

モノクローン抗体を用いたマウス眼球の発生学的解析 (図12)

辻 俊明・照林 宏文・糸井 素一 (京都府立医科大学眼科学教室)

高 木 新・藤 沢 肇 (京都府立医科大学第二解剖学教室)

Analyses of Ocular Development in the Mouse
by Monoclonal Antibodies

Toshiaki Tsuji, Hirofumi Terubayashi, Motokazu Itoi

Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine

Shin Takagi and Hajime Fujisawa

Department of Anatomy, Kyoto Prefectural University of Medicine

要 約

マウス眼球の特定の部位と結合するモノクローン抗体 (MAB111, MAB23) を用いて, マウス眼球の発生を免疫組織化学的に解析した. MAB111 は眼胞全域と均一に結合するが, 発生が進んで眼杯外板と内板が区分されると, 外板とは強く結合し, 内板とは弱く結合する. それらが網膜色素上皮層と神経網膜になると, MAB111 は前者と強く結合し, 後者とは殆んど結合しない. この様な事実は, 眼胞が眼杯内板と外板とに区分されるのと同時に, 両者で分子の構成にも差異が生じるという事を示唆する. MAB23 はまだ虹彩, 毛様体の認められない時期では, 神経網膜と結合する. 発生が進んでそれらが形成されると, MAB23 は神経網膜全域とは結合するが, 虹彩, 毛様体の色素上皮層及び網膜虹彩部, 網膜毛様体部とは殆んど結合しない. この様な事実は, 虹彩, 毛様体が形態的に区分されるのと同時に, それらと神経網膜との間で分子の構成にも差異が生じるという事を示唆する. (日眼 91: 1107—1112, 1987)

キーワード: マウス眼球の発生, モノクローン抗体, 免疫組織化学

Abstract

To study the development of the visual system in the mouse, monoclonal antibodies against mouse superior colliculus were made by the hybridoma technique. The tissue of the superior colliculus of the mice (BALB/c) was given intraperitoneally to Wistar rats as antigen. After immunization, spleen cells of the rat and mouse myeloma cells (P3X63Ag8U1) were fused with 50% polyethylene glycol. Hybridomas were selected by HAT medium. Only hybridomas which produced antibodies that bound to ocular tissue were cloned. Development of the mouse eye was immunohistochemically analyzed using two monoclonal antibodies named MAB111 and MAB23. In 9-day-old embryos, MAB111 uniformly bound to the entire optic vesicle. When the optic vesicle became invaginated to form the inner and outer layers of the optic cup in 11-day-old embryos, MAB111 bound strongly to the outer layer, but weakly to the inner layer. When the outer layer of the optic cup became the retinal pigment epithelium and the inner layer became the neural retina, MAB111 bound strongly to the former but negligibly to the latter. These findings indicate that the expression pattern of MAB111 epitope differs between the inner and the outer layer of the optic cup at the same time as the optic vesicle becomes transformed into the optic cup. MAB23 bound to neural retina in embryos less than 15 days old when the iris and ciliary body were not formed. In 17-day-old embryos and in the newborn, when the iris

別刷請求先: 602 京都市上京区河原町通広小路上ル 京都府立医科大学眼科学教室 辻 俊明

Reprint requests to: Toshiaki Tsuji, M.D. Dept. of Ophthalmol., Kyoto prefectural Univ. of Med.

Hirokojiagaru, Kawaramachidōri, Kamigyo-ku, Kyoto 602, Japan

(昭和62年7月3日受付) (Accepted July 3, 1987)

and ciliary body were formed at the periphery of the retina, MAb23 bound to the whole neural retina, but negligibly to the ciliary epithelium and to the pigment epithelium of iris. These findings indicate that the expression pattern of MAb23 epitope differs between the neural retina and the ciliary epithelium, the pigment epithelium of the iris at the same time as the iris and the ciliary body are formed. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91: 1107—1112, 1987)

Key words: Ocular development of the mouse, Monoclonal antibody, Immunohistochemistry

I 緒 言

マウス眼球の発生過程は、形態学的にはよく調べられている¹⁾²⁾。しかしながら、その分子レベルでの解析は、ほとんどなされていない。近年、ハイブリドーマ法を用いてモノクローン抗体を作製する技術が確立され^{3)~6)}、生体内の種々のエピトープに特異的な抗体を得ることが可能となった⁷⁾。この方法では、抗原を前もって精製しなくとも、特異的な抗体を得ることができ、生体内に存在する未知の微量な分子に対する特異抗体を得ることも可能である。

