# 第113回 日本眼科学会総会 評議員会指名講演Ⅲ

# 眼疾患と動物モデル

# 眼発生の分子メカニズムの探究と眼疾患モデルへの展開

### 稲谷 大

熊本大学医学部附属病院眼科

#### 共同研究者

岩尾圭一郎, 沖波 聡(佐賀大学医学部眼科学教室)
 岩尾美奈子, 瀧原 祐史, 谷原 秀信(熊本大学大学院医学薬学研究部視機能病態学)
 松本 嘉寛(九州大学医学部整形外科学教室)

入江 史敏,山口 祐(Sanford Children's Health Research Center, Burnham Institute for Medical Research)

視神経の軸索誘導は、中枢神経組織の神経回路形成の 研究モデルとして広く用いられ、そのメカニズムを解明 することは、緑内障や脊髄損傷などの後天的な中枢神経 障害に対する軸索再生治療においても重要な研究課題で ある. 網膜神経節細胞の軸索(視神経)が脳へ投射される 分子機構を解明する目的で、<br />
軸索誘導の候補分子とされ ていたプロテオグリカンに焦点を当て研究を行った。免 疫組織化学染色によって、プロテオグリカンは網膜発生 過程で、神経網膜内層に著しい発現上昇を認めた、さら に、網膜に発現するプロテオグリカンは、培養網膜神経 節細胞の神経突起の伸長を抑制することが示された、次 に生体内での役割を検証するために、ノックアウトマウ スを作製した.我々は、プロテオグリカンのグリコサミ ノグリカン糖鎖を合成する酵素がプロテオグリカン分子 群で共有されていることに注目し、ヘパラン硫酸の合成 酵素 Ext1のコンディショナルノックアウトマウスを作 製して、中枢神経組織選択的にヘパラン硫酸を欠損さ せ、プロテオグリカンの役割を検証した. ヘパラン硫酸 欠損マウスの脳組織と視神経において、軸索が正中線を 越える部位で軸索投射異常が生じた.視交叉では,正中 線を越えたあとに,対側の上位中枢へ投射せずに,僚眼 の視神経に沿って異常な投射を示した. この視神経投射 異常は、軸索ガイダンス分子 Slit 蛋白質による作用が 障害されるためであることが、遺伝子改変マウスの実験

#### 要 約

で示された. 視神経軸索に発現するヘパラン硫酸プロテ オグリカンが Slit 蛋白質とその受容体との相互作用を 修飾し、細胞応答を調節していると考えられた、この分 子機構はさまざまなヘパリン親和性分子の生体内での作 用にも重要なプロセスであると考え、前眼部を構成する 神経堤細胞でヘパラン硫酸を選択的にノックアウトさ せ、その眼発生を観察した、変異マウスでは、角膜内皮 欠損、角膜実質低形性、隅角形成不全などの前房形成異 常がみられ、Peters 奇形に酷似した表現型が生じた. 変異型の神経堤細胞由来の眼組織では、TGFB₂シグナ リングが障害されており、TGF B2依存性の細胞分裂や 下流のシグナルに関連する分子群の活性が低下してい た. さらに、TGFβ₂とヘパラン硫酸との相互作用を障 害させると、隅角形成不全と眼圧上昇を伴う発達緑内障 モデルが作製された.本研究結果において,哺乳動物の 生体内におけるヘパラン硫酸プロテオグリカンによる生 理活性物質の作用調節機構を、視神経軸索誘導と前眼部 形態形成の動物モデルを用いて証明することができた. (日眼会誌 114:280-297, 2010)

キーワード:コンドロイチン硫酸プロテオグリカン, Smad 2,虹彩裂,口蓋裂,線維芽細胞増 殖因子

別刷請求先:860-8556 熊本市本荘1—1—1 熊本大学医学部附属病院眼科 稲谷 大 (平成21年10月13日受付,平成21年11月20日改訂受理) E-mail:inatani@kumamoto-u.ac.jp Reprint requests to: Masaru Inatani, M. D. Department of Ophthalmology and Visual Science, Kumamoto University Graduate School of Medical Sciences. 1-1-1 Honjo, Kumamoto-shi 860-8556, Japan (Received October 13, 2009 and accepted in revised form November 20, 2009)

# A Review

# Exploration of the Molecular Mechanism of Ocular Development and the Creation of Animal Models for Ocular Diseases

眼発生の分子メカニズムの探究と眼疾患モデルへの展開・稲谷

#### Masaru Inatani

Department of Ophthalmology and Visual Science, Kumamoto University Graduate School of Medical Sciences

#### Abstract

Optic nerve pathfinding is a useful model for investigating neural network formation in the central nervous system (CNS). Understanding the molecular mechanism underlying optic nerve pathfinding will lead to progress in regenerative therapy for acquired CNS damage such as glaucoma and spinal cord injury in humans. To investigate why retinal ganglion cells extend their axons toward the brain, we focused on the role of proteoglycans in optic nerve guidance. Immunohistochemical analyses showed intense upregulation in expression of proteoglycans in the inner retinal layers during eye development. We found that proteoglycans inhibited neurite outgrowth of retinal ganglion cells in culture. Subsequently, we disrupted the gene for Ext 1, an essential enzyme for glycosaminoglycan synthesis of all the heparan sulfate proteoglycans. The Ext 1 mutant mice in which Ext 1 was selectively disrupted in the CNS exhibited severe guidance errors in optic nerve and brain commissural axons when the axons crossed the midline. When the optic nerve crossed the midline at the chiasm, the vast majority of axons projected ectopically into the contralateral optic nerve. Generation of Slit 2 and Ext 1 compound mutants caused disturbed activity of Slit proteins, heparin/heparan sulfate-binding chemorepulsive guidance factors. The data suggest that heparan sulfate proteoglycans in optic nerves probably modulate the activity of Slit during the optic

### I 緒 言

網膜の発生は,脳の間脳から両側へ突出した眼胞に由 来する.この突出した眼胞が表皮外胚葉へ接近すると, 自ら陥入し,外層が網膜色素上皮,内層が神経網膜へと 分化する.神経網膜は,内層(網膜神経節細胞)から外層 (視細胞)へ向かって細胞分化が生じ,神経細胞のネット ワークが形成されていく.一方,網膜神経節細胞の軸索 (視神経)は,網膜が脳からいったん分離した後に,再び もとの脳へ向かって投射する.その軸索投射は,網膜内 の神経ネットワーク形成よりも先立ち,視神経乳頭へ向 かって伸長し視神経乳頭を形成する.その後,視神経乳 頭から眼外へ向かって軸索が伸長し,正中線で視交叉を chiasm formation. Therefore, to examine whether the interaction between heparan sulfate and heparinbinding molecules is also critical for other ocular developmental events, we selectively disrupted heparan sulfate in the neural crest cells constituent of the anterior ocular segment in mice. Heparan sulfate deficiency in neural crest cells caused anterior chamber angle dysgenesis, including corneal endothelium defects, corneal stroma hypoplasia, and iridocorneal dysgenesis. The anomalies are comparable to Peters anomaly, a type of developmental glaucoma in humans. Loss of heparan sulfate in neural crest cells disturbed TGF $\beta_2$  signaling such as impaired TGF $\beta_2$ dependent cell proliferation and reduced activity of TGF $\beta_2$ -downstream molecules. Furthermore, impaired interaction between heparan sulfate and TGF $\beta_2$  caused developmental glaucoma, which was manifested as elevated intraocular pressure caused by iridocorneal angle dysgenesis. These developmental animal models revealed that heparan sulfate proteoglycans have an essential role in regulation of heparin-binding molecules in vivo.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 114 : 280—297, 2010)

## Key words : Chondroitin sulfate proteoglycan, Smad 2, Iris coloboma, Cleft palate, Fibroblast growth factor

形成する.両眼視のある動物の視神経では,視交叉にお いて交叉線維と非交叉線維に分かれ,さらに脳へ向かっ て投射する.それから,視索を経て外側膝状核や上丘/ 視蓋などの上位中枢を有する脳へ向かって投射し,最終 的にシナプスを形成するのである<sup>1)</sup>.このように,視神 経は軸索誘導の過程で実に特徴的なイベントが数多くみ られ,しかも,比較的太い軸索が脳から分離した空間を 長い距離にわたって投射するので,マウスやラット,ゼ ブラフィッシュのような小動物でも実験操作が行いやす く,中枢神経組織の神経回路形成の実験対象として広く 用いられてきた.視神経の軸索誘導のメカニズムを解明 することは,中枢神経組織の基本的機能に必須である神 経回路形成を理解するという純粋な科学的好奇心だけに

