

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

大内 淑代

岡山大学医学部眼科学教室

要 約

ニワトリ胚の眼の発生分化にともなう線維芽細胞増殖因子 (FGF) の標的細胞を同定する目的で、ふ卵 1 日より 5.5 日のニワトリ胚を用いて、FGF レセプター 1 (FGFR 1) 遺伝子の発現時期と部位を *in situ hybridization* 法により検討した。ふ卵 1 日、1.5 日においては胚全体に一樣に発現していたが、ふ卵 2.5 日になると頭部では、眼杯、水晶体胞、眼杯周囲の間葉組織、間脳の神経上皮に局在がみられた。ふ卵 3.5 日になると、眼杯内層における発現に局在がみられるようになり、水晶体側の眼杯内層に強い発現がみられた。FGFR 1 遺伝子の発現が、ニワトリの眼の形態形成、特に前後軸の決定に関与していることが示唆された。(日眼会誌 97: 304—309, 1993)

キーワード: FGF レセプター, *in situ hybridization*, 眼, 発生, ニワトリ胚

Expression Pattern of Fibroblast Growth Factor Receptor 1 Gene during Chick Eye Development

Hideyo Ohuchi

Department of Ophthalmology, Okayama University Medical School

Abstract

To reveal the expression pattern of fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) gene during chick eye development, *in situ hybridization* was performed on sections of chick embryo from stage 8 to 28. At stage 8 and 10, transcripts of FGFR1 were observed over the whole embryo and they were located at the optic cup, the lens vesicle, the orbital mesenchyme and the neuroepithelium of the diencephalon at stage 17. In the inner layer of the optic cup at stage 21, the expression was restricted to the anterior portion. It was suggested that FGFR1 expression was involved in chick eye development, especially in determination of anterior-posterior axis of the eye. (J Jpn Ophthalmol Soc 97: 304—309, 1993)

Key words: FGF receptor, *In situ hybridization*, Eye, Development, Chick embryo

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 大内 淑代

(平成 4 年 8 月 3 日受付, 平成 4 年 9 月 16 日改訂受理)

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

(Received August 3, 1992 and accepted in revised form September 16, 1992)

I 緒 言

近年、細胞成長因子は動物の形態形成に直接関与する重要な因子と考えられている。なかでも、fibroblast growth factor (FGF) と transforming growth factor type β (TGF- β) ファミリーとは、カエル、ニワトリ胚において中胚葉および神経誘導に関与することが知られ形態形成に果たす役割が大きいとされている¹⁾。眼においても、例えばニワトリの培養網膜色素上皮細胞は、培養条件により神経網膜の細胞にも水晶体上皮細胞にも分化転換するが、いずれの現象にも basic FGF (bFGF) が必要であることが報告されている^{2)~4)}。筆者は、眼の形態形成にも bFGF など FGF ファミリーが関与していると考え、ニワトリ胚を用いて bFGF の発現を *in situ* hybridization (ISH) 法により検討したが、胚全体に弱く一様に発現しており特徴的なパターンを見出すことはできなかった。そこで今回は、FGF の標的細胞を同定する目的で FGF レセプター (以下、FGFR) に焦点を当てた。

FGFR は、細胞内にチロシンキナーゼ領域をもつレセプターで、これまでに哺乳類では4種⁵⁾、ニワトリでは3種のサブタイプ、FGFR 1, FGFR 2, FGFR 3 の存在が知られている⁶⁾⁷⁾。まず FGFR 1 の眼発生分化における遺伝子発現の時期と部位を、ニワトリ胚を用いて ISH 法により検討した。

II 実験方法

1. リボプローブの調製

リボプローブの鋳型となる FGFR 1 の相補的 DNA (以下、cDNA) 断片は、ニワトリ 3 日胚 cDNA ライブラリー (川崎医科大学、濃野勉博士より供与) から polymerase chain reaction (PCR) 法を用いて得た。異なったサブタイプの FGFR cDNA を得ることができるよう、3 種の FGFR cDNA に相同性の高いキナーゼ部分を増幅するような混合プライマーを用い、上記ライブラリーをスクリーニングした (図 1)。PCR 産物 419 塩基対を pGEM 7[®] (Promega 社) ベクターに挿入し、dideoxy-chain termination 法により塩基配列を決定し、FGFR 1, FGFR 2, FGFR 3 の cDNA であることを確認した。このうち FGFR 1 cDNA を鋳型にして RNA 合成酵素 (SP 6, T 7 RNA polymerase) により [α -³⁵S]UTP (37 $\times$ 10³ GBq/mmol, Amersham 社, SJ 263) を用いてセンス、アンチセンス RNA を常法⁸⁾により合成した。合成 RNA はアルカリ加水分解

アミノ酸配列: EMEMMK
→5'プライマー: GA(AG)ATGGA(AG)ATGATGAA
アミノ酸配列: KWMAPE
→3'プライマー: TC(AGCT)GG(AGCT)GCCATCCA
(CT)TT

