

第97回 日本眼科学会総会 宿題報告

眼と分子生物学

眼の形態形成に關与する遺伝子

松尾俊彦

岡山大学医学部眼科学教室

共同研究者

大内 淑代, 藤原 美樹, 野地 澄晴, 大隅-山下 典子

松尾 信彦, 谷口 茂彦, 江藤 一洋

要 約

胎生期において、多くの遺伝子が時間的、空間的に特異的に発現し、その相互作用により眼球が形成される。眼球の形態形成に關与する因子として、コラーゲン、プロテオグリカンなどの細胞外基質、ホメオボックス遺伝子蛋白を初めとする転写制御因子、各種の成長因子およびその受容体などが挙げられる。眼の形態形成の過程における各因子の役割を明らかにするため、以下の実験を行った。

I. 遺伝性小眼球変異種ラット (rat small eye: rSey) における Pax-6 遺伝子の解析. このラットは、ホモ接合体では、水晶体板および鼻板が形成されないため無眼球、鼻の奇形を来し、ヘテロ接合体では小眼球を呈する。この形質は遺伝性小眼球変異種マウス (small eye: Sey) に類似しており、このマウスでは Pax-6 遺伝子の異常がみつがっている。Pax-6 遺伝子は、ホメオボックスの一種のペアードボックス (paired box) と呼ばれる共通の DNA 配列をもつ Pax 遺伝子群の1つである。ペアードボックスは DNA 結合部位を規定している、つまり、Pax-6 蛋白質は、DNA 結合蛋白質で、他の遺伝子の転写を制御している。そこで、このラットにおいて Pax-6 遺伝子の解析を行った。胎生 12 日のホモ接合体の頭部からメッセンジャー RNA (messenger RNA: mRNA) を抽出し、相補的 DNA (complementary DNA: cDNA) ライブラリーを作った。ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction) 法で得たラットの正常 Pax-6 cDNA 断片を用いてスクリーニングを行い、いくつかの陽性クローンを得た。そのうち一番長い挿入 cDNA をもつクローンの塩基配列を決定した。ホモ接合体の Pax-6 cDNA には、約 600 塩基対の内部欠失があった。この cDNA にみつがった内部欠失は、mRNA を用いたポリメラーゼ連鎖反応によっても確認できた。次に、ポリメラーゼ連鎖反応を用いて核 DNA の断片を増幅生成し、その塩基配列を決めると、エクソン中に 1 塩基 G の挿入があり、このため GT という配列が新たにできていた。この配列 GT が異常な 5'側スプライス部位として働き、mRNA の内部欠失を来したものと考えられる。前部中脳の神経堤由来の細胞は、通常、眼球原基のまわりを通り、鼻原基の所まで移動する。しかし、このラットのホモ接合体では、眼球原基のまわりまでしか移動しないことがわかっている。Pax-6 遺伝子の異常により、神経堤細胞の移動に異常を来し、眼球の形態形成が異常になったと考えられる。

別刷請求先: 700 岡山市鹿田町 2-5-1 岡山大学医学部眼科学教室 松尾 俊彦

(平成 5 年 7 月 19 日受付, 平成 5 年 9 月 3 日改訂受理)

Reprint requests to: Toshihiko Matsuo, M.D. Department of Ophthalmology, Okayama University Medical School, 2-5-1 Shikata-cho, Okayama City, Okayama 700, Japan.

(Received July 19, 1993 and accepted in revised form September 3, 1993)

II. 発生期における各種成長因子受容体の発現. **In situ hybridization** 法を用いて, マウス胎児および鶏胚における成長因子受容体 mRNA の局在を調べた. 1. レチノイン酸受容体 (**retinoic acid receptor**). 妊娠中にレチノイン酸を投与すると, 胎児に眼球奇形を初めとする種々の顔面奇形が起こることが知られている. 全トランス型レチノイン酸の受容体には, α , β , γ の3型がある. α 型, β 型, γ 型の mRNA はいずれも, 頭部神経堤, および眼杯のまわりの間葉細胞 (神経堤由来の細胞) にみられた. また, 眼杯内で水晶体胞を取り囲む細胞にも3種類ともに発現していた. これらの眼杯内の細胞は, 後に角膜実質, 虹彩実質や, 第一次硝子体を形成する神経堤由来の細胞である. 以上からレチノイン酸およびその受容体は, 眼球の形成に重要な働きをしている神経堤由来の細胞の機能に関与しており, レチノイン酸の投与により神経堤細胞の異常が起こり, そのため眼球奇形を起こすと考えられる. 2. 線維芽細胞成長因子受容体 (**fibroblast growth factor receptor**). 線維芽細胞成長因子 (FGF) は発生過程での中胚葉誘導に関与しており, また脳の形成でも重要な働きをしている. 眼においては, 網膜色素上皮から神経網膜への転化および水晶体上皮細胞の分化に, 塩基性 FGF が関与していることが知られている. FGF 群には7種, また, FGF 受容体には, 哺乳類で4種, ニワトリで3種あることがわかっている. FGF 受容体はチロシン燐酸化酵素活性をもつ膜蛋白質で, 1種類の FGF 受容体は複数の FGF 群と結合する. FGF 受容体 1 型, 2 型, 3 型の mRNA の鶏胚での分布を調べた. FGF 受容体 1 型は, 早期には眼杯内板および外板にみられ, 時間の経過とともにその発現は, 内板の水晶体側に局限してくる. これに対して FGF 受容体 2 型は眼杯の神経上皮にはみられず, 眼杯のまわりの間葉細胞に強い発現がみられる. FGF 受容体 3 型は水晶体胞に強い発現がみられる. 以上から, FGF 受容体の各型は, 眼杯の神経上皮とそのまわりの間葉細胞との相互作用, あるいは水晶体胞と眼杯上皮との相互作用に関与している可能性がある. 3. アクチビン受容体 (**activin receptor**). アクチビンは形質転換性成長因子 β 型 (**transforming growth factor β : TGF- β**) 群の1つで, やはり発生における中胚葉誘導に関与している. その受容体はセリン・スレオニン燐酸化酵素活性をもつ膜蛋白質である. 鶏胚におけるアクチビン受容体 IIA 型および IIB 型の mRNA の分布について調べた. IIA, IIB 型ともに, 眼杯内板, 水晶体胞および水晶体胞前方の表皮 (将来の角膜上皮に相当する) に発現していた. 眼杯内板におけるアクチビン受容体の発現は背側に比べて腹側の方に強くみられた.

以上の結果に基づき, 眼の形成過程における神経堤細胞, 上皮間葉相互作用, および位置情報の果たす役割について考察した. (日眼会誌 97: 1406-1434, 1993)

キーワード: 小眼球変異種ラット, Pax-6 遺伝子, レチノイン酸受容体遺伝子, 線維芽細胞成長因子受容体遺伝子, アクチビン受容体遺伝子

Molecular Biological Approaches to Eye Development

Toshihiko Matsuo

Department of Ophthalmology, Okayama University Medical School

Abstract

Many genes are expressed coordinately and proteins coded by these genes interact with one another in development of the eye. Candidates for such factors are growth factors, hormones, and their receptors, transcriptional factors such as homeodomain-containing proteins. The following experiments were done in order to understand their roles in eye development.

I. Analysis of Pax-6 gene in a rat strain with small eye phenotype. A mutant rat strain "rSey (rat small eye)" showed absence of both the nasal placode and the lens placode in homozygotes, which resulted in nasal malformation and lack of the eyes. This phenotype was similar to that of a mouse mutant "Sey (small eye)" with mutations of the Pax-6 gene, which motivated me to analyze the Pax-6

gene in the mutant rat. An exon of the Pax-6 genomic DNA in the homozygote had a novel dinucleotide (GT) due to one base (G) insertion, which served as an abnormal 5' donor splice site and generated an internal deletion of the messenger RNA. The homozygote also showed impaired migration of neural crest cells originating from the anterior midbrain, indicating that the Pax-6 gene would be conducting migration of the neural crest cells.

II. Localization of transcripts by in situ hybridization. 1. Retinoic acid receptor. Retinoic acids are teratogenic and exposure to them causes facial malformation including eye anomalies. Three types (α , β , γ) are known as receptors for all-trans retinoic acids. Transcripts for all the types were found in neural crest and its derivatives around and inside of the optic cup in mouse embryos. The finding is consistent with the fact that neural crest cells are involved in malformation caused by retinoic acids. 2. Fibroblast growth factor. Fibroblast growth factors exert effects on differentiation, proliferation, and survival of various kinds of cells in the eye. Three types (types 1, 2, and 3) of fibroblast growth factor receptors have been discovered in chick. The type 1 receptor was expressed mainly in the neuroepithelial layers of the optic cup, and the type 2 receptor was expressed in mesenchymal cells of neural crest origin around the optic cup of chick embryos. In contrast, transcripts for the type 3 receptor were detected at a high level in the lens vesicle. Different types of the receptor expressed in structures of different origins indicate that fibroblast growth factors would be involved in signaling among these different structures in eye development. 3. Activin receptor. Activin is a member of the transforming growth factor type β superfamily. Transcripts of activin receptor were found in the inner neuroepithelial layer of the optic cup, the lens vesicle, and the surface ectoderm overlying the lens vesicle. The gene was expressed higher in the ventral retina than in the dorsal retina.

Based on these molecular biological findings, the roles of neural crest derived cells, epithelial-mesenchymal interactions, and positional information in development of the eye were discussed in this report. (J Jpn Ophthalmol Soc 97: 1406-1434, 1993)

Key words: Small eye phenotype, Pax-6 gene, Retinoic acid receptor gene, Fibroblast growth factor gene, Activin receptor gene

I 緒 言

発生においては、様々な遺伝子が特異的に発現し、その遺伝子産物の相互作用により眼球のような複雑な組織が形成される。眼球の形態形成に関与する因子としては、ホルモン、成長因子およびその受容体、ホメオボックス遺伝子産物¹⁾²⁾、細胞表面接着受容体³⁾⁻¹²⁾、コラーゲンやプロテオグリカン¹³⁾⁻¹⁷⁾、フィブロネクチン、ラミニンなどの細胞外基質が挙げられる。これらの因子により、各細胞間および細胞と細胞外基質との間の相互作用、細胞の移動、細胞の増殖、各細胞の特殊な組織への分化が調節されていると考えられる。

成長因子には、各々対応する受容体が存在する。受容体は細胞表面にある場合と、核内にある場合とがある。細胞表面にある受容体は細胞内の第2次伝達系とつながっており、成長因子が受容体と反応すると、情報は第2伝達系を介して細胞内に伝えられる。第2次伝達系を仲介する分子としては、カルシウムイオン、

燐酸イノシトール、脂質、環状 AMP および GMP などがあることが現在までにわかっている。一方、甲状腺ホルモン、ステロイドおよびレチノイン酸などは細胞膜を透過し、細胞質を通してさらに核内に達し、そこにある核内受容体と反応する¹⁸⁾¹⁹⁾。核内受容体はそれ自身転写制御因子であり、DNA と直接結合し、他の遺伝子の転写を調節している。

最近の研究により、成長因子蛋白がその受容体と反応する際、プロテオグリカンとの相互作用が必要であることがわかってきた。例えば、線維芽細胞成長因子 (fibroblast growth factor: FGF) は、細胞表面や細胞外基質の中にあるヘパラン硫酸プロテオグリカンと結合する²⁰⁾。細胞外基質のヘパラン硫酸プロテオグリカンは FGF の貯蔵庫として働き、一方、細胞表面にあるものは、FGF に対する親和性の低い受容体として働いている。この細胞表面のプロテオグリカンに結合した FGF は、次に同じく細胞表面にある親和性の高い受容体 (チロシン燐酸化酵素活性をもった膜蛋白質)

に渡される²¹⁾²²⁾。別の例を挙げると、形質転換性成長因子 β 型 (transforming growth factor type β : TGF- β)の受容体には3種類ある。すなわちI型、II型、III型である^{23)~25)}。III型受容体は、細胞表面にあるプロテオグリカン (ペータグリカンと呼ばれる) で、膜蛋白質にヘパラン硫酸またはコンドロイチン硫酸グリコサミノグリカンが結合したものである²⁶⁾²⁷⁾。これとは対照的にII型受容体はセリン・スレオニン磷酸化酵素活性をもつ膜蛋白質である²⁸⁾。

ホメオボックスとは、最初、ショウジョウバエでみつけた特定のDNA配列のことを指し、この配列をもつ遺伝子のことをホメオボックス遺伝子と呼ぶ²⁹⁾³⁰⁾。ホメオボックスは、蛋白質のホメオボックス領域を規定しており、この領域はDNAに結合する。すなわち、ホメオボックス蛋白はDNAに結合し、他の遺伝子の転写を制御する転写制御因子である¹⁾²⁾。ショウジョウバエにみられる様々な奇形は、ホメオボックス遺伝子の異常によることがわかっている³⁰⁾³¹⁾。

ペアードボックス (paired box) はホメオボックスの一種で、このペアードボックスをもつ遺伝子のことをPax遺伝子と呼ぶ。ペアードボックスも最初、ショウジョウバエでみつかり³²⁾³³⁾、後にマウスや人にも同様な配列があることがわかった。現在のところ、マウスのPax遺伝子としてPax-1からPax-8までの8種類がみつまっている^{34)~41)}。マウスには種々の遺伝的変異種があるが、このうちのあるものはPax遺伝子の異常により起こる³⁴⁾³⁵⁾。さらに、人のある種の遺伝性疾患においてもPax遺伝子の異常がみつまっている。椎骨が形成されないundulatedという変異種マウスでは、Pax-1遺伝子が突然変異を起こしている⁴²⁾。一方、Pax-3遺伝子の異常は、神経管の形成および神経堤細胞に異常を来すマウスの変異種splotchでみつまっている⁴³⁾。ワーデンブルグ症候群は、難聴および皮膚や虹彩の色素異常を来す遺伝性疾患であり、これにもPax-3遺伝子の異常がみつまっている⁴⁴⁾⁴⁵⁾。Pax-6遺伝子の異常は、ホモ接合体では無眼球を呈する小眼球変異種マウス (small eye: Sey)⁴⁶⁾および人の先天性虹彩欠損症例^{47)~49)}でみつまっている。

今回の報告では、小眼球変異種マウスSeyに似た形質⁵⁰⁾⁵¹⁾をもつ小眼球変異種ラット (rat small eye: rSey)⁵²⁾におけるPax-6遺伝子の解析について述べる。さらに、眼の形態形成の過程において、レチノイン酸受容体、FGF受容体およびTGF- β 群の1つであるアクチビンの受容体のメッセンジャーRNA (mes-

senger RNA: mRNA)の発現についてin situ hybridizationを用いて調べたので、その結果も併せて報告する。これらの分子生物学的な結果に基づいて、眼球の形態形成過程における神経堤細胞の役割、上皮間葉相互作用および位置情報について考察する。

II 実験方法

1. プロープ

1) マウスのレチノイン酸受容体遺伝子⁵³⁾

人の α 型受容体のレチノイン酸結合領域 (マウスの α 型受容体遺伝子と交叉反応する)の断片、およびマウスの β 型、 γ 型受容体遺伝子の相補的DNA (cDNA)の全長をpGEMベクターに挿入したのから、in situ hybridizationに使うRNAプロープを合成した。これらの遺伝子は、フランス国ストラスブルグCNRSのPierre Chambon博士から提供を受けた⁵³⁾。

2) 鶏のFGF受容体遺伝子^{54)~56)}

受精後3日目の鶏胚cDNAライブラリー (倉敷市川崎医科大学薬理学教室、濃野勉博士からの提供)から、混合プライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction)を行い、1型、2型、3型受容体のcDNA断片を生成した。各cDNAのチロシン磷酸化酵素活性領域を挟むように、混合プライマーの位置を設定した。生成した各DNA断片をpGEMベクターに挿入し、その塩基配列を決め、各断片が属する型を確認した。そして、そのベクターを鋳型として、RNAプロープを合成した⁵⁷⁾⁵⁸⁾。プロープ間の交叉反応はほとんどない。

3) 鶏のアクチビン受容体遺伝子⁵⁹⁾

マウス胎児のcDNAライブラリー (Clontech社製)から、ポリメラーゼ連鎖反応を用いてマウスのアクチビン受容体のcDNA断片を生成した。次にこのマウスのcDNA断片をプロープとして、受精後4日目の鶏胚のcDNAライブラリーから陽性クローンを分離した。分離したcDNAをpGEMベクターに挿入し、その塩基配列を決め、さらにそれを鋳型としてRNAプロープを合成した。

4) ラットPax-6遺伝子⁵²⁾

妊娠後12日目のスプレイグ・ドロー種ラット胎児の頭部から抽出したmRNAを鋳型として、cDNAを合成した。このcDNAからポリメラーゼ連鎖反応を用いて、Pax-6のcDNA中の領域A、B、Cに対応する3断片を生成した (図4)。これらの各断片をpBlue-

script ベクターに挿入し、その塩基配列を決めた。

5) 人 Pax-6 遺伝子⁴⁷⁾

人 Pax-6 遺伝子は、英国エジンバラ市 Western General Hospital の Veronica van Heyningen 博士から提供を受けた。

2. ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction)

DNA Thermal Cycler PJ 2000 機器 (Perkin Elmer Cetus 社製) および GeneAmp PCR Reagent Kit (たから酒造社製) を用いてポリメラーゼ連鎖反応を行った。具体的には、94°C における 2 本鎖 DNA の変性を 1 分間、55°C における DNA の 2 本鎖化反応を 1 分間 (cDNA が鋳型の場合) または 2 分間 (核 DNA が鋳型の場合)、そして、72°C における DNA 合成酵素 (DNA ポリメラーゼ) による DNA の伸長反応を 1 分間行う過程を 25 回繰り返した。この過程の最後に 72°C において 7 分間 DNA の伸長反応を行った。

