Whole-mount in situ hybridization は Henrique のプロトコールを基本とし、以下の手順で行った (Henrique et al., 1995)。ステージ 8-15 の胚は、4% paraformaldehyde (PFA)/PBS (MEM; 0.1 M MOPS, 1.8 mM EGTA, 1 mM MgSO₄ · 7H₂O (pH7.4), PBS; 2.73 M NaCl, 53.7 mM KCl, 166 mM Na₂HPO₄) を用いて 4°C で一晩固定した。固定後、PBT (PBS + 0.1% Tween20) で洗浄した。RNA プローブの浸透性をあげるために、20 μ g/ml の Proteinase K (Roche) で 15 分間処理し、4% PFA/0.1% glutaraldehyde (TAAB) /PBT で 20 分間再固定した。PBT で洗浄してから hybridization buffer (ULTRAhyb™, Ambion) を用いて 68 °C で 1 時間 pre-hybridization を行った。DIG ラベルされた RNA プローブを添加し、

68°Cで一晩 hybridization を行った。余分なプローブを除くために 68 °C に温めた hybri-wash buffer (50% formamide, 5x SSC, 5 mM EDTA, 2% Tween20, 0.5% CHAPS)を用いて、30 分ずつ 2 回洗浄した。MABT (0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl, 1%Tween20 (pH7.4)に置換した後、blocking buffer I (2% Blocking Reagent (BBR,Roche), MABT)、blocking buffer II (2% BBR, 20% FBS, MABT)を用いて、それぞれ室温で 1 時間ずつブロッキングした。アルカリフォスファターゼ標識の抗 DIG 抗体 (alkaline phosphatase-conjugated anti-DIG antibody Fab fragment,ヒツジ由来, Roche)を blocking buffer IIで 2000 倍希釈し、4°Cで一晩反応させた。余分な抗体を除くために MABT を用いて 1 時間ずつ 3 回洗浄した後、NTMT (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH9.5), 50 mM MgCl₂, 0.1% Tween20)に置換し、0.45 mg/ml nitroblue-tetrazolium chloride (NBT, Roche)と 0.175 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphatase (BCIP, Roche)を添加して発色反応を行った。発色後、PBT で洗浄し、4% PFA/PBT を用いて 4°Cで 20 分間固定し、PBT で 4°Cにて保存した。

Pre-SN及び原条を標的とした in ovo electroporation

方法は、主に(Momose et al., 1999; Nakaya et al., 2004)に従い、若干の改良を加えた。ステージ 8-9(約 4-7 体節)の胚を用いて遺伝子導入を行った。卵の殻に穴をあけ注射器を用いて卵白を 5 ml 抜いた後、外科用ハサミで殻に小窓を開けた。胚を可視化するために、Hank's 液 (140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 5.6 mM glucose, 0.34 mM Na₂HPO₄, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, pH7.0)で 6 倍希釈した黒インク(HOLBEIN)を、ガラスキャピラリーを用いて胚と卵黄の間に注入した。タングステン針で胚の外側に位置するビテリン膜を破り(ガラスキャピラリーが通るくらい)、導入する遺伝子溶液 (2% Fast Green/PBS を色素として添加)を含んだガラスキャピラリーを先ほど破いた穴からビテリン膜と胚の間に差込み、ヘンゼン結節付近に滴下した。プラス電極に白金線を、マイナス電極にタングステン針を用いた。プラス電極は胚の下方にくるように卵黄の中に挿入し、DNA 溶液を滴下した領域のビテリン膜の上からマイナス電極で 4V、25 msecの電気パルス を 5回加えた。電極をはずし、卵殻に開けた小窓をテープ (Scotch™)でシールして 38.5°Cで再びインキュベートし、必要なステージになるまで発生を進めた。

結果

SN における上皮極性マーカーの局在変化の観察

SN における形態変化の指標として上皮極性因子をマーカーとして用いるため、これらの SN の進行に伴う局在の変化を観察した。ステージ 15 胚を用い、模式図の数字は観察した位置を表す(図 5A)。1 は SN 起こす細胞が間充織細胞(SN 間充織細胞)として存在している段階。2 は SN 間充織細胞が集合し Medulary code (MC)を作っている段階。3 は、MET が終了し神経管が完成している段階である。

基底膜の一種である Laminin を抗体染色したところ(図 5B, n=8)、1 の SN 間充織細胞では Laminin のシグナルが見られなかった。2 では MC の周囲に弱く局在していた。3 では、Laminin が神経管の周囲を取り巻いていた。また基底膜 Faibronectin も同様な局在変化を示した(図 5C, n=4)。

神経管の頂端側に局在する接着分子の N-cadherin に関しては(図 5D, n=9)、1 の段階から SN 間充織細胞の周囲に局在していた。2 になると N-cadherin は細胞の周囲から頂端側(MC の内側)へと移り、点状の局在パターンを示した。3 では、その局在が点状から途切れのない線状へと変わり、内腔との境界を示していた。その他、頂端マーカーとして広く用いられている aPKC は 1 及び 2 では見られず、3 の段階になって初めて頂端側に局在が見られた(図 5E, n=6)。

このような上皮極性因子の局在を見ながら、以降の解析を行っていく。

課題①Secondary neurulation を起こす間充織細胞の由来

SN 間充織細胞は後方神経板の表層の細胞に由来する

まず、SN の元となる SN 間充織細胞はどこから来るのかを調べた。これまでの組織移植による知見では、尾部領域の神経管はステージ 8 のニワトリ胚における後方神経板に由来し、さらにこの領域の細胞は中胚葉にも分化すると考えられてきた(ステージ 8 胚における組織の名称は図 6A に記す。)(Diez del Corral and Storey, 2004; Le Douarin, 2001; Le Douarin et al., 1998; Sawada and Aoyama, 1999)。しかしながら、このような移植による方法では、胚の表層に存在する上皮細胞と深層に存在する間充織細胞を区別することが困難であり、正確な由来を表していない可能性があると考えられる。そこで新たに PKH(レポーター分子を細胞膜に結合させ標識する)を用いて神経板の表層に存在する上皮細胞のみのラベリングを行った。ここでは、ガラスキャピラリーを用いて胚を傷つけないように表層の細胞のみに PKH 溶液を付着させた(図 7A)。この方法を用いて、神経板後方をラベルし(図 7B)、24 時間発生を進めたところ、ラベルされた細胞は SN 間充織細胞及び神経管(27 体節レベルより前方の PN 領域においてもラベルされた細胞が見られた。この領域が PN の前駆細胞であることは既に示されている。)(Akai et al., 2005)として存在していた(図 7C, n=6)。よって、後方神経板はこれまでの知見とは異なり、中胚葉へは分化せず、SN 間充織細胞を含む神経管になることが示された。

因みに、原条をラベルした場合には、これまでの知見通り中胚葉となった(図 7H,I)(Iimura and Pourquie, 2006)。また、胚に軽く傷をつけて深層に存在する間充織細胞を含めてラベルした場合(図 7J)、ラベルされた細胞は神経管及び中胚葉細胞へと分化した(図 7K, n=3)。このことから、これまでの細胞移植による知見は深層の細胞をも含めラベルしていた可能性が高いことがわかった。

後方神経板の中でも Laminin なしの領域 (Pre-SN 領域) に SN 間充織細胞は由来する

SN 間充織細胞の由来となる後方神経板には何か特徴があるのでしょうか？その問いを検証するために、ステージ 8 胚の連続横断切片を作製し、Laminin による抗体染色を行った(図 6B, n=2)。図 6B の数字は図 6C の模式図における胚上の位置と一致する。前方の 1-5 においては Laminin が神経板の基底側を途切れなく覆っていた。後方を観察すると、神経板の一部において Laminin の存在しない領域が見られた(7-16)。また、Laminin なしの領域は後方に行くにしたがって徐々に広がり、12 のおよそ 150um を最大とし、再び狭くなった。より後方の原条(17,18)では、これまでの知見と同様に正中付近で約 50um の Laminin なしの領域が存在した(Nakaya et al., 2008)。これらの結果を、図 6C の模式図にまとめると、ヘンゼン結節と原条の間には Laminin なし(白)のひし形の領域が存在することが明らかとなった。

このような特徴的な領域が後方神経板に存在していたことから、SN 間充織細胞は Laminin なしの領域に由来するのではないかと考えた。そこで、先ほどと同様に PKH を用いて、後方神経板の Laminin が存在する左側方の領域をラベルした(図 7F)。その結果、それらの細胞は SN 領域の神経管には含まれず、PN によって形成される神経管の左側にのみ存在していた(図 7G, n=4)。また、Laminin なしの領域が含まれるヘンゼン結節付近をラベルしたところ(図 7D)、図 7B,C と同様にラベルされた細胞は SN 間充織細胞において見られた(図 7E, n=6)。これらの結果から、SN 間充織細胞は後方神経板の中でも Laminin の存在しないひし形の領域に由来することが示された(以降この Laminin なしのひし形の領域を『Pre-SN 領域』と呼ぶ)。

Pre-SN 領域をターゲットとしたエレクトロポレーション

尾部の神経管特異的な遺伝子操作を確立するため、Pre-SN 領域をターゲットとしたエレクトロポレーションを行った。ステージ 8 胚の上に DNA 溶液を垂らし、極めて細い電極を用いて Pre-SN 領域の付近に電気を流した(図 8A)。遺伝子導入後、発生を進め観察を行うと、遺伝子導入された細胞は中胚葉へは分化せず、SN 間充織細胞を含む神経管となっていた(図 8B, n=30)。また、PKH では発生(細胞分裂)に伴って蛍光色素が薄くなってしまいうため切片上での観察は困難であったが、遺伝子導入の場合、個々の細胞の観察可能なレベルの蛍光が見られた(図 8C,D:n=6,7)。そこで、上皮極性マーカーで抗体染色行ったところ、遺伝子導入された細胞では図 5 で示した正常な胚と同様な上皮極性マーカーの局在変化が見られた(図 8C,D)。これらの結果から、Pre-SN 領域をターゲットとしたエレクトロポレーション行うことで SN 間充織細胞への遺伝子操作が可能であり、また、個々の細胞の観察も容易であることがわかった。

また、エレクトロポレーションでは、胚の表層の細胞のみに遺伝子が導入されると報告されており(Nakaya et al., 2008; Yoshino et al., 2011)、この結果は PKH の結果と同様に神経板表層の細胞が神経管にのみ分化するということを支持している。

以上の結果を図 9 にステージ 8 における Pre-SN/PN 及び原条の運命地図としてまとめた。

課題②尾部エピブラストの運命の分岐について

転写因子 Pax2 は予定中胚葉細胞を神経管へと運命変化させる

ニワトリ胚ステージ 8 において、神経前駆細胞マーカーである転写因子 Sox2 の発現を観察したところ、神経板の中でも Pre-SN 領域特異的に発現が

見られなかった(図 7L)。この結果は、これまで報告されている知見と一致する(Rex et al., 1997; Takemoto et al., 2006)。序論で述べたように、ニワトリの初期胚において、Sox2 の発現はエピブラストから神経系へと分化が決定したことを意味していることから(Papanayotou et al., 2008; Stern, 2005)、Sox2 を発現していない Pre-SN 細胞は神経系への運命が決定していないエピブラスト様の細胞であると考えられる。また、中胚葉へと分化する原条細胞も、胚内に潜り込む以前はエピブラストであると考えられている(Keller, 2005)。では、このようなエピブラスト様の細胞がどのようにして神経管及び中胚葉といった運命の違いが作られるのであろうか？

そこで、本来 SN が進行している細胞において発現している遺伝子を原条の細胞(以降より予定中胚葉細胞と呼ぶ)に強制発現させた場合、中胚葉から神経管へと運命変化が起こるのかを調べた(中胚葉特異的な遺伝子操作は既に確立されている)(Nakaya et al., 2004)。候補となる遺伝子はデータベース(Geisha)や過去の知見を参考にした。

その中で、注目した遺伝子が転写因子 Pax2 である。Pax2 は SN 間充織細胞群の中でもより尾側の領域において発現する(図 10A, n=6)。そこで、Pax2 を両方向に発現するプラスミドに EGFP と共につなぎ、予定中胚葉細胞へと発現させた(EGFP を発現している細胞は Pax2 も発現しているとみなすことができる)(図 10B)。遺伝子導入後 48 時間発生を進めた 3 日目胚を背側から観察をすると、コントロール(EGFP のみ)では、遺伝子導入された細胞は中胚葉領域において散在していた(図 10C, n=10)。それに対し、Pax2 を発現させた場合(同じ細胞で EGFP も発現する)では、遺伝子導入された細胞は神経管の両側において、頭尾軸に沿った凝集体を作った(図 10E, n=27)。横断切片を観察すると、コントロールでは遺伝子導入された細胞は、中胚葉領域において不定形な間充織細胞として存在していた(図 10D)。一方、Pax2 を導入した場合には同様な領域において丸い凝集体を形成していた(図 10F)。

さらに、上皮極性マーカーによる抗体染色を行うと、凝集体の周囲に基底膜の Laminin が取り巻いていること(図 10G, n=8)及び凝集体の内側には内腔状に頂端マーカーである N カドヘリンや aPKC が局在していることが観察された(図 10H,I: n=6,n=3)。つまり、Pax2 の遺伝子導入によって誘導された異所的な凝集体は、上皮極性をもった管構造であるといえる。

また、今回示した図では凝集体を構成する一部の細胞にのみ EGFP が存在しているように見えるが、より感度の高い DAB 染色で EGFP の存在を調べた結果、凝集体を構成する全ての細胞において EGFP が存在していることがわかった(図 10J, n=3)。このことから、Pax2 によって誘導された異所的な管構造は Pax2 を発現した細胞自立的に作られることが示された。

次に、Pax2 によって誘導された管構造の分化性質を検証した。実験に用いたステージの尾部領域では主に神経管と腎管(中間中胚葉)という管構造が存在する(Hamburger and Hamilton, 1951)。腎管においても Pax2 が発現することから、実験的に誘導された管構造は神経管又は腎管のどちらかに分化している可能性が高いと考えた。そこで、まず神経前駆細胞マーカー Sox2 及び NCAM の発現を見ると、Pax2 による管構造において発現が見られた(図 10K,O: n=5,n=6)。一方、腎管のマーカーである転写因子 Lim1 の発現は見られなかった(図 10L, n=3)。また、神経管では接着因子 N-cadherin が腎管では E-cadherin が発現しているが、Pax2 による管構造では E-cadherin ではなく、N-cadherin が発現していた(図 10M,N: n=6,n=4)。その他、後方神経管において活性化することが報告されている Sox2 の N1-エンハンサー(Kamachi et al., 2009; Takemoto et al., 2006; Uchikawa et al., 2003)が Pax2 を発現した細胞において活性化していた(図 11F)。これらの結果は一様に Pax2 による異所的な管構造は神経管へと分化していることを示している。よって、転写因子 Pax2 は予定中胚葉細胞を神経管へと運命変化させるために十分であるといえる。