今回、我々は、マウスの視覚系の発生を解析する目的で、出生0日のマウス上丘を抗原としてモノクローン抗体を作製した。これらの抗体のうち、発生途上の眼球の特定の部位と結合する二種類の抗体を用いて、マウスの眼球発生を免疫組織化学的に継時的に観察し、網膜、虹彩、毛様体の発生に伴う分子レベルの変動を解析した。

II 実験方法

1. モノクローン抗体の作製

出生0日のマウス(BALB/c)6匹の上丘組織を、0.1Mリン酸緩衝液(PBS)中で機械的に分散し、1mlの懸濁液にしたものを抗原としてウイスター系ラットの腹腔に投与し感作した。最初の感作後2週間目に、同様の方法で2回目の感作を行ない、その3日後にラット脾臓をとり出し、脾細胞とマウスミエローマ細胞(P3X63Ag8U1)とを50%ポリエチレングリコール⁸⁾を使って細胞融合させた。10%ウシ胎児血清を含んだダルベッコ変法MEM(minimum essential medium)に、hypoxanthine, aminopterin, ならびに thymidine を加えた培地(HAT培地)で、ハイブリドーマのみを選別した。ハイブリドーマ培養上澄で、出生0日のマウス眼球の凍結切片(後述)を間接蛍光抗体法(後述)で染め、網膜、虹彩、毛様体と結合する抗体を産生するか否かを指標にして、ハイブリドーマのスクリーニ

ングを行った。ハイブリドーマのクローニングは、一個のハイブリドーマをガラスキャピラリーで拾い上げる方法で行った⁹⁾。

2. 試料作製

胎生9日, 11日, 13日, 15日, 17日ならびに出生0日のマウス(BALB/c)を、4%パラホルムアルデヒドで固定した後、Tissue-Tek[®](Miles)で包埋し、クリオスタットで20 μ mの厚さの凍結切片を作製した。

3. 免疫組織化学

ハイブリドーマをスクリーニングするために、間接蛍光抗体法を用いた。すなわち、ハイブリドーマの培養上澄と眼球切片を15分間反応させ、のち0.1M PBSで15分間洗浄し、フルオレスセイン結合抗ラットIg(Cooper Biomedical)の70倍希釈液と15分間反応させ、0.1M PBSで30分間洗浄し、その後蛍光顕微鏡で観察した。

得られたモノクローン抗体を用いて眼球の発生を継時的に免疫組織化学的に解析するためにABC法を用いた。すなわち、モノクローン抗体を含む培養上澄と眼球切片を15分間反応させ、のち0.1M PBSで15分間洗浄し、ビオチン化抗ラットIg(Amersham)の200倍希釈液と30分間反応させ、0.1M PBSで15分間洗浄し、streptavidin-biotinylated horseradish peroxidase complexの400倍希釈液と15分間反応させ、0.1M PBSで15分間洗浄し、diaminobenzidineと15分間反応させた。切片はEntellan[®]で封入し、光学顕微鏡で観察した。

III 結 果

出生0日のマウス上丘組織を抗原にして、20個のハイブリドーマをクローニングした。これらのうち、モノクローン抗体111(MAb111)とモノクローン抗体23(MAb23)は、眼球組織と結合し、しかも発生に伴ってその結合量が変動することが明らかとなった。

1. 眼球組織に対する MAb111 の結合パターン

胎生9日では、前脳胞から眼胞が形成されている。



図1 胎生9日, MAb111 は, 眼胞と前脳胞とに一樣に結合する。(ABC法 ×212)



図3 胎生13日, MAb111 は, 網膜色素上皮層とは強く結合するが, 神経網膜との結合は弱い。(ABC法 ×106)

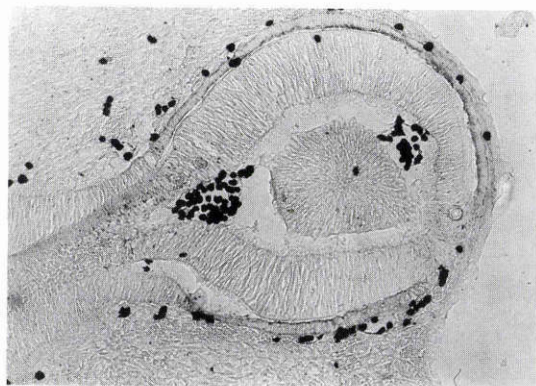


図2 胎生11日, MAb111 は, 眼杯外板とは強く結合するが, 内板との結合は弱い。(ABC法 ×106)