3. in situ hybridization⁶⁰⁾

マウス胎児または鶏胚を、0.1 M 燐酸緩衝液 (pH 7.4) を含む 4% パラホルムアルデヒド液中で 4°C において 3 時間固定した。その後、アルコール系およびキシレンによる脱水を行い、パラフィンに包埋した。5 μm 厚のパラフィン切片を作製し、0.05% ポリ L リジンを塗布したスライドガラス上に張り付けた。アルコール系による親水化の後、スライドガラス上の切片を燐酸緩衝液 (0.1 M 塩化ナトリウム, 10 mM 燐酸水素ナトリウム, pH 7.4) で洗い、2 mg/ml のグリシンにて残留固定剤を不活化した。さらに 0.1 M トリエタノールアミンおよび 0.25% 無水酢酸を用いて、切片のアセチル化を 15 分間行い、2×SSC 液 (1×SSC: 150 mM 塩化ナトリウム, 15 mM ぐえん酸ナトリウム) にて洗った。次に、50% ホルマミド, 2×SSC, 10 mM ジチオスレイトール (DTT) 液中にて 30 分間、50°C で保温し、50% ホルマミド, 2×SSC, 10 mM DTT, 1 μg/μl トランスファー RNA, 1 μg/μl 超音波処理の鮭精子 DNA, 1 μg/μl 牛血清アルブミン, 10% デキストラン硫酸を含む液中で、³⁵S で標識した RNA プローブと 50°C にて 12~14 時間反応させた。RNA プローブとしては、検出しようとする mRNA と全く同じ配列をもったプローブ、つまりセンス鎖をコント対照実験に用い、検出しようとする RNA と相補的な配列をもったプローブ、つまりアンチセンス鎖を本実験に用いた。両鎖とも目的とする cDNA を挿入したプラスミッドベクターを鋳型として、SP6/T7 Trans

cription Kit (Boehringer Mannheim 社製) を用いて合成した。反応終了後、0.5 M 塩化ナトリウム, 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0), 1 mM エチレンジアミンテトラアセテート (EDTA) 液中で、37°C において 30 分間保温し、20 μg/ml のリボヌクレアーゼ (RNA 分解酵素) と 37°C において 30 分間反応させて未反応の RNA プローブを分解し、0.1×SSC, 10 mM DTT 液中にて洗った。切片を再脱水し、乳剤 (Kodak 社製, NTB 2) を塗布し、暗箱中で 2 週間感光させた。切片を現像した後、ヘマトキシリン・エオジンにて染色した。

4. cDNA ライブラリーの作製

妊娠 12 日目のホモ接合体胎児の頭部から、Fast Track mRNA Isolation Kit Version 3.0 (Invitrogen 社製) を用いて mRNA を抽出し、これを鋳型として cDNA を合成した。次に ZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene 社製) を用いて、合成 2 本鎖 DNA を Uni-ZAP XR ファージ DNA 中に挿入した。抽出ラムダファージ蛋白 (Gigapack II Gold Packaging Extract: Stratagene 社製) を用いて、ファージ蛋白内に DNA を梱包してファージを再構築し、細菌種 Sure に感染させた。このようにして作った cDNA ライブラリーから、³²P で標識した正常ラットの Pax-6 cDNA 断片をプローブとして用い、陽性クローンを分離した。

5. 核 DNA のサザンブロッティング

Mono-Poly Resolving Medium (Flow 社製) を用いて、密度勾配遠心法により患者末梢血 10~20 ml 中から白血球を分離した。白血球を 100 mM EDTA, 0.5% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS), 20 μg/ml 膵臓リボヌクレアーゼを含む 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) 中に浮遊し、2 mg/ml プロテナーゼ K により 37°C において一夜蛋白を消化した。一方、正常スプレグ・ドローリー種ラット胎児の胎盤および小眼球変異種ラットのホモ接合体胎児の胎盤を摘出し、液体窒素にて組織を凍結した後 Freezer/Mill 6700 型機器 (Spex 社製) にて組織を粉碎した。粉状になった組織を上記のトリス塩酸緩衝液中に浮遊し、同様に蛋白消化を行った。その後、フェノール・クロロホルム混液 (1:1) にて 2 回、クロロホルム・イソアミルアルコール混液 (24:1) にて 1 回 DNA 溶液中から蛋白を抽出分離し、最終的に 100% エタノールを DNA 溶液量の 2.5 倍量加えて DNA を沈澱させた。沈澱した DNA を 70% エタノールにて洗い、1 mM EDTA, 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) 中に溶解させた。このよう

にして精製した核DNAを、DNA切断制限酵素 (BamHI, EcoRI, HindIII, PstI: たから酒造社製) を用いて切断し、0.8% アガロースゲル中にて電気泳動させた。ゲル中を泳動分離したDNA断片をナイロン膜 (Hybond-N⁺: Amersham 社製) に転写した。6×SSC, 5×Denhardt液 (1×Denhardt液: 0.02% フィコール, 0.02% ポリビニルピロリドン, 0.02% 牛血清アルブミン), 0.5% SDS, 10mM EDTA, 100 μg/ml 超音波処理鮭精子DNAを含む液中で、65°Cにおいて4時間この転写膜を保温し、その後同じ液中で³²Pで標識したDNAプローブと65°Cにおいて一夜反応させた。DNAプローブは、Random Primer DNA Labeling Kit (たから酒造社製) を用いて³²P-dCTPで標識した。反応終了後、2×SSC, 0.5% SDS液にて、さらに0.1×SSC, 0.5% SDS液にて65°Cで洗い、3日間-80°Cにてエックス線フィルムに感光させた。

6. 塩基配列の決定

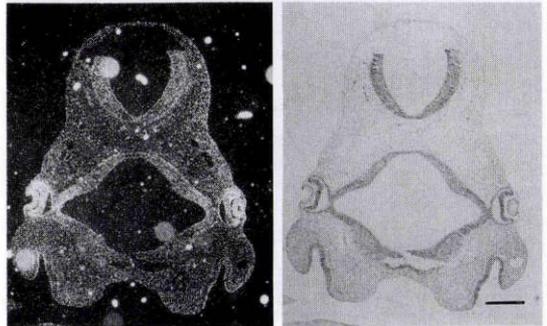
Pax-6 遺伝子の cDNA の挿入をもつ陽性ファージを分離し、細菌種 Sure 中でそのファージDNAを pBluescript プラスミッドに菌内変換した。Qiagen Kit (Diagen 社製) を用いて、プラスミッドを菌から抽出し、DNAをアルカリ変性させ、Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit (United States Biochemical 社製) を用いてDNAの塩基配列を決めた。アルカリ変性したプラスミッドDNAを鋳型として、4種類のジデオキシリボ核酸の取り込みのためDNA合成酵素によるDNA鎖の伸長が止まってできた産物を、6% ポリアクリラミドゲル中で電気泳動した。泳動終了後、5% 酢酸、5% メタノール液中で15分間固定し、80°Cで2時間乾燥させ、エックス線フィルムに一夜感光させた。ポリマーゼ連鎖反応によって得たDNA断片をプラスミッドに挿入したのも同様な方法で塩基配列を決めた。

III 結 果

1. 小眼球変異種ラット (rSey) の形質⁵²⁾

この変異種ラットは、スプレイグ・ドロー種群中からみつかった自然発生の突然変異種である。ホモ接合体では、鼻板および水晶体板が誘導されず (図1)、そのため鼻の奇形および無眼球を来す。ホモ接合体は、この奇形のため呼吸ができず、出生直後に死亡する。この形質は小眼球変異種マウスによく似ている⁵⁰⁾⁵¹⁾。一方、ヘテロ接合体では鼻板や水晶体板は正常に誘導され、成熟ラットで小眼球がみられる以外、他に異常

Normal/Heterozygote



Homozygote



図1 in situ hybridization による小眼球変異種ラットのホモ接合体胎児および正常様胎児 (正常胎児およびヘテロ接合体胎児) における Pax-6 遺伝子の転写物の分布。

明視野像 (右) および暗視野像 (左)。ホモ接合体には水晶体板および鼻板がみられない。Pax-6 遺伝子の転写物は、正常様胎児の水晶体胞、眼杯および神経管にみられる。(バーは 250 μm)

はない。ヘテロ接合体の成熟ラットの眼球を光学顕微鏡で観察すると、限局性の網膜異形成および虹彩実質の空胞変性があった (図2)。他に異常はなく、虹彩長も正常であった。ホモ、ヘテロ接合体ともに、他に全身的な異常はなかった。

ホモ接合体胎児は眼球ができないため、脳室が直接、表皮外胚葉と接している (図1)。そのため胎児を実体顕微鏡下でみると、ホモ接合体胎児の眼球が本来あるべき部位は、ヘテロ接合体および正常胎児に比べて透明にみえる。このようにホモ接合体胎児は、ヘテロ接合体および正常胎児と形態的に区別できる。しかし、ヘテロ接合体と正常胎児は形態的には区別できない。したがって以下の文章では、ヘテロ接合体と正常胎児を総称して正常様胎児と呼ぶことにする。

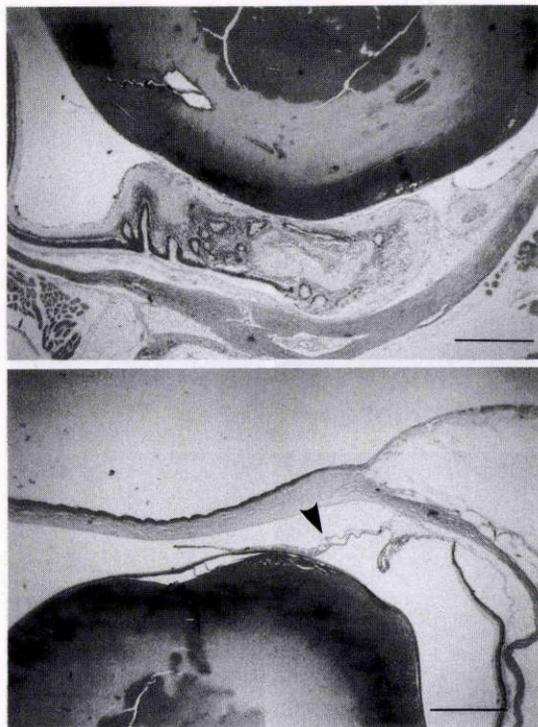


図2 小眼球変異種ラットの成熟ヘテロ接合体における眼球的光学顕微鏡による組織像。限局性網膜異形成(上)および虹彩実質の空胞変性(下, 矢尻)がみられる。(バーは500 μ m)

このラット種のホモ接合体, ヘテロ接合体および正常胎児の神経堤細胞を生体色素で標識し, それらの胎児を試験管内で培養し, 神経堤細胞の移動を追跡した実験がある⁵²⁾。それによると, ヘテロ接合体および正常胎児における前部中脳由来の神経堤細胞は, 眼球原基のまわりを通して鼻原基の所まで移動する(図3)。ところが, ホモ接合体胎児における前部中脳由来の神経堤細胞は, 眼球原基のまわりまでは移動するが, そこで止まってしまい, 鼻原基の所まで到達しないことがわかった(図3)。

2. 小眼球変異種ラットにおける Pax-6 遺伝子の発現

Pax-6 遺伝子がホモ接合体胎児で発現しているかどうかを調べるため, 正常ラットの Pax-6 遺伝子の相補的 DNA (complementary DNA : cDNA) をプローブとして in situ hybridization を行った。正常様胎児では, Pax-6 遺伝子の転写物は, 神経管上皮, 眼杯上皮, 水晶体胞および鼻板などの表皮外胚葉にみられた(図

1)。ホモ接合体でも, Pax-6 遺伝子は神経管上皮に発現していた(図1)。以上から, 例えこのラット種において Pax-6 遺伝子の異常があるにしても, Pax-6 遺伝子の転写物はホモ接合体でも作られているということになる。

3. 小眼球変異種ラットのホモ接合体の cDNA ライブラリーの作成

妊娠12日目の胎児を取り出し実体顕微鏡下でホモ接合体を選び, その頭部から mRNA を抽出した。この RNA から cDNA を合成し, ライブラリーを作成した。正常ラットの Pax-6 cDNA をプローブとして用い, このライブラリー中から陽性クローンをいくつか得た。このうち, 最長の挿入 DNA をもつクローンの塩基配列を決めた。cDNA には約 600 塩基対に及ぶ内部欠失があった(図4)。すなわち, ホモ接合体から得た cDNA におけるベアードボックスおよびそれに続くホメオボックスは正常である。ところが, その直後に内部欠失が起こり, 本来ならばホメオボックスに続くセリン・スレオニンに富む領域, および3'末端の非翻訳領域の一部を欠いている。

4. 小眼球変異種ラットにおける mRNA を用いたポリメラーゼ連鎖反応

ホモ接合体の cDNA にみつかった内部欠失をさらに確認するため, mRNA を用いたポリメラーゼ連鎖反応を行った。ホモ接合体, ヘテロ接合体および正常胎児を含む各胎児の頭部から各々別個に mRNA を抽出した。mRNA から cDNA を合成し, それを鋳型として3領域(領域 A, B, C, 図4)に対応する DNA 断片をポリメラーゼ連鎖反応により生成した。正常様胎児(ヘテロ接合体および正常胎児)では, 3領域に対応する DNA 断片がすべて生成されたが, ホモ接合体では領域 A に対応する断片しか生成されなかった(図5)。次に, cDNA にみられた内部欠失を挟むように5'側プライマーと3'側プライマーを位置づけ, 内部欠失を含むような形で領域 D を設定した。正常様胎児では, ポリメラーゼ連鎖反応により, 領域 D に対応する DNA 断片として800塩基対の断片が生成されたが, ホモ接合体ではこれとは対照的に200塩基対の断片が生成された(図5)。つまりホモ接合体では, 分離された cDNA にみられたように, mRNA には確かに600塩基対の内部欠失があることになる。正常様胎児のうちあるものでは, 領域 D に対応する断片として200塩基対の断片と800塩基対の断片の両方が生成された。この胎児は正常な Pax-6 mRNA と異常な

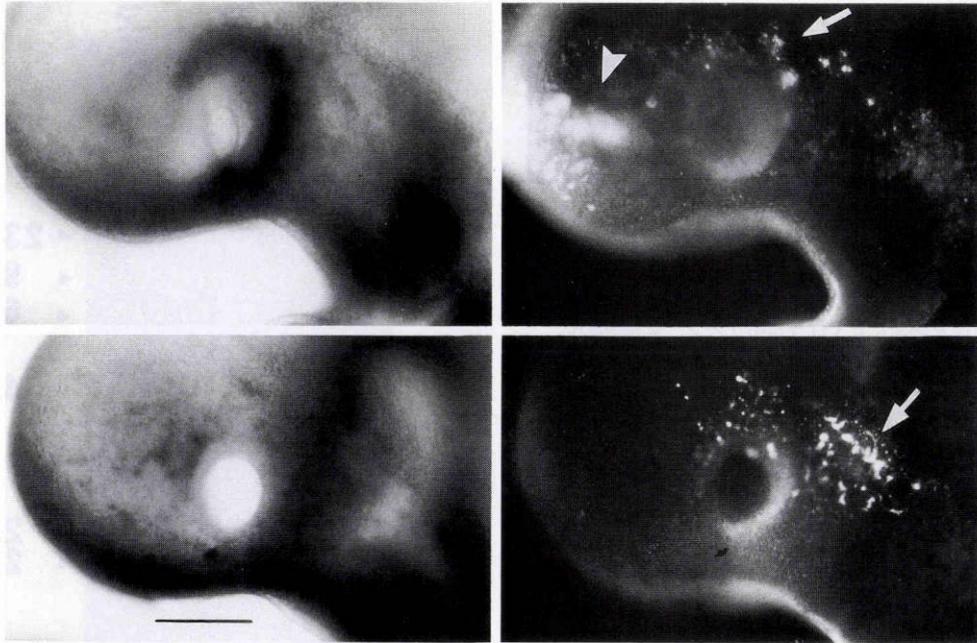


図 3 前部中脳由来の神経堤細胞の移動様式。

妊娠 10 日目の胎児の神経堤細胞を生体色素 DiI で標識し^{161)~163)}、胎児を試験管内で 30 時間培養し²⁰³⁾、標識された細胞の移動を蛍光顕微鏡下で観察した。明視野下での胎児の側面像(左)および暗視野下での蛍光像(右)。正常様胎児(上側 2 枚の図)における神経堤細胞は、眼球原基(矢印)および鼻原基(矢尻)の両方に達している。ところがホモ接合体胎児では(下側 2 枚の図)、神経堤細胞は眼球原基のまわり(矢印)に蓄積し、鼻原基の所まで到達しない。(大隅一山下典子博士の御好意による)(バーは 500 μm)