Pax2 による管構造は SN と同様な過程及びタイミングで作られる

序論で述べたように、神経管は体幹と尾部とではそれぞれ PN と SN といった異なる形成様式を経て作られる (Colas and Schoenwolf, 2001; Copp and Greene, 2010)。では、Pax2 による管構造はどちらの形成過程によって作られるのであろうか？そこで、先ほどと同様に遺伝子導入を行い、24 時間発生を進めたより若い 2 日目胚を観察した。胚を背側から観察すると、3 日目胚における結果と同様にコントロールの細胞は散在しているのに対し、Pax2 を導入された細胞は頭尾軸に沿った凝集体を作っていた (図 11A,B)。次に図 11B の模式図に示す数字の位置で横断切片作成した。頂端マーカー ZO-1 で抗体染色を行った場合 (図 11C, n=2)、1 では Pax2 が導入された細胞は不定形な間充織細胞であった。また、ZO-1 のシグナルも見られなかった。2 では、遺伝子導入された細胞は凝集体を形成しており、凝集体の内側には ZO-1 が点状に局在していた。3 では、凝集体の内側に ZO-1 が内腔状に局在していたことから、Pax2 による凝集体は管構造を形成していると考えられる。また、基底膜マーカーの Laminin で抗体染色を行った場合も同様に、尾側に存在する Pax2 発現細胞では Laminin のシグナルは見られず、頭側に進むにつれて現れ始め、最終的には Pax2 による凝集体の周囲を取り巻いた (図 10D, n=2)。これらの結果から、Pax2 による管構造は、SN と同様に間充織細胞が上皮化する過程を経て形成されることが示された。

さらに、隣で進行している本来の SN の ZO-1 の局在を観察すると、Pax2 を導入された細胞と同様に 2 の段階では ZO-1 が点状に、3 では内腔状に局在した (図 10C)。また、ラミニンの局在の変化も本来の SN と似ていた (図 10D)。これらの結果から Pax2 による管構造の上皮化は本来の SN と同様なタイミングで進行すると考えられる。

以上より、Pax2 による異所的な管形成現象は、① Sox2 の発現など神経管としての分化性質を獲得している、② SN と同様に MET を経て作られる、③ 上皮

化のタイミングが本来の SN と似ている、という 3 点から SN である可能性が高いことが示された。

Pax2 は転写活性によって異所的な SN を誘導する。

Pax2 は転写活性化及び転写抑制化、両方の機能を持つことが知られている(Goode and Elgar, 2009)。では、Pax2 はどちらの働きによって、異所的な神経管を誘導するのであろうか？そこで、Pax2 に転写抑制化ドメイン Engrailed (EnR) 又は転写活性化ドメイン VP16 を付加し、予定中胚葉細胞へと遺伝子導入を行った。この方法は、転写因子の機能を調べる上で広く用いられている(Kawakami et al., 2004; Kishi et al., 2000; Uchiyama et al., 2001)。原理的には、解析の対象としている転写因子と反対の機能を持つドメインを付加した場合には、転写因子の働きが阻害され結果が大きく変わるということを指標にしている。

Pax2-EnR を発現させた場合、遺伝子導入された細胞は Pax2 を発現させた際に見られるような凝集体を作らず、中胚葉領域に散在していた(図 12A, n=5)。一方、Pax2-VP16 を発現させた場合では、Pax2 と同様な頭尾軸に沿った凝集体を作った(図 12B,C, n=6)。また、横断切片を観察すると、この凝集体は中胚葉領域において上皮管構造を形成していた(図 12D-E)。これらの結果から、Pax2 は転写活性化を介して異所的な管構造を形成していることが示された。

Pax2/5/8 グループ特異的に異所的な SN を誘導することができる

ヒトやマウスでは、Pax ファミリーの中でも Pax2 と同様なドメインを有するものとして Pax5 及び Pax8 が知られている(ニワトリでは Pax8 は見つかっていない)

(Goode and Elgar, 2009; Lang et al., 2007)。また、Pax2/5/8 グループは腎臓形成や脳の領域決定などにおいて重複した働きを担うことが報告されている(Bouchard et al., 2000; Bouchard et al., 2002)。では、Pax2 による異所神経管形成は、Pax5 によっても誘導できるのでしょうか？そこで、これまでと同様にエレクトロポレーションによって Pax5 を予定中胚葉細胞に遺伝子導入を行った。その結果、遺伝子導入後 48 時間の 3 日目胚を背側から観察すると、Pax2 と同様に蛍光を発した細胞が頭尾軸に沿って凝集体を作っていた(図 13A)。そして、横断切片を見ると、Pax5 を発現した細胞は Pax2 の場合と同様な管構造を形成していることがわかった(図 13B-D, n=4)。さらに、この管構造では神経管マーカー Sox2 の発現が見られた(図 13E)。よって、異所的な SN 誘導においても Pax5 は Pax2 と同様に機能を発揮することが示された。また、マウス Pax8 でも Pax2/5 と同様な結果を得ている(資料未記載)。

次に、この誘導現象が Pax ファミリーの中でも Pax2/5/8 特異的なものなのかを調べた。Pax ファミリーには Pax1-9 の 9 種類が存在することが知られており、有しているドメインの種類で分別すると Pax1/9、Pax2/5/8、Pax3/7 及び Pax4/6 といったグループに分けることができる(Goode and Elgar, 2009; Lang et al., 2007)。今回はその中でも、Pax3 と Pax6 を用いて予定中胚葉細胞へと遺伝子導入を行った。その結果、Pax3、Pax6 共に異所的な管形成は起こらなかった(図 13F-I: n=3, n=5)。これらの結果は、Pax ファミリーの中でも Pax2/5/8 グループのみが異所的な SN を誘導することができる可能性が高いことを示している。

SN を起こすためには転写因子 Tbx6L の発現を抑える必要がある

ニワトリ胚ステージ 8 の予定中胚葉細胞に Pax2 を発現させると、本来中胚葉になる予定の細胞が神経系の細胞へと運命変化することを上で示した。で

は、神経系へと運命変化した細胞では、本来発現するはずの中胚葉因子の発現はどうなっているのでしょうか？そこで、未分節中胚葉（体節が形成される以前の中胚葉）において発現する転写因子 Tbx6L に注目した。Tbx6L は過去の知見どおりに未分節中胚葉で発現する(Knezevic et al., 1997) (GEISHA Id:Tbx6q) (図 14A, n=15)。また、横断切片を見ると、SN が進行している領域においては Tbx6L の発現が見られなかった(図 14A1-3)。では、Pax2 によって誘導された管構造において、本来発現するはずの Tbx6L はどうなっているのでしょうか？

コントロールでは、遺伝子導入された細胞(茶)は Tbx6L の発現を示すシグナル(紺)が重なっていた(図 14B, n=3)。一方、Pax2 を発現させた場合、遺伝子導入された細胞(茶)では本来重なるはずの紺色の色素が見られなかった(図 14C)。よって、Pax2 を予定中胚葉細胞に発現させると本来発現するはずの Tbx6L の発現が抑制されることが示された。また、Pax2 は転写活性化によって SN を誘導するという結果から(図 12)、Tbx6L の発現抑制は Pax2 によって直接的に行われるのではなく、Pax2 の下流の因子によるものと考えられる。

次に、Tbx6L の発現抑制が管構造を作るために必要なかを調べた。そこで、予定中胚葉細胞に対して Pax2 及び Tbx6 の共導入を行った。Tbx6L のプラスミドはゲノム上の Tbx6L のプロモーターやエンハンサーとは独立していることから、Pax2 の存在下においても Tbx6L を恒常的に発現することができる。両遺伝子の共導入を行った胚を背側から観察したところ、Pax2 単独の場合に誘導されるような頭尾軸に沿った凝集体は見られなかった(図 14D,E, n=4)。また 3 日目胚の横断切片を見ると、図 10 では Pax2 単独の場合では管構造を作ったのに対し、Pax2 と Tbx6L を共導入された細胞は間充織細胞として存在していた(図 14F, n=5)。これらの結果から Pax2 の下流因子による Tbx6L の発現抑制が異所的な SN を誘導するために必要である可能性が示された。

また、Tbx6L の発現抑制が本来の SN においても必要なのかを調べるために、Pre-SN 領域に対して Tbx6L の強制発現を行った。その結果、PN 領域においては少数ではあるが遺伝子導入された細胞は正常な上皮細胞の形態を保っていた(図 14H, n=5)。しかしながら、SN 領域においては蛍光を発している細胞そのものが全く見られなかった(図 14H,I)。SN 領域において Tbx6L を発現している細胞が見られない原因として細胞死が考えられるが、現在のところそれを示す結果は得られていない。いずれにせよ Tbx6L を発現した細胞が SN 領域において存在できないという結果は、本来の SN においても Tbx6L の発現抑制が必要であることを示唆している。

課題③SN 間充織細胞が神経管構造を作る仕組みについて

SN における MET には Sox2 の働きが必要であるが、十分ではない。

まず SN の MET と伴に転写因子 Sox2 の発現上昇が見られたため(図 15A, n=3)、Sox2 は SN の形態形成に関わっているのではないかと考えた。これまで、Sox2 はエピブラストから神経系への分化に必要であること及び、神経管へと分化した後においては神経前駆細胞の未分化性の維持に必要であることが示されている(Graham et al., 2003; Kishi et al., 2000)。では、神経系への分化性質の獲得に必要な Sox2 を阻害すると SN 間充織細胞はどうなるのであろうか？

今回の実験では、SoxB1 ファミリーをまとめて機能阻害することで知られている Sox3HMG-EnR(Sox3 の HMG ドメインに転写不活性化ドメインである Engrailed ドメインを付加したもの)(Bylund et al., 2003)を用いた。コントロール(DsRed)胚を背側から観察した場合、神経管の細胞は頭尾軸に垂直な二列の規則正しい配列をしている(図 12)。また、Sox3HMG-VP16(Sox3 の HMG ドメインに転写活性化ドメインを付加させたもの)でもコントロールと同様であっ

た(図 15E, n=5)。一方で、Sox3HMG-EnR を発現させた場合、PN の領域ではコントロールと同様な規則正しい配列をしていたのに対し、SN においては頭尾軸に沿った凝集体が神経管の中央に見られた(図 15F, n=8)。このサンプルの横断切片を観察すると、PN 領域では正常どおり上皮極性を形成している細胞が存在してした(図 15G,H)。それに対し、SN の領域においては Sox3HMG-EnR を導入された細胞は神経管から排除され表皮と神経管との間に凝集体を形成していた(図 15I,J, n=3)。さらに、この凝集体では、Laminin や aPKC といった上皮極性マーカーの局在は見られなかったことから、MET が阻害されていることがわかった。この結果から、本来の SN における上皮化には Sox2 の転写活性化を介した働きが必要であることが示された。

また、Pax2 による異所的な管形成においても Sox2 の働きが必要なのかを調べた。図 11B において Pax2 のみを遺伝子導入された細胞は頭尾軸に沿った明瞭な凝集体を作ったのに対し、Pax2 及び Sox3HMG-EnR を共導入された細胞によって作られた凝集体は不明瞭な形をしていた(図 15C, n=5)。また、ここで作られた凝集体では上皮極性が見られなかった(図 15D)。よって、Pax2 によって作られる管構造に関しても本来の SN と同様に Sox2 の転写活性化を介した働きが必要であることが示された。

さらには、Pax2 の下流で発現する Sox2 のみによって SN が誘導されるのではないかと考え、Sox2 の強制発現を行った。しかしながら、Sox2 を発現した細胞は凝集体を形成してはいたが上皮極性を形成していなかった(図 15B, n=5)。よって、Sox2 単独の発現では Pax2 のような SN の誘導に十分ではないことが示唆された。

SN における MET にはアクチン骨格制御因子である Rho ファミリーの制御が重要である

次に、細胞の形態変化や移動に重要であることで有名なアクチン細胞骨格制御因子 Rho ファミリー (Rac1 と Cdc42) に注目した (Etienne-Manneville and Hall, 2002; Jaffe and Hall, 2005)。これまでのイヌ腎臓細胞由来の MDCK 細胞を用いた知見では Rac1 及び Cdc42 の働きが上皮化に必要であることが示されている (Martin-Belmonte et al., 2007; O'Brien et al., 2001)。しかしながら、当研究室から報告した体節形成における MET では、Cdc42 の機能阻害は積極的に上皮化を進めるといった逆の結果を示している (Nakaya et al., 2004)。では、SN の MET においてはどのようなのであろうか？

そこで、SN と Rho ファミリー (Rac1 及び Cdc42) との関係調べるために、これらの優勢阻害型 (Dominant negative: DN) 及び恒常活性型 (Constitutive active: CA) を Pre-SN 領域に強制発現させた (以前体節研究に用いられた変異遺伝子と同様なものを用いた)。遺伝子導入後ステージ 15 まで発生を進めた胚の横断切片を作製し、観察を行った。DN-Rac1 を発現させた場合 (図 16A, n=12)、遺伝子導入された細胞は 1 において SN 間充織細胞として存在していた。2 では、これらの細胞は遺伝子導入がなされていない細胞に取り囲まれるように Medulary code (MC) の内側で凝集した。3 の MET が終了する段階においても、遺伝子導入された細胞は不定形であり、上皮極性マーカーの局在もほとんど見られなかった。また、CA-Rac1 を発現させた場合においても (図 16B, n=15)、DN-Rac1 と同様な細胞の挙動をとり MET に異常が見られた。このように SN 間充織細胞は Rac1 を活性化又は不活性化した際に同様な細胞挙動を見せることから、SN の MET には Rac1 の適度な活性が必要であることが考えられる。

Cdc42 に結合する N-WASP の CRIB ドメイン (Cdc42 に結合し Cdc42 の機能を優勢阻害する: N-WASP-CRIB) を発現させた場合 (図 16C, n=12)、遺

伝子導入された細胞は本来の SN 細胞と同様に MET を起こし、ほぼ正常な神経管を形成した。一方、CA-Cdc42 を発現させた場合 (図 16D, n=17)、1 及び 2 では、EGFP の蛍光を発している細胞はほとんど見られなかった。3 では、神経管の内腔において遺伝子導入された少数の細胞が見られたが、それらの細胞は明らかに上皮様の形態をとっていないかった。これらの結果から、SN の MET は Cdc42 の活性が低く抑えられていることが重要であると考えられる。

これらの結果は体節形成における Rho ファミリーの働きと一致し、SN と体節は同様な機構によって MET を制御している可能性が示唆された。

Rac1 を阻害された SN 細胞は神経提細胞様に分化する

最後に、上皮形成を阻害された細胞はその後どうなるのかを調べた。そこで、変異遺伝子を導入した胚を 3 日目まで発生を進め観察を行った。その結果、Sox3HMG-EnR、CA-Rac1 又は CA-Cdc42 の場合では、遺伝子導入された細胞は 3 日目胚においても異常な凝集体のままであった (資料未記載)。一方、DN-Rac1 を導入した胚を背側から見ると蛍光を発している細胞が神経管から側方に向かって飛び出しているように見えた (図 17A, n=5)。横断切片にすると、蛍光を発している細胞は神経管を構成する上皮細胞には含まれず、神経管と表皮の Laminin の間に存在していた (図 17B, n=2)。また、幾つかの細胞は腹側へ向かって移動しているように見えた。このような細胞の挙動は神経提細胞ときわめて似ている。そこで、神経提細胞のマーカーである HNK1 で抗体染色を行ったところ、蛍光を発している細胞において HNK1 の存在が観察された (図 17C, n=1)。これらの結果から、DN-Rac1 によって MET を阻害された SN 細胞は神経提細胞へと分化する可能性が示された。

