

平成 16 年度日本眼科学会学術奨励賞 受賞論文総説

網膜視細胞の細胞運命決定機構の解析

西田 明弘

大阪バイオサイエンス研究所発生生物学部門

要 約

目 的：網膜視細胞はその形態的、機能的特異性から多くの研究がなされてきたが、発生・分化のメカニズムについてはまだ十分に解明されていない。今回、我々はホメオボックス遺伝子 *Otx2* に注目し、視細胞発生に関する役割を解析した。

方法と結果：*Crx* プロモーターを用いて視細胞と松果体で特異的に *Otx2* の発現が消失するコンディショナルノックアウトマウスを作製した。この変異マウスでは、視細胞の発生はみられず、アマクリン細胞が著明に増加していた。また、松果体は完全に欠損していた。続いて、新生ラット網膜に *Otx2* を強制発現させ、細胞

系譜の解析を行ったところ、視細胞の割合が増加していた。さらに、*Crx* 上流のプロモーター領域を用いてルシフェラーゼアッセイを行った結果、*Otx2* が *Crx* の発現を制御することが示唆された。

結 論：*Otx2* は網膜視細胞における細胞運命決定および松果体の発生を最上流で制御する遺伝子である。(日眼会誌 109：708—716, 2005)

キーワード：網膜視細胞、細胞運命決定、松果体、*Otx2*, *Crx*

A Review

Mechanisms of Retinal Photoreceptor Cell Fate Determination

Akihiro Nishida

Department of Developmental Biology, Osaka Bioscience Institute

Abstract

Purpose : Understanding the molecular mechanisms by which distinct cell fate is determined during organogenesis is a central issue in cell development and disease. Using conditional gene ablation, we show that in mice the transcription factor *Otx2* is essential for retinal photoreceptor cell fate determination and the development of the pineal gland.

Methods and Results : In the *Otx2* knockout mice, differentiating photoreceptor cells were converted to amacrine-like neurons, and the pinealocytes in the pineal gland were totally absent. In addition, promoter assays revealed that *Otx2* transactivates *Crx*, which is required for terminal differentiation and maintenance of photoreceptor

cells. Furthermore, retroviral gene transfer of *Otx2* steered retinal progenitor cells toward becoming photoreceptors.

Conclusion : Thus, *Otx2* is a key regulatory gene for the cell fate determination of retinal photoreceptor cells. Our results revealed the key molecular steps required for photoreceptor cell fate determination and pineal gland development.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 109 : 708—716, 2005)

Key words : Photoreceptor, Cell fate determination, Pineal gland, *Otx2*, *Crx*

別刷請求先：565-0874 吹田市古江台 6-2-4 大阪バイオサイエンス研究所発生生物学部門 西田 明弘

(平成 17 年 3 月 18 日受付, 平成 17 年 5 月 23 日改訂受理) E-mail : nishida@obi.or.jp

Reprint requests to : Akihiro Nishida, M.D. Department of Developmental Biology, Osaka Bioscience Institute, 6-2-4, Furuedai, Suita 565-0874, Japan

(Received March 18, 2005 and accepted in revised form May 23, 2005)

I はじめに

網膜はそれ自体の重要性に加え、中枢神経発生のおよいモデルとして多くの研究がなされてきた。網膜は脊髄や脳と同様に神経上皮に由来し、発生初期には神経管が側方に膨らんでできる眼胞という構造を形成する。発生が進むと眼胞の表皮側が陥入して内外2層の眼杯が形成される。眼杯内層の細胞は分裂を繰り返し、整然とした神経細胞の層構造を形成する。この内層が神経網膜となり、外層が網膜色素上皮となる。神経網膜を構成する細胞としては、神経節細胞、アマクリン細胞、双極細胞、水平細胞、視細胞の5種類のニューロンと Müller グリアが存在する。視神経乳頭や血管周囲に存在するアストログリアは網膜由来ではなく、脳から移動してくることが報告¹⁾されている。これら網膜のニューロンやグリアはそれぞれ固有の時期に固有の場所で分化する。これらのニューロンやグリアの細胞運命決定メカニズムを解明することは、眼科学のみならず発生生物学および神経科学の大きな課題である。本稿では視細胞を中心に網膜細胞の運命決定メカニズムについて、最近の知見を交えて紹介したい。

II 神経発生の一元説と二元説

ニューロンとグリアが共通の前駆細胞から発生するか(一元説)、それぞれ別の前駆細胞から発生するか(二元説)という問題は、長い間神経発生学の大きな謎であった。この論争に終止符を打ったのが、Turner ら²⁾によ

る細胞系譜解析である。Turner らは β -galactosidase をコードするレトロウイルスベクターを生後 0~7 日のラット網膜下に注入し、4~6 週後に網膜を X-Gal で染色した。レトロウイルスに感染した前駆細胞は、その後分裂し、網膜を構成する細胞に分化する。単一の前駆細胞由来の網膜細胞は、近傍でクラスターを形成するため、それぞれのクラスターに含まれる細胞種や細胞数を解析することにより、単一の前駆細胞からどのような網膜細胞が分化してきたかということが追跡可能である(クローン解析)。クローン解析によると、生後 0 日の

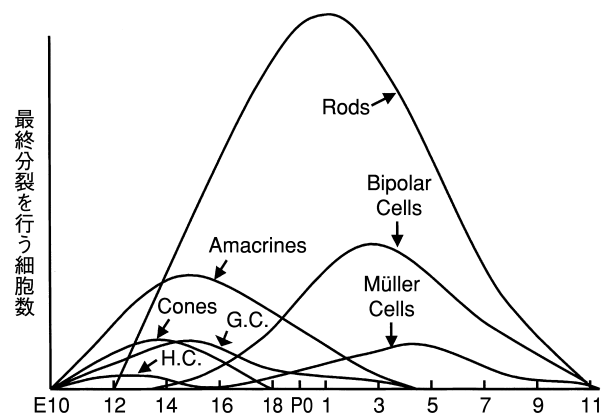


図 2 マウスにおける網膜細胞の発生順序。

それぞれの曲線は最終分裂の時期を示し、必ずしも分化の程度とは対応しないことに注意。

G.C.: ganglion cells, H.C.: horizontal cells. (文献 3 より一部改変)