分子名	分類	視神経に対する作用	作用する部位
L1	接着因子	軸索束形成	網膜, TM
Chondroitin sulfate	グリコサミノグリカン	反発	網膜, 視交叉
Heparan sulfate	グリコサミノグリカン	反発/誘引	視交叉
Netrin-1	DCC のリガンド	誘引	乳頭
DCC	Netrin-1 の受容体	誘弓	乳頭
Slit	Robo のリガンド	反発	視交叉
Robo	Slit の受容体	反発	視交叉
Ephrin-B1	EphB のリガンド	誘弓	TM
Ephrin-B2	EphB のリガンド	反発	視交叉
EphB1	Ephrin-B の受容体	反発	視交叉
EphB2	Ephrin-B の受容体	誘弓	TM
EphB3	Ephrin-B の受容体	誘弓	TM
Ephrin-A2	EphA のリガンド	反発	TM
Ephrin-A5	EphA のリガンド	反発	TM
EphA2	Ephrin-A の受容体	反発	TM
EphA5	Ephrin-A の受容体	反発	TM
EphA6	Ephrin-A の受容体	反発	TM
Semaphorin 5A	膜蛋白質	軸索束形成	網膜,乳頭
GAP-43	膜蛋白質	—	視交叉
HESX-1	転写因子	—	乳頭
Zic 2	転写因子	_	視交叉
Vax 1	転写因子	—	乳頭,視交叉
Vax 2	転写因子	—	乳頭,視交叉
Pax 2	転写因子	—	視交叉
Tbx 5	転写因子	—	TM
Brn 3b	転写因子	—	視交叉
Brn 3c	転写因子	—	視交叉
Foxd 1	転写因子	—	視交叉
Foxg 1	転写因子	—	視交叉
Islet-2	転写因子		視交叉

表 1 視神経軸索誘導に関連する分子

TM:上丘/視蓋へのトポグラフィックマッピング

とどまらず,脊髄損傷,緑内障などによる後天的な中枢 神経障害に対する軸索再生医療にもかかわってくる研究 課題でもある.

軸索誘導の分子メカニズムの古典的な概念として,19 世紀末に,スペインの解剖学者のカハールによって提唱 された化学向性説(chemotropic theory)がある<sup>2)</sup>.これ は,神経軸索が標的細胞から分泌される何らかの化学因 子によりガイドされるという考えであるが,近年になっ て,ノックアウトマウスやノックダウンによる遺伝子改 変動物の視神経を用いた解析によって,カハールの化学 向性説に合致するさまざまな軸索誘導(反発)因子や軸索 に発現するその受容体の存在が明らかになり,分子レベ ルでの軸索誘導のメカニズムの研究は大きく進歩してき た<sup>3</sup>(表 1).

視神経の投射はどのようなメカニズムで形成されるの か? この問いを解明することを目的に,我々はプロテ オグリカンと呼ばれる糖蛋白質の役割に焦点を当てて研 究を行った.なぜなら,プロテオグリカンは,生体内に おけるさまざまな成長因子や接着因子,軸索ガイダンス 分子と結合する働きがあり,中枢神経組織の発生過程に 深くかかわっていると長年指摘されてきたからである <sup>4)5)</sup>.プロテオグリカンは、グリコサミノグリカンと呼 ばれる糖鎖とその糖鎖へ共有結合する蛋白質(コア蛋白 質)で構成される糖蛋白質の総称であり、そのグリコサ ミノグリカン糖鎖とコア蛋白質を介して、さまざまな成 長因子や重要な機能性蛋白質との相互作用を示す. グリ コサミノグリカンは、ウロン酸とヘキソサミンからなる 二糖の繰り返し基本構造に、硫酸化によって修飾を受け た糖鎖分子である.糖鎖の性質によって、コンドロイチ ン硫酸、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸、ヒアルロン酸に 分類される. ヒアルロン酸を除いて, 生体内では, グリ コサミノグリカンは、プロテオグリカンとして存在す る. コア蛋白質にも分子構造の多様性がみられ、細胞外 に分泌され細胞外マトリックスを構成する分子と細胞膜 貫通ドメインや膜結合ドメインを有し細胞表面に発現す る分子とに分類される.

プロテオグリカンと視神経の軸索投射との関連につい ては、Brittis らが 1992 年に Science に報告したコンド ロイチン硫酸プロテオグリカンによる視神経乳頭への軸 索誘導の研究が最初である<sup>6)</sup>.彼らの報告によると、 ラットの胎生期の神経網膜を抗コンドロイチン硫酸抗体 で免疫染色したところ,周辺網膜の方が網膜後極部より も染色性が強く,コンドロイチン硫酸の濃度の低い後極 部側つまり視神経乳頭へ向かって,網膜神経節細胞の軸 索は投射する現象がみられるというものである.実際, 培養された網膜組織にコンドロイチン硫酸の分解酵素を 投与すると,網膜神経節細胞の軸索が乳頭以外の領域へ 投射する異常が報告されている.

本研究において我々は、哺乳動物の視神経の投射にお いて、プロテオグリカンが本当に不可欠な分子なのかを コンディショナルノックアウトマウスの手法を用いて検 証した.また、そのメカニズムは、視神経投射だけでな く、中枢神経組織の軸索誘導にも必要な分子機構であ り、さらに、眼発生にかかわる成長因子などの制御機構 をも担っていることが本研究で明らかになったため報告 する.

# Ⅱ ラット発生網膜におけるプロテオグリカン の局在変化

我々は、まず、網膜発生におけるプロテオグリカンの 発現を検討した.方法は、胎生期から生後42日までの ラット網膜の凍結切片を作製し、プロテオグリカンのう ち, 脳組織で豊富に発現することが知られているコンド ロイチン硫酸プロテオグリカン(ニューロカン、ホスフ ァカン), ヘパラン硫酸プロテオグリカン(N-シンデカ ン)の免疫組織化学染色を行った<sup>7)~9)</sup>. 脳組織に発現す るプロテオグリカンは神経回路形成に関与している可能 性が高く, 脳と比べて構造が単純な網膜では、神経回路 形成ときわめて連動した発現がみられると考えたからで ある.これらのプロテオグリカンの網膜での発現に共通 した現象として、 ラットの出生前後の神経網膜におい て、著しい発現上昇がみられ、神経網膜内層と視神経乳 頭に局在分布を認めた.また、網膜の神経細胞の分化が 内層から外層へと移行するにつれ、その発現も内層から 外層へと局在が変化し,成獣の網膜では発現が減弱して いた(図1).以上のことから、網膜神経節細胞が神経回 路を形成する時期において、プロテオグリカンは網膜の 内層に発現していることが確認できた.

#### Ⅲ 培養網膜神経節細胞に対する作用

次に、プロテオグリカンが網膜神経節細胞の軸索に与 える作用を検証するために、網膜神経節細胞の培養実験 を行った. Barres ら、Otori らの方法に従い<sup>1011)</sup>、網膜 神経節細胞を2ステップイムノパニング法にて単離し、 分泌蛋白質として細胞外マトリックスを構成するプロテ オグリカンであるニューロカンとホスファカンとをそれ ぞれ培養プレートにコーティングし、その上に網膜神経 節細胞を培養して、その突起伸長を評価した.対照とな る分子として、フィブロネクチン、ラミニン、リジンを 用い,それぞれをコーティングしたプレートで培養した 網膜神経節細胞の突起伸長と比較した.ニューロカンま たはホスファカンがコートされた培養環境では,培養後 48時間と72時間における突起伸長が著しく抑制された (図2).この結果は,発生段階の網膜に発現するコンド ロイチン硫酸プロテオグリカンが網膜神経節細胞の軸索 伸長を反発させ,視神経乳頭へ軸索を誘導させるという Brittis らの概念と一致した結果であった<sup>12</sup>.