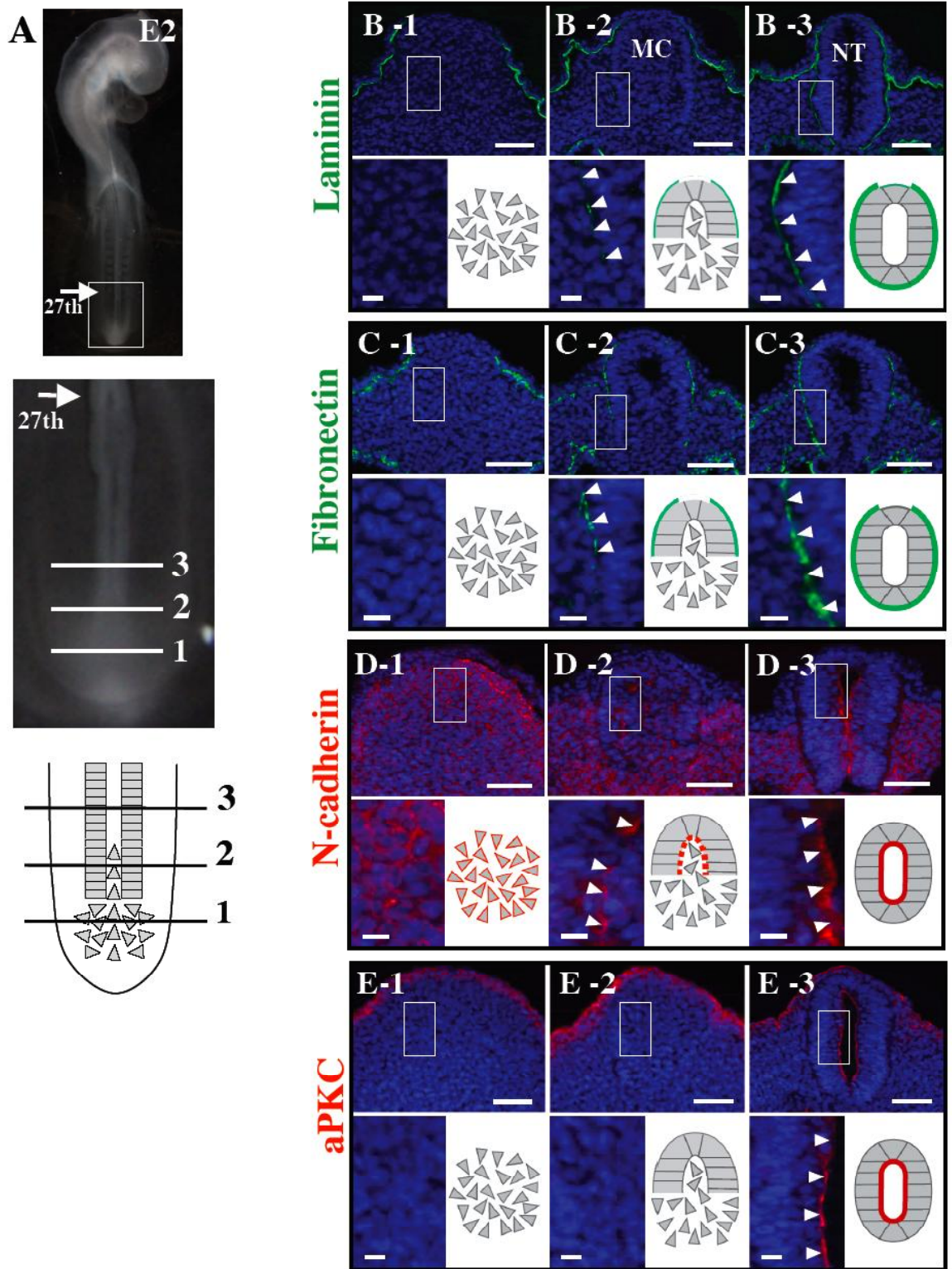


図5. SNにおける上皮極性マーカーの局在変化

(A) 2日目胚 (ステージ15) を背側からみた画像。胚の位置を示すレベル1-3はB-Eの数字と一致する。(B-E) レベル1-3の横断切片。(B) Lamininの局在。(C) Fibronectinの局在。(D) N-cadherinの局在。(E) aPKCの局在。それぞれの画像の四角で囲った領域の拡大したものを左下に示している。スケールバー: 50um、10um (拡大図)。27th (27体節レベル) ; MC (Medurally code) ; NT (神経管:Neural tube)

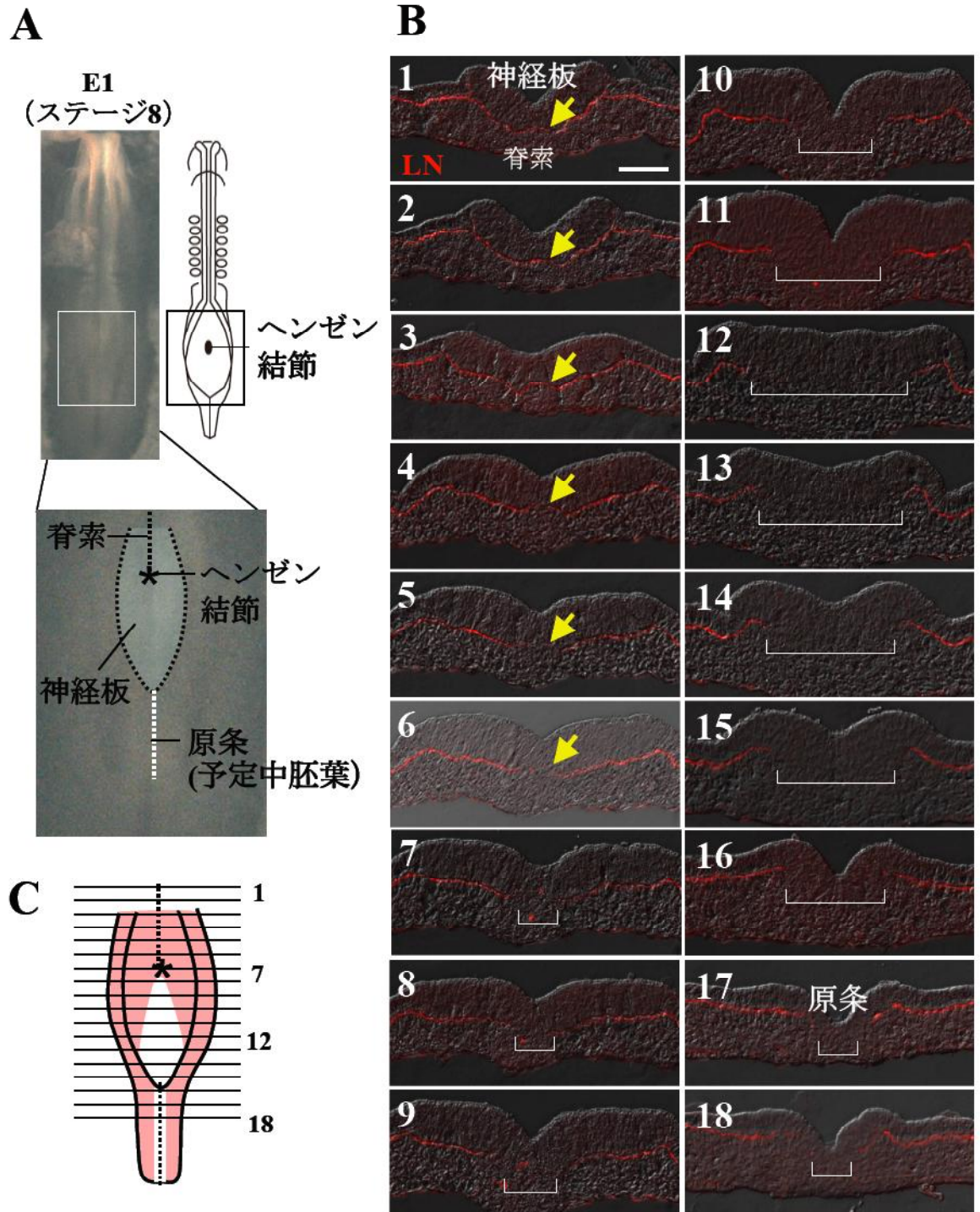


図6. 後方神経板の中にはLamininを有していない領域が存在する

(A) 1日目胚 (ステージ8) の胚を背側から見た画像。胚表層には神経板 (水色) 及び原条 (白点線) が存在する。(B) 胚の連続横断切片。1から6までは神経板の基底側でLamininが途切れなく存在している (黄矢印)。一方、7から18ではLamininの存在しない領域 (白角括弧) が存在する。17及び18は原条にあたる。(C) 胚後方を背側から見た模式図。数字は連続横断切片の番号と一致し、ピンクはLamininが存在する領域、白はLamininが存在しない領域を意味する。スケールバー: 50um。LN (Laminin)

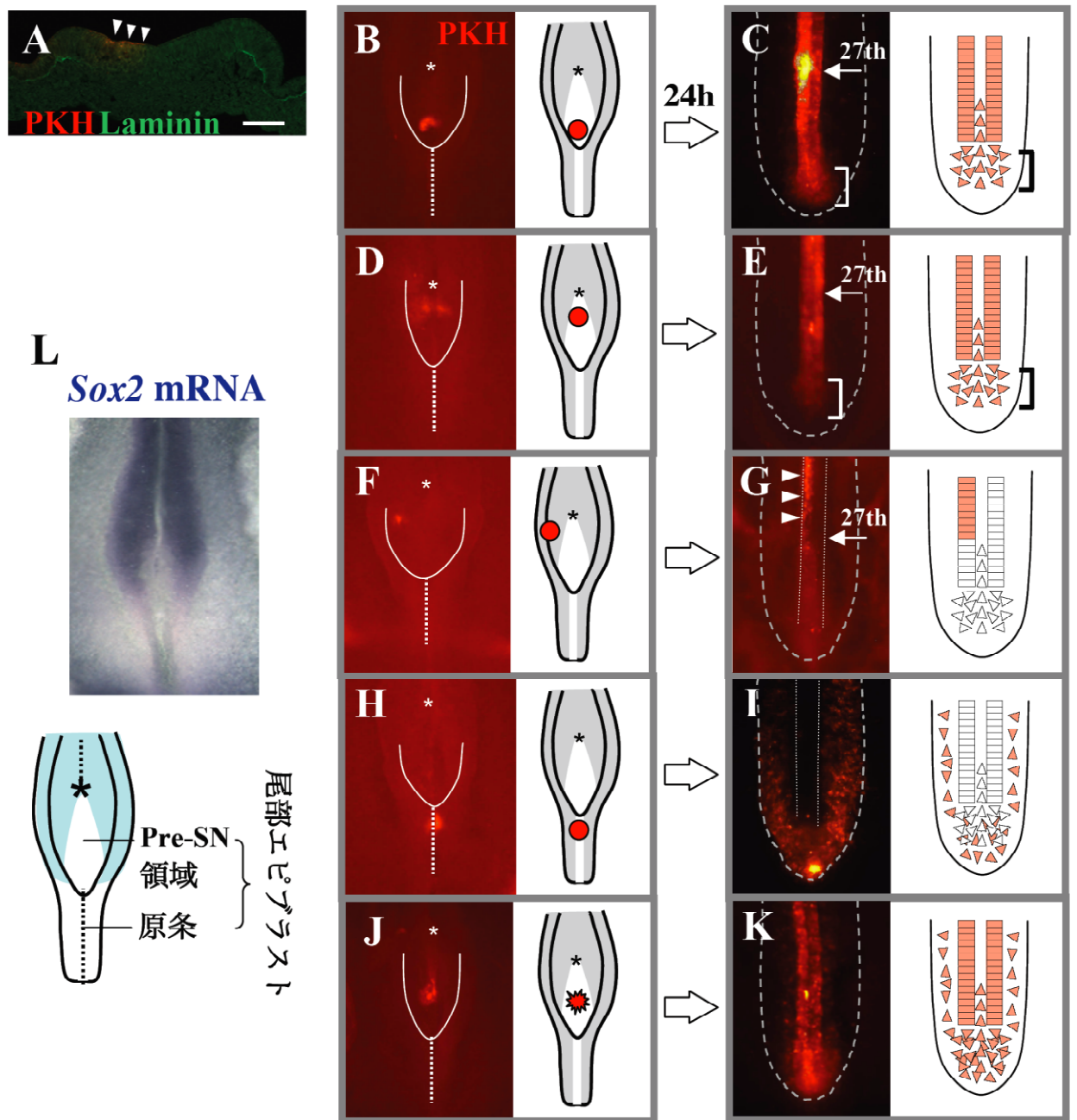


図7. SN間充式細胞は後方神経板のLamininなしの領域（Pre-SN領域）に由来する。

(A) PKH26溶液を神経板に付着させると、表層の細胞がラベルできる（矢頭）。スケールバー：50um。 (B-K) ステージ8の胚にPKH26を付着させ、24時間後のE2胚においてラベルされた細胞の分布を観察した。 (B, D) Lamininが存在しない領域の後方(B)及び前方 (D) をラベルした場合、それらの細胞は後方の神経管及びSN間充織細胞（白角括弧）へと分化した (C, E)。 (F) 後方神経板の左側方をラベルした場合、PNによって作られる神経管の左側となった (G)。 (H) 原条をラベルした場合、それらの細胞は中胚葉へと分化した (I)。 (J) 後方神経板の深層の細胞も含めラベルした場合、それらの細胞は神経管及び中胚葉へと分化した (K)。 (L) 神経前駆細胞マーカーである転写因子Sox2のmRNAは後方神経板のLamininなしのPre-SN領域において発現していなかった。 27th (27体節レベル)