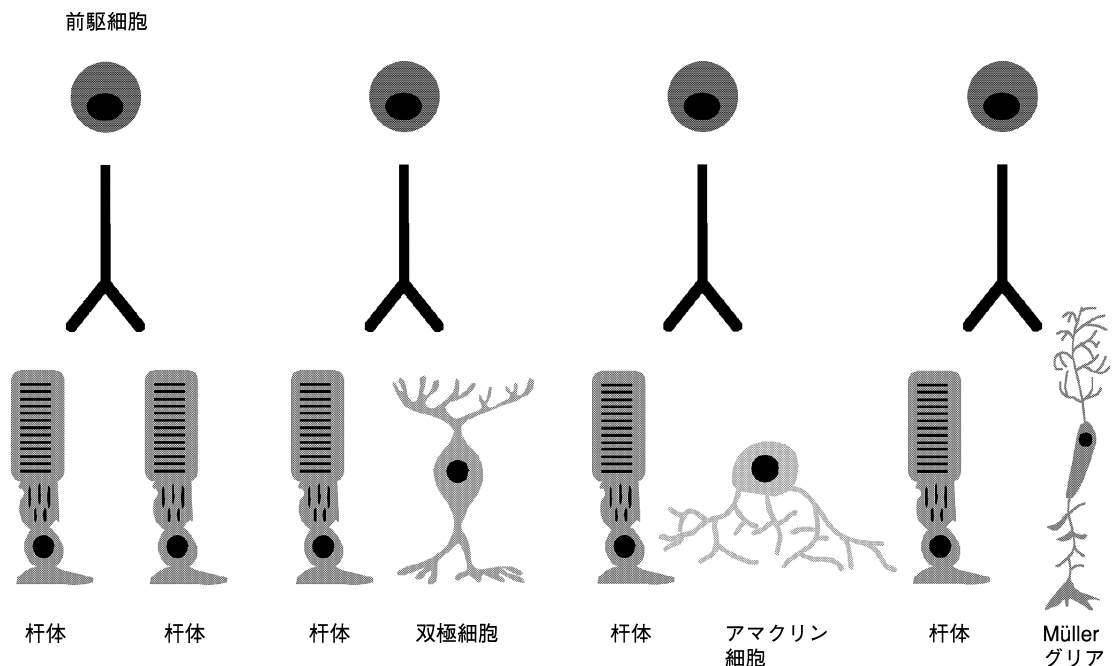


図 1 最終分裂段階の網膜前駆細胞。

出生直後のマウス網膜前駆細胞の多くは最終分裂段階にあり、1つの前駆細胞から2つの細胞に分化する。この2つの細胞の組み合わせはさまざまである。また、ニューロンだけにととまらず、ニューロンとグリア細胞の両方に分化する場合もある。