# Ⅳ *Ext1* コンディショナルノックアウト マウスの作製

プロテオグリカンが中枢神経の発生および軸索障害の 再生過程で、軸索誘導を制御していることを支持する データが多数報告されてきたが、その結果に反して、こ れらのプロテオグリカンの遺伝子をノックアウトさせた 遺伝子改変マウスでは、視神経を含めて中枢神経組織に 著明な軸索投射異常は未だ報告されていない。その理由 として、複雑な哺乳動物の中枢神経組織では、複数のプ ロテオグリカンが重複して発現しており、1つのプロテ オグリカンの遺伝子を欠損させたとしても代償作用が働 き、表現型がみられない可能性が考えられた。我々は、 プロテオグリカンのグリコサミノグリカン糖鎖を合成す る酵素がプロテオグリカンの糖鎖合成過程で共有されて 用いられていることに注目し、合成酵素のうちで、特に 不可欠な合成酵素を選択し、その遺伝子のノックアウト マウスを作製する実験を行った。

グリコサミノグリカン糖鎖のうち、 ヘパラン硫酸の合 成系にかかわる酵素である Ext1は、その遺伝子欠損に よって、ヘパラン硫酸の産生が消失し、そのノックアウ トマウスは胎生期7.5日目の原腸形成時期に致死である ことが報告されており13,この酵素がヘパラン硫酸合成 に必須の酵素であることが明らかになっている.この Ext1を組織選択的に欠損させるコンディショナルノッ クアウトマウスを作製し, 視神経軸索投射時期での表現 型の解析を行った、ヘパラン硫酸プロテオグリカンと軸 索誘導との関連に関しては、ゴキブリ幼虫の培養組織に ヘパラン硫酸の分解酵素を外的に投与すると、中部線維 路および末梢神経系での最初の軸索になる Til 軸索に走 行異常が生じることが報告されている<sup>14)</sup>.また,アフリ カツメガエルの視神経が視蓋へ投射する現象が、ヘパラ ン硫酸を分解したり、ヘパラン硫酸の類似体であるヘパ リンの外的投与によって障害されたりすることが報告さ れている<sup>15)16)</sup>. 我々は, *Ext1*のエクソン1の両端に *loxP* 遺伝子を挿入したアリル(Ext1<sup>flox</sup>)を有する遺伝子改変マ ウスを新たに作製した.未分化な中枢神経細胞で発現す る中間径フィラメントである Nestin のプロモーターで 誘導される Cre トランスジェニックマウス (Nestin-Cre マウス)と交配させ、遺伝子型が Nestin-Cre; Ext1<sup>flox/flox</sup> となるコンディショナルノックアウトマウスを作製した





図 1 発生網膜におけるプロテオグリカンの発現変化.

脳組織に豊富に発現するコンドロイチン硫酸プロテオグリカンのニューロカンとヘパラン硫酸プロテオグリ カンの N-シンデカンの免疫染色.ラット網膜の切片を用いた.胎生期16日目(E16)と生後0日目(P0)で は,網膜の内層に局在がみられる.P14では外網状層にも発現を認める.これらの発現は,P42ではほと んどみられない.発生段階の網膜では,視神経乳頭(ONH)や神経節細胞の軸索(Ax)にもN-シンデカンの 発現を認める.GCL:神経節細胞層,HE:ヘマトキシリン・エオジン染色,IPL:内網状層,NFL:神経 線維層,OPL:外網状層.

(使用許諾を得て, 文献7と9から転載改変)



図 2 コンドロイチン硫酸プロテオグリカンによる網膜 神経節細胞の突起伸長抑制効果.

生後6~8日目のラット網膜神経節細胞を48時間培養 した. ラミニン(LN)やポリLリジン(PLL)をコートし た培養プレートでは,網膜神経節細胞は神経突起を伸 長した. 一方,コンドロイチン硫酸プロテオグリカン のニューロカン(NC)またはホスファカン(PC)をコー トした培養プレートでは神経突起の伸長は著しく抑制 された. リジンと比較して,ニューロカン(\*:p< 0.01),ホスファカン(\*\*:p<0.0001)は有意に神経 突起の伸長を抑制した.

(使用許諾を得て, 文献12から転載改変)

(図3).このマウスの脳切片を作製し、軸索投射を観察 すると、脳梁、海馬交連、前交連といった正中線を越え る軸索投射がことごとく障害された(図4).この結果 は、ヘパラン硫酸プロテオグリカンが哺乳動物の中枢神 経細胞の軸索誘導にきわめて重要な因子であることを証 明するものである.視神経のガイダンスにおいて、正中 線を越える領域は視交叉である.したがって、視交叉で の表現型に注目して、変異マウスの視交叉を野生型と比較した.出生直前の胎仔を取り出し、角膜水晶体硝子体除去後、視神経乳頭にDiI色素をおき、37℃で2週間反応させると、視神経が順行性に蛍光標識される.標識された視神経を観察すると、野生型では、球後へ伸びた視神経のほとんどは視交叉を形成して対側の上位中枢へ投射しているのが観察されるが、変異型の視神経の大部分は、視神経乳頭から出たのちに正中線を越え、対側の上位中枢へ投射せずに、僚眼の視神経に沿って異常な投射を示していた(図5).この異常な視神経の走行は、なんらかのヘパラン硫酸に関連のある軸索ガイダンス分子の作用が障害され、視神経が上位中枢へ投射する手がかりを失い、対側から投射してきた僚眼の視神経の軸索を手がかりにして、僚眼の視神経に沿った逆行性の投射異常が生じたためと考えられた.

### V 視交叉形成の分子メカニズムの解析

この分子メカニズムを探索するうえで、過去に作製さ れたガイダンス分子のノックアウトマウスの中に、同様 の視交叉での投射異常がみられるノックアウトマウスの 報告がないかを検索した. Slit と呼ばれる軸索反発因子 として働く分泌蛋白質の遺伝子をノックアウトさせたマ ウスにおいて、 僚眼の視神経に沿った逆行性の投射異常 が報告されている<sup>17)</sup>. 哺乳動物の Slit 蛋白質のうち, Slit1とSlit2の2つの遺伝子のダブルノックアウトマ ウスの視交叉で著しい投射異常がみられる. Slit 蛋白質 は, 視交叉周辺に発現分布し, 視神経を反発させること によって、視神経が正常な投射経路から逸れてしまうの を防いでいると考えられている<sup>18)</sup>. Slit1とSlit2のダ ブルノックアウトマウスでは、Slit 蛋白質が完全に欠損 してしまう. そのために、視神経軸索が反発されること なく、Slit の発現すべき領域に侵入し、正常な投射経路 から逸れることによって,近くに走行する僚眼の視神経 軸索を手がかりにしてしまい、異常な視神経投射の表現 型を呈すると推測されている.網膜神経節細胞の軸索に は、Roboと呼ばれる Slit の受容体が発現しており、Robo に対する遺伝子のノックアウトマウスでも同様の視 交叉投射異常が報告されている<sup>19)</sup>.一方.グリピカン-1 と呼ばれる細胞表面に発現するヘパラン硫酸プロテオグ リカンは、Slit 蛋白質と結合し、その結合作用には、コ ア蛋白質よりはむしろヘパラン硫酸糖鎖の方が不可欠で あることが報告されている20). さらに、嗅球の神経細胞 を培養し、Slitを投与すると、軸索が反発する現象がみ られるが、その嗅球の神経細胞に発現するヘパラン硫酸 プロテオグリカンの糖鎖を酵素処理で分解すると、Slit を投与しても軸索反発がみられない<sup>21)</sup>.以上の過去の報 告から,我々は、網膜神経節細胞の軸索に発現するプロ テオグリカンのヘパラン硫酸が欠損したために、視交叉 周辺に発現する Slit と軸索表面に発現する Robo との結



図 3 Extl コンディショナルノックアウトマウスの作製.