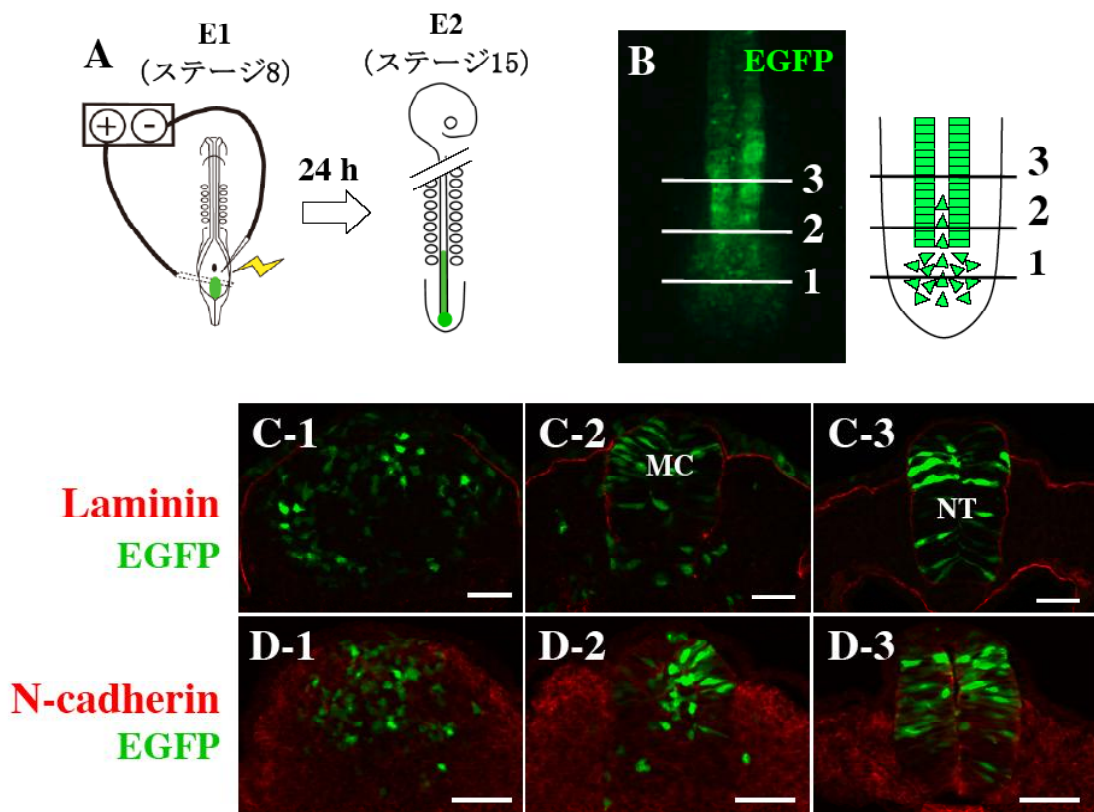


図8. Pre-SN領域をターゲットとしたエレクトロポレーション法による遺伝子導入

(A) ステージ8胚のPre-SN領域をターゲットとしてエレクトロポレーションを行いEGFP遺伝子を導入した。その後、24時間発生を進め観察を行った。(B) EGFPの蛍光が後方神経管及びSN間充織細胞において見られた。レベル1から3はCとDの数字と一致する。(C, D) 連続横断切片を作製し、Laminin又はN-cadherinによる抗体染色を行った。遺伝子導入された胚では正常通りSN間充織細胞が背側から腹側に向かってMETを起こし、神経管を形成した。スケールバー：50um。MC (Medurally code) ; NT (神経管:Neural tube)

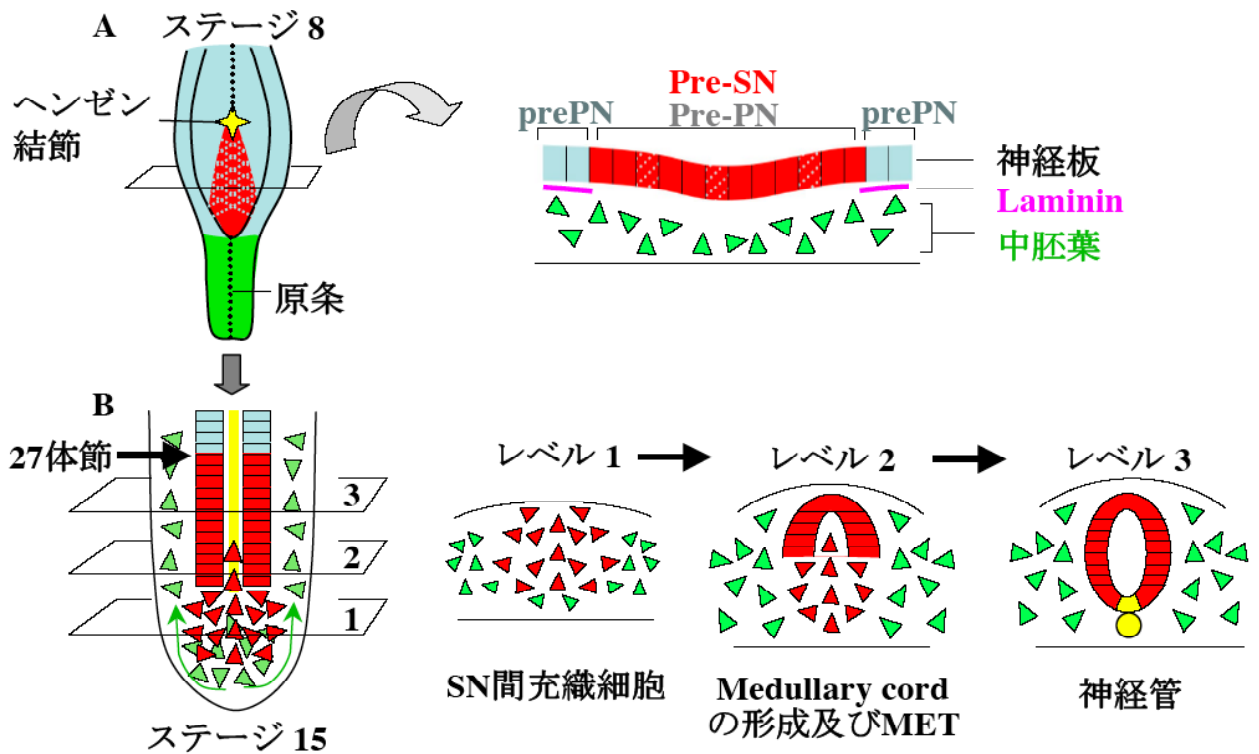


図9. ステージ8におけるPre-SN/PN及び原条の運命地図

(A) ステージ8において、後方神経板に存在するLamininなしのPre-SN領域（赤）はSN間充織細胞及びSNを介した神経管となる。Laminin有りのPre-PN領域（水色）はPNを経て神経管を作る。また、Pre-SN領域にはPre-PN細胞も含まれる（水色点線）。原条の細胞（緑）はこれまでの知見通り中胚葉となる。(B) ステージ15胚の尾部先端ではPre-SN領域から潜り込んだ細胞（赤）が間充織細胞として存在する。SN間充織細胞は背側から腹側に向かってMETを起こし、神経管を形成する。また、これまでに脊索と神経管の底板（ともに黄）はヘンゼン結節（Cord neural hinge）に由来することが報告されている(Le Douarin et al., 1998; Ledouarin et al., 2001)。

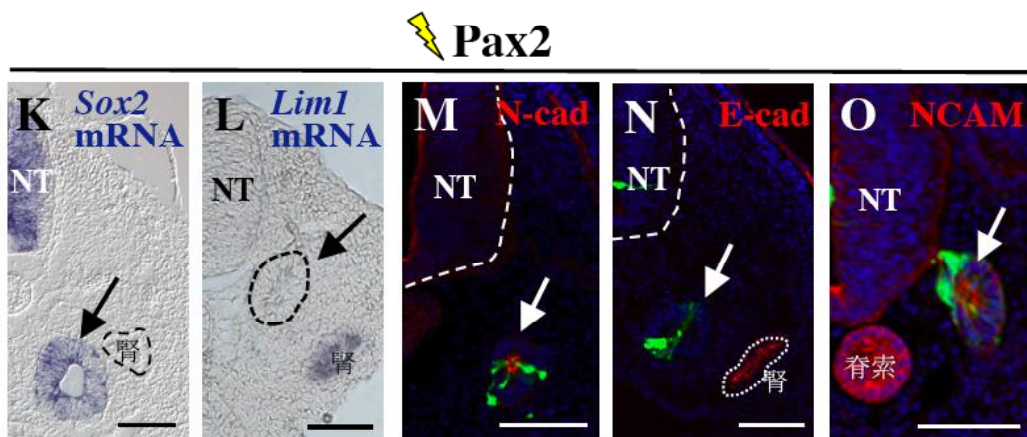
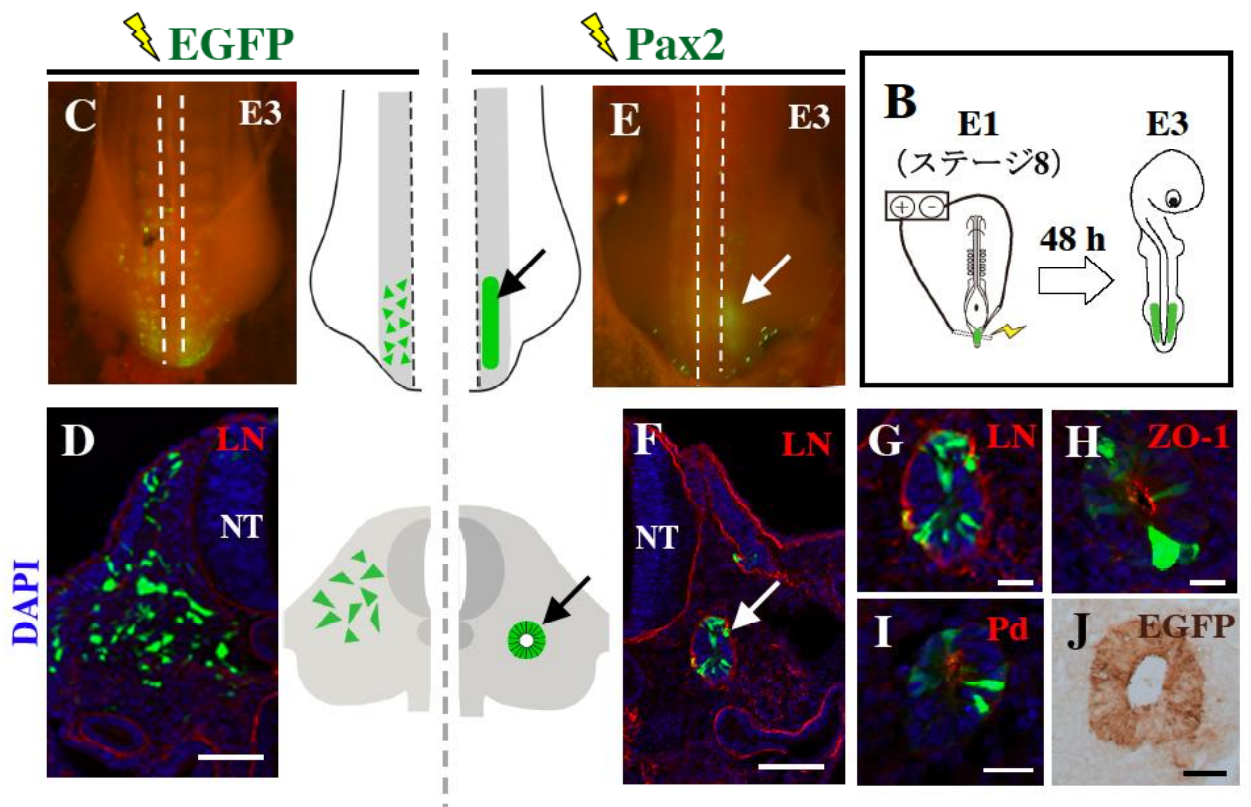
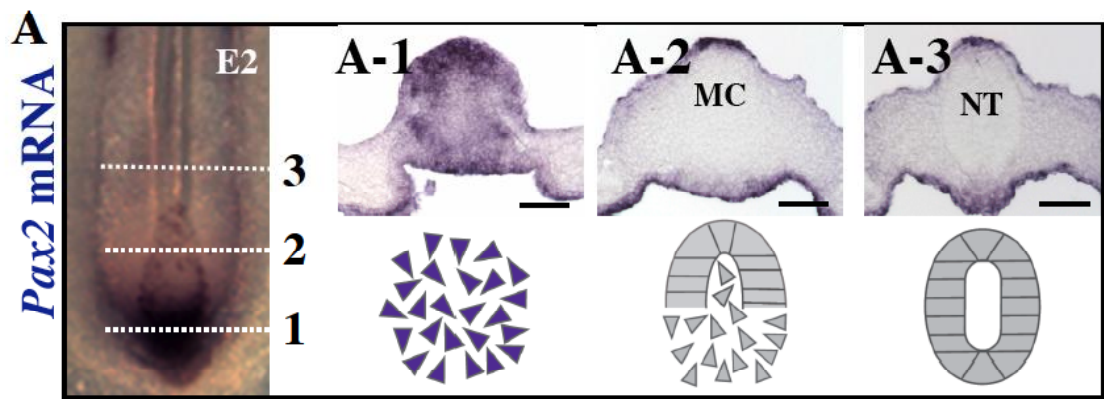


図10. 転写因子Pax2は予定中胚葉細胞（原条）を神経管へと運命変化させる

(A) E2胚のSN間充織細胞において転写因子Pax2が発現する。Pax2の発現はSN間充織細胞の中でも後方に存在する細胞においてのみ見られる。(B) Pax2をステージ8の原条（予定中胚葉細胞）に強制発現させ、48時間後に観察を行った。両方向に発現するプラスミドを用いているため、EGFP（緑）を発現している細胞はPax2を発現していると思なすことができる。(C, D) EGFPのみ（コントロール）を発現させた場合、3日目胚を背側から観察するとEGFPを発現した細胞は神経管（点線の間）の両脇に当たる中胚葉領域において散在していた（C）。横断切片を観察するとこれらの細胞は典型的な間充織細胞として存在していた（D）。(E-O) Pax2を発現させた場合。遺伝子導入された細胞は神経管の脇に頭尾軸に沿った凝集体を形成していた（E）。横断切片を観察するとPax2を発現した細胞群は丸い凝集体を形成していた（F:矢印）。（G-H）Pax2による凝集体の拡大図。基底膜マーカーのLaminin(LN)が凝集体の周囲に（G）、頂端マーカーのZO-1及びPhalloidin (Pd) が内腔状に（H, I）局在していることから、Pax2によって誘導された凝集体は上皮管構造を形成していると考えられる。F-Iでは管構造を構成する一部の細胞でのみEGFPを発現している様に見えるが、より感度の高いDAB染色（Poly）を行うと管構造を構成する全ての細胞においてEGFPが存在することがわかった（J）。このことからPax2による細胞自立的な働きによって、異所的な管構造が作られることが示された。（K-O）異所的な管の分化性質を調べた。Pax2による管構造では神経管マーカーSox2及びNCAMが発現していた（K, O: 矢印）。一方、腎管（腎）マーカーLim1の発現は見られなかった（L: 矢印）。また、神経管における接着因子N-cadherin(N-cad)の発現が見られ、腎管において発現するE-cadherin (E-cad) は見られなかった（M, N: 矢印）。これらの結果から、Pax2は中胚葉になる予定の細胞を神経管へと運命変化させることが示された。スケールバー：50um、20um（拡大図）。MC (Medurally code) ; NT (神経管:Neural tube)