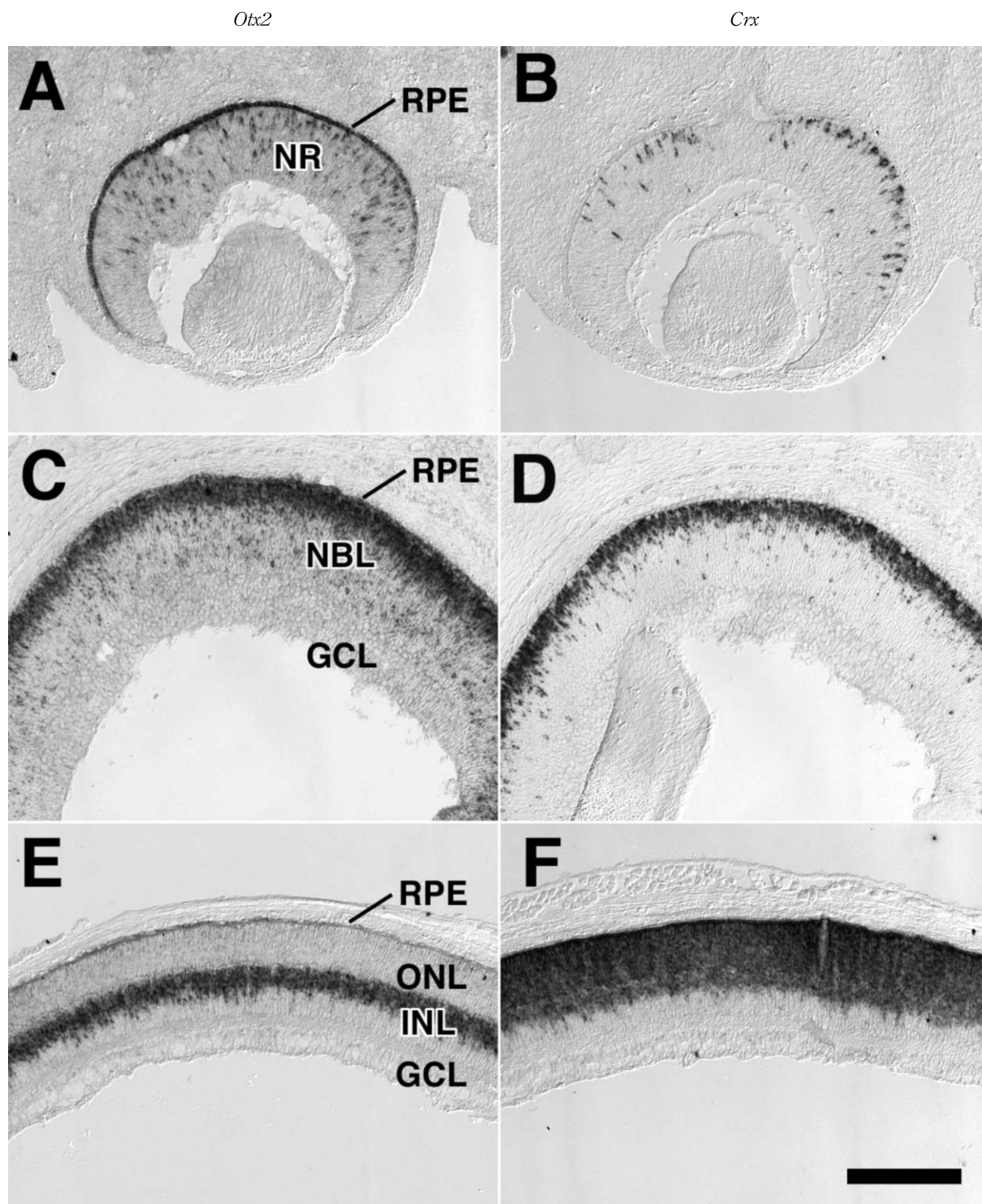


図3 発生過程のマウス網膜における *Otx2* と *Crx* の発現。

マウス網膜における *Otx2* (A, C, E) と *Crx* (B, D, F) の発現パターン (A, B). 胎生 12.5 日 (C, D). 胎生 17.5 日 (E, F). 生後 6 日. バーは 200 μ m

NR : neural retina, RPE : retinal pigment epithelium, GCL : ganglion cell layer, NBL : neuroblastic layer, INL : inner nuclear layer, ONL : outer nuclear layer. (文献 18 より一部改変)

ラット網膜では多くの前駆細胞が最終分裂段階にあり、1つの前駆細胞から2つの網膜細胞に分化する。この2つの細胞の組み合わせはさまざまであり、中には視細胞と Müller グリアという組み合わせも存在する²⁾(図1)。

これは、網膜においては最終分裂段階の前駆細胞からでも異なる種類のニューロンを生み出すことと、さらにニューロンとグリアが共通の前駆細胞から発生することを示している。

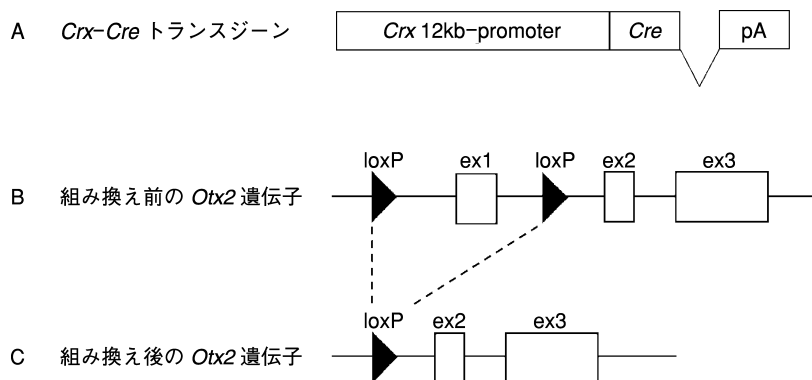


図 4 *Otx2* コンディショナルノックアウトマウスの作製。

(A) *Crx-Cre* トランスジェンの模式図。12 kb の *Crx* プロモーターの制御下に *Cre* リコンビナーゼが発現する (B, C)。Cre リコンビナーゼによる *Otx2* 遺伝子の組み換え。組み換え前の *Otx2/flox* マウスでは *Otx2* 遺伝子の第一エクソン(ex1)は loxP 配列によってはさまれている (B)。Cre リコンビナーゼによって組み換えが起こると loxP 配列にはさまれた部位に欠失が起こり、ex1 が欠損する (C)。Otx2 遺伝子の開始コドンは ex1 に存在するため、組み換えが起こると *Otx2* 遺伝子は不活性化する。(文献 18 より一部改変)

III 網膜の細胞運命決定のタイミング

網膜細胞は、それぞれに固有のタイミングで分化することが知られている。最も早く分化するのは神経節細胞であり、水平細胞、錐体視細胞、アマクリン細胞がそれに続き、最後に杆体視細胞、双極細胞、ミュラグリアが分化する³⁾(図 2)。網膜前駆細胞は多分化能を持つが、発生の各段階により分化できる細胞の種類が変化するというモデルが提唱されている⁴⁾。1 例を挙げると、ショウジョウバエの遺伝子 *atonal* のアフリカツメガエルホモログ *Xath5* は神経節細胞への分化を誘導することが知られている⁵⁾。*Xath5* 自身は細胞周期に対する影響を持たないが、サイクリンキナーゼのインヒビターである p27Xic1 を同時に強制発現し、細胞周期からの離脱を促進すると、*Xath5* の神経節細胞を誘導する活性が増強されることが報告⁶⁾されている。逆に、細胞周期のアクチベーターである cyclin E1 を *Xath5* と共発現させると、神経節細胞を誘導する活性が减弱し、より後期に発生する双極細胞が誘導されてくことも報告⁶⁾されている。これらの結果から、網膜細胞が正しく分化するには、適切な時期に分化を誘導するシグナル受け取り、適切な時期に細胞周期を離脱することが重要であると考えられる。

IV 網膜の細胞運命決定における転写因子の意義

転写因子は DNA 結合ドメインと活性化(または抑制)ドメインから成る蛋白質であり、DNA 上の遺伝子調節領域に結合することにより、その遺伝子の転写を活性化(または抑制)する。網膜を扱った多くの研究から、網膜前駆細胞が固有のニューロンやグリアへと分化していく際に、時期特異的あるいは細胞特異的な転写因子の発現