- A: *Ext1*のエクソン1(*Ex1*)の両端に*loxP*遺伝子を挿入したターゲッティングベクターをデザインし, *Ext1*<sup>flox</sup>アレルを有する遺伝子改変マウス(*Ext1 flox*マウス)を作製した.組織選択的に発現する分子の プロモーターを上流にもつ *Cre* 遺伝子は,組織選択的に Cre 酵素を発現し, *loxP*で挟まれた *Ext1* 遺 伝子のエクソン1を欠失させ, *Ext1*<sup>-</sup>アレルとなる. ▶: *loxP*, ▶: *frt*, ■: 5' untranslated region of exon 1, ■: translated region of exon 1, B: BamHI, S: SacI.
- B: Ext1 flox マウスと Nestin のプロモータを有する Cre トランスジェニックマウスと交配させた.3世代 目には、Cre; Ext1<sup>flox/flox</sup>の遺伝子型を有するマウスが得られる.このマウスでは nestin の発現する細 胞、つまり未分化な中枢神経細胞で Ext1が欠損した、言い換えると、中枢神経でヘパラン硫酸が欠損 したコンディショナルノックアウトマウスとなる.

合作用が低下し,Slit—Robo シグナリングによる軸索反 発作用が失われ,Slit 1/2のダブルノックアウトマウス と同様の表現型を呈したと推測した.

そこで,我々は、ショウジョウバエの実験で行われる genetic interaction の手法をマウスの遺伝子改変動物で 行い,この仮説の証明を試みた<sup>22)</sup>.この手法では、きわ めて特徴的な表現型が,或る遺伝子の欠損マウスでみら れ、さらに、別の遺伝子の欠損マウスでも同様の表現型 がみられたときに、この2つの遺伝子欠損マウスを交配 させ、その特徴的な表現型が増強した場合、この2つの 分子は、生体内において同じ分子シグナル経路に位置す る分子である可能性がきわめて高いことを示す結果とな る. 我々は, *Slit2のノックアウトマウスと Ext1*の ノックアウトマウスとを交配させ, 視交叉の表現型が増 強するのかを検討した. *Slit2のノックアウトマウスの* 視神経乳頭に DiI 色素の結晶を置き, 順行性に視神経を 染色すると野生型と同じ走行を示す. これは, Slit1が 代償しているためと考えられる. さらに, この *Slit2*の ノックアウトマウスの *Ext1*を1アレルのみ欠損させる と, *Ext1*がまだ1アレル残存しているにもかかわら ず, *Ext1*のコンディショナルノックアウトマウスと同 様の特徴的な視交叉異常がみられた(図 6). 以上の *Ext1*と *Slit2*との genetic interaction の結果は, Ext1 によって合成されるヘパラン硫酸が Slit 蛋白質による視



図 4 中枢神経選択的 *Ext 1* コンディショナルノックアウトマウスの脳軸索投射. 野生型(wild)では、脳梁(CC)、海馬交連(HC)、前交連(AC)が正中線を越えて投射している.しかし、変 異マウス(mutant)では、これらの軸索が形成されていない.

(使用許諾を得て、文献 22 から転載改変)



図 5 中枢神経選択的 Ext 1 コンディショナルノックアウトマウスの視交叉異常. 野生型(wild)では,視神経は,視交叉(\*)を通過後,脳へ投射するが,変異マウス(mutant)の視神経の大部分は,視交叉を通過後,僚眼の視神経に沿って逆行性の投射を示した(開矢頭). (使用許諾を得て,文献 22 から転載改変)



図 6 *Ext 1 と Slit 2 との* genetic interaction. *Ext 1*のヘテロマウス(*Ext1<sup>+/-</sup>*)または *Slit 2*のホモ欠損マウス(*Slit2<sup>-/-</sup>*)では,正常な視交叉が形成された. しかし,*Ext 1* ヘテロかつ *Slit 2* ホモ欠損のマウス(*Ext1<sup>+/-</sup>*; *Slit2<sup>-/-</sup>*)では,*Ext 1* コンディショナルノック アウトマウスと同様に僚眼の視神経に沿って逆行性の投射を示した.

(使用許諾を得て, 文献 22 から転載改変)

神経軸索誘導のメカニズムに密接にかかわっていること を示唆しており,我々の仮説を支持する結果となった (図7).

# Ⅵ ヘパラン硫酸による生理活性物質の 作用調節

軸索ガイダンス分子がその作用を発揮する際に、神経

細胞に発現するヘパラン硫酸プロテオグリカンを要求す る分子機構は、Slit蛋白質のみならず、他のヘパリン親 和性の軸索ガイダンス分子でもみられることが、Ext1 コンディショナルノックアウトマウスで明らかになっ た.ヘパラン硫酸/ヘパリンに結合する軸索ガイダンス 分子のうち、Netrin-1と semaphorin-5 A の2つの軸索 ガイダンス分子による軸索誘導が Ext1 コンディショナ ルノックアウトマウスで障害されていることが分かった. Netrin-1 による脊髄の交連線維の投射<sup>23)</sup>と semaphorin-5 A による間脳の神経軸索投射<sup>24)</sup>がヘパラン硫酸依 存性であることが確認された.

細胞に発現するヘパラン硫酸プロテオグリカンが、ヘ パリン親和性の生理活性物質とその受容体との相互作用 を制御しているという概念は、以前から線維芽細胞増殖 因子(fibroblast growth factor:FGF)での研究で提唱さ れていた<sup>25)</sup>.FGFは、FGF受容体と結合するときに、 FGFとFGF受容体とヘパラン硫酸プロテオグリカンと が2:2:1の複合体を形成することで、受容体の細胞内 のドメインが構造変化を起こし、FGF刺激に対し、よ り強く細胞が応答する.我々は、*Ext1*コンディショナ ルノックアウトマウスから未分化な神経前駆細胞を採取



図 7 Slit 蛋白質, Robo 受容体, ヘパラン硫酸プロテ オグリカンによる視交叉形成メカニズム. 視交叉周辺には Slit 蛋白質が分布している. 視神経軸 索には, Robo 受容体とヘパラン硫酸プロテオグリカ ンが発現している. ヘパラン硫酸は Slit 蛋白質と結合 し, Robo 受容体と Slit 蛋白質に対して co-receptor と して作用する. この3者複合体が視交叉を逸れた軸索 を反発させ,正常な視交叉を形成させる.

し培養したのちに、その培養液中に 10 ng/ml の濃度で FGF-2 または FGF-8 を添加し、その細胞増殖を観察し た<sup>22)</sup>. 妊娠したマウスの腹腔内に BrdU を注射すると、 増殖した胎仔の細胞は BrdU で標識される. BrdU 陽性 の神経前駆細胞を観察すると、野生型の細胞では, FGF 刺激で増殖が促進されるが、変異型の細胞では増殖が促 進されなかった(図8). このことは、細胞表面に発現す るへパラン硫酸プロテオグリカンが、神経細胞の軸索誘 導を制御するのみならず、FGF などの成長因子による 細胞への刺激をも調節していることを示唆している. そ こで、我々は、眼球発生にかかわる成長因子の働きがへ パラン硫酸プロテオグリカンによってどのような影響を 受けているのかを Ext1 コンディショナルノックアウト マウスを用いて明らかにする実験を行った.

### Ⅲ 前眼部発生における神経堤細胞の役割

脊椎動物の眼球は,表皮外胚葉と神経外胚葉に由来す る細胞以外に,背側の神経管近傍から遊走してきた神経 堤細胞が眼球の発生に大きくかかわっている<sup>26)</sup>.角膜実 質や角膜内皮,隅角線維柱帯組織,虹彩前面が神経堤細 胞に由来する組織であり,前房は神経堤細胞によって取 り囲まれているともいえる(図9).神経堤細胞の分化異 常によって発症する代表的な眼疾患として,Peters 奇 形や Axenfeld-Rieger 症候群などの発達緑内障が挙げら れる.これらの発達緑内障では,隅角形成不全だけでな く,角膜内皮欠損,虹彩欠損,歯牙顔面奇形など神経堤 細胞に由来する組織に多彩な異常がみられ,神経堤細胞 の分化異常によって発症していることが強く疑われてい る<sup>27)-29)</sup>.神経堤細胞の遊走分化に関与する細胞外基質 として,以前からフィブロネクチンやラミニン,プロテ



図8 神経前駆細胞の線維芽細胞増殖因子依存性細胞分裂.

大脳皮質の神経前駆細胞を培養し、線維芽細胞増殖因子(FGF2またはFGF8)を添加すると著しく細胞分裂が促進される(黒く染まった細胞がBrdU陽性の分裂した細胞).しかし、変異マウス(mutant)から採取した神経前駆細胞では、有意に(\*:p<0.0001)、FGF依存性細胞分裂が低下していた.□:野生型マウス、■:変異マウス.