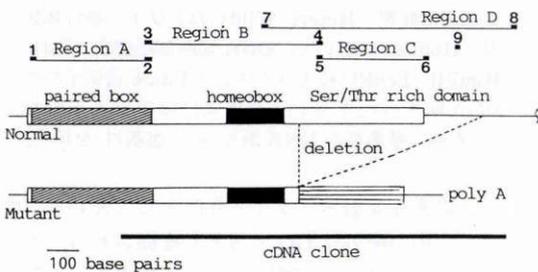


図 4 正常ラット Pax-6 cDNA の構造および異常な Pax-6 cDNA の構造を示す模式図。

翻訳領域の 3' 側の 3 分の 1 および 3' 側の非翻訳領域の一部を含む内部欠失により翻訳される蛋白質には、正常なペアードボックス領域およびホメオボックス領域はあるが、セリン・スレオニンに富む領域は欠如し、そのかわり意味のないアミノ酸配列が続いている。ポリマーゼ連鎖反応によって増幅される領域 (Region A, B, C, D) も示してある。数字がついた太線はプライマーの位置を示す。(文献 52 から引用)

mRNA の両方をもつヘテロ接合体と考えられる。

領域 B に対応する断片の生成に用いた 3' 側プライマーおよび領域 C の 3' および 5' 側の両プライマーは内部欠失領域に位置しており、ホモ接合体で領域 B, C に対応する断片が生成されなかったことは、cDNA にみつかった内部欠失の構造と理論的に合致する。

5. 小眼球変異種ラットにおける核 DNA の解析

mRNA にみられた内部欠失の原因を探るため、核 DNA の解析を行った。まず、正常ラットの Pax-6 cDNA をプローブとして、核 DNA のサザンブローディングを行った。DNA 切断制限酵素によってできる Pax-6 遺伝子の断片の大きさおよび様式に関して、正常胎児とホモ接合体胎児との間に違いはなかった(図 6)。つまり、核 DNA の Pax-6 遺伝子には、この方法で検出できる大きさの欠失や挿入はないということになる。

次に、mRNA にみられた内部欠失領域の 5' 側末端を挟むように両プライマーを設定し、核 DNA を鋳型

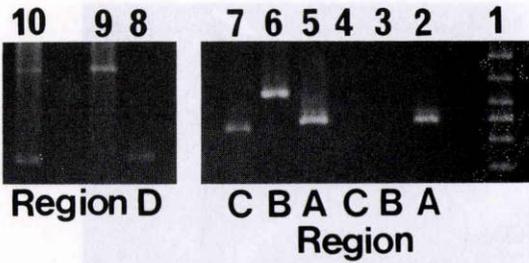


図5 小眼球変異種ラットの各胎児から抽出した mRNA を鋳型として行ったポリメラーゼ連鎖反応。正常胎児では各領域 A(第5列), B(第6列), C(第7列)に対応する DNA 断片が生成されるが, ホモ接合体胎児では領域 A(第2列)に対応する DNA 断片のみが生成され, 領域 B(第3列)および C(第4列)に対応する断片は生成されない。また, 正常胎児では領域 D(第9列)に対応する 800 塩基対の DNA 断片が生成されるが, これに対してホモ接合体胎児では領域 D(第8列)に対応して生成される DNA 断片は 200 塩基対である。つまり, ホモ接合体では 600 塩基対の内部欠失があることを示し, これは分離された cDNA の構造異常と一致する(図4)。胎児によっては(第10列), 200 および 800 塩基対の両方の DNA 断片がみられるが, これはヘテロ接合体と考えられる。各領域およびプライマーの位置は図4に明示してある。第1列には塩基対長の標識(上から 1,000, 700, 500, 400, 300, 200 塩基対)を示す。(文献 52 から引用)

としてポリメラーゼ連鎖反応を行った。また, 内部欠失領域の 3'側末端を挟むように両プライマーを設定し, 同様に反応を行った。内部欠失領域の 5'末端を挟むようなプライマーを用いると, 約 500 塩基対の核 DNA 断片が生成された。ホモ接合体および正常胎児から得た DNA 断片は, 同じ大きさであった。この DNA 断片は, 1 個のエクソンおよびそれを挟む 2 個のイントロン, さらに, その両外側のごく短いエクソンの切れ端から成っていた(図7)。正常胎児と比較すると, ホモ接合体ではこの真ん中のエクソン中に 1 塩基 G の挿入があり, そのため新たに GT という配列ができていた。両側のイントロン中には塩基配列の違いはなかった。一方, 内部欠失領域の 3'末端を挟むようなプライマーを用いると, 約 200 塩基対の長さの核 DNA 断片が生成された。この断片は別のエクソン中の配列に対応し, 正常胎児とホモ接合体とはその塩基配列に違いはなかった(図7)。以上から, エクソン中にできた新しい配列 GT が, 異常な 5'側スプライス部位として働き, mRNA の内部欠失を来したと考え

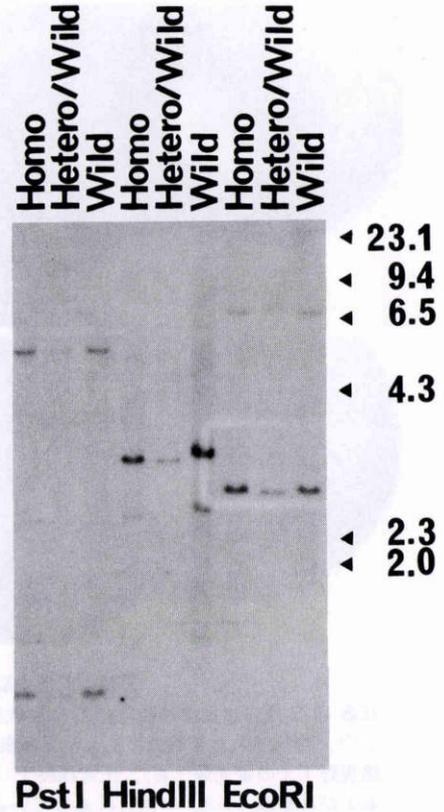


図6 小眼球変異種ラットにおける核 DNA のサザンプロットング。

正常胎児 (Wild), 正常様胎児 (ヘテロ接合体胎児および正常胎児: Hetero/Wild) およびホモ接合体胎児 (Homo) において, DNA 切断制限酵素 (PstI, HindIII, EcoRI) によって生じる Pax-6 遺伝子の核 DNA 断片の大きさおよび様式には差はみられない。右端に標準長の DNA 断片(キロ塩基対)を示す。

られる。異常な 3'側スプライス部位として使われた他のエクソン中の配列は GG であると推測される。この配列は, 3'側スプライス部位として通常使われる配列 AG とは一致していない⁶¹⁾。

6. 虹彩欠損症および無眼球症における解析

先天性両眼性完全虹彩欠損症を示した 2 例, および先天性両側性無眼球症を呈した 1 例(図8)において, 人 Pax-6 遺伝子をプローブとして, 核 DNA のサザンプロットングを行った。正常人と比較して, 各症例とも DNA 切断制限酵素によってできる Pax-6 遺伝子の核 DNA 断片の大きさおよび様式に変化はなかった(図9)。つまり, 例えこれらの症例に Pax-6 遺伝子の異常があるにしても, この方法によって検出できる

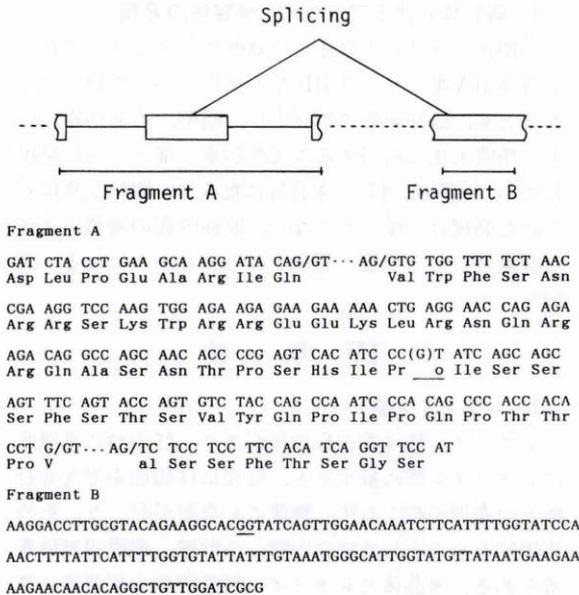


図 7 小眼球変異種ラットにおける核 DNA の解析。

ポリメラーゼ連鎖反応により、2本の核 DNA 断片を生成した。断片 A には mRNA にみられた内部欠失領域の 5'末端が含まれ、断片 B にはその 3'末端が含まれる。断片 A 中には 1 個のエクソンとそれを挟む 2 個のイントロンがあり、断片 B には別のエクソンの一部が入っている。ホモ接合体では正常胎児に比べて断片 A のエクソン中に一塩基 (G) の挿入があり (下線)、そのため新しい配列 GT が生じている。この GT が異常な 5'側スプライス部位として利用され、その結果 mRNA の内部欠失を来すと考えられる。断片 B 中にある 3'側スプライス部位の配列は GG (下線) になると考えられる。(文献 52 から引用)

大きさの挿入や欠失は、Pax-6 遺伝子の核 DNA にはないことがわかった。

7. マウス胎児におけるレチノイン酸受容体の発現

妊娠 9 日～13 日目までのマウス胎児の頭部におけるレチノイン酸受容体 α 型、β 型、γ 型の mRNA の発現を調べた。その 3 型ともに頭部神経堤の細胞群に発現していた(図 10～12)。また、眼杯のまわりの間葉細胞、および眼杯内の水晶体胞を取り囲む間葉細胞にも発現していた。この時期、頭部にみられる間葉細胞は神経堤由来の細胞である。神経管上皮、眼杯の神経上皮、水晶体胞などの表皮外胚葉には発現はみられなかった。

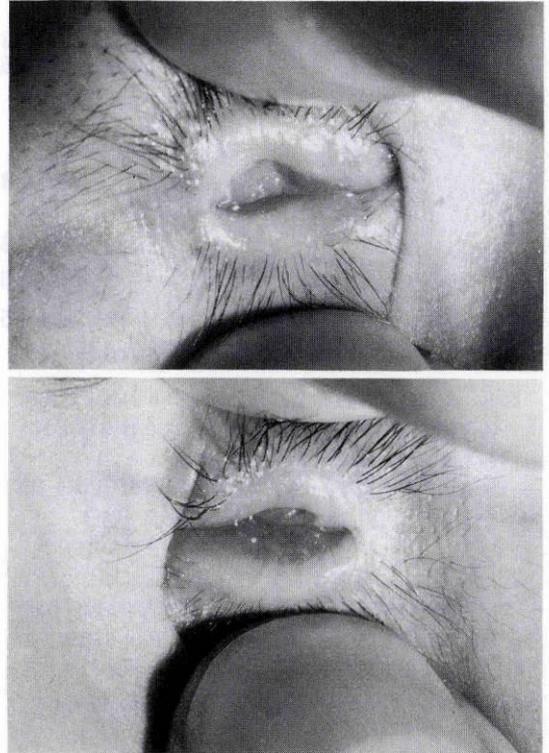


図 8 6 歳の男児にみられた先天性両側性無眼球症。

右眼(上)および左眼(左)。患児の発達および発育は正常で、他に異常はない。家族歴にも特記すべきことはなく、妊娠および分娩の経過中にも異常はない。

8. 鶏胚における線維芽細胞成長因子 (FGF) 受容体の発現

受精後、2.5 日、3.5 日、4 日目の鶏胚における FGF 受容体 1 型、2 型、3 型の発現について調べた。1 型は、受精後 2.5 日では、眼杯内板および外板の神経上皮にはほぼ一様に発現していた。受精後 3.5 日、4 日と時期が進むにつれて、その発現は眼杯内板の水晶体胞寄りの部分に限局してきた。眼杯を取り囲む間葉細胞には、あまり強い 1 型の発現はみられなかった(図 13～15)。

これに対して 2 型は、各時期を通して眼杯の神経上皮には発現せず、眼杯のまわりの間葉細胞に強く発現していた(図 13～15)。

3 型は、水晶体胞に最も強い発現がみられた。また、眼杯内板の神経上皮や眼杯周囲の間葉細胞にも発現していた(図 14, 15)。

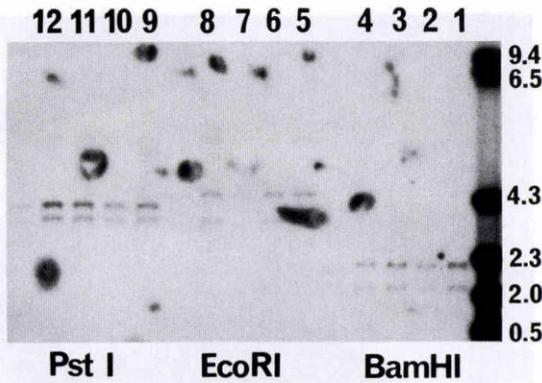


図9 先天性両眼性完全虹彩欠損症の2例および先天性両側性無眼球症の1例(図8)における核DNAのサザンブロッティング。

無眼球の患者(第1, 5, 9列), 無虹彩の症例1(第2, 6, 10列)および無虹彩の症例2(第3, 7, 11列), および正常人(第4, 8, 12列)を示す。これら3人の患者および5人の正常人(ここでは1例のみを示す)において, DNA切断制限酵素(BamHI, EcoRI, PstI)によって生じるPax-6遺伝子の核DNA断片の大きさおよび様式には差がみられない。右端に標準長のDNA断片(キロ塩基対)を示す。

9. 鶏胚におけるアクチビン受容体の発現

受精後3.5日および4日の鶏胚におけるアクチビン受容体 IIA 型, および IIB 型の発現について調べた。両型とも, 眼杯内板の神経上皮, 眼柄, 水晶体胞, 将来の角膜上皮に相当する表皮外胚葉の部分に主に発現していた(図16, 17)。4日目になると, 眼杯上皮にみられた発現は一様でなくなり, 眼杯内板の背側に比べて腹側の方により強い発現がみられるようになる(図17)。

IV 考 按

1. レチノイン酸

レチノイン酸は催奇形作用があり, 妊娠時に高濃度のレチノイン酸に接すると, 胎児には顔面奇形を含む種々の奇形が起こる⁶²⁾。眼球にも奇形が起こり, その代表的なものとしては白内障, 小眼球, 網膜視神経異常がある。水晶体でレチノイン酸受容体を恒常的に発現している遺伝子組み換えラットでは, レチノイン酸投与によって誘発される奇形と同様に, 白内障や小眼球がみられた⁶³⁾。また, 眼の発生中の網膜におけるレチノイン酸合成は不均一で, 背側網膜に比べて腹側網

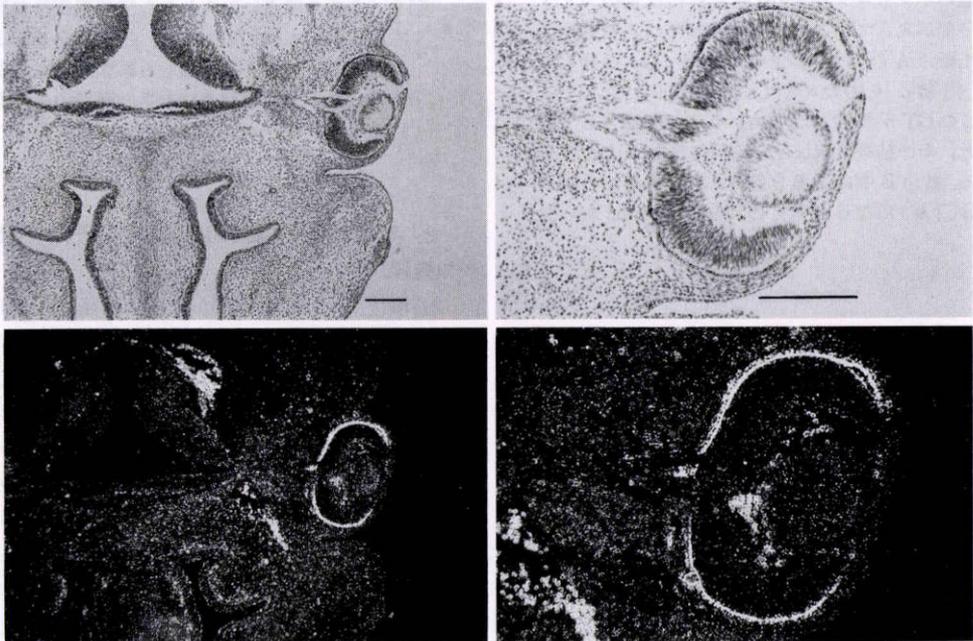


図10 妊娠12日目のマウス胎児の頭部横断面におけるレチノイン酸受容体 α 型のmRNAの局在。明視野像(上段)および暗視野像(下段)。右段の図は左段の図の拡大像である。転写物は神経堤および眼杯内外の神経堤由来の細胞にみられる。眼杯外板にみられる陽性シグナルは, 色素による暗視野下での反射による人工産物である(バーは200 μ m)

表 線維芽細胞成長因子 (FGF) とその受容体

	FGF 受容体 (鶏)	(マウスおよび人)	受容体に結合する蛋白
FGF 受容体 1 型	cek 1	flg	塩基性 FGF, 酸性 FGF
FGF 受容体 2 型	cek 3	bek, k-sam, KGF-R	塩基性 FGF, 酸性 FGF, KGF
FGF 受容体 3 型	cek 2	fig-2	不明
FGF 受容体 4 型			酸性 FGF

KGF: 角質細胞成長因子 (keratinocyte growth factor) の略称, KGF-R: KGF に対する受容体, 文献 54)-56)108)-120)から引用.