によって細胞の運命決定がなされることがわかっている。Cayouette ら⁷⁾は胎生 16~17 日のラット網膜を、血清を含む培地で器官培養したものと、分散処理後に無血清培地で低密度培養したものとで、その後の網膜細胞の分化パターンを比較したところ有意差はみられなかったと報告している。無血清培地中の低密度培養では、血清に含まれる液性因子や隣接する細胞からのシグナルの影響が排除されていると考えられるので、少なくとも発生の途中課程において、細胞外からの外的因子が細胞運命決定に影響を与えない時期が存在すると考えられる。いい換えれば、細胞内の転写因子の発現が細胞運命決定に非常に重要な役割を演じていることが推測される。一方では、ラット網膜の器官培養に ciliary neurotrophic factor (CNTF) を添加することにより、網膜視細胞から双極細胞に細胞運命が変換したという報告⁸⁾もされている。CNTF の正常網膜発生への関与は不明であるが、転写因子によって決定した細胞運命を外的因子の添加によって修飾できるというのは興味深い事実である。

V 網膜視細胞の運命決定に関わる *Otx2* と *Crx* の役割

網膜視細胞の細胞運命決定機構に目を向けると、いくつかの重要な転写因子が存在する。網膜視細胞および松果体に発現する *Crx* は、転写因子の一つである *Otx* ホメオボックス遺伝子ファミリーに属し、1997 年に Furukawa ら⁹⁾によってクローニングされた。ヒト *CRX* の変異は網膜色素変性症、II 型錐体杆体ジストロフィ、Leber 先天盲といった疾患の原因になることが報告^{10)~13)}されている。網膜における *Crx* の発現は、マウスでは胎生 12.5 日頃から神経網膜外層にみられるようになり、視細胞に特異的な遺伝子が発現しはじめる生後 6 日頃にピークを迎える(図 3)。Crx 蛋白の結合する DNA 配

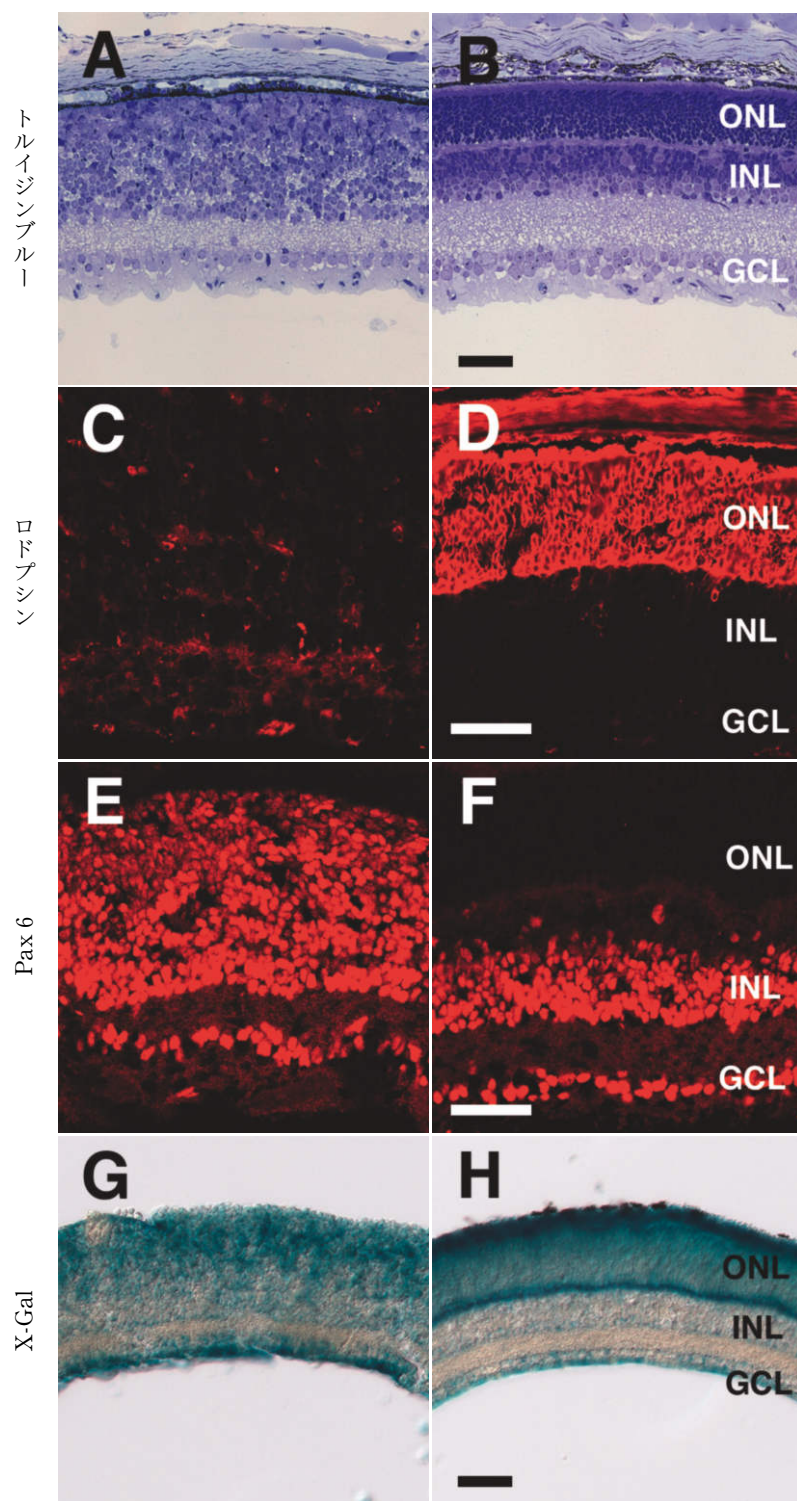


図 5 *Otx2* コンディショナルノックアウトマウスの網膜所見.