(使用許諾を得て, 文献 22 から転載改変)

オグリカンなどが in vitro や組織培養の実験で報告され ていた<sup>30)~34)</sup>.また,隅角線維柱帯組織はもともとプロ テオグリカンが豊富に存在する組織であり<sup>35)</sup>,線維柱帯 組織の細胞外マトリックスを構成したり,線維柱帯細胞 表面の膜蛋白質として発現している<sup>36)37)</sup>.ヒトの発達緑 内障<sup>38)39)</sup>,原発開放隅角緑内障<sup>40)</sup>,ステロイド緑内障<sup>41)</sup>



図 9 眼球の発生と前眼部の発生. 眼胞は、間脳から突出し、表皮外胚葉に接近する.眼胞 が表皮外胚葉に近づくと、眼胞は陥入し神経網膜と網膜 色素上皮(RPE)に分化し、表皮外胚葉も陥入し水晶体へ 分化する.一方、眼胞を取り囲む間葉系組織は神経堤細 胞で構成されており、眼内にも遊走し、前房は神経堤細 胞に取り囲まれる.黄色:神経外胚葉由来,水色:表皮 外胚葉由来,緑:神経堤細胞由来.

の隅角線維柱帯組織では、グリコサミノグリカン糖鎖の 組成に変化がみられることから、我々は、前眼部発生に かかわる成長因子の働きがヘパラン硫酸プロテオグリカ ンによって調節されていることを予想した.そこで、神 経堤細胞選択的にヘパラン硫酸を欠損させ、マウスに発 達緑内障が再現されるかを検証した.

## ₩ 神経堤細胞選択的 *Ext1* コンディショナル ノックアウトマウスの作製

神経堤細胞選択的に発現する分子である Wnt1のプ ロモーターで誘導される Cre トランスジェニックマウ ス<sup>42)</sup>を *Ext1 flox* マウスと交配させ,発生段階の神経堤 細胞でヘパラン硫酸を欠損させる実験を行った.まず, 前眼部において、ヘパラン硫酸が消失しているのかを *in situ* hybridization と免疫組織化学染色にて確認した. 変異型の胎仔の Ext1 mRNA は、胎生期 10.5 日目から、 眼周囲および鰓弓において発現が低下していた. 生後 12.5日の野生型の胎仔では, mRNA は, 大脳皮質, 小 脳, 顔面, 四肢, 尻尾に発現が強くみられ, これらのう ち,変異型の胎仔では、小脳、顔面、そして眼周囲間葉 系細胞で発現が低下していた. 眼球組織の切片を作製 し, 抗ヘパラン硫酸抗体で免疫染色したところ, 野生型 では眼球組織すべてにヘパラン硫酸の免疫染色性がみら れたが、変異型では、眼周囲間葉系細胞の分布する前眼 部組織のみ発現がほぼ消失しているのが確認された(図 10).

#### IX ヘパラン硫酸欠損による顔面奇形

次に、作製されたマウスの表現型を観察した.マウス



図 10 神経堤細胞選択的 Ext I コンディショナルノックアウトマウスにおけるヘパラン硫酸の分布. ヘパラン硫酸に対する抗体で免疫染色を行った。A: 胎生期 13.5 日目の野生型の眼周囲間葉系組織(点線で 囲まれた領域)では、ヘパラン硫酸の染色がみられる。B:一方、変異マウスでは眼周囲間葉系組織選択的 に染色性が低下していた(点線で囲まれた領域).cb:毛様体,le:水晶体,nr:神経網膜.スケールバーは 50 µm.



図 11 神経堤細胞選択的 Ext I コンディショナルノックアウトマウスの表現型. 野生型(A, C, E, G)と変異マウス(B, D, F, H, I)の実体顕微鏡写真. 変異マウスでは、耳介奇形(Bの 黒矢印)と口蓋裂(BとDの白矢印)および硬口蓋の欠損(Fの開黒矢印)がみられた.また、眼瞼の欠損(H とIの黒矢頭)と腹側の虹彩欠損(HとIの白矢頭)を合併した.

が生まれてくるかを確認したところ,生直後にすべての マウスが死亡した.しかし,そのマウスは,非常に共通 した顔面奇形がみられた.顔面には口蓋裂,耳介奇形が みられ,これらの組織は神経堤細胞により構成される組 織である.眼組織には,眼瞼の欠損や虹彩裂がみられ た.虹彩裂は,98.5%の個体でみられ,すべて腹側の 虹彩欠損であった.また,腹側の毛様体の欠損まで及ん でいる虹彩欠損が58.2%の個体でみられた(図11).

### X ヘパラン硫酸欠損による Peters 奇形

眼球切片を作製したところ,切片を作製したすべての 個体において,角膜の菲薄化と隅角の形成不全がみられ た. 角膜組織は、内皮側から菲薄化した所見がみられ、 これらの前眼部組織の表現型は、Peters 奇形に酷似し ていた. 抗 zonula occludens (ZO)-1 抗体で角膜内皮側 から免疫染色したところ,野生型では,角膜内皮細胞の 輪郭が抗 ZO-1 抗体によって染色され、角膜内皮細胞の 配列が観察されたが、変異型の角膜では、ZO-1 陰性で あり,角膜内皮細胞の欠損もしくは分化不全が考えられ た.角膜実質は、I型コラーゲンが豊富に存在する組織 である.角膜の菲薄化は、胎生期の角膜実質の結合組織 の産生が阻害されているためと考えられた. Van Gieson 染色でコラーゲンを染色したところ,変異型では著しく 角膜実質のコラーゲンが減少していることが分かった (図 12). Cre 酵素を発現した細胞を β-gal にて標識した ところ, 胎生期 13.5 日の角膜組織では, Cre 酵素発現 細胞つまり神経堤細胞の分布には野生型と変異型では差 がみられなかった.このことは、神経堤細胞が前眼部組 織までに遊走する過程は障害されていないことを意味す る. つまり、神経堤細胞が遊走し前眼部にたどり着いた 後に、細胞の分化異常、細胞外マトリックスの産生低 下,分裂能の低下,細胞死の増加などが生じていると考 (使用許諾を得て、文献 49 から転載改変)

えられた.細胞分裂を定量評価するために,胎生期 13.5日目と15.5日目の胎仔を有する母親マウスの腹腔 内にBrdUを注射し,その1時間後に胎仔を取り出して 切片を作製し,抗BrdU抗体で免疫染色を行った.同一 視野に存在するBrdU陽性細胞(分裂細胞)数を野生型と 変異型とで比較したところ,角膜実質および隅角組織に おける細胞分裂が変異型で著しく低下していた(図13). 一方,TUNEL染色でアポトーシスした細胞数を比較し たところ,TUNEL陽性細胞は,両群ともにほとんどみ られず,神経堤細胞の分裂低下が前眼部形成不全の一因 であることが分かった.

### XI 前眼部奇形の分子メカニズム

この前眼部の奇形はいかなる分子メカニズムがかか わっているのであろうか? この表現型と同様の表現型 を有するノックアウトマウスが過去に報告がないかを 我々は検索した. Transforming growth factor  $\beta_2$  (TGF Bo)シグナルに関連する分子のノックアウトマウスであ る *Tgfb2*ノックアウトマウス<sup>43)</sup>, TGF*B*22型受容体に 対する遺伝子の神経堤細胞選択的コンディショナルノッ クアウトマウス<sup>44)</sup>が類似した表現型を有することが分 かった.また,発達緑内障の原因遺伝子として同定され ている転写因子の遺伝子である Foxc 145 と Pitx 246 の ノックアウトマウスも隅角の形成不全がみられることが 報告されている。TGFB2とヘパラン硫酸との親和性を検 証するために, TGFβ2をポリスチレン ELISA トレイに コーティングし、ビオチン標識したヘパラン硫酸を加 え、親和性を定量評価したところ、TGFβ2はヘパラン硫 酸と結合することが確認された. しかし、TGFβ2の代わ りに上皮成長因子(epidermal growth factor)をコーティ ングしたところ,結合能はみられなかった(図14). ノックアウトマウスの表現型の類似性と TGFβ2との結



図 12 神経堤細胞選択的 Ext I コンディショナルノックアウトマウスの前眼部表現型. 変異マウス(mutant)の角膜は内皮側から菲薄化していた(黒矢印). 隅角は閉じ,形成不全を認めた(白矢 頭). Van Gieson 染色では,角膜の染色性が低下(コラーゲンの減少)していた.角膜内皮側からのフラット マウントを抗 zonula occludens(ZO)-1 抗体で染色すると,ZO-1 の免疫染色性が消失(角膜内皮細胞の欠損) していた.c:角膜,le:水晶体.スケールバーは 50 µm.