図 1 FGFR cDNA のキナーゼ領域の一部を増幅するような混合プライマー。

により約 150 塩基とし、プローブとして用いた。

2. ISH 法

対象は、ニワトリ (white leghorn) ふ卵 1 日、1.5 日、2.5 日、3.5 日、4 日、5.5 日胚を用いた。

各胚は 4% パラホルムアルデヒドで 4℃ で 3 時間固定後、リン酸緩衝生理食塩水 (0.9% 塩化ナトリウム、10 mM リン酸ナトリウム、pH 7.4, 以下、PBS(-)) で洗浄、エタノール系列で脱水、キシレン透徹、パラフィン包埋した。ポリリジン (poly-L-lysine, 500 μ g/ml, Sigma 社, P 1524) を塗布したスライドガラス上に 5 μ m 厚の切片を作製し、脱パラフィンした。PBS(-) で洗浄、グリシン (2 mg/ml) でクエンチし、0.1 M トリエタノールアミン中で 0.25% (v/v) 無水酢酸処理をした。2 $\times$ SSC (0.3 M 塩化ナトリウム、0.03 M クエン酸三ナトリウム) で洗浄し、プレハイブリダイゼーション (50% ホルムアミド, 2 $\times$ SSC, 10 mM dithiothreitol (DTT), 50℃, 1 時間) を行った。前述したリボプローブ (0.1 μ g RNA/ml) で、50℃ で 16 時間ハイブリダイゼーション (2 $\times$ SSC, 10 mM DTT, 1 μ g/ μ l yeast transfer RNA, 1 μ g/ μ l sonicated salmon sperm DNA, 1 μ g/ μ l 牛血清アルブミン, 10% dextran sulfate, 50% ホルムアミド) を行った。洗浄 (2 $\times$ SSC, 10 mM DTT, 50% ホルムアミド, 50℃) 後、NTE (0.5 M 塩化ナトリウム, 10 mM トリス塩酸 (pH 8.0), 1 mM エチレンジアミン四酢酸) 中、37℃ で RNA 分解酵素 (RNase A (20 μ g/ml)) 処理を行った。洗浄 (0.1 $\times$ SSC, 10 mM DTT, 50℃), 脱水後、乳剤 (Kodak 社, NTB 2) を塗布し 4℃ で 2 週間オートラジオグラフィーした。現像、ヘマトキシリン-エオジン染色後、暗視野、明視野で検鏡した。

III 結 果

すべての切片においてセンスプローブによる ISH を対照実験として行ったが、有意なシグナルは検出されなかった。よって以下アンチセンスプローブによる結果のみ供覧する。また、今回用いた FGFR 1 プロー

表1 ニワトリ胚の眼の発生 (文献⁹⁾¹⁰⁾による)

ふ卵日数(時間)	Hamburger & Hamilton stage	眼 の 発 生
約 1 日(23-30)	8+	第一次眼胞が形成される
約 1.5 日(29-38)	10	眼柄が認められる
約 2 日(43-52)	14+	水晶体胞が形成される, 眼杯が形成され始める
(48-56)	16	水晶体胞が表皮外胚葉より分離する, 視室がほぼ消失する
約 2.5 日(52-64)	17	眼杯が完成する
約 3.5 日	21-23	眼杯外層に色素が出現する

ブは他の FGFR cDNA とクロスハイブリダイズしないことを確認した。

ニワトリ胚のふ卵日数と眼の発生の関係について, 表1にまとめた⁹⁾¹⁰⁾, ここに示したように眼の発生は胚発生のきわめて早期より開始され, ニワトリ胚ではふ卵約3.5日までに眼のおおまかな構造が形成される, ふ卵1日で第一次眼胞が形成され, ふ卵1.5日で

眼柄が認められるようになる, 両時期において FGFR 1 遺伝子は, 胚全体に一樣に弱く発現する傾向にあったが局在性は認められなかった。

ふ卵2.5日になると(図2)頭部では, 間脳の神経上皮, 眼杯周囲の間葉組織, 眼杯の外層, 内層の将来それぞれ神経網膜, 網膜色素上皮(以下, RPE)となる細胞, 水晶体胞に多くの発現を認めた, 図2には上