生後9～12日の *Otx2* コンディショナルノックアウトマウス(A, C, E, G)と対照マウス(B, D, F, H)の網膜所見(A, B). トルイジンブルー染色(C, D). 抗ロドプシン抗体による免疫染色(E, F). 抗 Pax 6 抗体による免疫染色(G, H). X-Gal 染色. lacZ 陽性細胞は緑色に染色される. バーは 50 μ m

GCL: ganglion cell layer, INL: inner nuclear layer, ONL: outer nuclear layer. (文献 18 より一部抜粋)

列 TAATCC/A は, ロドプシンをはじめとする視細胞特異的遺伝子上流の発現制御領域にみられ, *Crx* はこれらの遺伝子の転写を制御している. 生後0日のラット

網膜にレトロウイルスを使って *Crx* の強制発現を行ったところ, 杆体を含むクローンが増加し, アマクリン細胞や Müller グリアを含むクローンが減少した⁹⁾. この

実験から、*Crx* が視細胞の細胞運命決定に関与していることが示唆された。一方、*Crx* のノックアウトマウスの解析によると、*Crx* ホモ変異体マウスでは視細胞外節が形成されず、網膜電図では錐体・杆体の網膜電位がともに消失していた¹⁴⁾。また、ロドプシンをはじめとする視細胞特異的遺伝子の発現が著しく低下していた¹⁴⁾。これらの結果から、*Crx* は視細胞特異的遺伝子の発現を調節することにより、視細胞の最終分化に不可欠であると考えられたが、その一方でホモ変異体マウスでも視細胞の初期発生はみられることから、機能的に重複する遺伝子の存在が示唆されていた。

Otx2 は *Crx* と同じ *Otx* ホメオボックス遺伝子ファミリーに属し、ショウジョウバエの遺伝子 *orthodenticle* (*otd*) のホモログとしてクローニングされた¹⁵⁾¹⁶⁾。*Otx2* は眼を含む前脳から中脳にかけての神経上皮に広く発現していることが報告¹⁶⁾¹⁷⁾されている。網膜における *Otx2* の発現は胎生 12 日頃から神経網膜外層にみられ、*Crx* の発現パターンとよくオーバーラップしている。*Crx* の発現と異なる点は、神経網膜に加えて網膜色素上皮にも発現がみられることと、生後は視細胞層での発現が著しく減弱することである¹⁸⁾(図 3)。*Otx2* のホモ変異体マウスは胎生致死であるため¹⁷⁾¹⁹⁾²⁰⁾、*Otx2* の視細胞発生における役割を調べるために Cre-loxP システムを用いたコンディショナルノックアウトマウスを作製した。*Otx2* 遺伝子の 5' 上流領域と第 1 イントロンに loxP 配列を挿入した *Otx2/flox* マウス²¹⁾と、*Crx* プロモーターの制御下に Cre リコンビナーゼを発現する *Crx-Cre* トランスジェニックマウスを掛け合わせるにより、網膜視細胞および松果体で特異的に *Otx2* が不活性化されるような *Otx2* コンディショナルノックアウトマウスを作製した¹⁸⁾(図 4)。このコンディショナルノックアウトマウスは小眼球を示し、また、松果体は完全に欠損していた。網膜の組織を詳細に解析すると、生後 9 日で明らかな視細胞層を認めず、層構造の異常を示した(図 5 A, B)。網膜細胞の各種マーカーを用いて免疫染色を行ったところ、ロドプシンによって染色される視細胞の消失と Pax 6 によって染色されるアマクリン細胞の著しい増加がみられた(図 5 C~F)。さらに、網膜細胞をトリプシンで分散した後に免疫染色を行い、細胞数を定量したところ、コンディショナルノックアウトマウスではアマクリン細胞の比率が増えているだけでなく、実際の細胞数も増加していることが明らかになった(図 6)。続いて Cre リコンビナーゼ存在下に lacZ 活性が陽性となる CAG-CAT-Z トランスジェニックマウス²²⁾をコンディショナルノックアウトマウスと掛け合わせ、*Otx2*^{+/flox}; *Crx-Cre*(+); CAG-CAT-Z(+)²²⁾と *Otx2*^{flox/flox}; *Crx-Cre*(+); CAG-CAT-Z(+)²²⁾の遺伝子型を持つものを比較した。前者では lacZ 陽性細胞、すなわち Cre リコンビナーゼにより遺伝子組み換えが起こった細胞は、視細胞層に局限しているのに対し、後者では網膜全層に分布