(使用許諾を得て, 文献 49 から転載改変)



図 13 神経堤細胞選択的 Ext 1 コンディショナルノックアウトマウスの細胞分裂低下. BrdU で標識し,胎生期 13.5 日目の胎仔の角膜と胎生期 15.5 日目の隅角とで分裂する細胞を野生型(A, C)と変異マウス(B, D)間で比較した.角膜(黒矢印),隅角(開矢印)ともに有意に(\*:p<0.01)野生型マ ウスの BrdU 陽性細胞数が少なかった(E).le:水晶体.

(使用許諾を得て, 文献 49 から転載改変)



図 14 へパラン硫酸と TGF $\beta_2$ との結合アッセイ. Transforming growth factor  $\beta_2$ (TGF $\beta_2$ )は濃度依存的に ヘパラン硫酸と結合した.しかし、上皮成長因子(EGF) はヘパラン硫酸と結合しなかった. (使用許諾を得て、文献 49 から転載改変)

合能から、ヘパラン硫酸の欠損によって、TGFβ2の作用 が障害され、神経堤細胞由来の前眼部組織の発生が障害 されたと考えた.過去に、ショウジョウバエの実験で、 ヘパラン硫酸プロテオグリカンのホモログ dally の変異 体では TGFβ のホモログ Dpp を介したシグナリングが 障害されることが報告されている<sup>47)</sup>.線虫の生殖器の発 生においても、TGFβ のホモログとヘパラン硫酸プロテ オグリカンのホモログとが同じシグナル経路に位置する 分子であることが報告されている<sup>48)</sup>.

#### XII TGF<sub>β2</sub>シグナリングの解析

もし、過去に報告されたこれらの研究結果が哺乳動物 の神経堤細胞の分化においても成り立つ分子メカニズム であるならば、神経堤細胞選択的 Ext1 コンディショナ ルノックアウトマウスでは、TGFβ2の下流に位置する細 胞内分子の発現に異常がみられるはずである. TGFB2は 細胞表面に発現する TGF B2 受容体と結合し、細胞内の Smad2がリン酸化により活性化される. 抗リン酸化 Smad 2 抗体で胎仔の前眼部切片を免疫染色したところ, 神経堤細胞に由来する隅角線維柱帯組織および角膜実質 に相当する領域の組織のみ,その免疫染色性が著しく低 下していた.一方,表皮外胚葉由来の角膜上皮細胞のリ ン酸化 Smad 2 の発現には、野生型と変異型において差 がみられなかった.同様に、リン酸化に関係なくSmad 2を認識する抗体で免疫染色を行うと、野生型、変異型 いずれも差がみられなかった(図15).以上の結果は、 Smad 2 のリン酸化が変異型の神経堤細胞でのみ抑制さ



図 15 神経堤細胞選択的 Ext 1 コンディショナルノッ クアウトマウスの Smad 2 の活性低下. 胎生期 13.5 日目の胎仔隅角組織を抗 Smad 2 抗体 (A, C)と抗リン酸化 Smad 2 抗体(B, D)で免疫染色 を行った.神経堤細胞に由来する隅角組織(白破線で 囲まれた領域)のうち,変異マウスのみリン酸化 Smad 2 の染色性が著しく低下していた.c:角膜, epi:角膜上皮,\*:毛様体原基.スケールバーは 20 µm.

(使用許諾を得て、文献49から転載改変)

れていることを意味している. TGF $\beta_2$ の分布にも野生 型,変異型においてまったく差がみられないことから, TGF $\beta_2$ は変異マウスの眼でも分布しているが,神経堤細 胞の下流の TGF $\beta_2$ シグナリングが阻害されていると考 えられた. さらに,口蓋裂のみられた軟口蓋においても Smad 2 のリン酸化が抑制されていることが確認された. しかし, bone morphogenetic protein 4 の下流シグナル 分子 Smad 1/5/8 のリン酸化や fibroblast growth factor の下流シグナル分子 Erk 1/2 のリン酸化は前眼部神経堤 細胞で抑制されていなかった.一方,発達緑内障の原因 遺伝子として同定されている転写因子である Foxc 1 と Pitx 2 の発現も低下していた. これは,TGF $\beta_2$ シグナリ ングの下流にこれらの転写因子が位置することを示唆し ている.



図 16 神経堤細胞の TGFβ₂依存性細胞分裂.

神経堤細胞を培養し、TGFβ₂を添加すると、細胞分裂が促進される。BrdUを取り込んだ BrdU 陽性細胞 (矢印)を観察すると、ヘパラン硫酸(HS)の欠損した神経堤細胞は、TGFβ₂を添加しても、対照と比較して、 分裂した細胞は有意に(\*:p<0.01)少なかった。

(使用許諾を得て、文献 49 から転載改変)

神経堤細胞内の TGF β₂シグナリングがヘパラン硫酸 の欠損で消失するのかを培養神経堤細胞を用いた実験で 検証した. Ext1 flox マウスの胎仔から眼周囲組織の神 経堤細胞を採取し、培養を行った、培養神経堤細胞にア デノウイルスを用いて Cre 遺伝子を感染させ、Cre 酵素 を発現させることによって培養神経堤細胞の Ext1 を欠 損させた. 無血清培養液中で神経堤細胞を培養し, TGFβ₂を添加すると細胞分裂が著しく促進される. 図 16 は分裂した細胞を BrdU で標識し,抗 BrdU 抗体で 免疫染色した結果である. ヘパラン硫酸が欠損した神経 堤細胞では、TGF&添加による BrdU 陽性細胞の増加は みられなかった.この神経堤細胞の蛋白質サンプルを用 いて、リン酸化 Smad 2 のウェスタンブロッティングを 行ったところ、ヘパラン硫酸の欠損した神経堤細胞の蛋 白質サンプルではリン酸化 Smad 2 が TGFβ2添加後も増 強しないことが確認された. さらに、ヘパラン硫酸の発 現している神経堤細胞とヘパラン硫酸の消失した神経堤 細胞を混在させ培養を行い, さらに TGFβ2を添加し, 細胞分裂を観察した、細胞分裂した細胞はヘパラン硫酸 陽性細胞に有意に多い結果となった.以上の結果は, TGF<sub>B2</sub>によるそれぞれの神経堤細胞の分裂促進は、それ ぞれの神経堤細胞が自発的に発現するヘパラン硫酸に依 存していることを反映している.

# XII ヘパラン硫酸-TGFβ2阻害による 発達緑内障モデル

へパラン硫酸を介した TGF &シグナリングが、生体 内の神経堤細胞の発生に不可欠なメカニズムであるのか を確認する動物実験を行った. Ext1 欠損マウスと Tgfb2 欠損マウスでみられた特徴的な隅角の表現型が,2系統 間の交配によってそれぞれの遺伝子が減数した個体(ダ ブルヘテロマウス)でその表現型が増強していれば, Ext1とTGFβ2との間の相互作用が隅角発生に深くかか わっていることを示す結果となる. Ext1 ヘテロマウス と Tgfb2 ヘテロマウスのそれぞれ独立した個体では、 正常な Schlemm 管および線維柱帯組織を確認すること ができた. ところが, Ext1と Tgfb2とのダブルヘテ ロマウスでは、Schlemm 管の構造が欠損しており、線 維柱帯細胞の細胞数も減少していることが分かった.こ のダブルヘテロマウスは成獣まで発育した. 生後42日 目の午前11時30分から12時30分の間に、トノラボを 用いて眼圧を測定したところ、ダブルヘテロマウスは、 野生型と比較して眼圧が有意に上昇していた(図17). この結果は、隅角線維柱帯組織の発育には、ヘパラン硫 酸と TGF B2との相互作用が必要であることを意味して おり、この作用が障害されると、マウスに発達緑内障モ デルが生じることが明らかになった49(図18).