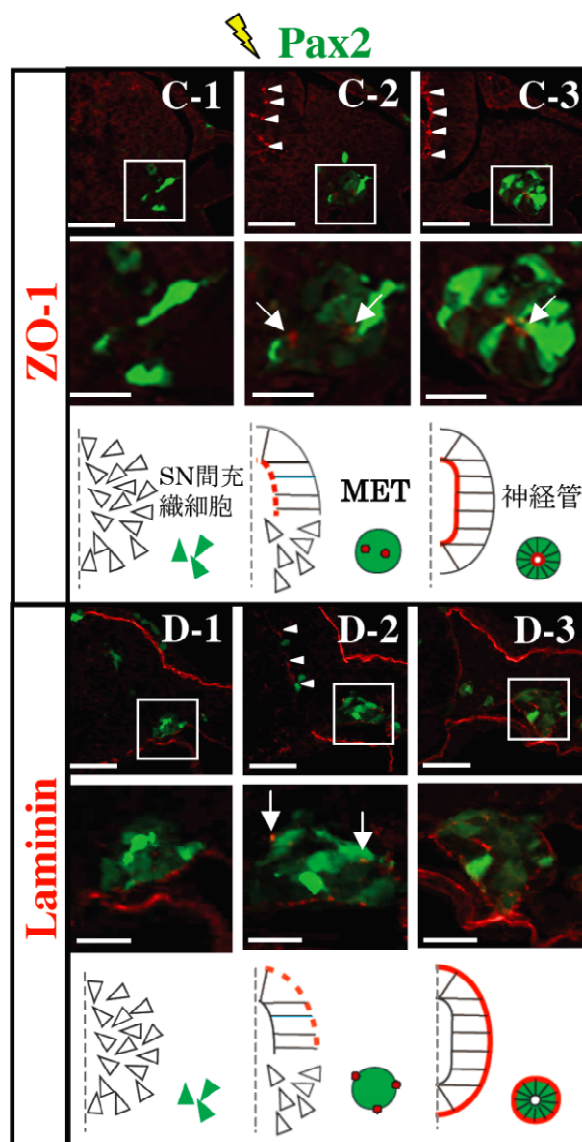
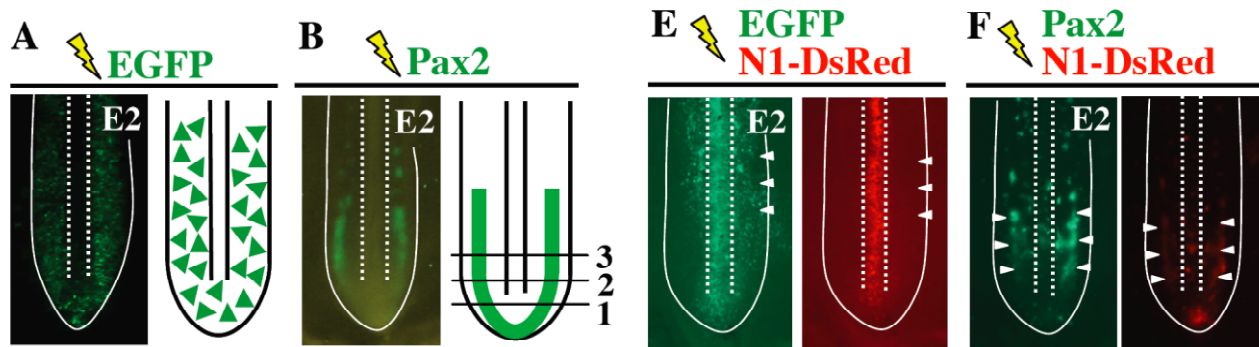


図11. Pax2による管構造はSNと同様な過程 (MET) 及びタイミングによって作られる。また、Pax2を発現した細胞ではSox2-N1エンハンサーの活性が上がる。

(A, B) 遺伝子導入しE2胚を背側から見た画像。EGFPのみを発現させた場合、遺伝子導入された細胞は中胚葉領域に散在していた

(A)。それに対し、Pax2を発現させた場合には遺伝子導入された細胞は中胚葉領域において頭尾軸に沿った凝集体を作った (B)。Bの位置を表す数字はC、Dの数字と一致する。

(C, D) Pax2を強制発現させた胚の横断切片。(C) 頂端マーカーZO-1 (赤) による抗体染色。C-1ではPax2を発現した細胞 (緑) は間充細胞として存在していた。C-2ではこれらの細胞は凝集体を作り、その内側においてZO-1の点状の局在が見られた (矢印)。C-3では、ZO-1の局在が内腔状になっていた (矢印)。

これらの結果から、Pax2による管構造はMETを経て作られることが示された。また、C-2及びC-3では、本来のSNにおいても同様なZO-1の局在が見られたことから (矢頭)、Pax2の凝集体におけるMETは本来のSNと同様なタイミングで進行することが示された。(E) 基底膜マーカーLaminin (赤) を用いた抗体染色。Dと同様に前方に行くに従ってLamininのシグナルが見え始め (矢印)、最終的にはPax2による凝集体の周囲をLamininが取り囲んだ。また、その局在の変化は本来のSNでも同様であった (矢頭)。

(E, F) Sox2-N1エンハンサーの活性を調べた。EGFPを発現している細胞は遺伝子導入された細胞であること、DsRedを発現している細胞はN1エンハンサーの活性が上がっていることを示す。(E) 本来N1エンハンサーは神経管 (点線の間) において活性化し、中胚葉の細胞では活性が見られない (矢頭)。一方、(F) Pax2を発現させた場合には、中胚葉領域に形成されたPax2による凝集体において、N1エンハンサーの活性の上昇が見られた (矢頭)。スケールバー：50um、20um (拡大図)。

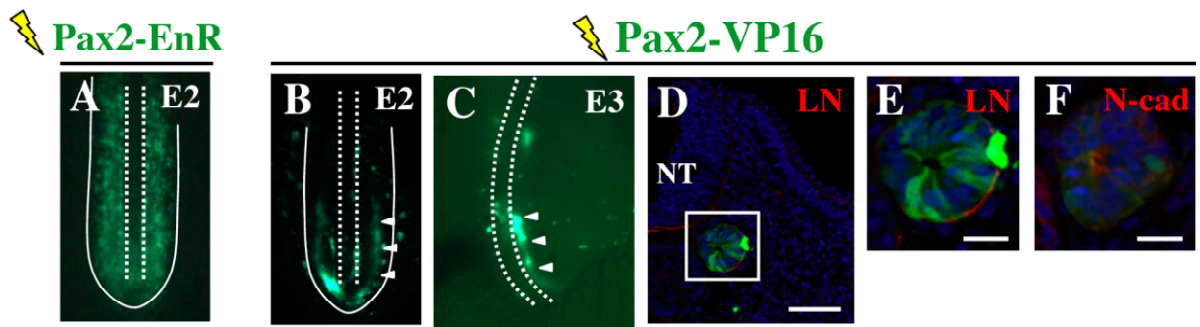


図12. Pax2は転写活性化を介して異所的な管構造を形成する

(A) Pax2-EnRを発現させた場合、遺伝子導入された細胞は中胚葉領域において散在していた。一方、(B-F) Pax2-VP16を発現させた場合では、Pax2を発現させた場合と同様に頭尾軸に沿った凝集体が形成された (B, C: 矢頭)。また、Lamininが凝集体の周囲に (D, E)、N-cadherinが内腔状に (F) 見られたことから上皮管構造であることがわかる。スケールバー: 50um、20um (拡大図)。NT (Neural tube) ; LN (Laminin) ; N-cad (N-cadherin)

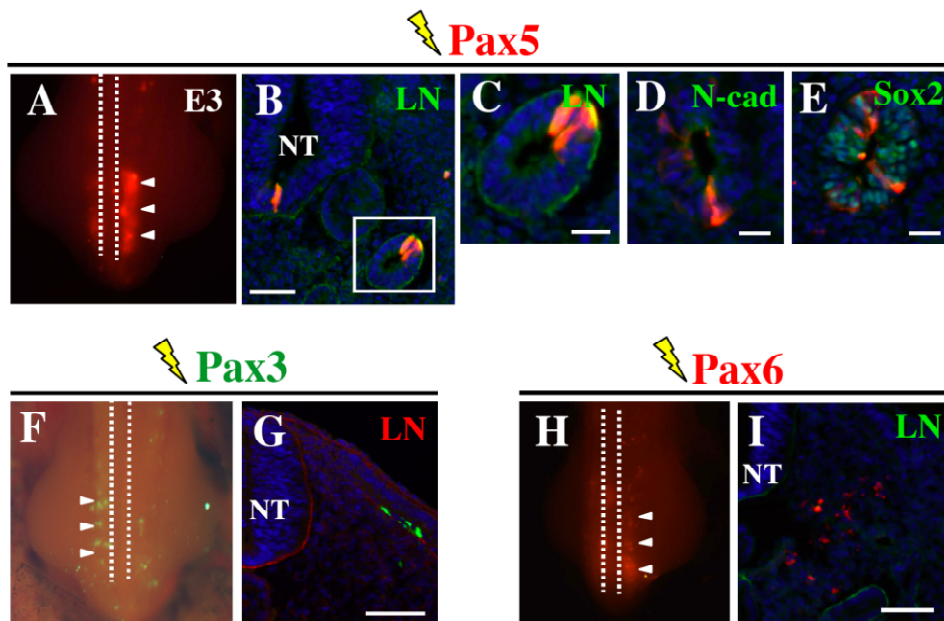


図13. Pax5はPax2と同様に異所的な神経管を誘導する

(A) Pax5を発現させた場合では、Pax2の場合と同様に頭尾軸に沿った凝集体が形成された (矢頭)。また、Lamininが凝集体の周囲に (B, C)、N-cadherinが内腔状に (D)、さらにはSox2の発現が (E) 見られたことから神経管であると考えられる。Pax3 (F, G) 及び Pax6 (H, I) を発現させた場合では、管構造は形成されなかった。スケールバー: 50um、20um (拡大図)。NT (神経管:Neural tube) ; LN (Laminin) ; N-cad (N-cadherin)

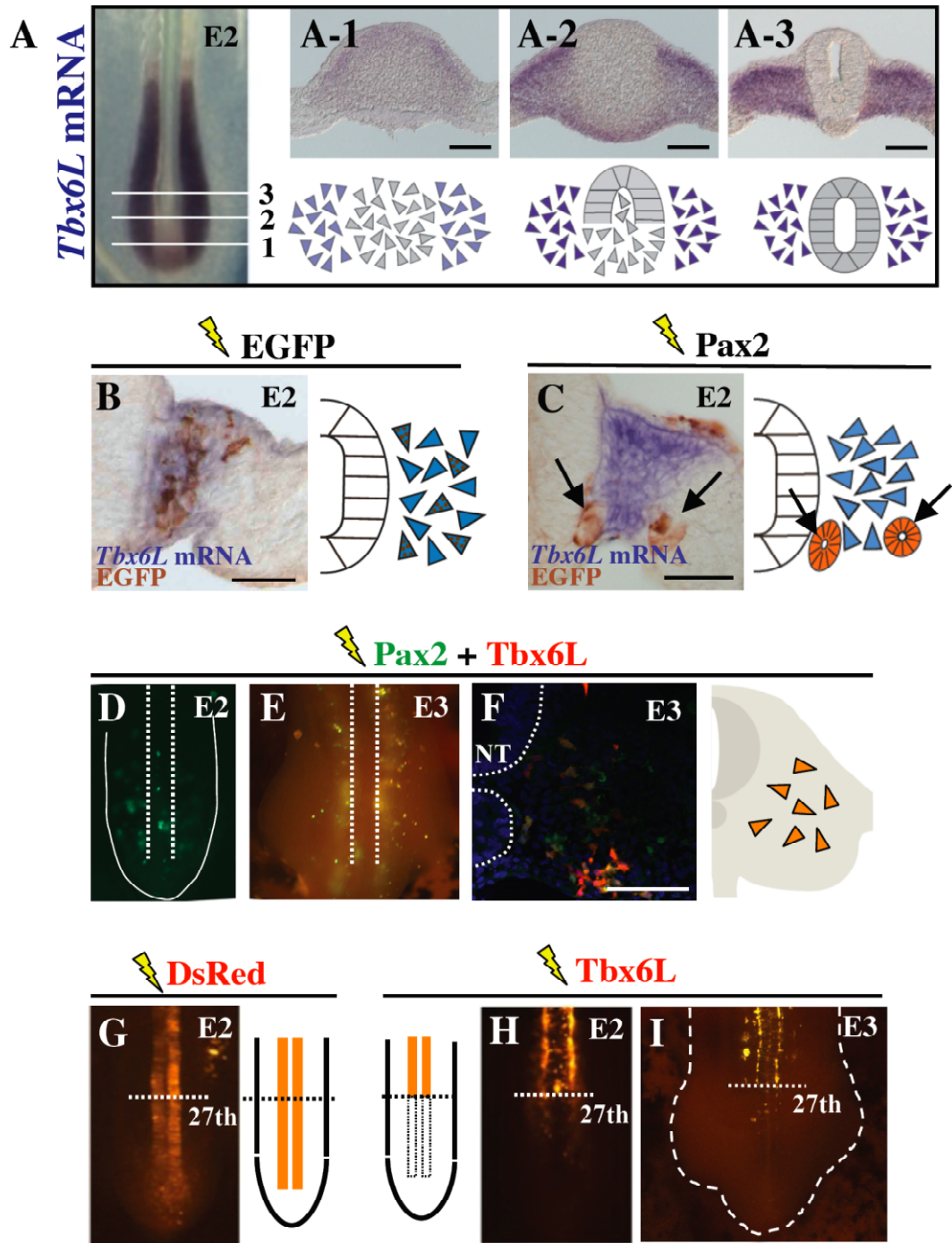


図14. SNを起こすためには転写因子Tbx6Lの発現を抑制する必要がある

(A) *Tbx6L*は未分節中胚葉において発現する。(B) EGFPを予定中胚葉細胞に発現させた場合、EGFP (茶) と *Tbx6L* mRNA (青) のシグナルは重なって見える。一方、(C) Pax2を発現させた場合、EGFPが存在する凝集体では *Tbx6L* mRNAのシグナルが重なって見られない。よって、Pax2を発現させた細胞では本来発現するはずの *Tbx6L* の発現が抑制されていることが示された。(D-F) Pax2と *Tbx6L* を予定中胚葉細胞に共発現させた。E2胚において、遺伝子導入された細胞は複数の丸い凝集体を作っていた (D)。E3胚において、これらの細胞は管構造を作ることなく間充織細胞として存在した (E, f)。(G-I) Pre-SN領域をターゲットとして遺伝子を強制発現させた。 *Tbx6L* を発現させた場合、2日目胚において遺伝子導入された細胞はPNの領域においてのみ見られた (H)。3日目胚でも後足より後方では遺伝子導入された細胞は見られなかった (I)。スケールバー：50um。