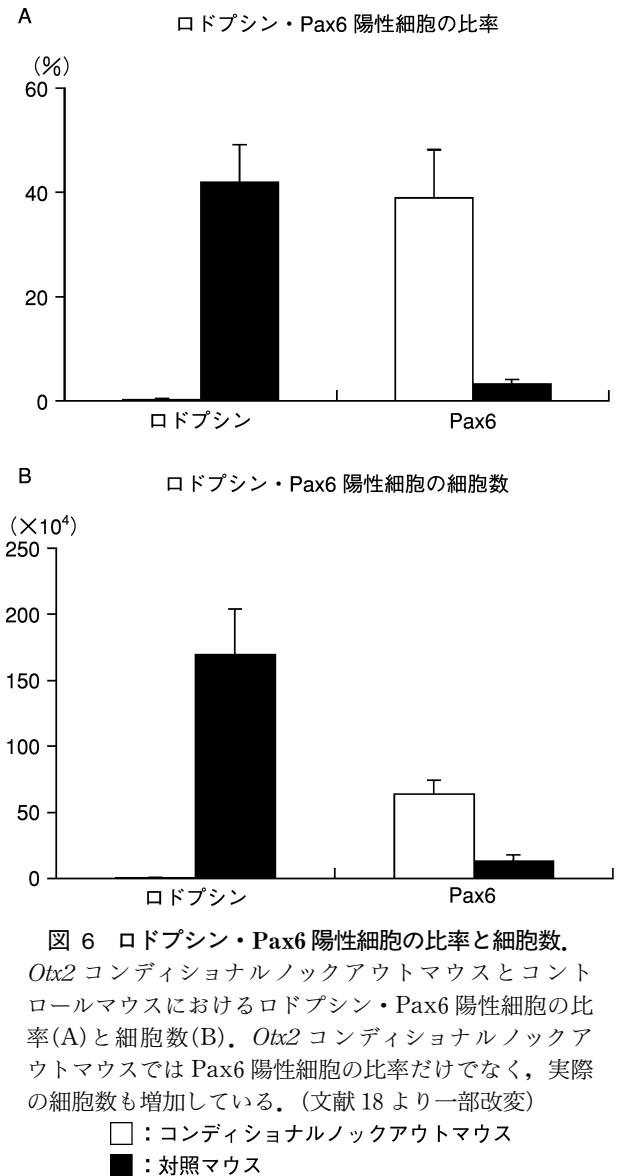


図 6 ロドプシン・Pax6 陽性細胞の比率と細胞数。

Otx2 コンディショナルノックアウトマウスとコントロールマウスにおけるロドプシン・Pax6 陽性細胞の比率(A)と細胞数(B)。 *Otx2* コンディショナルノックアウトマウスでは Pax6 陽性細胞の比率だけでなく、実際の細胞数も増加している。(文献 18 より一部改変)

□ : コンディショナルノックアウトマウス
■ : 対照マウス

細胞層に局限しているのに対し、後者では網膜全層に分布していた(図 5 G, H)。すなわち、コンディショナルノックアウトマウスにおける視細胞の消失とアマクリン細胞の増加は、視細胞の系譜を選択した細胞が細胞死によって消失し、アマクリン細胞の系譜を選択した細胞が増殖した結果ではなく、本来であれば視細胞の系譜を選択するはずの細胞が *Otx2* を不活性化することによりアマクリン細胞の系譜に細胞運命を転換したものと考えられる。また、*Otx2* と網膜に発現がみられる他の転写因子群との関係を調べるために、胎生 18.5 日の *Otx2* コンディショナルノックアウトマウスの網膜に *in situ* ハイブリダイゼーションを行ったところ、*Crx* の発現が消失していることが明らかになった。*Crx* は、そのプロモーター領域に *Crx* 結合配列を持ち、*Crx* 自身が自己の発現を維持していることが報告²³⁾されている。*Otx2* は *Crx* と共通の DNA 結合ドメインを持つため、発生

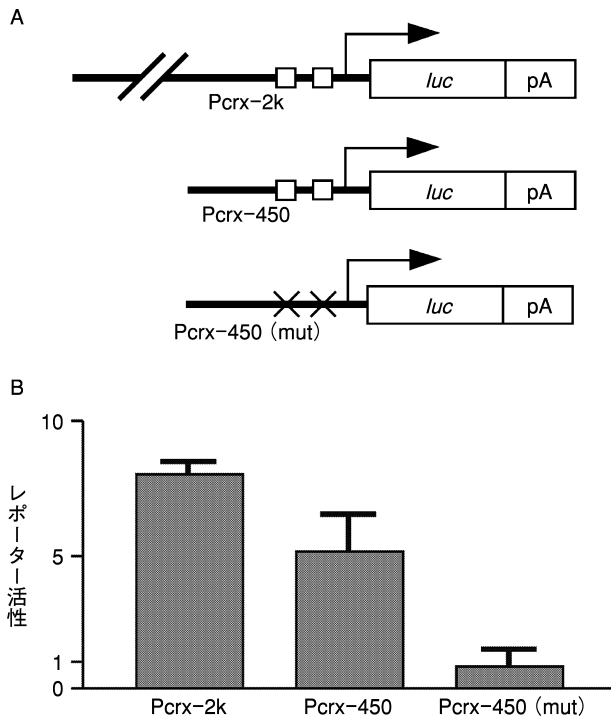


図7 *Crx* プロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイ。

A: レポーターベクターの模式図。2kb および 450bp の *Crx* 上流領域(Pcrx-2k, Pcrx-450)にルシフェラーゼ遺伝子を結合した。また, *Crx* 結合部位に変位を導入したレポーターベクター {Pcrx-450 (mut)} も作製した。□は *Crx* 結合部位, ×は変異を導入した *Crx* 結合部位を示す。B: レポーターベクターを *Otx2* 発現ベクターと共発現させると, レポーターベクターの *Crx* 結合部位に変異が導入されていない場合はレポーター活性が上昇するが, 変異が導入されている場合はレポーター活性が上昇しない。(文献 18 より一部改変)

初期には *Otx2* が *Crx* の発現を調節している可能性が考えられた。そこで, *Crx* のプロモーター領域を用いたルシフェラーゼアッセイを行った。*Crx* プロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を結合したレポーターベクターを作製し(図7A), NIH3T3 細胞に *Otx2* 発現ベクターと共発現させた。*Crx* プロモーター上の *Crx* 結合配列に変異を導入しない場合, *Otx2* の共発現によりルシフェラーゼ活性は上昇したが, *Crx* 結合配列に変異を導入すると, *Otx2* を共発現してもルシフェラーゼ活性はほとんど変化しなかった(図7B)。これは *Otx2* が *Crx* プロモーター上の *Crx* 結合部位を介して *Crx* の発現を直接調節することを強く示唆する結果である。さらに, 我々は *Otx2* の強制発現の効果を調べるために, レトロウイルスによる遺伝子導入実験を行った。生後0日のラット網膜にレトロウイルスベクターを用いて *Otx2* を強制発現させたところ, 杆体を含むクローンが有意に増加し, アマクリン細胞, 双極細胞, Müller グリアを含むクローンは有意に減少した(図8)。*Crx* の強制発現によっても同様の傾向が認められているが⁹⁾, 杆体を含む