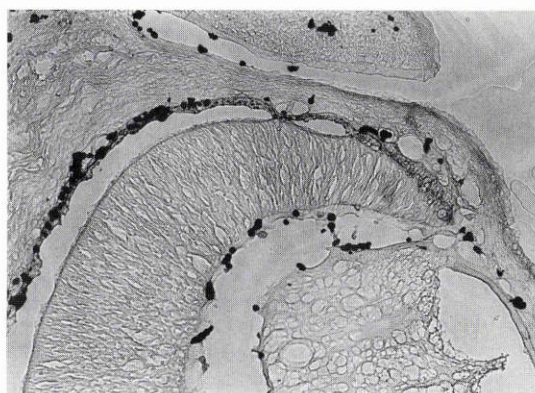


図4 胎生15日, MAb111 は, 網膜色素上皮層とは強く結合するが, 神経網膜との結合は弱い(ABC法 ×106)

MAb111 は前脳胞及び眼胞と一樣に結合し, その結合は, 胎生11日～出生0日とくらべると弱かった(図1).

胎生11日になると, 眼杯が形成され, 眼杯内板と外板との区分が明瞭となってくる. この時期では, MAb111 は外板と強く結合し, 内板との結合は弱かった(図2).

胎生13日, 15日, 17日, 出生0日では, この抗体は眼杯外板由来の網膜色素上皮層と強く結合し, 内板由来の神経網膜とはほとんど結合しなかった. また胎生17日と出生0日では, 虹彩, 毛様体が形態的にははっきりと区別されるが, この抗体は, 虹彩, 毛様体の色素上皮層とも強く結合した(図3, 図4, 図5, 図6).

2. 眼球組織に対する MAb23 の結合パターン

胎生9日では, MAb23 は眼胞とは結合しなかった(図7).

胎生11日では, 眼杯内板の後極部と強く結合したが,

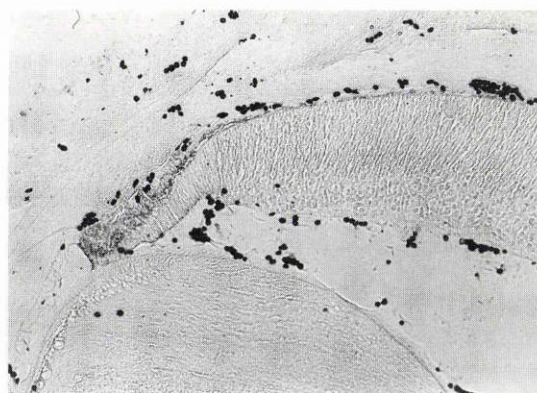


図5 胎生17日, MAb111 は, 網膜色素上皮層に加えて, 虹彩, 毛様体の色素上皮層とも強く結合するようになる。(ABC法 ×106)



図6 出生0日, MAb111は, 網膜色素上皮層及び虹彩, 毛様体の色素上皮層と強く結合する。(ABC法 $\times 106$)

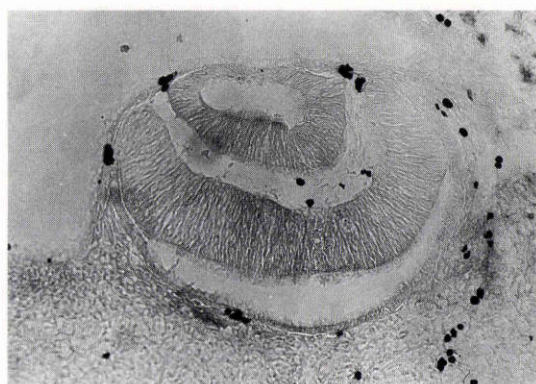


図8 胎生11日, MAb23は, 眼杯内板の後極部と強く結合する。(ABC法 $\times 106$)

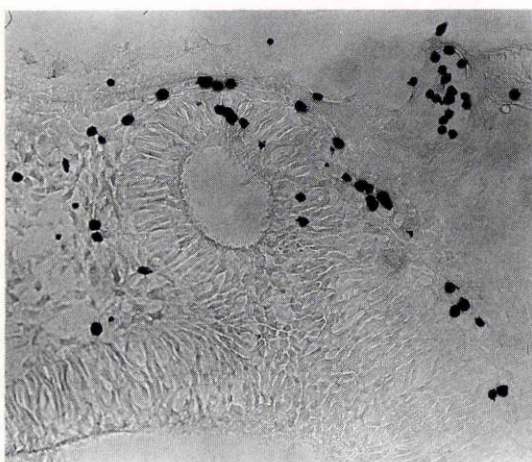


図7 胎生9日, MAb23は, 眼胞とは結合しない。(ABC法 $\times 170$)