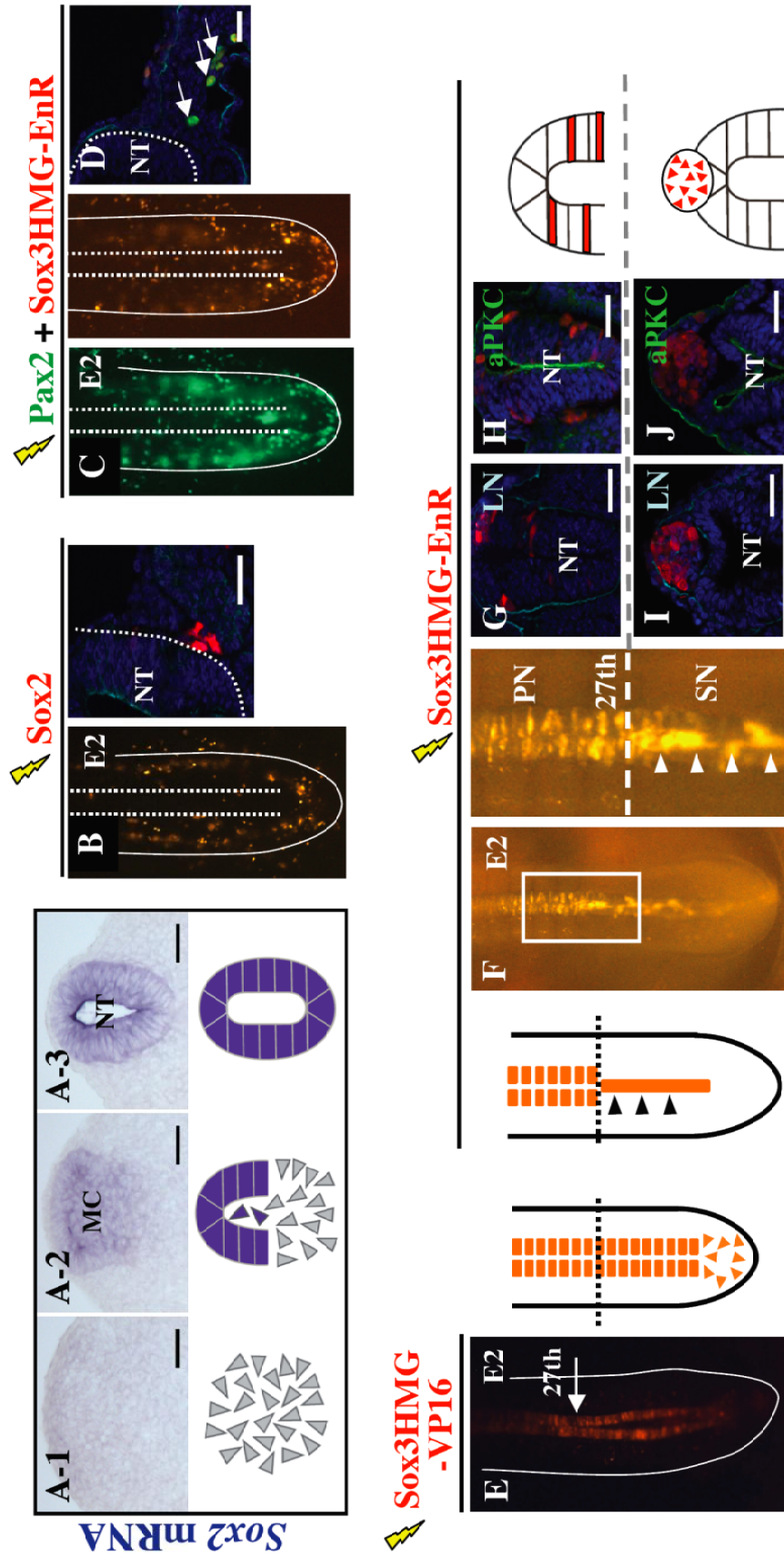


図15. SNにおけるMETにはSox2の転写活性化を介した働きが必要である

(A) 転写因子Sox2はSNにおけるMETに伴い発現が上昇する。(B) Sox2を中胚葉に発現させても、遺伝子導入された細胞は上皮極性は形成しないかった。(C, D) Pax2とSox3HMG-EnRを中胚葉に共発現させて作られた凝集体は不明瞭な形をしていて(C)。また、ここで作られた凝集体では上皮極性が見られなかった(D)。(E) Sox3HMG-VP16をPre-SN領域をターゲットとし発現させた場合、コントロール(図14-G)と比較しても形態的な異常は見られない。(F-J) Sox3HMG-EnRを同様に発現させた場合。(F) 胚を背側から観察すると、遺伝子導入された細胞はPN領域にほぼ正常な形態であったが、SN領域では神経管の中央部分において頭尾軸に沿った凝集体が見られた(矢頭)。(G, H) PN領域における横断切片を観察すると、遺伝子導入された細胞はほぼ正常であった。一方、(I, J) SN領域においては、Sox3HMG-EnRを発現した細胞は神経管の背側に排除され、さらには上皮極性の形成が阻害されていた。スケールバー: 30 μ m。NT (神経管; Neural tube) ; LN (Laminin)

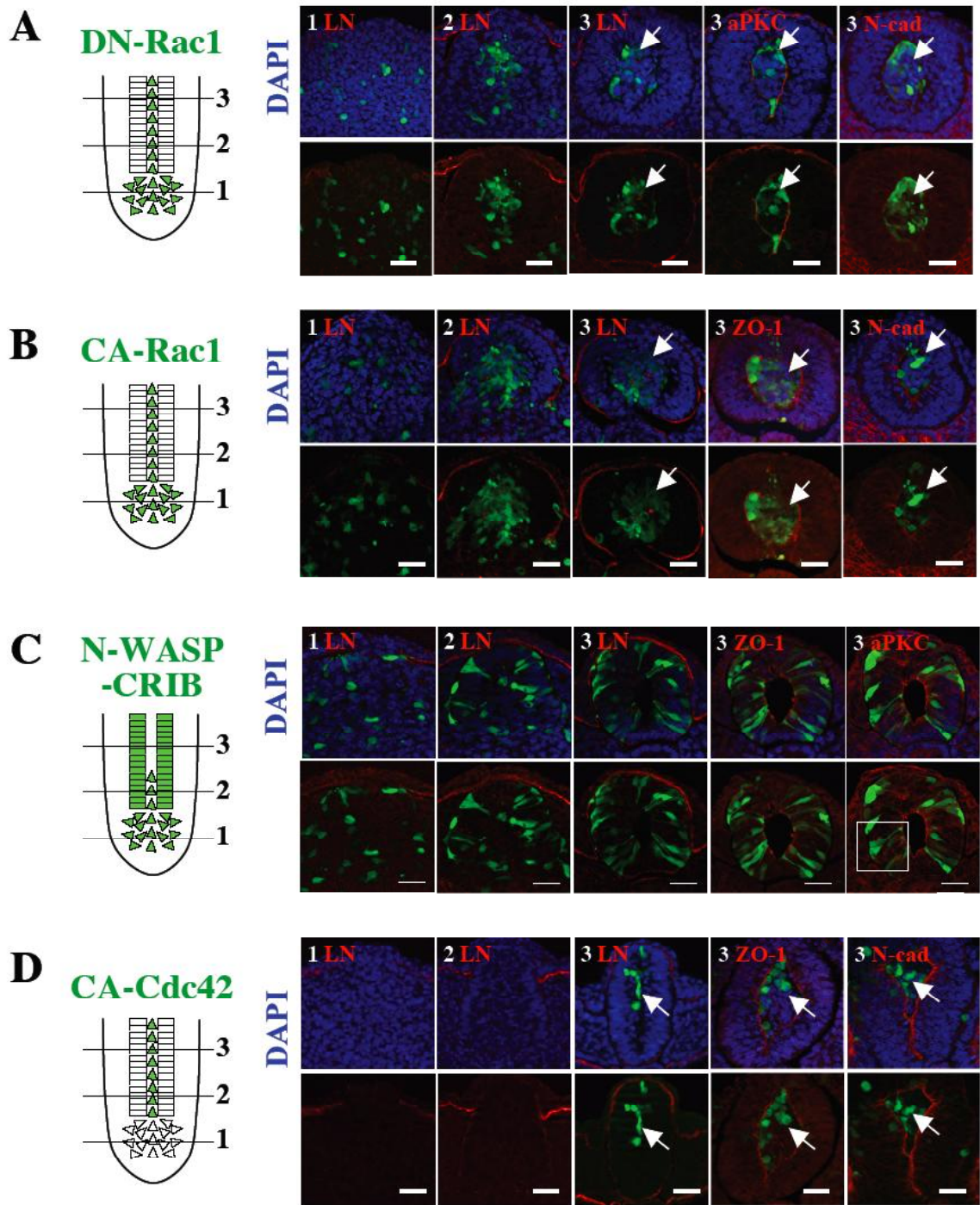


図 16. SNにおけるMETではRac1の適度な活性化及びCdc42が低活性であることが重要である

(A-D) 模式図の数字は胚の位置を意味し、右の画像の数字と一致する。(A, B) Rac1の優勢阻害型 (Dominant negative : DN) (A) 又は恒常活性型 (Constitutive active : CA) (B) を発現させた場合、遺伝子導入された細胞は2のMETの段階において異常が見られ、本来の神経管から内腔領域へと排除された (矢印)。また、排除された細胞では正常な上皮極性は形成されていなかった。(C) N-WASP-CRIBを用いて内在性Cdc42の機能阻害を行った。遺伝子導入された細胞はほぼ正常通りに上皮極性を形成したが、細胞体が基底膜側へと移行するという異常が見られた (矢頭)。(D) CA-Cdc42を発現させた場合、A及びBと同様にMETの異常が見られた。付け加え、遺伝子導入された細胞はレベル1及び2の段階では、見られなかった。スケールバー：30um。LN (Laminin) ; N-cad (N-cadherin)

⚡ DN-Rac1

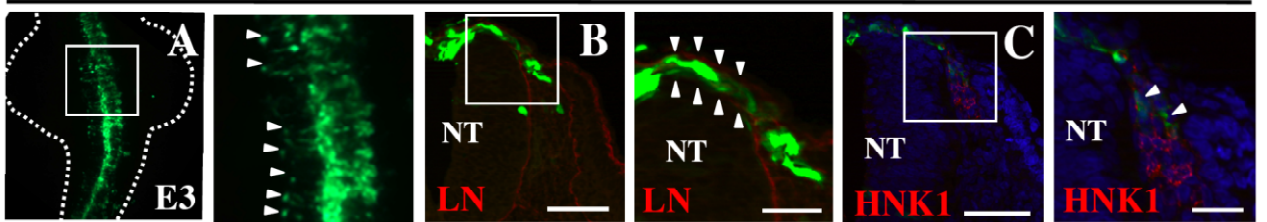


図17. DN-Rac1によってMETを阻害されたSN細胞は、3日目胚になると神経堤細胞様へと変化する

(A-F) DN-Rac1をPre-SN領域へと発現させた3日目胚。(A, B) 遺伝子導入された胚を背側から見た図。四角の領域を拡大するとEGFPを発現した細胞が無数に神経管から側方へと伸びている様に見える。(B) 横断切片を作成し観察すると、遺伝子導入された細胞は神経管 (NT) にはほとんど見られず、表皮と神経管のLamininの間に存在した (矢頭)。また、(C) 神経堤細胞マーカーであるHNK1陽性細胞と同様の位置に存在した (矢頭)。スケールバー：50um、20um (拡大図)。LN (Laminin)

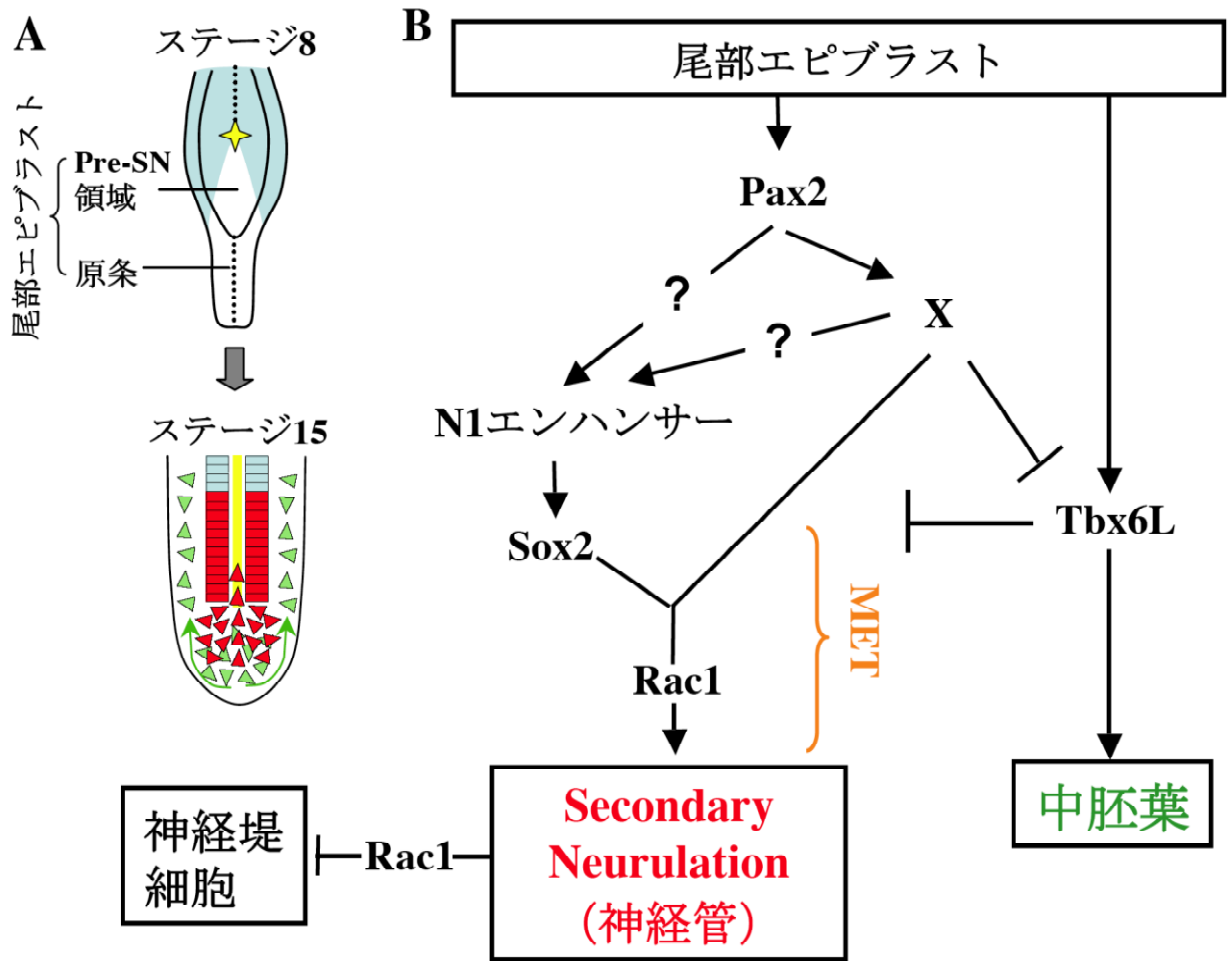


図18. 尾部におけるエピブラストからSecondary neurulation (神経管) 又は中胚葉への分化メカニズムモデル

(A) ステージ8の尾部エピブラスト (Pre-SN領域及び原条) はSN (神経管: 赤) 又は中胚葉 (緑) へと分化する。(B) 尾部エピブラストにおいてPax2が発現すると、下流の因子 (X) を介しTbx6Lの発現を抑制する。また、Pax2の発現によりN1エンハンサーの活性が上昇しSox2が発現する。Sox2はPax2の下流の因子Xと協調的に働くことによってMETを引き起こす。METではRac1の適度な活性化が必要であり、Rac1が低活性である細胞は神経管ではなく神経堤細胞へと分化する。また、Tbx6LはSNへの分化を抑制する。このような分子メカニズムが働き、尾部エピブラストはSN (神経管) 又は中胚葉へと分化すると考えられる。

考察

尾部エピブラスト（Pre-SN 及び原条）について

ステージ 8 のニワトリ胚において、後方神経板に存在する細胞は神経管だけではなく中胚葉にも分化すると考えられてきた(Diez del Corral and Storey, 2004; Le Douarin, 2001; Le Douarin et al., 1998; Sawada and Aoyama, 1999)。しかしながら、本論文において表層に存在する細胞は中胚葉には分化せず、SN 間充織細胞を含む神経管にのみ分化することを明らかとした。また、後方神経板の中でも Laminin の存在しないひし形の領域 (Pre-SN 領域) に SN の前駆細胞が含まれていることを示した。以上の結果を図 9 にまとめた。さらには、Pre-SN 領域では神経前駆細胞マーカーである Sox2 の発現がみられず未分化性が維持されていることを見出した。