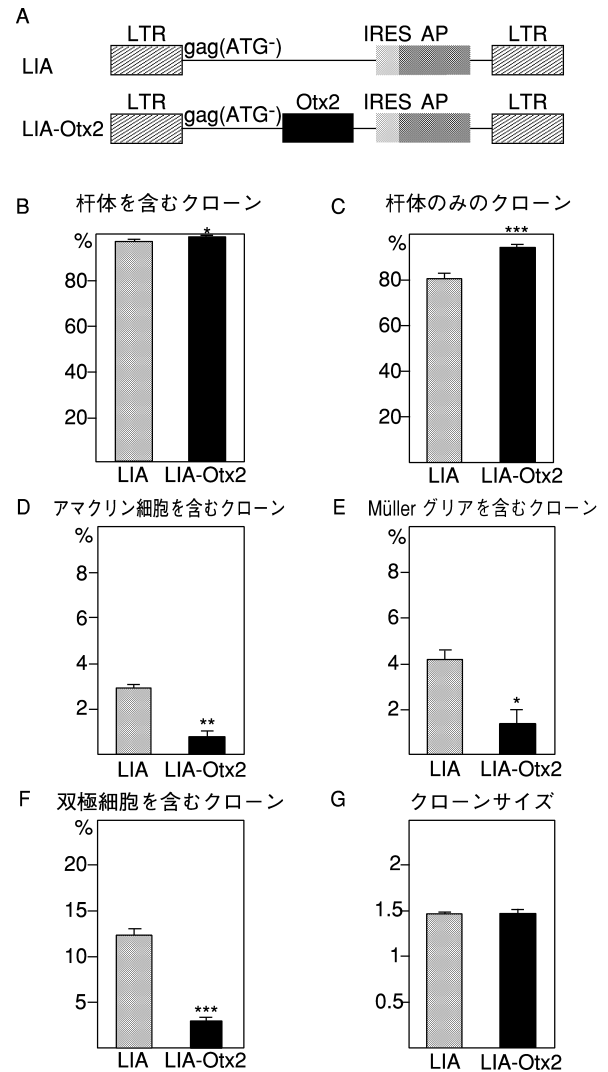


図8 *Otx2* の強制発現の効果。

A: *Otx2* 発現レトロウイルスベクター(LIA-Otx2)とコントロールベクター(LIA)。B~F: LIA-Otx2に感染したクローンは, 杆体を含むクローンが有意に増加し, アマクリン細胞, Müller グリア, 双極細胞を含むクローンが有意に減少する。G: クローンサイズ(一つのクローンに含まれる平均細胞数)は LIA 感染群と LIA-Otx2 感染群で変化がないことから, *Otx2* の強制発現は細胞増殖や細胞死に影響を与えないと考えられる。*t* 検定で* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0005$ 。(文献 18 より一部改変)

クローンの増加は *Crx* を強制発現させた場合よりも著しく, *Otx2* は *Crx* よりも視細胞を誘導する効果が大きいと考えられる。

以上の結果から, *Otx2* は網膜前駆細胞の運命を視細胞に決定するためのマスター遺伝子であるということが出来る。また同時に, *Otx2* は *Crx* の発現を誘導し, 視細胞に運命を決定した前駆細胞は成熟した視細胞へと最終分化する(図9)。生後には視細胞における *Otx2* の発現は減弱している(図3E)ことから, 視細胞の最終分化に主に関与しているのは *Crx* であるといえる。つまり

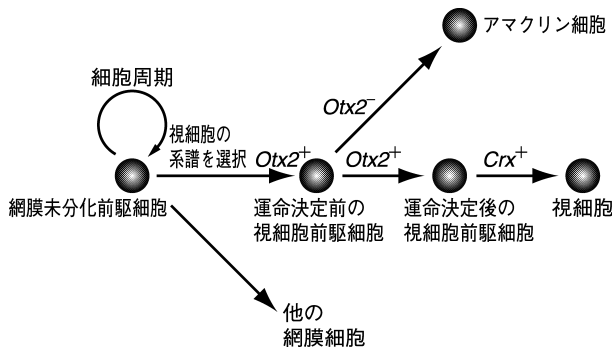


図 9 網膜視細胞の運命決定モデル。

網膜未分化前駆細胞の一部が細胞周期を離脱し、視細胞の系譜を選択する。Otx2 の存在下で細胞運命は視細胞に決定され、Crx の発現により成熟した視細胞へと最終分化する。細胞運命の決定前に Otx2 の発現が消失すると、視細胞前駆細胞はその細胞運命をアマクリン細胞へと転換する。

視細胞の発生において、細胞運命の決定には Otx2 が、最終分化には Crx が主な役割を演じていると考えられる。

VI おわりに

以上、網膜視細胞の細胞運命決定機構を Otx2 と Crx の働きを中心に解説した。視細胞は網膜色素変性症や加齢黄斑変性症など、多くの網膜疾患で傷害され、その多くは有効な治療法がない。網膜は中枢神経由来の組織であるため、いったん損傷を受けると機能回復は困難とされてきた。しかし、近年の網膜を含めた中枢神経系幹細胞の発見により、従来は不可能とされていた網膜変性疾患に対する治療にも希望の光が見えてきたといえる。視細胞を含めた網膜の発生メカニズムをより正しく理解することが、今後網膜に対する再生医療を進める上で必要不可欠であると考えている。