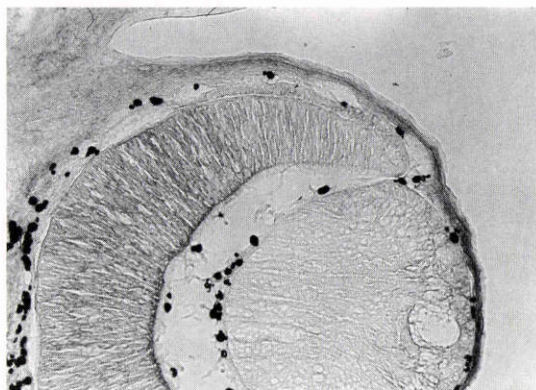


図9 胎生13日, MAb23は, 神経網膜の後極部付近とは強く結合するが, 辺縁部にゆくにつれて結合は弱くなる。(ABC法 $\times 106$)

その辺縁部とは弱く結合した(図8)。

胎生13日では, この抗体は神経網膜の後極部の全層と強く結合したが, 辺縁部にゆくにつれてその結合はだんだん弱くなり, 最辺縁部では, 神経網膜とほとんど結合しなかった。また網膜色素上皮層の辺縁部とは弱く結合したが, その後極部とは結合しなかった(図9)。

胎生15日では, この抗体は神経網膜とは胎生13日と同じようなパターンで結合したが, 胎生13日よりも辺縁部まで強く結合するようになった。また網膜色素上皮層との結合は消失した。新たに, 網膜辺縁部に接する間葉組織と弱く結合するようになった(図10)。

胎生17日では, 神経網膜全域と一様に強く結合し,

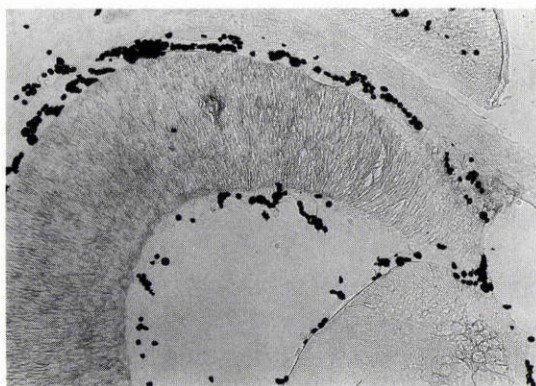


図10 胎生15日, MAb23は, 神経網膜の後極部付近とは強く結合するが, 辺縁部では結合は弱い。胎生13日とくらべると, この抗体は, より辺縁部まで神経網膜と強く結合している。(ABC法 $\times 106$)



図11 胎生17日, MAb23 は, 神経網膜とは結合するが, 虹彩, 毛様体の色素上皮層及び網膜虹彩部, 網膜毛様体部とは結合しない。(ABC法 ×106)



図12 出生0日, MAb23 は, 神経網膜とは結合するが, 虹彩, 毛様体の色素上皮層及び網膜虹彩部, 網膜毛様体部とはほとんど結合しない。(ABC法 ×106)

その後極部と辺縁部とではほとんど結合の強さの差はみられなくなった。また、この抗体は、虹彩、毛様体の支質とは結合したが、それらの色素上皮層及び網膜虹彩部、網膜毛様体部とは結合しなかった(図11)。

出生0日になると、網膜虹彩部と網膜毛様体部では、その内層の一部と弱く結合したが、それ以外の部位とは結合しなかった。また脈絡膜、角膜内皮とも結合するようになった。神経網膜全層と虹彩、毛様体の支質とは強く結合した(図12)。

IV 考 按

モノクローン抗体を用いて、ラット眼球組織の発生を解析した報告がいくつかなされている。

Barnstable¹⁰⁾¹¹⁾は、ラット網膜に対してモノクローン抗体を作製し、視細胞と結合する抗体を見い出しており、これらの抗体の結合性の違いから、視細胞におけるエピトープのパターンの解析を行なっている。また Sarthy¹²⁾は、シナプス小胞の蛋白質を認識するモノクローン抗体を用いて、発生途上のラット網膜でのこのエピトープの発現の様子を調べ、シナプス形成との関係を論じている。しかしながら神経網膜、網膜色素上皮層及び虹彩、毛様体などの眼球組織の形態分化にともなう分子の変化についての報告はない。今回の我々の解析により、いくつかの分子が眼球組織の分化に伴って消長することが明らかにされた。