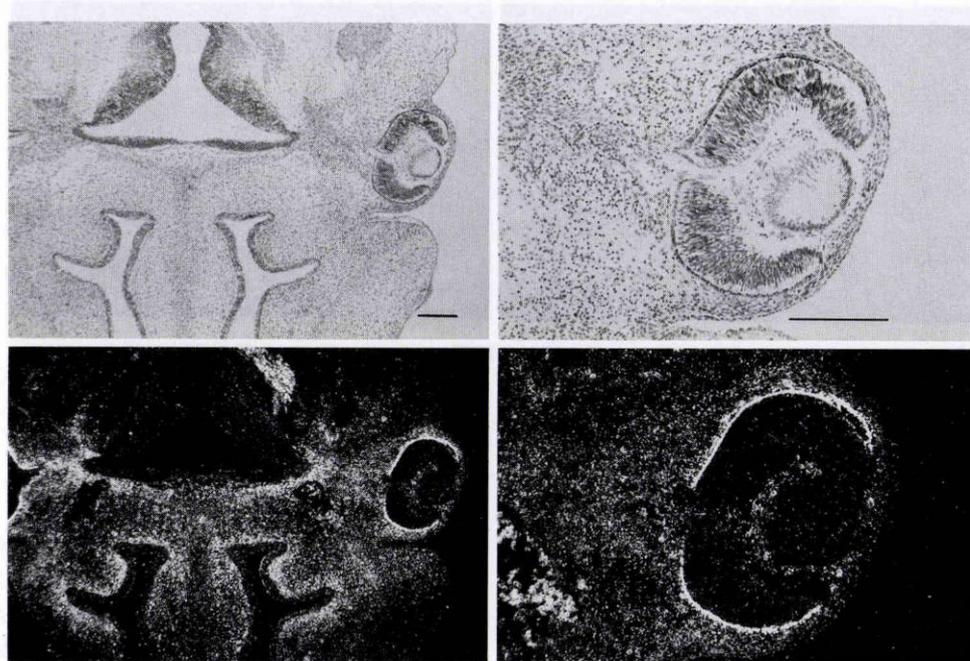


図 11 妊娠 12 日目のマウス胎児の頭部横断面におけるレチノイン酸受容体 β 型の mRNA の局在.

明視野像 (上段) および暗視野像 (下段). 右段の図は左段の図の拡大像である. 転写物は神経堤および眼杯内外にある神経堤由来の細胞にみられる. 暗視野下での眼杯外板にみられるシグナルは, 色素による人工産物である. (バーは 200 μ m)

膜においてその合成は強い⁶⁴⁾. レチノイン酸は網膜色素上皮細胞⁶⁵⁾, 水晶体上皮細胞⁶⁶⁾, 角膜内皮⁶⁷⁾, および実質細胞⁶⁸⁾の増殖や分化にも関係している. 以上から, レチノイン酸およびその受容体は眼の形態形成に深く関係していることがわかる.

レチノイン酸受容体蛋白質は核内にあり, 特定の DNA 配列と結合し, 他の遺伝子の転写を制御している転写制御因子である¹⁸⁾¹⁹⁾. 現在までに全トランス型レチノイン酸の受容体には 3 種類あることが明らかにされており⁶⁹⁾, これらの受容体は発生の過程で特異的

に発現することがわかっている⁷⁰⁾⁻⁷⁴⁾. レチノイン酸およびその受容体の働きは, 特に鶏の四肢形成においてよく研究されている³¹⁾⁷⁵⁾⁷⁶⁾. 3 種類のレチノイン酸受容体は, 各々レチノイン酸に対する親和性が異なる. レチノイン酸受容体が転写制御している遺伝子としては, ホメオボックス遺伝子などが考えられている³¹⁾.

レチノイン酸によって起こる奇形には, 神経堤由来の細胞が関与しており, 一方レチノイン酸は, 神経堤由来の細胞の移動に影響を及ぼすことが知られている⁷⁷⁾. レチノイン酸受容体が神経堤由来の細胞に発現

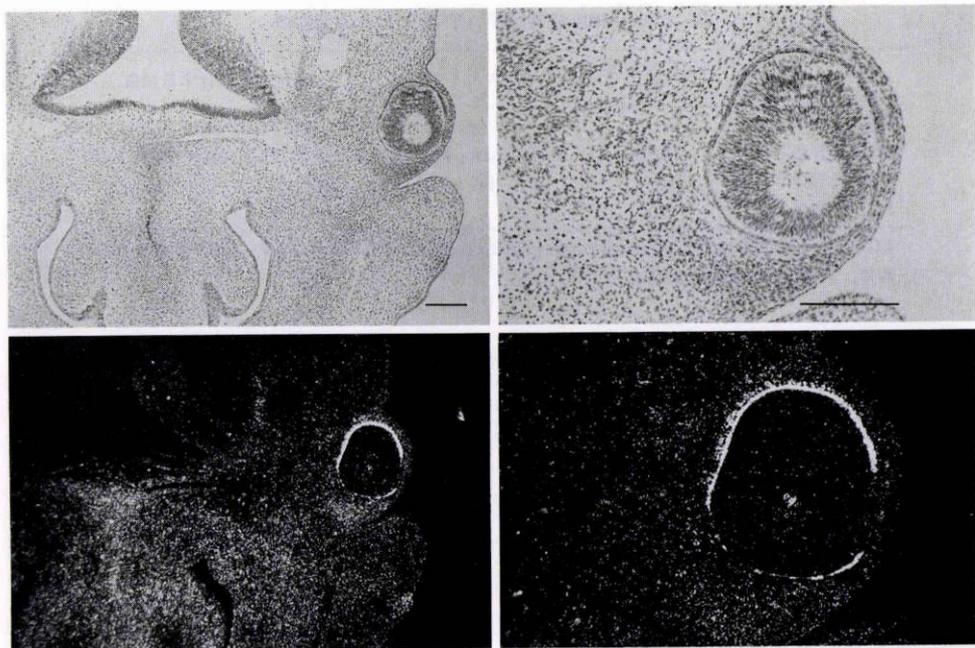


図12 妊娠12日目のマウス胎児の頭部横断面におけるレチノイン酸受容体 γ 型のmRNAの局在。

明視野像(上段)および暗視野像(下段)。右段の図は左段の図の拡大像である。転写物は眼杯内外の神経堤由来の細胞にみられる。暗視野下における眼杯外板のシグナルは、色素による人工産物である。(バーは200 μ m)

していることは、これらの事実とよく一致する。また、レチノイン酸は網膜で合成されていることから⁸⁴⁾、レチノイン酸が網膜(眼杯内板の神経上皮)と神経堤由来の細胞との間の情報交換に関与していると考えられる。つまり、網膜で合成されたレチノイン酸が拡散して神経堤由来の細胞に達し、その核内にあるレチノイン酸受容体と反応する。そして、神経堤由来細胞の移動、分化、増殖に影響を与えると推察できる。

2. 線維芽細胞成長因子(FGF)

網膜には、血管新生を促進する因子があることが以前からわかっていた。そのうち、網膜から血管内皮細胞成長因子が抽出され、この因子はFGFと同一であることが判明した⁷⁸⁾⁷⁹⁾。それ以後、糖尿病網膜症のような血管増殖を来す眼疾患におけるFGFの役割について、多くの研究がなされてきた^{79)~82)}。FGFは、網膜^{83)~85)}、網膜色素上皮⁸⁶⁾⁸⁷⁾、その他の眼組織⁸⁵⁾⁸⁸⁾⁸⁹⁾および眼球内の増殖組織⁸²⁾⁹⁰⁾に存在する。また、増殖性糖尿病網膜症の患者においては、FGFの量が硝子体中で上昇している⁹¹⁾。

一方、FGFは、水晶体上皮細胞の分化を誘発した

り⁹²⁾⁹³⁾、網膜神経細胞の増殖、分化や神経突起の成長にも関与している^{94)~98)}。網膜色素上皮細胞は、生体内や試験管内で網膜に転化することが知られている^{99)~101)}。また、網膜色素上皮細胞や虹彩上皮細胞は、水晶体にも転化し得る¹⁰²⁾¹⁰³⁾。こうした転化に塩基性FGFが関与していることが明らかになっている。以上から、FGFは眼の形態形成において重要な役割を果たしているといえる。

FGFは個体発生における中胚葉誘導、特に後方および腹側中胚葉の誘導を制御している因子として考えられている^{104)~107)}。FGF群には酸性および塩基性FGFを含めて7種類あり、それらはヘパリンに結合するという共通の特徴をもっている。その受容体は大別して、鶏で3種類^{54)~56)}、哺乳類で4種類^{108)~120)}あることがわかっている(表)。個体発生や中枢神経の発生において、各受容体は特異的に発現している^{121)~125)}。

各受容体には複数の因子が結合する場合もある。例えば、1型および2型受容体には塩基性および酸性FGFの両方が同じような親和性で結合する。3型受容体に結合する因子については詳細不明である。1型受

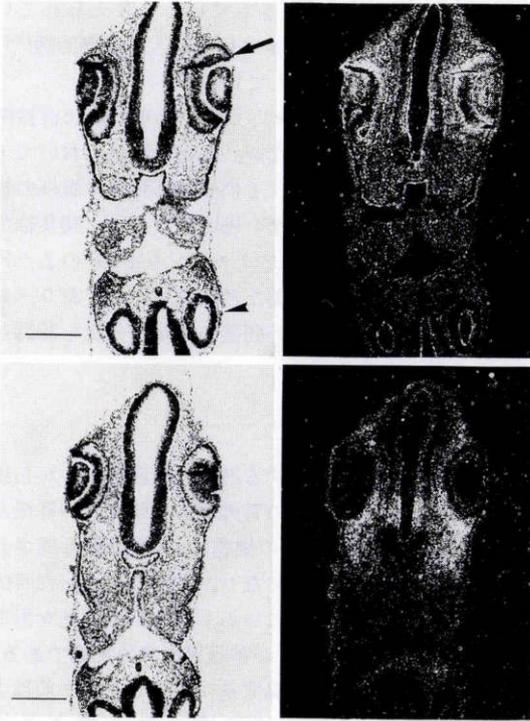


図 13 受精後 2.5 日目の鶏胚の頭部横断面における線維芽細胞成長因子 (FGF) 受容体の mRNA の局在。

FGF 受容体 1 型 (上段) および FGF 受容体 2 型 (下段) の明視野像 (左段) および暗視野像 (右段), 眼杯 (矢印) と耳胞 (矢尻) を通る横断面である。1 型の転写物は主として眼杯の神経上皮にみられるが, 2 型の転写物は眼杯周囲の間葉細胞にみられる。この時期, 眼杯外板にはまだ色素は出現していない²⁰⁴⁾。(バーは 200 μm)

容体が, 将来網膜色素上皮へと分化する眼杯外板に存在していることから, 塩基性 FGF によって起こる網膜色素上皮細胞の網膜への転化には 1 型受容体が関与していると考えられる。1 型受容体より 3 型受容体の方が水晶体上皮には強く発現していることから, 水晶体上皮細胞の分化には, よく知られている塩基性 FGF 以外に⁹²⁾⁹³⁾, 三型受容体に結合する未知の因子が関与している可能性がある。2 型受容体は眼杯のまわりの間葉細胞に強く発現している。これらの間葉細胞は神経堤由来の細胞であり, そのうち脈絡膜の色素細胞や強膜へと分化していく。これに対して, 1 型受容体は眼杯の神経上皮に発現している。以上から, 1 型と 2 型受容体は, 脈絡膜や強膜ができる過程における神経

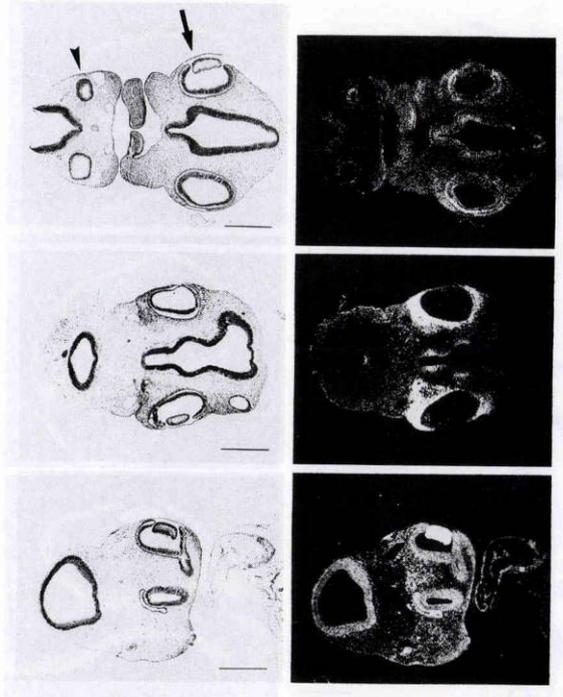


図 14 受精後 3.5 日目の鶏胚の頭部横断面における線維芽細胞成長因子 (FGF) 受容体の mRNA の局在。

FGF 受容体 1 型 (上段), 2 型 (中段), 3 型 (下段) の明視野像 (左段) および暗視野像 (右段), 眼杯 (矢印) と耳胞 (矢尻) を通る横断面である。1 型の転写物は眼杯内板の水晶体側に多くみられ, 2 型は眼杯周囲の間葉細胞にみられる。3 型は水晶体胞に多くみられる。この時期, 眼杯外板には色素が出現し始め²⁰⁴⁾, そのため暗視野下では人工産物のシグナルを生じている。(バーは 500 μm)

上皮と間葉細胞との間の情報伝達に関与していると考えられる。

3. 形質転換性成長因子 β 型 (transforming growth factor- β : TGF- β)

TGF- β には類似した蛋白質が多数あり, それらを総称して TGF- β 群と呼んでいる²³⁾²⁴⁾。TGF- β 群の蛋白質は細胞の増殖を, 作用する細胞の種類により促進したり抑制したりする。また, マウスや人の発生過程において TGF- β 蛋白質は特異的に発現することもわかっている^{126)~131)}。TGF- β 群中のアクチビン, 中胚葉誘導, 特に前方および背側の誘導を制御する因子であると考えられている^{132)~139)}。これは, FGF が後方および腹側の中胚葉誘導の制御因子であることと対照的

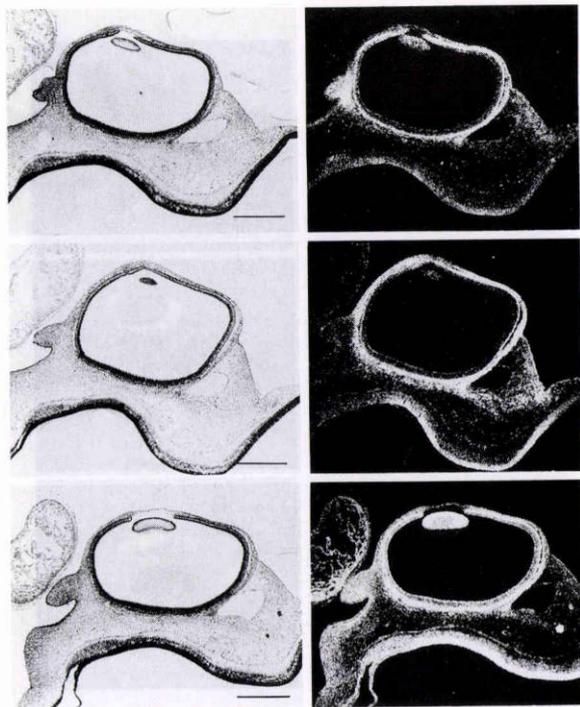


図15 受精後4日目の鶏胚の眼杯における線維芽細胞成長因子(FGF)受容体のmRNAの局在。

FGF受容体1型(上段), 2型(中段), 3型(下段)の明視野像(左段)および暗視野像(右段)。1型の転写物は眼杯内板の水晶体側に多くみられ, 2型は眼杯周囲の間葉細胞にみられる, 3型は水晶体胞に多くみられる。この時期, 眼杯外板には色素が出現しており²⁰⁴⁾, そのため暗視野下では人工産物のシグナルを生じている。(バーは500 μ m)

である^{104)~107)}。さらに, アクチビンは, 中枢神経の発生にも深く関与していると考えられている¹⁴⁰⁾。例えば, 神経細胞の生存を促進したり¹⁴¹⁾, 神経細胞の分化を抑制したりする¹⁴²⁾。現在までに2種類のアクチビン受容体が分離されており(IIA型, IIB型), これらの受容体のアクチビンに対する親和性は異なる¹⁴³⁾¹⁴⁴⁾。

眼科領域においてTGF- β は, 線維化や血管新生に関与する因子として注目されてきた⁸⁰⁾¹⁴⁵⁾。TGF- β は一般的に線維化を促進し¹³⁾¹⁴⁶⁾¹⁴⁷⁾, 血管内皮細胞の増殖を抑制する¹⁴⁸⁾¹⁴⁹⁾。こうした事実に基づき, 増殖性糖尿病網膜症や増殖性硝子体網膜症において, TGF- β が重要な役割をしているのではないかと考えられるようになった。実際, 増殖性硝子体網膜症の患者では, 硝子体液中のTGF- β 量が上昇している¹⁵⁰⁾。一方, 前房水中にもTGF- β が検出されているが, これはむしろ

眼内の免疫系の調節に関与していると考えられている^{151)~155)}。その他, TGF- β は角膜などの創傷治癒¹⁵⁶⁾, や視細胞の機能にも関係している¹⁵⁷⁾。

現在のところ, アクチビンが眼の形態形成に直接関与しているという証拠はない。今回の実験においてアクチビン受容体の発現は, 主に表皮外胚葉や眼杯の神経上皮のような外胚葉由来の細胞にみられ, 間葉細胞には弱かった。以上から, アクチビンもFGFのように眼の形態形成において重要な役割を果たしており, おそらく神経外胚葉や表皮外胚葉の増殖や分化を制御していると考えられる。