稿を終えるに当たり研究をご指導いただきました大阪バイオサイエンス研究所発生生物学部門古川貴久部長、小池千恵子博士、大阪大学医学部眼科学教室田野保雄教授、古川晶子先生、理化学研究所発生・再生科学総合研究センター相澤慎一グループリーダー、松尾 勲博士に深謝いたします。

文 献

- 1) Ling TL, Mitrofanis J, Stone J : Origin of retinal astrocytes in the rat : evidence of migration from the optic nerve. J Comp Neurol 286 : 345—352, 1989.
- 2) Turner DL, Cepko CL : A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. Nature 328 : 131—136, 1987.
- 3) Young RW : Cell differentiation in the retina of the mouse. Anat Rec 212 : 199—205, 1985.

- 4) Cepko CL, Austin CP, Yang X, Alexiades M, Ezzeddine D : Cell fate determination in the vertebrate retina. Proc Natl Acad Sci U S A 93 : 589—595, 1996.
- 5) Kanekar S, Perron M, Dorsky R, Harris WA, Jan LY, Jan YN, et al : Xath5 participates in a network of bHLH genes in the developing Xenopus retina. Neuron 19 : 981—994, 1997.
- 6) Ohnuma S, Hopper S, Wang KC, Philpott A, Harris WA : Co-ordinating retinal histogenesis : early cell cycle exit enhances early cell fate determination in the Xenopus retina. Development 129 : 2435—2446, 2002.
- 7) Cayouette M, Barres BA, Raff M : Importance of intrinsic mechanisms in cell fate decisions in the developing rat retina. Neuron 40 : 897—904, 2003.
- 8) Ezzeddine ZD, Yang X, DeChiara T, Yancopoulos G, Cepko CL : Postmitotic cells fated to become rod photoreceptors can be respecified by CNTF treatment of the retina. Development 124 : 1055—1067, 1997.
- 9) Furukawa T, Morrow EM, Cepko CL : Crx, a novel *otx*-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation. Cell 91 : 531—541, 1997.
- 10) Freund CL, Gregory-Evans CY, Furukawa T, Papaioannou M, Looser J, Ploder L, et al : Cone-rod dystrophy due to mutations in a novel photoreceptor-specific homeobox gene (CRX) essential for maintenance of the photoreceptor. Cell 91 : 543—553, 1997.
- 11) Freund CL, Wang QL, Chen S, Muskat BL, Wiles CD, Sheffield VC, et al : De novo mutations in the CRX homeobox gene associated with Leber congenital amaurosis. Nat Genet 18 : 311—312, 1998.
- 12) Sohocki MM, Sullivan LS, Mintz-Hittner HA, Birch D, Heckenlively JR, Freund CL, et al : A range of clinical phenotypes associated with mutations in CRX, a photoreceptor transcription factor gene. Am J Hum Genet 63 : 1307—1315, 1998.
- 13) Swain PK, Chen S, Wang QL, Affatigato LM, Coats CL, Brady KD, et al : Mutations in the cone-rod homeobox gene are associated with the cone-rod dystrophy photoreceptor degeneration. Neuron 19 : 1329—1336, 1997.
- 14) Furukawa T, Morrow EM, Li T, Davis FC, Cepko CL : Retinopathy and attenuated circadian entrainment in Crx-deficient mice. Nat Genet 23 : 466—470, 1999.
- 15) Simeone A, Acampora D, Gulisano M, Stornaiuolo A, Boncinelli E : Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain. Nature 358 : 687—690, 1992.
- 16) Simeone A, Acampora D, Mallamaci A, Stornaiuolo A, Boncinelli E, Zappavigna S, et al : The homeobox gene *Crx* is expressed in the developing mouse retina and is essential for the differentiation of rod photoreceptors. Development 124 : 1055—1067, 1997.

- naiuolo A, D'Apice MR, Nigro V**, et al : A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo. *Embo J* 12 : 2735—2747, 1993.
- 17) **Ang SL, Jin O, Rhinn M, Daigle N, Stevenson L, Rossant J** : A targeted mouse *Otx2* mutation leads to severe defects in gastrulation and formation of axial mesoderm and to deletion of rostral brain. *Development* 122 : 243—252, 1996.
 - 18) **Nishida A, Furukawa A, Koike C, Tano Y, Aizawa S, Matsuo I**, et al : *Otx2* homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development. *Nat Neurosci* 6 : 1255—1263, 2003.
 - 19) **Acampora D, Mazan S, Lallemand Y, Avantaggiato V, Maury M, Simeone A**, et al : Forebrain and midbrain regions are deleted in *Otx2*^{-/-} mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Development* 121 : 3279—3290, 1995.
 - 20) **Matsuo I, Kuratani S, Kimura C, Takeda N, Aizawa S** : Mouse *Otx2* functions in the formation and patterning of rostral head. *Genes Dev* 9 : 2646—2658, 1995.
 - 21) **Tian E, Kimura C, Takeda N, Aizawa S, Matsuo I** : *Otx2* is required to respond to signals from anterior neural ridge for forebrain specification. *Dev Biol* 242 : 204—223, 2002.
 - 22) **Sakai K, Miyazaki J** : A transgenic mouse line that retains Cre recombinase activity in mature oocytes irrespective of the *cre* transgene transmission. *Biochem Biophys Res Commun* 237 : 318—324, 1997.
 - 23) **Furukawa A, Koike C, Lippincott P, Cepko CL, Furukawa T** : The mouse *Crx* 5'-upstream transgene sequence directs cell-specific and developmentally regulated expression in retinal photoreceptor cells. *J Neurosci* 22 : 1640—1647, 2002.
-