野生型(A), Ext 1 ヘテロ欠損マウス(B), Tgfb 2 ヘテロ欠損マウス(C)では隅角奇形はみられなかった. 矢印は Schlemm 管, 白矢頭は線維柱帯細胞. Ext 1, Tgfb 2 ダブルヘテロ欠損マウス(D)では, Schlemm 管の欠損および野生型と比較して線維柱帯細胞数の有意な(E, \*:p<0.01)減少がみられた. また, 眼圧も 有意に上昇した(F, \*:p<0.01). スケールバーは 50  $\mu$ m.

(使用許諾を得て, 文献 49 から転載改変)



図 18 前眼部形成における TGFβ2とヘパラン硫酸プロ テオグリカンとの関係.

眼球の発生では、TGFβ2は水晶体から産生される。神 経堤細胞の細胞表面に発現する TGFβ2受容体とヘパ ラン硫酸プロテオグリカンが TGFβ2と複合体を形成 し、角膜内皮細胞の増殖や実質細胞のコラーゲン産 生、隅角組織の分化へ働く。

### XW 結 論

我々は, 視神経の軸索投射を解明するため, プロテオ グリカンに焦点を当て、その糖鎖を合成する酵素をコー ドする遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスを 作製した. 視神経の軸索誘導には、ヘパラン硫酸プロテ オグリカンが必須であり, Slit 蛋白質を介した軸索誘導 を制御することが明らかとなった. さらに、神経細胞の 軸索誘導だけでなく,神経堤細胞の分化に対する成長因 子の作用も制御しており、その障害によって発達緑内障 モデルが引き起こされる。以上の研究結果は、生理活性 物質による細胞応答にはヘパラン硫酸プロテオグリカン の発現が密接にかかわっているという基本原理を哺乳動 物の生体内で明らかにしたものともいえる. このような ヘパラン硫酸プロテオグリカンによる生理活性物質への 制御機構は、さまざまな生体反応にもかかわってくる現 象であり、神経再生、器官形成、炎症反応、創傷治癒反 応に対する応用へと今後の研究を展開したい.

本研究遂行と原著作成にあたり、ご支援を賜りました熊本 大学医学部眼科学教室および京都大学医学部眼科学教室の先 生方、さらに、数多くの共同研究者、研究協力者の先生方に 御礼申し上げます.評議員会指名講演で発表させていただく 機会を与えていただきました日本眼科学会評議員の先生方、 第113回日本眼科学会総会学会長の澤 充教授、座長の労を おとりくださいました新家 真教授に御礼申し上げます.

また,表記の共同研究者以外に,熊本大学医学部眼科学教 室の福地(中石)裕子,内藤智香,宮川真央,大坪えみが研究 補助員として研究に貢献しました.

本研究は、日本学術振興会科学研究費若手研究(S)(課題番号 19679008),若手研究(A)(課題番号 18689043),文部科学 省科学研究費(萌芽研究)(課題番号 18659514),特定領域研 究(分子脳科学)(課題番号 18022034),日本眼科学会評議員 会賞,Rohto Award の支援を受けました。

本総説は、第113回日本眼科学会総会での発表の内容に基 づいて執筆いたしましたが、現在投稿中のデータが発表に含 まれていたため、内容の一部を割愛させていただきましたこ とをお詫び申し上げます.

### 文 献

- Inatani M : Molecular mechanisms of optic axon guidance. Naturwissenschaften 92 : 549-561, 2005.
- Ramón y Cajal S: La rétine des vertébrés. La Cellule 9: 119-258, 1892.
- Harada T, Harada C, Parada LF : Molecular regulation of visual system development : more than meets the eye. Genes Dev 21 : 367-378, 2007.
- Lander AD, Selleck SB : The elusive functions of proteoglycans : *in vivo* veritas. J Cell Biol 148 : 227-232, 2000.
- Iozzo RV : Heparan sulfate proteoglycans : intricate molecules with intriguing functions. J Clin Invest 108 : 165—167, 2001.
- Brittis PA, Canning DR, Silver J : Chondroitin sulfate as a regulator of neuronal patterning in the retina. Science 255 : 733-736, 1992.
- 7) Inatani M, Tanihara H, Oohira A, Honjo M, Honda Y : Identification of a nervous tissuespecific chondroitin sulfate proteoglycan, neurocan, in developing rat retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 40 : 2350–2359, 1999.
- 8) Inatani M, Tanihara H, Oohira A, Honjo M, Kido N, Honda Y : Spatiotemporal expression patterns of 6B4 proteoglycan/phosphacan in the developing rat retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 41 : 1990– 1997. 2000.
- 9) Inatani M, Honjo M, Oohira A, Kido N, Otori Y, Tano Y, et al : Spatiotemporal expression patterns of N-syndecan, a transmembrane heparan sulfate proteoglycan, in developing retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 43 : 1616—1621, 2002.
- 10) Barres BA, Silverstein BE, Corey DP, Chun LL :

Immunnological, morphological, and electrophysiological variation among retinal ganglion cells purified by panning. Neuron 1: 791–803, 1988.

- Otori Y, Wei JY, Barnstable CJ : Neurotoxic effects of low doses of glutamate on purified rat retinal ganglion cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 39 : 972–981, 1998.
- 12) Inatani M, Honjo M, Otori Y, Oohira A, Kido N, Tano Y, et al : Inhibitory effects of neurocan and phosphacan on neurite outgrowth from retinal ganglion cells in culture. Invest Ophthalmol Vis Sci 42 : 1930—1938, 2001.
- 13) Lin X, Wei G, Shi Z, Dryer L, Esko JD, Wells DE, et al : Disruption of gastrulation and heparan sulfate biosynthesis in EXT 1-deficient mice. Dev Biol 224 : 299—311, 2000.
- 14) Wang L, Denburg JL : A role for proteoglycans in the guidance of a subset of pioneer axons in cultured embryos of the cockroach. Neuron 8:701-714, 1992.
- 15) Walz A, McFarlane S, Brickman YG, Nurcombe V, Bartlett PF, Holt CE : Essential role of heparan sulfates in axon navigation and targeting in the developing visual system. Development 124 : 2421-2430, 1997.
- 16) Irie A, Yates EA, Turnbull JE, Holt CE : Specific heparan sulfate structures involved in retinal axon targeting. Development 129 : 61-70, 2002.
- 17) Plump AS, Erskine L, Sabatier C, Brose K, Epstein CJ, Goodman CS, et al : Slit 1 and Slit 2 cooperate to prevent premature midline crossing of retinal axons in the mouse visual system. Neuron 33 : 219–232, 2002.
- 18) Erskine L, Williams SE, Brose K, Kidd T, Rachel RA, Goodman CS, et al : Retinal ganglion cell axon guidance in the mouse optic chiasm : expression and function of robos and slits. J Neurosci 20 : 4975—4982, 2000.
- 19) Plachez C, Andrews W, Liapi A, Knoell B, Drescher U, Mankoo B, et al : Robos are required for the correct targeting of retinal ganglion cell axons in the visual pathway of the brain. Mol Cell Neurosci 37 : 719-730, 2008.
- 20) Ronca F, Andersen JS, Paech V, Margolis RU: Characterization of Slit protein interactions with glypican-1. J Biol Chem 276 : 29141—29147, 2001.
- 21) Hu H : Cell-surface heparan sulfate is involved in the repulsive guidance activities of Slit 2 protein. Nat Neurosci 4 : 695-701, 2001.
- 22) Inatani M, Irie F, Plump AS, Tessier-Lavigne M, Yamaguchi Y : Mammalian brain morphogenesis and midline axon guidance require heparan sulfate. Science 302 : 1044–1046, 2003.
- 23) Matumoto Y, Irie F, Inatani M, Tessier-Lavigne M, Yamaguchi Y : Netrin-1/DCC signaling in commissural axon guidance requires cell-autonomous expression of heparan sulfate. J Neurosci 27 :

4342-4350, 2007.