4. 神経堤細胞

1) 神経堤細胞の移動

神経管がちょうど閉鎖する時に, 神経襪の中から出てきた細胞群により, その背外側に一時的に神経堤が形成される¹⁵⁸⁾¹⁵⁹⁾。神経堤の細胞は, 神経管が形成される時にはすでにばらばらになり, 体内の決まった目的地をめざして移動を始めている。顔面の各原基を形成する間葉細胞は, ほとんどが神経堤由来の細胞である。前脳由来の神経堤細胞は鼻原基に移動し, 後に前部中脳から移動してきた神経堤細胞と混ざり合う^{158)160)~162)}。上顎の原基を作る神経堤細胞は後部中脳由来であり, 下顎の原基を作る神経堤細胞は後脳由来である¹⁵⁸⁾¹⁶³⁾。

前部中脳由来の神経堤細胞は鼻原基の他に眼球原基の所に移動し^{158)160)~162)}, 最終的には分化して角膜実質および内皮, 虹彩および毛様体の実質および筋, 線維柱体の表面を覆う内皮細胞, 脈絡膜の色素細胞や強膜になる¹⁵⁸⁾¹⁵⁹⁾¹⁶⁴⁾。第一次硝子体も神経堤細胞からなると考えられている¹⁶⁵⁾。第一次硝子体が神経堤由来の細胞からなることは, 今回の実験によっても支持される。すなわち, 第一次硝子体を形成する眼杯内の水晶体後方にある間葉細胞には, レチノイン酸受容体が発現していた。レチノイン酸受容体は他の神経堤由来の細胞にもみられることから, 第一次硝子体は神経堤由来の細胞で形成されているということになる。

2) 神経堤細胞の移動の機序

神経堤を形成する細胞が散らばり, 移動して行くには, 以下の過程を経なければならない。まず, 神経堤にある細胞が相互に離れていく。次に散らばり, そして目的地に向かって決まった道を移動していく。最終的に目的地にたどり着くと再び互にくっつき合い, 特別な組織へと分化していく。このように, 細胞間同士の離合集散が神経堤細胞の移動には重要な役目を果

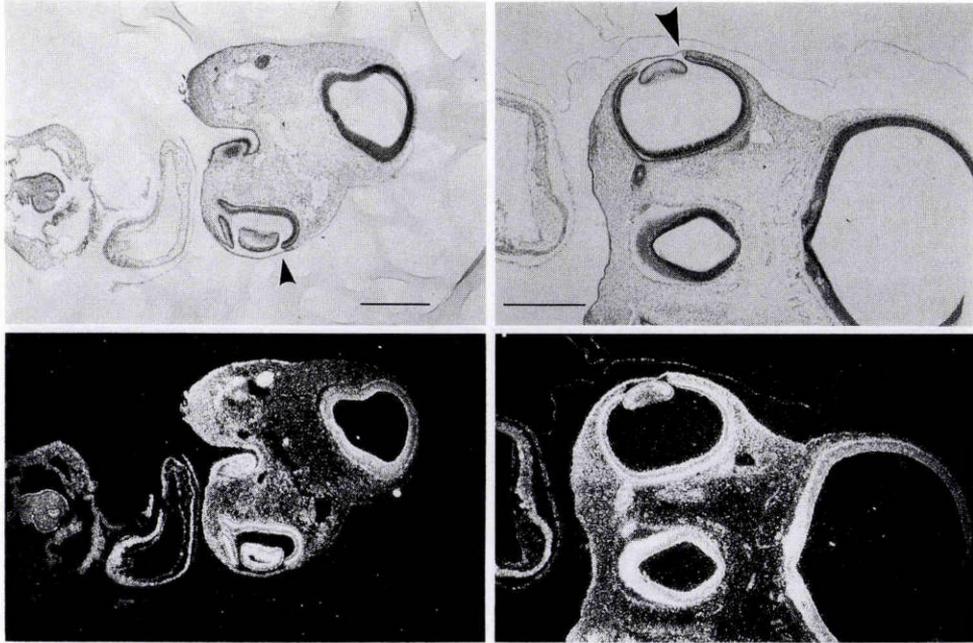


図 16 受精後 3.5 日目の鶏胚の頭部横断面におけるアクチビン受容体 IIA 型の mRNA の局在。

21 期 (左段) および 23 期 (右段) の明視野像 (上段) および暗視野像 (下段)。両時期とも受精後 3.5 日に相当する。転写物は眼杯内板の神経上皮 (矢尻)、眼柄、水晶体胞、および将来角膜上皮となる表皮外胚葉にみられる。この時期、眼杯外板には色素が出現し始め²⁰⁴⁾、そのため暗視野下で人工産物のシグナルを生ずる。(バーは 500 μm)

たしている¹⁵⁸⁾。

神経堤細胞間の接着に関する細胞表面接着受容体には、大別して 3 種類あることがわかっている¹²⁾。第 1 は、カルシウム依存性の細胞間接着をつかさどるカドヘリンである^{3)~5)}。第 2 は、神経細胞接着分子 (N-CAM)^{7)~10)}を初めとするカルシウム非依存性の接着に関するイムノグロブリン群⁶⁾である。第 3 は、インテグリンである¹¹⁾。神経堤細胞が神経管のまわりから散らばり始める時には、その細胞表面から N-CAM や N-カドヘリンが消失する。そして、目的地にたどり着いて細胞が凝集する時には、その表面に再び N-CAM と N-カドヘリンが出現する^{166)~168)}。一方、インテグリン、N-CAM や N-カドヘリンに対する抗体を投与すると、神経堤細胞の移動を阻害したり、乱したりする¹⁶⁹⁾¹⁷⁰⁾。

細胞外基質も神経堤細胞の移動にとって重要な役割を果たしている^{171)~175)}。細胞外基質として主要なものは、フィブロネクチン、ラミニン、テネシン、ヒア

ルロン酸を含むプロテオグリカンやコラーゲンなどがある。このうち、フィブロネクチンのように細胞外基質のあるものは神経堤細胞の移動を促進し¹⁷³⁾、一方、プロテオグリカンのような他のものはその移動を抑制する¹⁷⁵⁾。さらに、これら細胞外基質は、上述した細胞表面接着受容体とも結合する。例えば、N-CAM はヘパラン硫酸プロテオグリカンと結合する⁷⁾。大多数のインテグリンはフィブロネクチンやラミニンと結合する¹¹⁾。こうした細胞と細胞外基質との相互作用の中で移動に関する促進あるいは抑制の情報もたらされ、その釣合によって神経堤細胞は、決まった道を通って決まった目的地にたどりつくと考えられる。TGF- β は、コラーゲン、フィブロネクチンやプロテオグリカンなどの細胞外基質の合成を調節することによって、神経堤細胞の移動にも関与していると思われる¹³⁾¹⁴⁶⁾¹⁴⁷⁾。

3) 神経堤細胞の移動の異常

一般的に、神経堤細胞の移動が異常である場合、そ

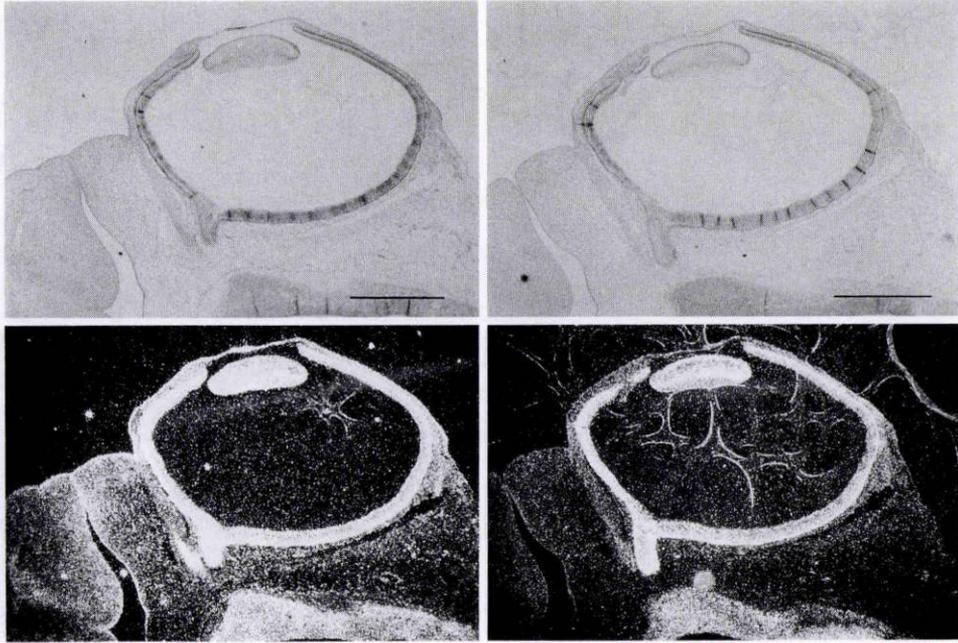


図17 受精後4日目(26期)の鶏胚の眼杯におけるアクチビン受容体の mRNA の局在。

IIA型(左段)およびIIB型(右段)の明視野像(上段)および暗視野像(下段) IIA型, IIB型ともに水晶体上皮, 眼杯内板, 眼柄, 将来の角膜上皮に相当する表皮外胚葉にみられる。背側網膜(各図の右側)に比べて腹側網膜(各図の左側)の方により多くの転写物がみられる。暗視野における眼杯外板のシグナルは, 色素による人工産物である²⁰⁴⁾。(バーは500 μm)

の理由は以下のように大別できる。神経堤細胞自身の機能に欠陥があるか, あるいは神経堤細胞自身が移動していく途上で出会う細胞や細胞外基質の構成などの環境に欠陥があるかのどちらかである¹⁵⁸⁾。現在のところ, Pax-6 遺伝子産物が制御している遺伝子が何かは不明である。Pax-6 遺伝子の転写物は, 眼杯の神経上皮, 水晶体胞や鼻板にはみられるが, 神経堤由来の細胞にはみられなかった。このように, 正常な発生過程において神経堤細胞には Pax-6 遺伝子が発現していないことより, 小眼球変異種ラットのホモ接合体にみられる神経堤細胞の異常な移動は, 神経堤細胞自身の異常によるためとは考えにくい。むしろ, 神経堤細胞が移動していく途上の環境に問題があって異常な移動が起こるのではないかと思われる。眼球や鼻原基の外胚葉由来の細胞に Pax-6 遺伝子の転写物がみられることより, Pax-6 遺伝子はこれらの原基の外胚葉由来の細胞表面にある細胞表面接着受容体を制御しているか, あるいはこれらの細胞による細胞外基質の合成を

制御していると考えられる。

これとは対照的に, レチノイン酸受容体の転写物は, 眼杯のまわりやその中に移動してきている神経堤細胞にみられた。このことから, レチノイン酸受容体は, 移動開始から目的地にたどりつくまでの神経堤細胞の機能上重要な働きをしているといえる。レチノイン酸は, 神経堤細胞の移動に対する誘導因子として働いているかもしれない。実際, レチノイン酸の一種のビタミンAは, 神経堤細胞の移動に影響を及ぼすことがわかっている⁷⁷⁾。

Pax-3 遺伝子³⁹⁾は Pax-6 遺伝子⁴⁰⁾と同様に, ペアードボックスとホメオボックスの両方を持つ遺伝子である。Pax-3 遺伝子の異常がマウスの *splotch* 変異種⁴³⁾および人のワーデンブルグ症候群⁴⁴⁾⁴⁵⁾でみつまっている。*splotch* 変異種では, 神経管や神経堤の異常により, 脊髄披裂や脳脱出症を来す。ワーデンブルグ症候群では難聴や皮膚の色素異常を来すが, やはり神経堤細胞の異常によると考えられている。マウスの

splotch 変異種では、N-CAM の発現様式に異常がみられることが明らかになり、N-CAM は Pax-3 遺伝子産物が制御している下流の遺伝子ではないかと考えられている¹⁷⁶⁾。このように、Pax-3 および Pax-6 遺伝子が両方とも神経堤細胞に関連していることから、Pax-3 および Pax-6 遺伝子は、異なる脳の部位由来の神経堤細胞の移動に関与しているのではないかという推測も成り立つ。

4) 神経堤細胞と眼球原基

正常な発生過程においては、神経管の側壁から眼胞が発芽し、伸びて表皮外胚葉と緊密に接することにより、その部位の表皮外胚葉は肥厚し始め、水晶体板を形成する。そのうち水晶体板は陥入していき、水晶体窩、そして水晶体胞へと変化していく。それと同時に眼胞も陥入していき、二重の層からなる眼杯となる¹⁵⁸⁾¹⁶⁴⁾。眼杯の外板は網膜色素上皮となり、内板は急速に細胞増殖を来し、神経細胞が何層か重なっている神経網膜へと分化していく。神経堤細胞は、水晶体板が誘導される以前に、すでに眼球および鼻の原基のまわりに移動している¹⁶⁰⁾¹⁶²⁾。小眼球変異種ラットのホモ接合体では、水晶体板および鼻板が形成されない。言い換えると、眼球原基および鼻原基に相当する部位の表皮外胚葉の肥厚が起らない。ホモ接合体では、神経堤細胞は、本来なら移動すべき鼻原基の所まで到達しない。このことが鼻板の誘導が起らない原因になっていると考えられる。また、ホモ接合体では、神経堤細胞は眼球原基のまわりまで到達し、そこに異常に集積しているが、水晶体板の誘導は起らない。つまり、神経堤細胞の眼球原基のまわりへの異常な集積が水晶体板の誘導を妨げているということになる。以上の結果および考察に基づくと、神経堤細胞が鼻板および水晶体板の誘導に関与しているということになる。

5. 上皮間葉相互作用

上皮間葉相互作用については、四肢の形態形成においてよく研究されている³¹⁾。肢芽の成長末端の表皮外胚葉は肥厚し、前方から後方（つまり拇指から小指の方向）に向かって外胚葉先端隆起（apical ectodermal ridge）を形成する。この外胚葉先端隆起から出る情報は、四肢のさらなる発達にとって重要である。外胚葉先端隆起により、そのすぐ下に広がる間葉細胞は未分化な状態に保たれている。この未分化間葉細胞層は進行領域（progress zone）と呼ばれ、外胚葉先端隆起は逆にこの間葉細胞層から出る情報によって維持されている。このような上皮間葉間の相互作用に異常が起こ

ると四肢の奇形が誘発される。

眼球原基を初めとする顔面の各原基の形成過程においても、上皮間葉相互作用が重要な役割を果たしている¹⁷⁷⁾~¹⁸⁰⁾。そして、この顔面原基の形成過程における上皮間葉相互作用に関与している情報伝達物質は、四肢の形態形成における上皮間葉相互作用を仲介する物質と類似のものであることがわかっている¹⁸¹⁾。発生早期の顔面原基にみられる間葉細胞は、そのほとんどが神経堤由来の細胞である¹⁷⁸⁾¹⁸²⁾。水晶体窩が表皮外胚葉から分離して水晶体胞になる過程で、こうした間葉細胞が重要な役割を果たしているという報告もある¹⁶⁵⁾。レチノイン酸受容体は、眼杯中の水晶体胞のまわりの神経堤由来の細胞に発現していた。また、FGF 受容体は、その1型は眼杯の神経上皮、その2型は神経堤由来の間葉細胞、その3型は表皮外胚葉由来の水晶体胞に主として発現していた。このように異なった由来の細胞に別々に発現していることから、レチノイン酸や FGF は、眼球の形態形成過程における上皮間葉相互作用の情報伝達物質として働いている可能性がある¹⁷⁷⁾¹⁸⁰⁾。

6. 位置情報³⁰⁾³¹⁾

1) 位置情報の概念

発生過程において各細胞は、組織上で自分がどの位置にいるかについての情報を得ていると考えられる。この情報を位置情報といい、位置情報は組織の3次元空間の中で細胞同士の相対的な位置関係を示す位置値として与えられる。発生における3次元は、互いに直交する前後軸、背側腹側軸および近位遠位軸で規定される。位置値を各細胞に与える因子として、形原（morphogen）という物質を想定する。組織中におけるこの形原の濃度勾配により、各細胞は自分の位置を知ることができる。形原の具体的な候補としては、レチノイン酸⁷⁵⁾⁷⁶⁾や、FGF、アクチビンなどの蛋白性成長因子¹⁸³⁾¹⁸⁴⁾、およびプロテオグリカンなどの細胞外基質が考えられている。形原により位置情報を得た各細胞は、自身の増殖を調節したり、移動したり、他の細胞や細胞外基質との相互作用を行ったりして特異的に分化していく。このようにして最終的に特殊な組織を形作るべく形態形成が進んでいく。

2) 眼球の形成における位置情報

鶏、マウス、ラット、人の眼球においては、その網膜における上下軸が発生上の背側腹側軸に、網膜における鼻側耳側軸が発生上の前後軸に、網膜における前後軸が遠位近位軸に対応する。FGF 受容体1型の転

写物が眼杯内板の水晶体側により強くみられることから、この1型は眼球の発生における遠位近位軸の形成、言い換えれば後方あるいは前方網膜の区分の形成に関与しているのではないかと考えられる。FGF受容体1型に結合する塩基性および酸性FGFが位置情報を提供している形原である可能性がある。ただ、注意しなければならないのは、眼杯内板の水晶体側は視神経側に比べて細胞分裂が遅くまで続くので、そのためFGF受容体の発現が水晶体側においてより強くみられるだけなのかもしれない。

アクチビン受容体IIA型およびIIB型に関しては、受精後3.5日目まで眼杯内板におけるその発現に偏りはみられない。ところが受精後4日目になると、眼杯内板の腹側の方に、その背側に比べてより強い発現がみられるようになる。このことから、アクチビン受容体は眼球の発生における網膜の背側腹側軸の形成に関与しており、この軸は受精後4日目頃にはできないのではないかと推察される。