では、この Pre-SN 領域はどのようにして未分化性を維持しているのであろうか？この問いに対する直接的な結果が既にニワトリ胚を用いて報告されている(Takemoto et al., 2006)。この論文では、Pre-SN 領域における Sox2 の発現は BMP シグナルによって制御されていることを示しており、Noggin などを用いて BMP シグナルを阻害することによって Pre-SN 領域における Sox2 の発現を上昇させている。しかしながら、それ以降の解析は為されておらず、Sox2 を発現した Pre-SN 細胞はどのようになるかは示されていない。

また、大きな謎として Pre-SN 領域の未分化な細胞はどこから来るのかという問題が挙げられる。この問いは進化的に尾部がどのようにして付加されたのかを理解する重要な問題であると考えられる。Sox2 の発現に注目すると、ステージ 4 の段階において既に胚後方では Sox2 の発現は見られない(Rex et al., 1997; Uchikawa et al., 2003)。また、Pre-SN 領域における Sox2 の発現を制御する BMP に注目すると、体幹の三胚葉が形成され始めるエピブラストの段階から発現が後方で見られ、その発現は Stage8 の Pre-SN および原条まで

継続しているようであった(GEISH ID:BMP2,BMP7)。よって、ステージ 8 の Pre-SN 領域は、BMP などによって未分化性が維持された体幹を作るエピブラストの一部であると推測される。つまり、体幹を作るエピブラストの未分化性を維持のする新たな機構が生まれたことをきっかけとし尾部組織が誕生したのではないかと仮説を立てている。

また、ゼブラフィッシュでは尾芽のみを誘導する Tail オーガナイザーの存在が発見されており(Agathon et al., 2003)、その分子実態が BMP と Nodal であることが示されている(Fauny et al., 2009)。ニワトリ胚のエピブラストの段階で異所的に BMP などを作用させると同様に異所的な尾部が誘導されるかもしれない。

尾部エピブラストから神経管又は中胚葉への運命決定について

本論文で得られた結果を図 18 にまとめた。まず、尾部エピブラストの予定中胚葉細胞に対して転写因子 Pax2 を発現させると、Pax2 を導入された細胞は自立的に異所的な神経管を形成することを示した。そして、この異所的な神経管は本来の SN と同様な過程及びタイミングによって形成されていることを示した。また、Pax2 は N1 エンハンサーを介して Sox2 の発現を上昇させていること、さらには、Pax2 の下流の因子が Tbx6L の発現を抑制することが必須であることを示した。

中胚葉領域に神経管が作られるという現象は Tbx6 欠損マウスにおいて見られる現象と良く似ている(現在のところ Tbx6 欠損マウスにおける異所的な神経管の形成様式が PN なのか SN なのかはわかっていない)(Chapman and Papaioannou, 1998)。これまでにニワトリ Tbx6L の機能阻害を試みたが、現在のところ異所的な神経管は形成されない。その理由として複数考えられるが、その中でもマウス Tbx6 とニワトリ Tbx6L のアミノ酸配列が大きく異なることから

(Lardelli, 2003)、そもそも異なる働きをしている可能性に注目している(実際に、結合する DNA 配列が異なるという情報も他の研究者から得ている)。ニワトリとマウスでは、運命決定機構が異なる可能性も含め解析を行う必要があるようだ。

また、SN における Pax2 の必要性に関しては現在のところ証明できていない。ニワトリ Pax2 に対する shRNA (ウエスタンブローディングにおいて有効であると示されているもの)を用いて実験を行ったが、SN に顕著な異常は見られなかった。また、Pax2 欠損マウス、さらには、Pax2 と Pax5 及び Pax2 と Pax8 の二重欠損マウスにおいても、尾部に異常は見られない(Bouchard et al., 2002; Schwarz et al., 1999)。このことから、本来の SN においては Pax2/5/8 グループと同等な働きをする他の転写因子の存在が考えられる。その候補として転写因子 Cdx2(Chawengsaksophak et al., 2004; Marom et al., 1997; Savory et al., 2009)及び転写因子 Sp8(Bell et al., 2003; Kawakami et al., 2004)が挙げられる。共に SN が進行している細胞で発現しており、遺伝子欠損マウスでは尾部が消失する。実際に、Cdx2 を Pax2 と同様に異所的な管形成の誘導することが可能であるという結果を得ているが、Pax2 と比較すると確率が低く現在のところ解析が進んでいない。SP8 に関しては、まだ検証していない。

このように本来の発生過程における Pax2 と SN との関わりについては依然よくわかっていない。しかしながら、今回発見した Pax2 による SN 誘導現象は尾部エピブラストの運命決定の機構を理解していく上で大きな足がかりとなると考えている。なぜなら、Pax2 は転写活性を介して、且つ細胞自立的に神経管を誘導することから、Pax2 発現細胞をマイクロアレイに掛けることによって神経管の誘導に関わる遺伝子を網羅的に解析できると考えられるからである。このような解析を通して、本来の尾部の形成メカニズムをより詳細に理解していきたい。

SN 間充織細胞から神経管構造への形態変化について

ランダムに存在する間充織細胞がどのようにして規則正しい上皮管構造へと変化するのか？本論文では、これまで神経系の分化性質を獲得するために必要と考えられてきた転写因子 Sox2 が、SN の MET を伴う形態変化にも必要であることを示した。その他、SN における MET とアクチン骨格制御因子である Rac1 及び Cdc42 との関係を調べた結果、Rac1 の適度な活性及び Cdc42 の低活性が重要であることを示した。また、DN-Rac1 を誘導され MET を阻害された細胞は後に神経提細胞様へと変化することを示した。

SN の MET における Rac1 及び Cdc42 の働きは体節形成における MET と一致する(Nakaya et al., 2004)。一方、Cdc42 に関しては、MDCK 細胞の知見とは異なる(Martin-Belmonte et al., 2007; O'Brien et al., 2001)。ではなぜ細胞種によって、MET に関わる Rho ファミリー遺伝子が異なるのであろうか。MDCK 細胞における Cdc42 の役割は膜脂質を頂端側へと輸送する為に必要であることが示されており、その結果として上皮極性が異常になると考えられている(Martin-Belmonte et al., 2007)。この知見を受け注目したのが細胞の形態である。腎臓由来の MDCK 細胞は四角い形をしており頂端膜の領域が比較的大きいのに対し、神経管及び体節の細胞は細長く頂端膜の領域がほとんど存在しない。つまり、頂端膜を必要としない SN 及び体節の MET では Cdc42 の働きが必要ではなく、むしろ Cdc42 が活性化することによって、形態形成が異常となり上皮化が抑制されるのではないかと考えている。また、ヒト骨肉種由来の Saos2 細胞 (Pax3 を強制発現させると MET を起こすことが知られている)(Wiggan et al., 2002)の MET においても、Cdc42 の働きが必要ないことが示されている(Wiggan et al., 2006)。このように、上皮細胞と雖もその細胞形態の違いによって、MET の分子メカニズムが異なるという新たなアイデアを提示したい。

また、本論文では MET を阻害された細胞は神経管から排除されるという結果を得ている。しかしながら、Sox2 (Sox3HMG-EnR) の場合では神経管の外側に、Rac1 及び Cdc42 の場合では神経管の内腔にと排除される位置が異なる。その違いを生み出す理由として考えられることは、排除される段階の違いである。この SN 過程には主に未分化-間充織細胞、神経系-間充織細胞及び神経系-上皮細胞が存在するが、Sox2 を阻害した場合には神経系に分化できず、神経管の外側に排除されると推測する。一方、Rac1 及び Cdc42 の場合には、神経系-間充織細胞までは分化できるが、MET が阻害されるために神経系-上皮細胞によって排除され、神経管の内側に位置するのではないかと考えている。このような同種の細胞が集合する(同種が集合することによって、異種を排除する)という現象は、組織形成の初期にみられる最も基礎的な現象の一つである(Gilbert, 2006; Nose et al., 1988)。このような同種の細胞同士が集合するという現象は、尾部の一樣な間充織細胞が混ざり合うことなく、SN 又は中胚葉へと分化する上においても非常に重要であると考えている。

また、神経提細胞と Rho ファミリーとの関係については、これまで主に神経提細胞へと分化した後の細胞を対象とした解析がなされてきた(Fuchs et al., 2009; Thomas et al., 2010)。そこでは、神経提細胞の初期の移動においては Rac1 と Cdc42 は必要ではないが、移動先において適切に分化することに必要であるということが示されている。しかしながら、神経提細胞への分化過程における Rho ファミリーの役割に関しての知見はかなり限られており、これまでカエルにおいて RhoV と呼ばれる遺伝子が必要であるという報告が為されているのみであるようだ(Guemar et al., 2007)。本論文では、DN-Rac1 を導入した細胞が神経提細胞様へと分化したという結果を示したが、この結果が得られたのは SN 間充織細胞を特異的に遺伝子操作するという本研究独自の手法によるものである(Rho ファミリーの欠損マウスは胎生致死であることから、組

織特異的な解析を必要とする)。仮に本来の神経堤細胞への分化過程においても同様なメカニズムが用いられているとするならば、今回得られた結果は非常に重要な知見となるかもしれない。SN における神経堤細胞は PN のものとは異なるといった報告も為されていることから(Catala et al., 2000; Osorio et al., 2009a; Osorio et al., 2009b)、神経堤細胞においても体幹と尾部を区別して考える必要があるようである。

SN 研究における今後の展望

今後の SN 研究の展望として大きな 2 つの課題挙げられる。①SN 間充織細胞が神経上皮細胞へと変化する際の細胞挙動の解析と②SN 間充織細胞はの正体(幹細胞なのか)についてである。

①については、SN 間充織細胞は SN が進行している間常に尾の先端において存在していることから、SN 間充織細胞の中にはおそらく間充織細胞の形態を維持し尾側へ移行するものと MET を起こし神経管へと分化する細胞が含まれていると考えられる。また、偶然 SN 間充織細胞の挙動を捕らえた動画(この論文は中胚葉の解析を行っている)では、SN 間充織細胞はなぜか頭尾軸に垂直に細胞分裂を起こしている様子が捉えられている(Benazeraf et al., 2010)(Movie17)。さらには、SN 間充織細胞は神経上皮細胞へと変化する際に細胞の長さが約 4 倍になる(図 8C,D)。このように数多くの劇的な現象が SN では起こっていると考えられる。これらを検証する上では、ライブイメージングをメインとした SN 間充織細胞の解析が必要となるであろう。これらの解析は、どのようにして付属肢(尾部及び手足)が体軸(頭尾軸及び遠近軸)に沿って伸長するのかという大きな謎を解く鍵でもある。

②に関しては、幹細胞が尾部の間充織細胞の中には存在するという報告が既に為されている(McGrew et al., 2008)。しかしながら、この知見では尾部

に含まれる SN 間充織細胞や未分節中胚葉といった組織の違いは考慮されていない。その理由としては、形態的にこれらの違いを区別することが極めて困難であったことが挙げられる。しかしながら、本論文において確立した SN 間充織細胞への遺伝子導入法を用いることによって、この問題を解決することが可能である。中枢神経系を生み出す SN 間充織細胞の正体を明らかにすれば、現在活発な神経幹細胞研究において新たな舞台を提供できることが予想される。

補足：羊膜類の尾部は臍帯（尿膜管）より後方を意味しているのかもしれない

最後に羊膜類の尾部がどこからなのかについて述べる。進化的に尾は肛門の後方に付加した組織であり、魚類や両性類では尾部は肛門より後方に当てはまる(Kardong, 2006)。しかしながら、羊膜類(爬虫類、鳥類及び哺乳類)における尾部領域に関してはこれまで明確に述べられていない。そこで本論文では、以下の理由から羊膜類の尾部は肛門ではなく臍帯(爬虫類及び鳥類では尿膜管))より後方である可能性を紹介する。

- ① 両生類以前の生物の消化管は口と肛門のみが外部と接するのに対し、爬虫類以降では口と肛門以外に臍帯(尿膜管)も外部と接している。
- ② 臍帯(尿膜管)は胎内(卵内)において排出管(肛門)として働く。
- ③ PN から SN への変化が臍帯と同じレベル(後足の付け根)を境に起こる。
- ④ 尿膜管より尾側の腸は特別な存在である(ニワトリでは体節 1-7 レベルの神経提細胞(末梢神経)が口から肛門までの消化管を取り巻くが、尿膜管(腸)より尾側の腸ではさらに体節 28-53 レベル(SN 領域)の神経提細胞が加わる)(Le Douarin and Kalcheim, 1999)。

あくまで仮説であるが、両生類の肛門が爬虫類以降の臍帯(尿膜管)へと

代わり、さらには腸が尾部領域へと伸びることによって新たな位置に肛門が作られた(尾部の神経提細胞の影響を受けるようになった)のではないかと考えている。

⑤ Wnt3a の欠損マウスでは臍帯より後方の部位が消失する(Takada et al., 1994)。

⑥ 進化の過程で付け加わったとされる後方 Hox が 27 体節レベルを境に発現する(de Rosa et al., 1999; Liu et al., 2001)。

といった知見もこの仮説を支持する要因である。

仮にこの仮説が真実ならば、生物が水中(両生類まで)から陸上(爬虫類)へと生息域を変えたことにより、卵内において老廃物を尿膜管(臍帯)へと排出する必要性が生じたことをきっかけとしているのかもしれない。

謝辞

プローブ用の Sox2 プラスミドは、福田公子准教授(東京首都大学・理工学研究科)より供与いただきました。tkEGFP-N1 及び tkDsRed-N1 は、近藤寿人教授及び竹本龍也助教(大阪大学・生命機能研究科)より供与いただきました。また、お二方には、研究内容に関するアドバイスをいただきました。

本学の分子発生生物学講座のみなさまには多大なサポートをいただき、今日まで研究生活を続けることができました。斉藤大介助教を始め多くの先輩方に実験方法を教えていただきました。安江泰司さん、高橋輝明さんにはたくさんのディスカッションをして頂きました。渡辺景子さんや川地輝明さんには実験を手伝って頂き、また研究を引き継いでくれて感謝しています。内山朱美さんにはコンピューターのサポートとイラストを供与いただきました。酒井洋子さん及び堀内由美さんには事務手続きなど大変お世話になりました。

私は、日本学術振興会の特別研究員(DC1)に採用され、研究生活をバックアップしていただきました。

最後に、高橋淑子教授には、本学に入学してからの5年間、辛抱強いご指導とさまざまな貴重な機会を与えていただきました。研究は大変でしたが、得るものも多かったです。

以上のたくさんの方々に、この場を借りてお礼を申し上げます。

参考文献

- Agathon, A., Thisse, C. and Thisse, B.** (2003). The molecular nature of the zebrafish tail organizer. *Nature* **424**, 448-52.
- Akai, J., Halley, P. A. and Storey, K. G.** (2005). FGF-dependent Notch signaling maintains the spinal cord stem zone. *Genes Dev* **19**, 2877-87.
- Bell, S. M., Schreiner, C. M., Waclaw, R. R., Campbell, K., Potter, S. S. and Scott, W. J.** (2003). Sp8 is crucial for limb outgrowth and neuropore closure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12195-200.
- Benazeraf, B., Francois, P., Baker, R. E., Denans, N., Little, C. D. and Pourquie, O.** (2010). A random cell motility gradient downstream of FGF controls elongation of an amniote embryo. *Nature* **466**, 248-52.
- Betancur, P., Bronner-Fraser, M. and Sauka-Spengler, T.** (2010). Assembling neural crest regulatory circuits into a gene regulatory network. *Annu Rev Cell Dev Biol* **26**, 581-603.
- Bouchard, M., Pfeffer, P. and Busslinger, M.** (2000). Functional equivalence of the transcription factors Pax2 and Pax5 in mouse development. *Development* **127**, 3703-13.
- Bouchard, M., Souabni, A., Mandler, M., Neubuser, A. and Busslinger, M.** (2002). Nephric lineage specification by Pax2 and Pax8. *Genes Dev* **16**, 2958-70.
- Bryant, D. M. and Mostov, K. E.** (2008). From cells to organs: building polarized tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 887-901.
- Bylund, M., Andersson, E., Novitch, B. G. and Muhr, J.** (2003). Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat Neurosci* **6**, 1162-8.
- Catala, M.** (2002). Genetic control of caudal development. *Clin Genet* **61**, 89-96.
- Catala, M., Teillet, M. A. and Le Douarin, N. M.** (1995). Organization and

development of the tail bud analyzed with the quail-chick chimaera system. *Mech Dev* **51**, 51-65.