- 24) Kantor DB, Chivatakarn O, Peer KL, Oster SF, Inatani M, Hansen MJ : Semaphorin 5A is a bifunctional axon guidance cue regulated by heparan and chondroitin sulfate proteoglycans. Neuron 44 : 961—975, 2004.
- 25) Pellegrini L, Burke DF, von Delft F, Mulloy B, Blundell TL : Crystal structure of fibroblast growth factor receptor ectodomain bound to ligand and heparin. Nature 407 : 1029–1034, 2000.
- 26) Idress F, Vaideanu D, Fraser SG, Sowden JC, Khaw PT : A review of anterior segment dysgeneses. Surv Ophthalmol 51 : 213–231, 2006.
- 27) Traboulsi EI, Maumenee IH : Peters anomaly and associated congenital malformations. Arch Ophthalmol 110 : 1739—1742, 1992.
- 28) Honkanen RA, Nishimura DY, Swideeski RE, Bennett SR, Hong S, Kwon YH, et al : A family with Axenfeld-Rieger syndrome and Peters Anomaly caused by a point mutation (Phe112Ser) in the FOXC 1 gene. Am J Ophthalmol 135 : 368—375, 2003.
- 29) Strungaru MH, Dinu I, Walter MA : Genotypephenotype correlations in Axenfeld-Rieger malformation and glaucoma patients with FOXC 1 and PITX 2 mutations. Invest Ophthalmol Vis Sci 48 : 228–237, 2007.
- 30) Newgreen D, Thiery JP : Fibronectin in early avian embryos : synthesis and distribution along the migration pathways of neural crest cells. Cell Tissue Res 211 : 269—291, 1980.
- 31) Rovasio RA, Delouvee A, Yamada KM, Timpl R, Thiery JP : Neural crest cell migration : requirements for exogenous fibronectin and high cell density. J Cell Biol 96 : 462—473, 1983.
- 32) Oakley RA, Tosney KW : Peanut agglutinin and chondroitin-6-sulfate are molecular markers for tissues that act as barriers to axon advance in the avian embryo. Dev Biol 147 : 187—206, 1991.
- 33) Oakley RA, Lasky CJ, Erickson CA, Tosney KW: Glycoconjugates mark a transient barrier to neural crest migration in the chicken embryo. Development 120: 103—114, 1994.
- 34) Dutt S, Kleber M, Matasci M, Sommer L, Zimmermann DR: Versican V 0 and V 1 guide migratory neural crest cells. J Biol Chem 281: 12123—12131, 2006.
- 35) Acott TS, Kelley MJ : Extracellular matrix in the trabecular meshwork. Exp Eye Res 86 : 543—561, 2008.
- 36) Rohen JW, Schachtschabel DO, Berghoff K: Histoautoradiographic and biochemical studies on human and monkey trabecular meshwork and ciliary body in short-term explant culture. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 221: 199—206, 1984.
- 37) Tawara A, Varner HH, Hollyfield JG : Distribution and characterization of sulfated proteoglycans

in the human trabecular tissue. Invest Ophthalmol Vis Sci 30 : 2215—2231, 1989.

- 38) Tawara A, Inomata H : Distribution and characterization of sulfated proteoglycans in the trabecular tissue of goniodysgenetic glaucoma. Am J Ophthalmol 117 : 741-755, 1994.
- 39) Kuleshova ON, Zaidman AM, Korel AV : Glycosaminoglycans of the trabecular meshwork of the eye in primary juvenile glaucoma. Bull Exp Biol Med 143 : 381—384, 2007.
- 40) Knepper PA, Goossens W, Hvizd M, Palmberg PF: Glycosaminoglycans of the human trabecular meshwork in primary open-angle glaucoma. Invest Ophthalmol Vis Sci 37: 1360—1367, 1996.
- 41) Tawara A, Tou N, Kubota T, Harada Y, Yokota K : Immunohistochemical evaluation of the extracellular matrix in trabecular meshwork in steroidinduced glaucoma. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 246 : 1021—1028, 2008.
- 42) Gage PJ, Rhoades W, Prucka SK, Hjalt T : Fate maps of neural crest and mesoderm in the mammalian eye. Invest Ophthalmol Vis Sci 46 : 4200-4208, 2005.
- 43) Saika S, Liu CY, Azhar M, Sanford LP, Doetschman T, Gendron RL, et al : TGFβ2 in corneal morphogenesis during mouse embryonic development. Dev Biol 240 : 419-432, 2001.
- 44) Ittner LM, Wurdak H, Schwerdtfeger K, Kunz T, Ille F, Leveen P, et al : Compound developmental eye disorders following inactivation of TGFβ signaling in neural-crest stem cells. J Biol 4 : 11, 2005.
- 45) Smith RS, Zabaleta A, Kume T, Savinova OV, Kidoson SH, Martin JE, et al : Haploinsufficiency of the transcription factors FOXC 1 and FOXC 2 results in aberrant ocular development. Hum Mol Genet 9 : 1021—1032, 2000.
- 46) Evans AL, Gage PJ : Expression of the homeobox gene Pitx 2 in neural crest is required for optic stalk and ocular anterior segment development. Hum Mol Genet 14 : 3347—3359, 2005.
- 47) Jackson SM, Nakato H, Sugiura M, Jannuzi A, Oakes R, Kaluza V, et al : dally, a Drosophila glypican, controls cellular responses to the TGF-βrelated morphogen, Dpp. Development 124 : 4113— 4120, 1997.
- 48) Merz DC, Alves G, Kawano T, Zheng H, Culotti JG : UNC-52/perlecan affects gonadal leader cell migrations in *C. elegans* hermaphrodites through alterations in growth factor signaling. Dev Biol 256 : 173—186, 2003.
- 49) Iwao K, Inatani M, Matsumoto Y, Ogata-Iwao M, Takihara Y, Irie F, et al : Heparan sulfate deficiency leads to Peters anomaly in mice by disturbing neural crest TGF-β2 signaling. J Clin Invest 119 : 1997—2008, 2009.

### Comment:本田 孔士

プロテオグリカン糖鎖合成酵素のいくつかの個体内発現を制御することによって、視神経軸索お よび眼球各部の発生異常を追究した論文である.まず、制御する物質の組織的所在を確認のうえ、 組織培養によってある程度の目安のもとに、目的とするプロテオグリカン合成酵素の遺伝子ノック アウトマウスを作り、その糖鎖の出現欠損が如何に局所の表現型に影響を与えるかを体系的に実証 している.結果は明快で、その解釈も納得できるものである.著者が述べているように、視神経 は、中枢神経の発生をみるのに最適の場所であり、研究結果が中枢神経発生一般に敷衍できるとい う面でも広く注目に値する研究である。私は、なかでもプロテオグリカンの欠落で視交叉に発生異 常がみられたとする所見に特に興味を持った. Albinismus を伴う疾患の中に Prader-Willi 症候群 があるが、神経発達異常を伴う故に視野検査ができない. しかし visual evoked potential 検査で他 覚的に、視神経が正常に半交叉していないことが約20年前に示唆されている。今回の所見から 遡って、同症候群がプロテオグリカン発生に関連するのではないかと思ったりした。一つの新しい 発見で,過去の疑問が連鎖的に解けてくる例である.前眼部の発生異常から,Peters 奇形, Axenfeld-Rieger 症候群に類似した所見がみられたことにもとても興味がある. さらにヘパラン硫 酸関連の実験から、マウスで Schlemm 管,線維柱帯に異常を持つものが見つかり、眼圧も高いと いう、今まで開放隅角緑内障の良い動物モデルがないことから緑内障研究者が苦労してきたことを 考えると、これは大変な発見ではないかと思われる。勿論、同障には多因があろうが、一つの候補 としてプロテオグリカン系の代謝異常の関与を示唆するものである。以上のように、この論文には 多くの重要な発見が記載されているが、著者が断っているように、英文原著の版権の問題から、必 ずしも十分なデータがこの報告に載せられていないことのもどかしさが残る. 勿論,読者は原著に 遡って詳しいデータをみたらよいのであるが、特別講演、評議員会指名講演の場合、これは避けら れないことなのであろう.勢い内容が総論的な記載にならざるを得ない.私は、特に引用文献の 22, 49 に興味を持ったが、投稿中の論文記載がないのは残念である.

一つのターゲット物質を選び(その選択が大切である),その発現をノックアウトマウスを使って 欠損させ,異常の表現型から,その物質の役割を割り出すという手法は,各種疾患,特に先天異常 疾患の病因解明に大いに威力を発揮することを示した最近まれに見る優れた総説である.この研究 の延長上に,私にも次なる課題がいろいろと思い浮かぶが,著者の手によるさらなる発展に期待し たい.