7. Pax-6 遺伝子における異常スプライシング

1) スプライシングとその異常

ある蛋白質を規定するある遺伝子の核DNAにおける配列は、たいてい、エクソンとイントロン（介在配列）からなっている。核DNAから最初に転写されたRNAは、やはりエクソンとイントロンからなっており、きちんとしたmRNAになるためには、イントロンが切り出されエクソン同士をつなぐスプライシングという過程を経なければならない。エクソンの塩基配列は、蛋白質のアミノ酸配列を規定し、イントロンはエクソンの間に存在するアミノ酸配列には対応しない介在配列ということになる。

現在までに報告されている多くの遺伝子異常は、異常なスプライシングによる場合が多い。そして、この異常なスプライシングは、すべてイントロン内に起こった突然変異、特にイントロン両端の5'側スプライス部位および3'側スプライス部位の配列に起こった突然変異により引き起こされている。イントロン内にみられる突然変異が異常なスプライシングへとつながっていくには、大きく分けて2通りの様式がある。1つは、イントロン両端のスプライス部位のうち一方が突然変異により潰され、その結果、エクソン内の配列や、イントロン内の本来のスプライス部位以外の配列が新たなスプライス部位として使われる場合である^{185)~194)}。もう1つの様式としては、突然変異によってイントロン内に新たなスプライス部位ができ、スプ

ライシングの際、本来のスプライス部位に優先して使われる場合である^{187)195)~197)}。小眼球変異種ラットにみられたPax-6遺伝子の異常スプライシングは、以下の点で大変珍しい。つまり、エクソン内の突然変異により、イントロン内ではなくエクソン内に新たなスプライス部位ができ、これが本来のスプライス部位に優先して使われているという点である。

2) 小眼球変異種ラットおよびマウスにみられる異常 Pax-6 蛋白

in situ hybridization やポリメラーゼ連鎖反応の結果からわかるように、小眼球変異種ラットのホモ接合体では異常なPax-6 mRNAが存在している。この異常なmRNAから翻訳される蛋白質には、正常なペアーボックス領域およびホメオボックス領域はあるが、セリン・スレオニンに富む領域が欠如している。つまり、このセリン・スレオニンに富む領域は、Pax-6蛋白の機能にとって重要であるということになる。ホモ接合体では、このようなPax-6異常蛋白の存在により、あるいは正常なPax-6蛋白がないことにより前部中脳からの神経堤細胞の移動に異常が起こり、鼻板や水晶体板が誘導されないと考えられる。一方、ヘテロ接合体では、Pax-6の正常蛋白および異常蛋白の両方が混ざって存在している。そして、このことから虹彩の空胞変性、および網膜異形成が起こるものと考えられる。

現在のところマウスでは、Pax-6遺伝子に異常がある3種類の小眼球変異種が報告されている⁴⁶⁾。そのうち、変異種Seyでは、Pax-6遺伝子のとあるエクソン中の突然変異により終止コドンが生じ、そのため合成される蛋白質はホメオボックス領域の手前で途切れている。つまり、この異常蛋白にはペアーボックス領域はあるが、ホメオボックス領域およびそれに続くセリン・スレオニンに富む領域は欠損していることになる。一方、ニトロソウレアによって誘発された別の変異種Sey^{Neu}では、Pax-6 mRNAのホメオボックスの3'側に116塩基対の挿入があり、これにより合成される異常蛋白にはペアーボックス領域およびホメオボックス領域はあるが、セリン・スレオニンに富む領域が欠如している。放射線により誘発された変異種Sey^Rでは、核DNAに大きな欠失があり、Pax-6遺伝子の転写産物はできていない。ラットの小眼球変異種とマウスの変異種SeyおよびSey^{Neu}とは、その形態がよく似ている⁵⁰⁾⁵¹⁾。これは、両種が有する異常なPax-6蛋白が類似していることによると考えられる。

つまり、どの異常蛋白にもセリン・スレオニンに富む領域は欠如しているが、ベアードボックス領域は存在しているという共通点がある。

8. 人における Pax-6 遺伝子の展望

小眼球変異種ラットの成熟ヘテロ接合体の眼球には、虹彩空胞変性、および網膜異形成がみついている。このラットにみられた網膜異形成の組織像は、人眼でみられるものとよく似ている¹⁹⁸⁾¹⁹⁹⁾。したがって、人眼でみられる網膜異形成の発生にも Pax-6 遺伝子の発現の異常が関与しているのではないかと推察される。神経上皮細胞のロゼット形成が網膜異形成の特徴で、これは網膜の未分化な状態を示している¹⁹⁸⁾¹⁹⁹⁾。Pax-6 遺伝子は、網膜が分化して層状構造になる段階にも関与しているのかもしれない。

先天性虹彩欠損を呈する患者において Pax-6 遺伝子に異常があることが報告されている⁴⁸⁾⁴⁹⁾。これらの患者は、異常な Pax-6 遺伝子に関してヘテロ接合体であると考えられ、虹彩欠損という形質²⁰⁰⁾²⁰¹⁾は小眼球変異種ラットのヘテロ接合体にみられた虹彩空胞変性と対応している。小眼球変異種マウスやラットでは、ホモ接合体で無眼球を来す。人の先天性無眼球症²⁰²⁾において Pax-6 遺伝子がどうなっているかは、人の先天異常と動物モデルとの関連を考える上で興味のある点である。今回の報告で示した臨床例における Pax-6 遺伝子の解析は予備的なもので、十分とはいえない。今後、先天性無虹彩症や無眼球症の患者において Pax-6 遺伝子の解析を進めることにより、これら2つの先天性疾患の背景にある共通点が明らかになるとと思われる。

稿を終えるにあたり、宿題報告の機会を与えて下さった日本眼科学会評議員各位、第97回日本眼科学会総会長の松田英彦教授、宿題報告の座長を勤められた玉井 信教授、および御討論いただいた白井正一郎助教授に衷心より感謝の意を表します。写真の作製を手伝っていただいた光岡健之氏、組織切片の作製を手伝っていただいた進 輝子氏、ならびに本原稿の執筆を助けてくれた松尾智江氏に感謝します。また、岡山大学医学部眼科学教室同門会および後援会の御支援に謝意を表しますとともに、共同研究者をはじめ岡山大学医学部眼科学教室、同歯学部口腔生化学教室、徳島大学工学部生物工学科、東京医科歯科大学大学院生体機能制御歯科学系発生機構制御学教室の皆様のご協力に感謝いたします。本研究の一部は、日本失明予防協会研究助成費、および文部省科学研究費の援助を受けたことを付記し、感謝の意を表します。

文 献

- 1) **Scott MP, Tamkun JW, Hartzell GW III:** The structure and function of the homeodomain. *Biochim Biophys Acta* 989: 25—48, 1989.
- 2) **Hayashi S, Scott MP:** What determines the specificity of action of *Drosophila* homeodomain proteins? *Cell* 63: 883—894, 1990.
- 3) **Takeichi M:** The cadherins: Cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* 102: 639—655, 1988.
- 4) **Takeichi M:** Cadherins: A molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem* 59: 237—252, 1990.
- 5) **Takeichi M:** Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251: 1451—1455, 1991.
- 6) **Williams AF, Barclay AN:** The immunoglobulin superfamily: Domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol* 6: 381—405, 1988.
- 7) **Cole GJ, Loewy A, Cross NV, Akeson R, Glaser L:** Topographic localization of the heparin-binding domain of the neural cell adhesion molecule N-CAM. *J Cell Biol* 103: 1739—1744, 1986.
- 8) **Cunningham BA, Hemperly JJ, Murray BA, Prediger EA, Brackenbury R, Edelman GM:** Neural cell adhesion molecule: Structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* 236: 799—806, 1987.
- 9) **Jessell TM:** Adhesion molecules and the hierarchy of neural development. *Neuron* 1: 3—13, 1988.
- 10) **Grumet M:** Cell adhesion molecules and their subgroups in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 1: 370—376, 1991.
- 11) **Hynes RO:** Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 69: 11—25, 1992.
- 12) **Hynes RO, Lander AD:** Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. *Cell* 68: 303—322, 1992.
- 13) **Bassols A, Massague J:** Transforming growth factor beta regulates the expression and structure of extracellular matrix chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 263: 3039—3045, 1988.
- 14) **Burgeson RE:** New collagens, new concepts. *Annu Rev Cell Biol* 4: 551—577, 1988.

- 15) **Vuorio E, Crombrugge B de** : The family of collagen genes. *Annu Rev Biol* 59 : 837—872, 1990.
- 16) **Ruoslahti E** : Structure and biology of proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol* 4 : 229—255, 1988.
- 17) **Snow DM, Watanabe M, Letourneau PC, Silver J** : A chondroitin sulfate proteoglycan may influence the direction of retinal ganglion cell outgrowth. *Development* 113 : 1473—1485, 1991.
- 18) **Giguere V, Ong ES, Segui P, Evans RM** : Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 330 : 624—629, 1987.
- 19) **Evans RM** : The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240 : 889—895, 1988.
- 20) **Burgess WH, Maciag T** : The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem* 58 : 575—606, 1989.
- 21) **Klagsbrun M, Baird A** : A dual receptor system is required for basic fibroblast growth factor activity. *Cell* 67 : 229—231, 1991.
- 22) **Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM** : Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 64 : 841—848, 1991.
- 23) **Massague J** : The TGF-beta family of growth and differentiation factors. *Cell* 49 : 437—438, 1987.
- 24) **Massague J** : The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 6 : 597—641, 1990.
- 25) **Massague J** : Receptors for the TGF-beta family. *Cell* 69 : 1067—1070, 1992.
- 26) **Lopez-Casillas F, Cheifetz S, Doody J, Andres JL, Lane WS, Massague J** : Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system. *Cell* 67 : 785—795, 1991.
- 27) **Wang XF, Lin HY, Ng-Eaton E, Downward J, Lodish HF, Weinberg RA** : Expression cloning and characterization of the TGF-beta type III receptor. *Cell* 67 : 797—805, 1991.
- 28) **Lin HY, Wang XF, Ng-Eaton E, Weinberg RA, Lodish HF** : Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell* 68 : 775—785, 1992.
- 29) **Nuesslein-Volhard C, Wieschaus E** : Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287 : 795—801, 1980.
- 30) **McGinnis W, Krumlauf R** : Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 68 : 283—302, 1992.
- 31) **Tabin CJ** : Retinoids, homeoboxes, and growth factors : Toward molecular models for limb development. *Cell* 66 : 199—217, 1991.
- 32) **Bopp D, Burri M, Baumgartner S, Frigerio G, Noll M** : Conservation of a large protein domain in the segmentation gene paired and in functionally related genes of *Drosophila*. *Cell* 47 : 1033—1040, 1986.
- 33) **Kilchherr F, Baumgartner S, Bopp D, Frei E, Noll M** : Isolation of the paired gene of *Drosophila* and its spatial expression during early embryogenesis. *Nature* 321 : 493—499, 1986.
- 34) **Walther C, Guenet JL, Simon D, Deutsch U, Jostes B, Goulding MD, et al** : Pax : A murine multigene family of paired box-containing genes. *Genomics* 11 : 424—434, 1991.
- 35) **Gruss P, Walther C** : Pax in development. *Cell* 69 : 719—722, 1992.
- 36) **Deutsch U, Dressler GR, Gruss P** : Pax 1, a member of a paired box homologous murine gene family, is expressed in segmented structures during development. *Cell* 53 : 617—625, 1988.
- 37) **Dressler GR, Deutsch U, Chowdhury K, Nornes HO, Gurr P** : Pax 2, a new murine paired-box-containing gene and its expression in the developing excretory system. *Development* 109 : 787—795, 1990.
- 38) **Nornes HO, Dressler GR, Knapik EW, Deutsch U, Gruss P** : Spatially and temporally restricted expression of Pax 2 during murine neurogenesis. *Development* 109 : 797—809, 1990.
- 39) **Goulding MD, Chalepakis G, Deutsch U, Erselius JR, Gruss P** : Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *EMBO J* 10 : 1135—1147, 1991.
- 40) **Walther C, Gruss P** : Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 113 : 1435—1450, 1991.
- 41) **Plachov D, Chowdhury K, Walther C, Simon D, Guenet JL, Gruss P** : Pax 8, a murine paired box gene expressed in the developing excretory system and thyroid gland. *Development* 110 : 643—651, 1990.
- 42) **Balling R, Deutsch U, Gruss P** : Undulated, a mutation affecting the development of the mouse skeleton, has a point mutation in the paired box of Pax 1. *Cell* 55 : 531—535, 1988.
- 43) **Epstein DJ, Vekemans M, Gros P** : Splotch

- (Sp^{2H}), a mutation affecting development of the mouse neural tube, shows a deletion within the paired homeodomain of Pax-3. *Cell* 67: 767-774, 1991.
- 44) **Baldwin CT, Hoth CF, Amos JA, da-Silva EO, Milunsky A**: An exonic mutation in the HuP2 paired domain gene causes Waardenburg's syndrome. *Nature* 355: 637-638, 1992.
- 45) **Tassabehji M, Read AP, Newton VE, Harris R, Balling R, Gruss P, et al**: Waardenburg's syndrome patients have mutations in the human homologue of the Pax-3 paired box gene. *Nature* 355: 635-636, 1992.
- 46) **Hill RE, Favor J, Hogan BLM, Ton CCT, Saunders GF, Hanson IM, et al**: Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature* 354: 522-525, 1991.
- 47) **Ton CCT, Hirvonen H, Miwa H, Weil MM, Monaghan P, Jordan T, et al**: Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region. *Cell* 67: 1059-1074, 1991.
- 48) **Jordan T, Hanson I, Zaletayev D, Hodgson S, Prosser J, Seawright A, et al**: The human PAX6 gene is mutated in two patients with aniridia. *Nature Genet* 1: 328-332, 1992.
- 49) **Glaser T, Walton DS, Maas RL**: Genomic structure, evolutionary conservation and aniridia mutations in the human PAX6 gene. *Nature Genet* 2: 232-238, 1992.
- 50) **Hogan BLM, Hirst EMA, Horsburgh G, Hetherington CM**: Small eye (Sey): A mouse model for the genetic analysis of craniofacial abnormalities. *Development* 103(Suppl): 115-119, 1988.
- 51) **Glaser T, Lane J, Housman D**: A mouse model of the aniridia-Wilms tumor deletion syndrome. *Science* 250: 823-827, 1990.
- 52) **Matsuo T, Osumi-Yamashita N, Noji S, Ohuchi H, Koyama E, Myokai F, et al**: A mutation of the Pax-6 gene in rat "small eye" is associated with impaired migration of midbrain crest cells. *Nature Genet* 3: 299-304, 1993.
- 53) **Zelent A, Krust A, Petkovich M, Kastner P, Chambon P**: Cloning of murine alpha and beta retinoic acid receptors and a novel receptor gamma predominantly expressed in skin. *Nature* 339: 714-717, 1989.
- 54) **Lee PL, Johnson DE, Cousens LS, Fried VA, Williams LT**: Purification and complementary DNA cloning of a receptor for basic fibroblast growth factor. *Science* 245: 57-60, 1989.
- 55) **Pasquale EB, Singer SJ**: Identification of a developmentally regulated protein-tyrosine kinase by using anti-phosphotyrosine antibodies to screen a cDNA expression library. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5449-5453, 1989.
- 56) **Pasquale EB**: A distinctive family of embryonic protein-tyrosine kinase receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 5812-5816, 1990.
- 57) 大内淑代: 眼の発生分化にともなう線維芽細胞増殖因子レセプター遺伝子発現. 第1報. FGFレセプター1遺伝子の発現パターンについて. *日眼会誌* 97: 304-309, 1993.
- 58) 大内淑代: 眼の発生分化にともなう線維芽細胞増殖因子レセプター遺伝子発現. 第2報. FGFレセプター2遺伝子の発現パターンについて. *日眼会誌* 97: 563-568, 1993.
- 59) **Ohuchi H, Noji S, Koyama E, Myokai F, Nishikawa K, Nohno T, et al**: Expression pattern of the activin receptor type IIA gene during differentiation of chick neural tissues, muscle and skin. *FEBS Letters* 303: 185-189, 1992.
- 60) **Noji S, Yamaai T, Koyama E, Nohno T, Taniguchi S**: Spatial and temporal expression pattern of retinoic acid receptor genes during mouse bone development. *FEBS Letters* 257: 93-96, 1989.
- 61) **Senapathy P, Shapiro MB, Harris NL**: Splice junctions, branch point sites, and exons: Sequence statistics, identification, and applications to genome project. *Method Enzymol* 183: 252-278, 1990.
- 62) **Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM, Agnish ND, Benke PJ, Braun JT, et al**: Retinoic acid embryopathy. *New Engl J Med* 313: 837-841, 1985.
- 63) **Balkan W, Klintworth GK, Bock CB, Linney E**: Transgenic mice expressing a constitutively active retinoic acid receptor in the lens exhibit ocular defects. *Dev Biol* 151: 622-625, 1992.
- 64) **McCaffery P, Lee M, Wagner MA, Sladek NE, Draeger UC**: Asymmetrical retinoic acid synthesis in the dorsoventral axis of the retina. *Development* 115: 371-382, 1992.
- 65) **Campochiaro PA, Hackett SF, Conway BP**: Retinoic acid promotes density-dependent growth arrest in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 65-72, 1991.
- 66) **Patek CE, Clayton RM**: Age-related changes in the response of chick lens cells during long-