Catala, M., Ziller, C., Lapointe, F. and Le Douarin, N. M. (2000). The developmental potentials of the caudalmost part of the neural crest are restricted to melanocytes and glia. *Mech Dev* **95**, 77-87.

Chaffer, C. L., Thompson, E. W. and Williams, E. D. (2007). Mesenchymal to epithelial transition in development and disease. *Cells Tissues Organs* **185**, 7-19.

Chapman, D. L. and Papaioannou, V. E. (1998). Three neural tubes in mouse embryos with mutations in the T-box gene *Tbx6*. *Nature* **391**, 695-7.

Chawengsaksophak, K., de Graaff, W., Rossant, J., Deschamps, J. and Beck, F. (2004). *Cdx2* is essential for axial elongation in mouse development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7641-5.

Colas, J. F. and Schoenwolf, G. C. (2001). Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Dev Dyn* **221**, 117-45.

Copp, A. J. and Greene, N. D. (2010). Genetics and development of neural tube defects. *J Pathol* **220**, 217-30.

Criley, B. B. (1969). Analysis of embryonic sources and mechanisms of development of posterior levels of chick neural tubes. *J Morphol* **128**, 465-501.

Darnell, D. K., Stark, M. R. and Schoenwolf, G. C. (1999). Timing and cell interactions underlying neural induction in the chick embryo. *Development* **126**, 2505-14.

de Rosa, R., Grenier, J. K., Andreeva, T., Cook, C. E., Adoutte, A., Akam, M., Carroll, S. B. and Balavoine, G. (1999). Hox genes in brachiopods and priapulids and protostome evolution. *Nature* **399**, 772-6.

Diez del Corral, R. and Storey, K. G. (2004). Opposing FGF and retinoid pathways: a signalling switch that controls differentiation and patterning onset in the extending

vertebrate body axis. *Bioessays* **26**, 857-69.

Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-35.

Fauny, J. D., Thisse, B. and Thisse, C. (2009). The entire zebrafish blastula-gastrula margin acts as an organizer dependent on the ratio of Nodal to BMP activity. *Development* **136**, 3811-9.

Fuchs, S., Herzog, D., Sumara, G., Buchmann-Moller, S., Civenni, G., Wu, X., Chrostek-Grashoff, A., Suter, U., Ricci, R., Relvas, J. B. et al. (2009). Stage-specific control of neural crest stem cell proliferation by the small rho GTPases Cdc42 and Rac1. *Cell Stem Cell* **4**, 236-47.

Gilbert, S. F. (2006). *Developmental Biology. 8th edition.*

Goode, D. K. and Elgar, G. (2009). The PAX258 gene subfamily: a comparative perspective. *Dev Dyn* **238**, 2951-74.

Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P. and Pevny, L. (2003). SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron* **39**, 749-65.

Griffith, C. M., Wiley, M. J. and Sanders, E. J. (1992). The vertebrate tail bud: three germ layers from one tissue. *Anat Embryol (Berl)* **185**, 101-13.

Guemar, L., de Santa Barbara, P., Vignal, E., Maurel, B., Fort, P. and Faure, S. (2007). The small GTPase RhoV is an essential regulator of neural crest induction in *Xenopus*. *Dev Biol* **310**, 113-28.

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

Handrigan, G. R. (2003). Concordia discors: duality in the origin of the vertebrate tail. *J Anat* **202**, 255-67.

Harvey, S. A., Tumpel, S., Dubrulle, J., Schier, A. F. and Smith, J. C. (2010). no tail integrates two modes of mesoderm induction. *Development* **137**, 1127-35.

- Henrique, D., Adam, J., Myat, A., Chitnis, A., Lewis, J. and Ish-Horowicz, D.** (1995). Expression of a Delta homologue in prospective neurons in the chick. *Nature* **375**, 787-90.
- Holley, S. A.** (2006). Anterior-posterior differences in vertebrate segments: specification of trunk and tail somites in the zebrafish blastula. *Genes Dev* **20**, 1831-7.
- Holmdahl, D. E.** (1938). Die Morphogenese des Vertebratorganismus vom formalin und experimentellen Gesichtspunkt. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **139**, 191-226.
- Iimura, T. and Pourquie, O.** (2006). Collinear activation of Hoxb genes during gastrulation is linked to mesoderm cell ingression. *Nature* **442**, 568-71.
- Jaffe, A. B. and Hall, A.** (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 247-69.
- Kamachi, Y., Iwafuchi, M., Okuda, Y., Takemoto, T., Uchikawa, M. and Kondoh, H.** (2009). Evolution of non-coding regulatory sequences involved in the developmental process: reflection of differential employment of paralogous genes as highlighted by Sox2 and group B1 Sox genes. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **85**, 55-68.
- Kardong, K. V.** (2006). Vertebrates, Comparative Anatomy, Function, Evolution. *4th edition, McGraw-Hill.*
- Kawakami, Y., Esteban, C. R., Matsui, T., Rodriguez-Leon, J., Kato, S. and Izpisua Belmonte, J. C.** (2004). Sp8 and Sp9, two closely related buttonhead-like transcription factors, regulate Fgf8 expression and limb outgrowth in vertebrate embryos. *Development* **131**, 4763-74.
- Keller, R.** (2005). Cell migration during gastrulation. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 533-41.
- Kishi, M., Mizuseki, K., Sasai, N., Yamazaki, H., Shiota, K., Nakanishi, S. and**

- Sasai, Y.** (2000). Requirement of Sox2-mediated signaling for differentiation of early *Xenopus* neuroectoderm. *Development* **127**, 791-800.
- Knezevic, V., De Santo, R. and Mackem, S.** (1997). Two novel chick T-box genes related to mouse *Brachyury* are expressed in different, non-overlapping mesodermal domains during gastrulation. *Development* **124**, 411-9.
- Lang, D., Powell, S. K., Plummer, R. S., Young, K. P. and Ruggeri, B. A.** (2007). PAX genes: roles in development, pathophysiology, and cancer. *Biochem Pharmacol* **73**, 1-14.
- Lardelli, M.** (2003). The evolutionary relationships of zebrafish genes *tbx6*, *tbx16/spadetail* and *mga*. *Dev Genes Evol* **213**, 519-22.
- Le Douarin, N. M.** (2001). Early neurogenesis in Amniote vertebrates. *Int J Dev Biol* **45**, 373-8.
- Le Douarin, N. M. and Kalcheim, C.** (1999). *The Neural Crest*, 2nd *Cambridge University Press*.
- Le Douarin, N. M., Teillet, M. A. and Catala, M.** (1998). Neurulation in amniote vertebrates: a novel view deduced from the use of quail-chick chimeras. *Int J Dev Biol* **42**, 909-16.
- Liu, J. P., Laufer, E. and Jessell, T. M.** (2001). Assigning the positional identity of spinal motor neurons: rostrocaudal patterning of *Hox-c* expression by FGFs, *Gdf11*, and retinoids. *Neuron* **32**, 997-1012.
- Marom, K., Shapira, E. and Fainsod, A.** (1997). The chicken caudal genes establish an anterior-posterior gradient by partially overlapping temporal and spatial patterns of expression. *Mech Dev* **64**, 41-52.
- Martin-Belmonte, F., Gassama, A., Datta, A., Yu, W., Rescher, U., Gerke, V. and Mostov, K.** (2007). PTEN-mediated apical segregation of phosphoinositides controls epithelial morphogenesis through *Cdc42*. *Cell* **128**, 383-97.

- McGrew, M. J., Sherman, A., Lillico, S. G., Ellard, F. M., Radcliffe, P. A., Gilhooley, H. J., Mitrophanous, K. A., Cambray, N., Wilson, V. and Sang, H.** (2008). Localised axial progenitor cell populations in the avian tail bud are not committed to a posterior Hox identity. *Development* **135**, 2289-99.
- 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**, 335-44.
- Nakaya, Y., Kuroda, S., Katagiri, Y. T., Kaibuchi, K. and Takahashi, Y.** (2004). Mesenchymal-epithelial transition during somitic segmentation is regulated by differential roles of Cdc42 and Rac1. *Dev Cell* **7**, 425-38.
- Nakaya, Y., Sukowati, E. W., Wu, Y. and Sheng, G.** (2008). RhoA and microtubule dynamics control cell-basement membrane interaction in EMT during gastrulation. *Nat Cell Biol* **10**, 765-75.
- Nievelstein, R. A., Hartwig, N. G., Vermeij-Keers, C. and Valk, J.** (1993). Embryonic development of the mammalian caudal neural tube. *Teratology* **48**, 21-31.
- Nose, A., Nagafuchi, A. and Takeichi, M.** (1988). Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems. *Cell* **54**, 993-1001.
- O'Brien, L. E., Jou, T. S., Pollack, A. L., Zhang, Q., Hansen, S. H., Yurchenco, P. and Mostov, K. E.** (2001). Rac1 orientates epithelial apical polarity through effects on basolateral laminin assembly. *Nat Cell Biol* **3**, 831-8.
- Osorio, L., Teillet, M. A. and Catala, M.** (2009a). Role of noggin as an upstream signal in the lack of neuronal derivatives found in the avian caudal-most neural crest. *Development* **136**, 1717-26.
- Osorio, L., Teillet, M. A., Palmeirim, I. and Catala, M.** (2009b). Neural crest ontogeny during secondary neurulation: a gene expression pattern study in the chick embryo. *Int J Dev Biol* **53**, 641-8.

- Papanayotou, C., Mey, A., Birot, A. M., Saka, Y., Boast, S., Smith, J. C., Samarut, J. and Stern, C. D.** (2008). A mechanism regulating the onset of Sox2 expression in the embryonic neural plate. *PLoS Biol* **6**, e2.
- Pasteels, J.** (1937). Etudes sur la gastrulation des vertébrés méroblastiques. III.Oiseaux. IV Conclusions générales. *Arch. Biol.* **48**, 381-488.
- Rex, M., Orme, A., Uwanogho, D., Tointon, K., Wigmore, P. M., Sharpe, P. T. and Scotting, P. J.** (1997). Dynamic expression of chicken Sox2 and Sox3 genes in ectoderm induced to form neural tissue. *Dev Dyn* **209**, 323-32.
- Saitsu, H., Yamada, S., Uwabe, C., Ishibashi, M. and Shiota, K.** (2004). Development of the posterior neural tube in human embryos. *Anat Embryol (Berl)* **209**, 107-17.
- Savory, J. G., Bouchard, N., Pierre, V., Rijli, F. M., De Repentigny, Y., Kothary, R. and Lohnes, D.** (2009). Cdx2 regulation of posterior development through non-Hox targets. *Development* **136**, 4099-110.
- Sawada, K. and Aoyama, H.** (1999). Fate maps of the primitive streak in chick and quail embryo: ingression timing of progenitor cells of each rostro-caudal axial level of somites. *Int J Dev Biol* **43**, 809-15.
- Schoenwolf, G. C. and Smith, J. L.** (1990). Mechanisms of neurulation: traditional viewpoint and recent advances. *Development* **109**, 243-70.
- Schwarz, M., Alvarez-Bolado, G., Dressler, G., Urbanek, P., Busslinger, M. and Gruss, P.** (1999). Pax2/5 and Pax6 subdivide the early neural tube into three domains. *Mech Dev* **82**, 29-39.
- Stern, C. D.** (2004). Gastrulation: from cells to embryo New York. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Stern, C. D.** (2005). Neural induction: old problem, new findings, yet more questions. *Development* **132**, 2007-21.

- Stern, C. D., Charite, J., Deschamps, J., Duboule, D., Durston, A. J., Kmita, M., Nicolas, J. F., Palmeirim, I., Smith, J. C. and Wolpert, L. (2006).** Head-tail patterning of the vertebrate embryo: one, two or many unresolved problems? *Int J Dev Biol* **50**, 3-15.
- Takada, S., Stark, K. L., Shea, M. J., Vassileva, G., McMahon, J. A. and McMahon, A. P. (1994).** Wnt-3a regulates somite and tailbud formation in the mouse embryo. *Genes Dev* **8**, 174-89.
- Takahashi, Y., Sato, Y., Suetsugu, R. and Nakaya, Y. (2005).** Mesenchymal-to-epithelial transition during somitic segmentation: a novel approach to studying the roles of Rho family GTPases in morphogenesis. *Cells Tissues Organs* **179**, 36-42.
- Takemoto, T., Uchikawa, M., Kamachi, Y. and Kondoh, H. (2006).** Convergence of Wnt and FGF signals in the genesis of posterior neural plate through activation of the Sox2 enhancer N-1. *Development* **133**, 297-306.
- Thomas, P. S., Kim, J., Nunez, S., Glogauer, M. and Kaartinen, V. (2010).** Neural crest cell-specific deletion of Rac1 results in defective cell-matrix interactions and severe craniofacial and cardiovascular malformations. *Dev Biol* **340**, 613-25.
- Uchikawa, M., Ishida, Y., Takemoto, T., Kamachi, Y. and Kondoh, H. (2003).** Functional analysis of chicken Sox2 enhancers highlights an array of diverse regulatory elements that are conserved in mammals. *Dev Cell* **4**, 509-19.
- Uchiyama, H., Kobayashi, T., Yamashita, A., Ohno, S. and Yabe, S. (2001).** Cloning and characterization of the T-box gene Tbx6 in *Xenopus laevis*. *Dev Growth Differ* **43**, 657-69.
- Wallingford, J. B. (2006).** Planar cell polarity, ciliogenesis and neural tube defects. *Hum Mol Genet* **15 Spec No 2**, R227-34.
- Wiggan, O., Fadel, M. P. and Hamel, P. A. (2002).** Pax3 induces cell aggregation

and regulates phenotypic mesenchymal-epithelial interconversion. *J Cell Sci* **115**, 517-29.

Wiggan, O., Shaw, A. E. and Bamburg, J. R. (2006). Essential requirement for Rho family GTPase signaling in Pax3 induced mesenchymal-epithelial transition. *Cell Signal* **18**, 1501-14.

Wilson, V., Olivera-Martinez, I. and Storey, K. G. (2009). Stem cells, signals and vertebrate body axis extension. *Development* **136**, 1591-604.

Yoshino, T., Saito, D., Tadokoro, R. and Takahashi, Y. (2011). In vivo gene manipulations of epithelial cell sheets: a novel model to study epithelial-to-mesenchymal transition. *Dev Growth Differ.*