マウスでは、胎生9日頃に前脳胞から眼胞が突出し、胎生11日には眼胞は陥入して眼杯となり、眼杯の内板は増殖して肥厚する。胎生13日頃には、眼杯の内板と外板とは接するようになり、内板は神経網膜に、外板は網膜色素上皮層になる¹³⁾。MAb111によって認識されるエピトープは、胎生9日では眼胞中に均一に発現しているが、胎生11日になると眼杯内板よりも眼杯外板に多く発現するようになった。胎生13日から出生0日までは、網膜色素上皮層に多く発現し、神経網膜にはほとんど発現しなくなった。このような結果は、眼胞が発生の進行とともに眼杯内板と外板とにわかれるのと同時に、眼杯内板と外板とで分子の構成が異なってくることを示唆する。

胎生17日になると、虹彩、毛様体が形態的に網膜と区分される¹¹⁾¹³⁾。一方、この時期の眼球をMAb23で染めると、この抗体によって認識されるエピトープは、神経網膜全域に発現し、網膜虹彩部、網膜毛様体部には発現していないことが明らかとなった。出生0日でも、MAb23のエピトープは神経網膜の全層に発現しているが、網膜虹彩部、網膜毛様体部では、その内層の一部に弱く発現しているのみであった。これらの事実は、発生の進行とともに網膜虹彩部、網膜毛様体部が形態的に神経網膜と区分されるのと同時に、分子の構成も両者の間で異なってくることを示唆する。

また、マウスの網膜では、視神経細胞は後極で最初に発生が開始し、次第に網膜の辺縁に進んでゆくことがわかっている¹⁴⁾。したがって、胎生11日から胎生17日までの間で、MAb23によって認識されるエピトープの発現が神経網膜の後極部から開始し、発生の進行とともに辺縁部へ進行してゆく事実は、MAb23のエピトープが分化した神経網膜に発現する可能性を示唆している。この仮説の上にたてば、MAb23が胎生17日と

出生0日で、網膜虹彩部及び網膜毛様体部とほとんど結合しないという事実は、眼杯内板の辺縁部が神経網膜としての分化をせず、未分化のまま残り残され、網膜虹彩部及び網膜毛様体部となったと考えることもできる。

現在までの所、MAB111ならびにMAB23の認識する抗原分子の同定には成功しておらず、具体的にどのような分子が眼球の形態分化にもなって変動するのかは明らかでなく、今後の問題として残されている。

この研究の一部は、昭和62年度文部省科学研究費特定研究62121004の援助を受けた。

なお本論文の要旨は第91回日本眼科学会総会にて発表した。

References

- 1) **Pei YF, Rhodin JAG**: The prenatal development of the mouse eye. *Anat Rec* 168: 105—126, 1970.
- 2) **Kaufman M**: Cephalic neurulation and optic vesicle formation in the early mouse embryo. *Am J Anat* 155: 425—444, 1979.
- 3) **Köhler G, Milstein C**: Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature* 256: 495—497, 1975.
- 4) **Oi VT, Herzenberg LA**: Immunoglobulin producing hybrid cell lines. in Mishell BB, Shiigi SM (eds): *Selected Methods in Cellular Immunology*. San Francisco, Freeman and Company, 351—372, 1981.
- 5) **Yelton DE, Scharff MD**: Monoclonal antibodies: A powerful new tool in biology and

- medicine. *Ann Rev Biochem* 50: 657—680, 1981.
- 6) **Melchers F, Potter M, Warner NL (eds)**: Lymphocyte hybridomas. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 81, 1978.
- 7) **Milstein C**: Monoclonal antibodies from hybrid myelomas. *Proc Roy Soc Lond B211*: 393—412, 1981.
- 8) **Galfre G, Howe SC, Milstein C**: Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature* 266: 550—552, 1977.
- 9) **Takagi S, Tsuji T, Amagai T, et al**: Specific cell surface labels in the visual centers of *Xenopus laevis* tadpole identified using monoclonal antibodies. *Dev Biol* 122: 90—100, 1987.
- 10) **Barnstable CJ**: Monoclonal antibodies which recognize different cell types in the rat retina. *Nature* 286: 231—235, 1980.
- 11) **McKay R, Raff MC, Reichardt LF (eds)**: Monoclonal antibodies to neural antigens. New York, Cold Spring Harbor Lab, 1981.
- 12) **Sarthy PV, Bacon W**: Developmental expression of a synaptic vesicle specific protein in the rat retina. *Dev Biol* 112: 284—291, 1985.
- 13) **Imaizumi M, Kuwabara T**: Development of the rat iris. *Invest Ophthalmol* 10: 733—744, 1971.
- 14) **Sidman R**: Histogenesis of mouse retina studied with thymidine-³H, in Smelser (ed): *The Structure of the Eye*. New York, Academic Press, 487—506.

(第91回日眼総会原著)