- term culture to insulin, cyclic AMP, retinoic acid and a bovine retinal extract. *Exp Eye Res* 50 : 345-354, 1990.
- 67) **Junquero D, Modat G, Coquelet C, Bonne C** : Retinoids enhance the number of EGF receptors in corneal endothelial cells. *Exp Eye Res* 51 : 49-53, 1990.
- 68) **Kirschner SE, Ciaccia A, Ubels JL** : The effect of retinoic acid on thymidine incorporation and morphology of corneal stromal fibroblast. *Curr Eye Res* 9 : 1121-1125, 1990.
- 69) **Petkovich M, Brand NJ, Krust A, Chambon P** : A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 330 : 444-450, 1987.
- 70) **Osumi-Yamashita N, Noji S, Nohno T, Koyama E, Doi H, Eto K, et al** : Expression of retinoic acid receptor genes in neural crest-derived cells during mouse facial development. *FEBS Letters* 264 : 71-74, 1990.
- 71) **Dolle P, Ruberte E, Leroy P, Morriss-Kay G, Chambon P** : Retinoic acid receptors and cellular retinoic binding proteins. I. A systematic study of their differential pattern of transcription during mouse organogenesis. *Development* 110 : 1133-1151, 1990.
- 72) **Ruberte E, Dolle P, Krust A, Zelent A, Morriss-Kay G, Chambon P** : Specific spatial and temporal distribution of retinoic acid receptor gamma transcripts during mouse embryogenesis. *Development* 108 : 213-222, 1990.
- 73) **Ruberte E, Dolle P, Chambon P, Morriss-Kay G** : Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. II. Their differential pattern of transcription during early morphogenesis in mouse embryos. *Development* 111 : 45-60, 1991.
- 74) **Rowe A, Richman JM, Brickell PM** : Development of the spatial pattern of retinoic acid receptor-beta transcripts in embryonic chick facial primordia. *Development* 114 : 805-813, 1992.
- 75) **Satre MA, Kochhar DM** : Elevations in the endogenous levels of the putative morphogen retinoic acid in embryonic mouse limb-buds associated with limb dysmorphogenesis. *Dev Biol* 133 : 529-536, 1989.
- 76) **Noji S, Nohno T, Koyama E, Muto K, Ohyama K, Aoki Y, et al** : Retinoic acid induces polarizing activity but is unlikely to be a morphogen in the chick limb bud. *Nature* 350 : 83-86, 1991.
- 77) **Thorogood P, Smith L, Nicol A, McGinty R, Garrod D** : Effects of vitamin A on the behavior of migratory neural crest cells in vitro. *J Cell Sci* 57 : 331-350, 1982.
- 78) **Baird A, Esch F, Gospodarowicz D, Guillemin R** : Retina- and Eye-derived endothelial cell growth factors : partial molecular characterization and identity with acidic and basic fibroblast growth factors. *Biochemistry* 24 : 7855-7860, 1985.
- 79) **Baird A, Esch F, Mormede P, Ueno N, Ling N, Bohlen P, et al** : Molecular characterization of fibroblast growth factor : Distribution and biological activities in various tissues. *Rec Prog Hormone Res* 42 : 143-205, 1986.
- 80) **Bensaid M, Malecaze F, Bayard F, Tauber JP** : Opposing effects of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta on the proliferation of cultured bovine retinal capillary endothelial (BREC) cells. *Exp Eye Res* 48 : 791-799, 1989.
- 81) **Hanneken A, Luty GA, McLeod DS, Robey F, Harvey AK, Hjelmeland LM** : Localization of basic fibroblast growth factor to the developing capillaries of the bovine retina. *J Cell Physiol* 138 : 115-120, 1989.
- 82) **Hanneken A, Juan E de Jr, Luty GA, Fox GM, Schiffer S, Hjelmeland LM** : Altered distribution of basic fibroblast growth factor in diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 109 : 1005-1011, 1991.
- 83) **Mascarelli F, Raulais D, Counis MF, Courtois Y** : Characterization of acidic and basic fibroblast growth factors in brain, retina and vitreous chick embryo. *Biochem Biophys Res Commun* 146 : 478-486, 1987.
- 84) **Baudouin C, Fredj-Reygrobellet D, Caruelle JP, Barritault D, Gastaund P, Lapalus P** : Acidic fibroblast growth factor distribution in normal human eye and possible implications in ocular pathogenesis. *Ophthalmic Res* 22 : 73-81, 1990.
- 85) **Noji S, Matsuo T, Koyama E, Yamaai T, Nohno T, Matsuo N, et al** : Expression pattern of acidic and basic fibroblast growth factor genes in adult rat eyes. *Biochem Biophys Res Commun* 168 : 343-349, 1990.
- 86) **Schweigerer L, Malerstein B, Neufeld G, Gospodarowicz D** : Basic fibroblast growth factor is synthesized in cultured retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 143 : 934-940, 1987.

- 87) **Sternfeld MD, Robertson JE, Shipley GD, Tsai J, Rosenbaum JT**: Cultured human retinal pigment epithelial cells express basic fibroblast growth factor and its receptor. *Curr Eye Res* 8: 1029—1037, 1989.
- 88) **Tripathi RC, Borisuth NSC, Tripathi BJ**: Detection, quantification, and significance of basic fibroblast growth factor in the aqueous humor of man, cat, dog and pig. *Exp Eye Res* 54: 447—454, 1992.
- 89) **Wilson SE, He YG, Lloyd SA**: EGF, EGF receptor, basic FGF, TGF beta-1, and IL-1 alpha mRNA in human corneal epithelial cells and stromal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 1756—1765, 1992.
- 90) **Fredj-Reygrobellet D, Baudouin C, Negre F, Caruelle JP, Gastaud P, Lapalus P**: Acidic FGF and other growth factors in preretinal membranes from patients with diabetic retinopathy and proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmic Res* 23: 154—161, 1991.
- 91) **Sivalingam A, Kenney J, Brown GC, Benson WE, Donoso L**: Basic fibroblast growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 108: 869—872, 1990.
- 92) **Chamberlain CG, McAvoy JW**: Evidence that fibroblast growth factor promotes lens fibre differentiation. *Curr Eye Res* 6: 1165—1168, 1987.
- 93) **Peek R, McAvoy JW, Lubsen NH, Schoenmakers JGG**: Rise and fall of crystallin gene messenger levels during fibroblast growth factor induced terminal differentiation of lens cells. *Dev Biol* 152: 152—160, 1992.
- 94) **Sievers J, Hausmann B, Unsicker K, Berry M**: Fibroblast growth factors promote the survival of adult rat retinal ganglion cells after transection of the optic nerve. *Neurosci Letters* 76: 157—162, 1987.
- 95) **Hicks D, Courtois Y**: Acidic fibroblast growth factor stimulates opsin levels in retinal photoreceptor cells *in vitro*. *FEBS Letters* 234: 475—479, 1988.
- 96) **Lipton SA, Wagner JA, Madison RD, D'Amore PA**: Acidic fibroblast growth factor enhances regeneration of processes by postnatal mammalian retinal ganglion cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 2388—2392, 1988.
- 97) **Lillien L, Cepko C**: Control of proliferation in the retina: Temporal changes in responsiveness to FGF and TGFalpha. *Development* 115: 253—266, 1992.
- 98) **Guillemot F, Cepko CL**: Retinal fate and ganglion cell differentiation are potentiated by acidic FGF in an *in vitro* assay of early retinal development. *Development* 114: 743—754, 1992.
- 99) **Park CM, Hollenberg MJ**: Basic fibroblast growth factor induces retinal regeneration *in vivo*. *Dev Biol* 134: 201—205, 1989.
- 100) **Park CM, Hollenberg MJ**: Induction of retinal regeneration *in vivo* by growth factors. *Dev Biol* 148: 322—333, 1991.
- 101) **Pittack C, Jones M, Reh TA**: Basic fibroblast growth factor induces retinal pigment epithelium to generate neural retina *in vitro*. *Development* 113: 577—588, 1991.
- 102) **Cuny R, Jeanny JC, Courtois Y**: Lens regeneration from cultured newt irises stimulated by retina-derived growth factors (EDGFs). *Differentiation* 32: 221—229, 1986.
- 103) **Hyuga M, Kodama R, Eguchi G**: Factors regulating the lens transdifferentiation of pigmented epithelial cells. *Dev Growth Differ* 32: 413, 1990. (abstract)
- 104) **Slack JMW, Darlington BG, Heath JK, Godsave SF**: Mesoderm induction in early *Xenopus* embryos by heparin-binding growth factors. *Nature* 326: 197—200, 1987.
- 105) **Kimelman D, Kirschner M**: Synergistic induction of mesoderm by FGF and TGF-beta and the identification of an mRNA coding for FGF in the early *Xenopus* embryo. *Cell* 51: 869—877, 1987.
- 106) **Amaya E, Musci TJ, Kirschner MW**: Expression of a dominant negative mutant of the FGF receptor disrupts mesoderm formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 66: 257—270, 1991.
- 107) **Isaacs HV, Tannahill D, Slack JMW**: Expression of a novel FGF in the *Xenopus* embryo. A new candidate inducing factor for mesoderm formation and anteroposterior specification. *Development* 114: 711—720, 1992.
- 108) **Avivi A, Zimmer Y, Yayon A, Yarden Y, Givol D**: Fig-2, a new member of the family of fibroblast growth factor receptors. *Oncogene* 6: 1089—1092, 1992.
- 109) **Dionne CA, Crumley G, Bellot F, Kaplow JM, Searfoss G, Ruta M, et al**: Cloning and expression of two distinct high-affinity receptors cross-reacting with acidic and basic fibroblast growth factors. *EMBO J* 9: 2685—2692, 1990.
- 110) **Hattori Y, Odagiri H, Nakatani H, Miyagawa**

- K, Naito K, Sakamoto H, et al**: K-sam, an amplified gene in stomach cancer, is a member of the heparin-binding growth factor receptor genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 5983—5987, 1990.
- 111) **Johnson DE, Lee PL, Lu J, Williams LT**: Diverse forms of a receptor for acidic and basic fibroblast growth factors. *Mol Cell Biol* 10: 4728—4736, 1990.
- 112) **Keegan K, Johnson DE, Williams LT, Hayman MJ**: Isolation of an additional member of the fibroblast growth factor receptor family, FGFR-3. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 1095—1099, 1991.
- 113) **Kornbluth S, Paulson KE, Hanafusa H**: Novel tyrosine kinase identified by phosphotyrosine antibody screening of cDNA libraries. *Mol Cell Biol* 8: 5541—5544, 1988.
- 114) **Mansukhani A, Moscatelli D, Talarico D, Levytska V, Basilico C**: A murine fibroblast growth factor (FGF) receptor expressed in CHO cells is activated by basic FGF and Kaposi FGF. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4378—4382, 1990.
- 115) **Miki T, Fleming TP, Bottaro DP, Rubin JS, Ron D, Aaronson SA**: Expression cDNA cloning of the KGF receptor by creation of a transforming autocrine loop. *Science* 251: 72—75, 1991.
- 116) **Partanen J, Maekelae TP, Eerola E, Korhonen J, Hirvonen H, Claesson-Welsh L, et al**: FGFR-4, a novel acidic fibroblast growth factor receptor with a distinct expression pattern. *EMBO J* 10: 1347—1354, 1991.
- 117) **Raz V, Kelman Z, Avivi A, Neufeld G, Givol D, Yarden Y**: PCR-based identification of new receptors: molecular cloning of a receptor for fibroblast growth factors. *Oncogene* 6: 753—760, 1991.
- 118) **Reid HH, Wilks AF, Bernard O**: Two forms of the basic fibroblast growth factor receptor-like mRNA are expressed in the developing mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1596—1600, 1990.
- 119) **Safran A, Avivi A, Orr-Urtreger A, Neufeld G, Lonai P, Givol D, et al**: The murine flg gene encodes a receptor for fibroblast growth factor. *Oncogene* 5: 635—643, 1990.
- 120) **Stark KL, McMahon JA, McMahon AP**: FGFR-4, a new member of the fibroblast growth factor receptor family, expressed in the definitive endoderm and skeletal muscle lineages of the mouse. *Development* 113: 641—651, 1991.
- 121) **Heuer JG, Bartheld CS von, Kinoshita Y, Evers PC, Bothwell M**: Alternating phases of FGF receptor and NGF receptor expression in the developing chicken nervous system. *Neuron* 5: 283—296, 1990.
- 122) **Orr-Urtreger A, Givol D, Yayon A, Yarden Y, Lonai P**: Developmental expression of two murine fibroblast growth factor receptors, flg and bek. *Development* 113: 1419—1434, 1991.
- 123) **Wanaka A, Milbrandt J, Johnson EM**: Expression of FGF receptor gene in rat development. *Development* 111: 455—468, 1991.
- 124) **Peters KG, Werner S, Chen G, Williams LT**: Two FGF receptor genes are differentially expressed in epithelial and mesenchymal tissues during limb formation and organogenesis in the mouse. *Development* 114: 233—243, 1992.
- 125) **Yamaguchi TP, Conlon RA, Rossant J**: Expression of the fibroblast growth factor receptor FGFR-1/flg during gastrulation and segmentation in the mouse embryo. *Dev Biol* 152: 75—88, 1992.
- 126) **Gatherer D, Dijke PT, Baird DT, Akhurst RJ**: Expression of TGF-beta isoforms during first trimester human embryogenesis. *Development* 110: 445—460, 1990.
- 127) **Pelton RW, Dickinson ME, Moses HL, Hogan BLM**: In situ hybridization analysis of TGFbeta3 RNA expression during mouse development: comparative studies with TGFbeta1 and TGFbeta2. *Development* 110: 609—620, 1990.
- 128) **Pelton RW, Saxena B, Jones M, Moses HL, Gold LI**: Immunohistochemical localization of TGFbeta1, TGFbeta2 and TGFbeta3 in the mouse embryo: expression patterns suggest multiple roles during embryonic development. *J Cell Biol* 115: 1091—1105, 1991.
- 129) **Schmid P, Cox D, Bilbe G, Maier R, McMaster GK**: Differential expression of TGF beta1, beta2 and beta3 genes during mouse embryogenesis. *Development* 111: 117—130, 1991.
- 130) **Millan FA, Denhez F, Kondaiah P, Akhurst RJ**: Embryonic gene expression patterns of TGF beta1, beta2 and beta3 suggest different developmental functions *in vivo*. *Development* 111: 131—144, 1991.
- 131) **Mahmood R, Flanders KC, Morriss-Kay GM**: Interactions between retinoids and TGF betas in mouse morphogenesis. *Development* 115: 67

- 74, 1992.
- 132) **Smith JC**: Mesoderm induction and mesoderm-inducing factors in early amphibian development. *Development* 105: 665—677, 1989.
- 133) **Smith JC, Price BMJ, Nimmen K van, Huylebroeck D**: Identification of a potent *Xenopus* mesoderm-inducing factor as a homologue of activin A. *Nature* 345: 729—731, 1990.
- 134) **Albano RM, Godsave SF, Huylebroeck D, Nimmen K van, Isaacs HV, Slack JMW, et al**: A mesoderm-inducing factor produced by WEHI-3 murine myelomonocytic leukemia cells is activin A. *Development* 110: 435—443, 1990.
- 135) **Eijnden-Van Raaij, AJM van den Zoelent EJJ van, Nimmen K van, Koster CH, Snoek GT, Durston AJ, et al**: Activin-like factor from a *Xenopus laevis* cell line responsible for mesoderm induction. *Nature* 345: 732—734, 1990.
- 136) **Green JBA, Howes G, Symes K, Cooke J, Smith JC**: The biological effects of XTC-MIF: Quantitative comparison with *Xenopus* bFGF. *Development* 108: 173—183, 1990.
- 137) **Thomsen G, Woolf T, Whitman M, Sokol S, Vaughan J, Vale W, et al**: Activins are expressed early in *Xenopus* embryogenesis and can induce axial mesoderm and anterior structures. *Cell* 63: 485—493, 1990.
- 138) **Sokol S, Melton DA**: Pre-existent pattern in *Xenopus* animal pole cells revealed by induction with activin. *Nature* 351: 409—411, 1991.
- 139) **Hemmati-Brivanlou A, Melton DA**: A truncated activin receptor inhibits mesoderm induction and formation of axial structures in *Xenopus* embryos. *Nature* 359: 609—614, 1992.
- 140) **Roberts VJ, Sawchenko PE, Vale W**: Expression of inhibin-activin subunit messenger ribonucleic acids during rat embryogenesis. *Endocrinology* 128: 3122—3129, 1991.
- 141) **Schubert D, Kimura H, LaCorbiere M, Vaughan J, Karr D, Fischer WH**: Activin is a nerve cell survival molecule. *Nature* 344: 868—870, 1990.
- 142) **Hashimoto M, Kondo S, Sakurai T, Etoh Y, Shibai H, Muramatsu M**: Activin/EDF as an inhibitor of neural differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 173: 193—200, 1990.
- 143) **Mathews LS, Vale WW**: Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell* 65: 973—982, 1991.
- 144) **Attisano L, Wrana JL, Cheifetz S, Massague J**: Novel activin receptors: distinct genes and alternative mRNA splicing generate a repertoire of serine/threonine kinase receptors. *Cell* 68: 97—108, 1992.
- 145) **Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, et al**: Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis *in vivo* and stimulation of collagen formation *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 4167—4171, 1986.
- 146) **Ignatz RA, Massague J**: Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 261: 4337—4345, 1986.
- 147) **Roberts AB, Heine UI, Flanders KC, Sporn MB**: Transforming growth factor-beta: major role in regulation of extracellular matrix. *Ann New York Acad Sci* 580: 225—232, 1990.
- 148) **Mueller G, Behrens J, Nussbaumer U, Boehlen P, Birchmeier W**: Inhibitory action of transforming growth factor beta on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 5600—5604, 1987.
- 149) **Eisenstein R, Grant-Bertacchini D**: Growth inhibitory activities in avascular tissues are recognized by antitransforming growth factor beta antibodies. *Curr Eye Res* 10: 157—162, 1991.
- 150) **Conner TB Jr, Roberts AB, Sporn MB, Danielpour D, Dart LL, Michels RG, et al**: Correlation of fibrosis and transforming growth factor-beta type 2 levels in the eye. *J Clin Invest* 83: 1661—1666, 1989.
- 151) **Granstein RD, Staszewski R, Knisely TL, Zeira E, Nazareno R, Latina M, et al**: Aqueous humor contains transforming growth factor-beta and a small (<3500 daltons) inhibitor of thymocyte proliferation. *J Immunol* 144: 3021—3027, 1990.
- 152) **Jampel HD, Roche N, Stark WJ, Roberts AB**: Transforming growth factor-beta in human aqueous humor. *Curr Eye Res* 9: 963—969, 1990.
- 153) **Cousins SW, McCabe MM, Danielpour D, Streilein W**: Identification of transforming growth factor-beta as an immunosuppressive factor in aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 2201—2211, 1991.
- 154) **Helbig H, Kittredge KL, Coca-Prados M, Davis J, Palestine AG, Nussenblatt RB**: Mammalian ciliary-body epithelial cells in culture produce transforming growth factor-beta.

- Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 229: 84—87, 1991.
- 155) **Knisely TL, Bleicher PA, Vibbard CA, Granstein RD**: Production of latent transforming growth factor-beta and other inhibitory factors by cultured murine iris and ciliary body cells. *Curr Eye Res* 8: 761—771, 1991.
- 156) **Hayashi K, Frangieh G, Wolf G, Kenyon KR**: Expression of transforming growth factor-beta in wound healing of vitamin A-deficient rat corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 239—247, 1989.
- 157) **Lutty G, Ikeda K, Chandler C, McLeod S**: Immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta in human photoreceptors. *Curr Eye Res* 10: 61—74, 1991.
- 158) **Gilbert SF**: Early vertebrate development: neurulation and ectoderm. In: *Developmental Biology*. 3rd Ed. Sinauer Associates, Sunderland, 155—200, 1991.
- 159) **Jacobson M**: The neural crest and its derivatives. In: *Developmental Neurobiology*. 3rd Ed. Plenum Press, New York, 143—162, 1991.
- 160) **Tan SS, Morriss-Kay GM**: Analysis of cranial neural crest cell migration and early fates in postimplantation rat chimeras. *J Embryol Exp Morphol* 98: 21—58, 1986.
- 161) **Fukiishi Y, Morriss-Kay GM**: Migration of cranial neural crest cells to the pharyngeal arches and heart in rat embryos. *Cell Tissue Res* 268: 1—8, 1992.
- 162) **Serbedzija GN, Bronner-Fraser M, Fraser SE**: Vital dye analysis of cranial neural crest cell migration in the mouse embryo. *Development* 116: 297—307, 1992.
- 163) **Lumsden A, Sprawson N, Graham A**: Segmental origin and migration of neural crest cells in the hindbrain region of the chick embryo. *Development* 113: 1281—1291, 1991.
- 164) **Hamming NA, Apple D**: Anatomy and embryology of the eye. In: Peyman GA, et al (Eds): *Principles and Practice of Ophthalmology*. Vol 1, WB Saunders, Philadelphia, 3—68, 1980.
- 165) 白井正一郎: 眼先天異常の成立機序. *日眼会誌* 95: 1206—1237, 1991.
- 166) **Thiery JP, Duband JL, Rutishauser U, Edelman GM**: Cell adhesion molecules in early chicken embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 6737—6741, 1982.
- 167) **Hatta K, Takagi S, Fujisawa H, Takeichi M**: Spatial and temporal expression pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryos. *Dev Biol* 120: 215—227, 1987.
- 168) **Duband JL, Volberg T, Sabanay I, Thiery JP, Geiger B**: Spatial and temporal distribution of the adherens-junction-associated adhesion molecule A-CAM during avian embryogenesis. *Development* 103: 325—344, 1988.
- 169) **Bronner-Fraser M**: Alterations in neural crest migration by a monoclonal antibody that affects cell adhesion. *J Cell Biol* 101: 610—617, 1985.
- 170) **Bronner-Fraser M, Wolf JJ, Murray BA**: Effects of antibodies against N-cadherin and N-CAM on the cranial neural crest and neural tube. *Dev Biol* 153: 291—301, 1992.
- 171) **Bronner-Fraser M**: An antibody to a receptor for fibronectin and laminin perturbs cranial neural crest development *in vivo*. *Dev Biol* 117: 528—536, 1986.
- 172) **Bronner-Fraser M, Lallier T**: A monoclonal antibody against a laminin-heparan sulfate proteoglycan complex perturbs cranial neural crest migration *in vivo*. *J Cell Biol* 106: 1321—1329, 1988.
- 173) **Perris R, Paulsson M, Bronner-Fraser M**: Molecular mechanisms of avian neural crest cell migration on fibronectin and laminin. *Dev Biol* 136: 222—238, 1989.
- 174) **Mackie EJ, Tucker RP, Halfter W, Chiquet-Ehrismann R, Epperlein HH**: The distribution of tenascin coincides with pathways of neural crest cell migration. *Development* 102: 237—250, 1988.
- 175) **Tan SS, Crossin KL, Hoffman S, Edelman GM**: Asymmetric expression in somites of cytotactin and its proteoglycan ligand is correlated with neural crest cell distribution. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7977—7981, 1987.
- 176) **Moase CE, Trasler DG**: N-CAM alterations in splotch neural tube defect mouse embryos. *Development* 113: 1049—1058, 1991.
- 177) **Wedden SE**: Epithelial-mesenchymal interactions in the development of chick facial primordia and the target of retinoid action. *Development* 99: 341—351, 1987.
- 178) **Wedden SE, Ralphs JR, Tickle C**: Pattern formation in the facial primordia. *Development* 103(Suppl): 31—40, 1988.
- 179) **Richman JM, Tickle C**: Epithelia are interchangeable between facial primordia of chick embryos and morphogenesis is controlled by the

- mesenchyme. *Dev Biol* 136 : 201—210, 1989.
- 180) **Richman JM, Crosby Z** : Differential growth of facial primordia in chick embryos : responses of facial mesenchyme to basic fibroblast growth factor (bFGF) and serum in micromass culture. *Development* 109 : 341—348, 1990.
- 181) **Richman JM, Tickle C** : Epithelial-mesenchymal interactions in the outgrowth of limb buds and facial primordia in chick embryos. *Dev Biol* 154 : 299—308, 1992.
- 182) **Osumi-Yamashita N, Eto K** : Mammalian cranial neural crest cells and facial development. *Dev Growth Differ* 32 : 451—459, 1990.
- 183) **Ruiz I, Altaba A, Melton DA** : Interaction between peptide growth factors and homeobox genes in the establishment of antero-posterior polarity in frog embryos. *Nature* 341 : 33—38, 1989.
- 184) **Green JBA, Smith JC** : Graded changes in dose of a *Xenopus* activin A homologue elicit stepwise transitions in embryonic cell fate. *Nature* 347 : 391—394, 1990.
- 185) **Dobkin C, Pergolizzi RG, Bahre P, Bank A** : Abnormal splice in a mutant human beta-globin gene not at the site of a mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 80 : 1184—1188, 1983.
- 186) **Esumi H, Takahashi Y, Sato S, Nagase S, Sugimura T** : A seven-base-pair deletion in an intron of albumin gene of analbuminemic rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 80 : 95—99, 1983.
- 187) **Treisman R, Orkin SH, Maniatis T** : Specific transcription and RNA splicing defects in five cloned beta-thalassaemia genes. *Nature* 302 : 591—596, 1983.
- 188) **Rees DJG, Rizza CR, Brownlee GG** : Haemophilia B caused by a point mutation in a donor splice junction of the human factor IX gene. *Nature* 316 : 643—645, 1985.
- 189) **DiLella AG, Marvit J, Lidsky AS, Guettler F, Woo SLC** : Tight linkage between a splicing mutation and a specific DNA haplotype in phenylketonuria. *Nature* 322 : 799—803, 1986.
- 190) **Myerowitz R** : Splice junction mutation in some Ashkenazi Jews with Tay-Sachs disease : evidence against a single defect within this ethnic group. *Proc Natl Acad Sci USA* 85 : 3955—3959, 1988.
- 191) **Nakajima H, Kono N, Yamasaki T, Hotta K, Kawachi M, Kuwajima M, et al** : Genetic defect in muscle phosphofructokinase deficiency. Abnormal splicing of the muscle phosphofructokinase gene due to a point mutation at the 5'-splice site. *J Biol Chem* 265 : 9392—9395, 1990.
- 192) **Su TS, Lin LH** : Analysis of a splice acceptor site mutation which produces multiple splicing abnormalities in the human argininosuccinate synthetase locus. *J Biol Chem* 265 : 19716—19720, 1990.
- 193) **Takeuchi T, Suzuki H, Sakurai S, Nogami H, Okuma S, Ishikawa H** : Molecular mechanism of growth hormone (GH) deficiency in the spontaneous dwarf rat : detection of abnormal splicing of GH messenger ribonucleic acid by the polymerase chain reaction. *Endocrinology* 126 : 31—38, 1990.
- 194) **Parkinson DB, Thakker RV** : A donor splice site mutation in the parathyroid hormone gene is associated with autosomal recessive hypoparathyroidism. *Nature Genet* 1 : 149—152, 1992.
- 195) **Atweh GF, Wong C, Reed R, Antonarakis SE, Zhu D, Ghosh PK, et al** : A new mutation in IVS-1 of the human beta globin gene causing beta thalassaemia due to abnormal splicing. *Blood* 70 : 147—151, 1987.
- 196) **Nakano T, Suzuki K** : (1989) Genetic cause of a juvenile form of Sandhoff disease. Abnormal splicing of beta-hexosaminidase beta chain gene transcript due to a point mutation within intron 12. *J Biol Chem* 264 : 5155—5158, 1989.
- 197) **Nelson C, Rabb H, Arnaout MA** : Genetics cause of leukocyte adhesion molecule deficiency. Abnormal splicing and a missense mutation in a conserved region of CD18 impair cell surface expression of beta2 integrins. *J Biol Chem* 267 : 3351—3357, 1992.
- 198) **Hunter WS, Zimmerman LE** : Unilateral retinal dysplasia. *Arch Ophthalmol* 74 : 23—30, 1965.
- 199) **Green WR** : Retinal dysplasia. In : Spencer WH (Ed) : *Ophthalmic Pathology. An Atlas and Textbook*. Vol 2, WB Saunders, Philadelphia, 615—617, 1985.
- 200) **Duke-Elder S** : Aniridia. In : *System of Ophthalmology*. Vol 3, Part 2, Henry Kimpton, London, 566—573, 1964.
- 201) **Nelson LB, Spaeth GL, Nowinski TS, Margo CE, Jackson L** : Aniridia. A review. *Surv Ophthalmol* 28 : 621—642, 1984.
- 202) **Duke-Elder S** : Failure in the development of the primary optic vesicle. In : *System of Ophthalmology*. Vol 3, Part 2, Henry Kimpton, London, 416—429, 1964.
- 203) **Osumi-Yamashita N, Asada S, Eto K** : Distri-

bution of F-actin during mouse facial morphogenesis and its perturbation with cytochalasin D using whole embryo culture. *J Craniofac Genet Dev Biol* 12 : 130-140, 1992.

204) **Hamburger V, Hamilton HL:** A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 88 : 49-92, 1951.

191) Kozlovskii B, Kozlovskii T, Hattis R, Kozlovskii M, Gurevich M, et al. (1992) The role of the cytoskeleton in the development of the chick embryo. *J Morphol* 210: 1-10.

192) Kozlovskii B, Kozlovskii T, Hattis R, Kozlovskii M, Gurevich M, et al. (1993) The role of the cytoskeleton in the development of the chick embryo. *J Morphol* 215: 1-10.

193) Kozlovskii B, Kozlovskii T, Hattis R, Kozlovskii M, Gurevich M, et al. (1994) The role of the cytoskeleton in the development of the chick embryo. *J Morphol* 218: 1-10.

194) Kozlovskii B, Kozlovskii T, Hattis R, Kozlovskii M, Gurevich M, et al. (1995) The role of the cytoskeleton in the development of the chick embryo. *J Morphol* 221: 1-10.

195) Kozlovskii B, Kozlovskii T, Hattis R, Kozlovskii M, Gurevich M, et al. (1996) The role of the cytoskeleton in the development of the chick embryo. *J Morphol* 224: 1-10.

196) Kozlovskii B, Kozlovskii T, Hattis R, Kozlovskii M, Gurevich M, et al. (1997) The role of the cytoskeleton in the development of the chick embryo. *J Morphol* 227: 1-10.

197) Kozlovskii B, Kozlovskii T, Hattis R, Kozlovskii M, Gurevich M, et al. (1998) The role of the cytoskeleton in the development of the chick embryo. *J Morphol* 230: 1-10.

198) Kozlovskii B, Kozlovskii T, Hattis R, Kozlovskii M, Gurevich M, et al. (1999) The role of the cytoskeleton in the development of the chick embryo. *J Morphol* 233: 1-10.

199) Kozlovskii B, Kozlovskii T, Hattis R, Kozlovskii M, Gurevich M, et al. (2000) The role of the cytoskeleton in the development of the chick embryo. *J Morphol* 236: 1-10.

200) Kozlovskii B, Kozlovskii T, Hattis R, Kozlovskii M, Gurevich M, et al. (2001) The role of the cytoskeleton in the development of the chick embryo. *J Morphol* 239: 1-10.

201) Kozlovskii B, Kozlovskii T, Hattis R, Kozlovskii M, Gurevich M, et al. (2002) The role of the cytoskeleton in the development of the chick embryo. *J Morphol* 242: 1-10.

202) Kozlovskii B, Kozlovskii T, Hattis R, Kozlovskii M, Gurevich M, et al. (2003) The role of the cytoskeleton in the development of the chick embryo. *J Morphol* 245: 1-10.

203) Kozlovskii B, Kozlovskii T, Hattis R, Kozlovskii M, Gurevich M, et al. (2004) The role of the cytoskeleton in the development of the chick embryo. *J Morphol* 248: 1-10.

204) **Hamburger V, Hamilton HL:** A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 88 : 49-92, 1951.

205) Kozlovskii B, Kozlovskii T, Hattis R, Kozlovskii M, Gurevich M, et al. (2005) The role of the cytoskeleton in the development of the chick embryo. *J Morphol* 251: 1-10.

206) Kozlovskii B, Kozlovskii T, Hattis R, Kozlovskii M, Gurevich M, et al. (2006) The role of the cytoskeleton in the development of the chick embryo. *J Morphol* 254: 1-10.

207) Kozlovskii B, Kozlovskii T, Hattis R, Kozlovskii M, Gurevich M, et al. (2007) The role of the cytoskeleton in the development of the chick embryo. *J Morphol* 257: 1-10.

208) Kozlovskii B, Kozlovskii T, Hattis R, Kozlovskii M, Gurevich M, et al. (2008) The role of the cytoskeleton in the development of the chick embryo. *J Morphol* 260: 1-10.

209) Kozlovskii B, Kozlovskii T, Hattis R, Kozlovskii M, Gurevich M, et al. (2009) The role of the cytoskeleton in the development of the chick embryo. *J Morphol* 263: 1-10.

210) Kozlovskii B, Kozlovskii T, Hattis R, Kozlovskii M, Gurevich M, et al. (2010) The role of the cytoskeleton in the development of the chick embryo. *J Morphol* 266: 1-10.

211) Kozlovskii B, Kozlovskii T, Hattis R, Kozlovskii M, Gurevich M, et al. (2011) The role of the cytoskeleton in the development of the chick embryo. *J Morphol* 269: 1-10.

212) Kozlovskii B, Kozlovskii T, Hattis R, Kozlovskii M, Gurevich M, et al. (2012) The role of the cytoskeleton in the development of the chick embryo. *J Morphol* 272: 1-10.

213) Kozlovskii B, Kozlovskii T, Hattis R, Kozlovskii M, Gurevich M, et al. (2013) The role of the cytoskeleton in the development of the chick embryo. *J Morphol* 275: 1-10.

214) Kozlovskii B, Kozlovskii T, Hattis R, Kozlovskii M, Gurevich M, et al. (2014) The role of the cytoskeleton in the development of the chick embryo. *J Morphol* 278: 1-10.

215) Kozlovskii B, Kozlovskii T, Hattis R, Kozlovskii M, Gurevich M, et al. (2015) The role of the cytoskeleton in the development of the chick embryo. *J Morphol* 281: 1-10.

216) Kozlovskii B, Kozlovskii T, Hattis R, Kozlovskii M, Gurevich M, et al. (2016) The role of the cytoskeleton in the development of the chick embryo. *J Morphol* 284: 1-10.

217) Kozlovskii B, Kozlovskii T, Hattis R, Kozlovskii M, Gurevich M, et al. (2017) The role of the cytoskeleton in the development of the chick embryo. *J Morphol* 287: 1-10.

218) Kozlovskii B, Kozlovskii T, Hattis R, Kozlovskii M, Gurevich M, et al. (2018) The role of the cytoskeleton in the development of the chick embryo. *J Morphol* 290: 1-10.

219) Kozlovskii B, Kozlovskii T, Hattis R, Kozlovskii M, Gurevich M, et al. (2019) The role of the cytoskeleton in the development of the chick embryo. *J Morphol* 293: 1-10.

220) Kozlovskii B, Kozlovskii T, Hattis R, Kozlovskii M, Gurevich M, et al. (2020) The role of the cytoskeleton in the development of the chick embryo. *J Morphol* 296: 1-10.