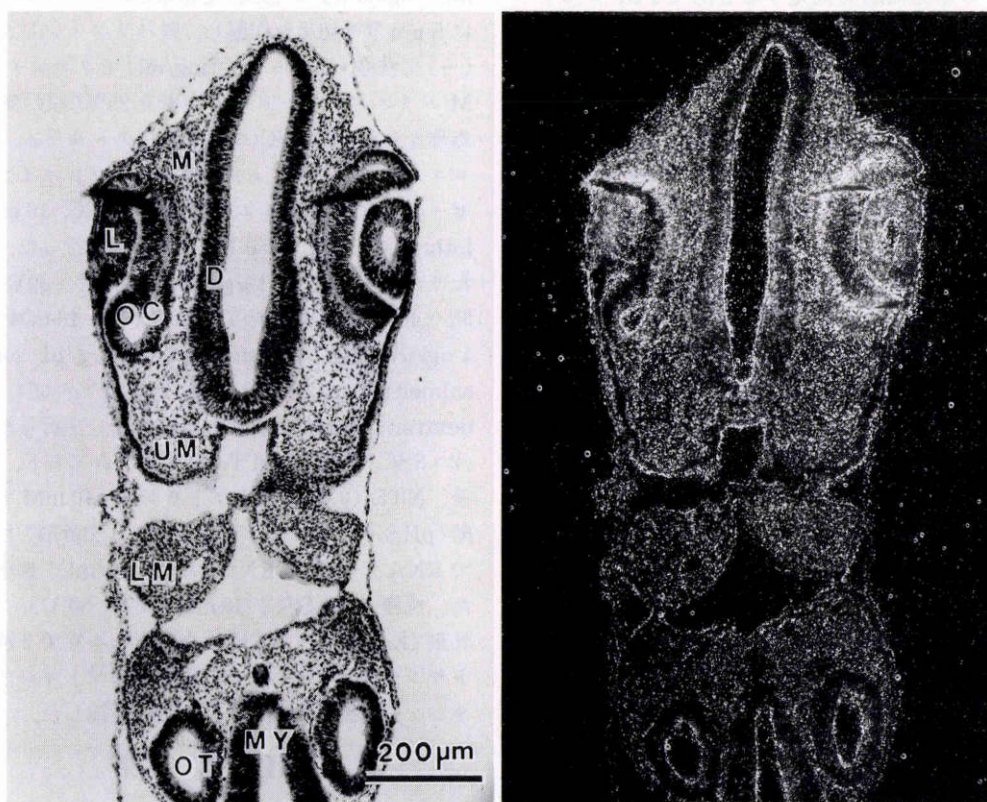


図2 ふ卵約2.5日のニワトリ胚横断面(左:明視野, HE染色 右:暗視野). 暗視野において, 眼杯(OC), 水晶体胞(L), 眼杯周囲の間葉細胞(M), 間脳の神経上皮(D)に白い銀粒子が集積しており FGFR 1 mRNA の存在を示している. ×50 (OT: 耳胞, MY: 髄脳, LM: 下顎弓, UM: 上顎突起)

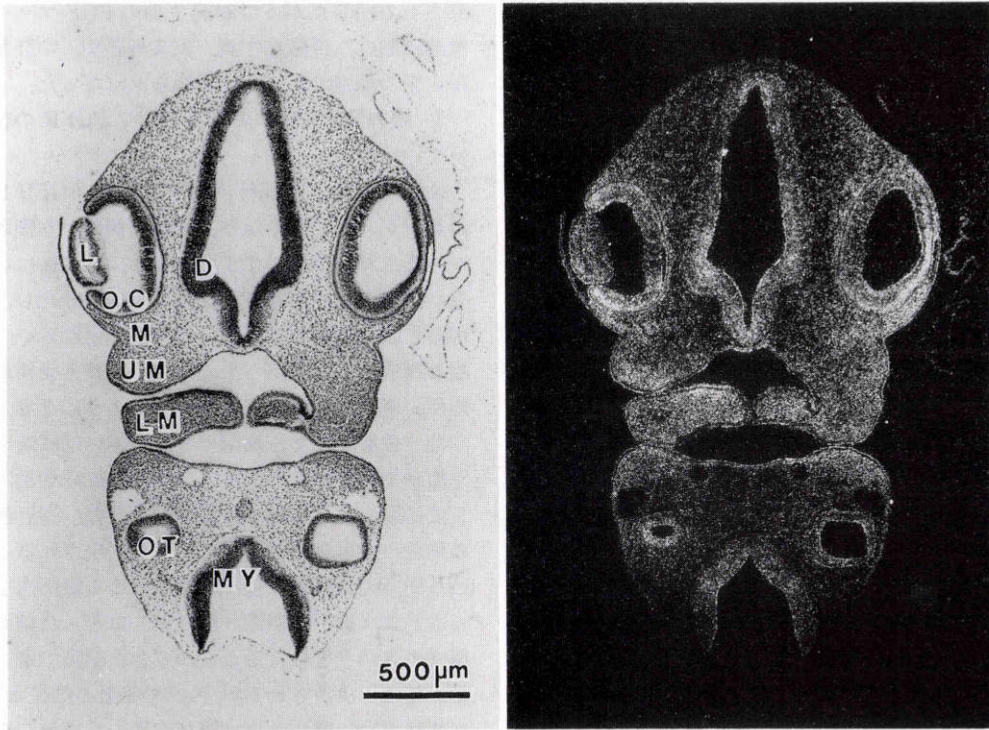


図 3 ふ卵約 3.5 日のニワトリ胚横断面 (左: 明視野, HE 染色 右: 暗視野).
眼杯内層において水晶体側により強い発現を認める. ふ卵 2.5 日と比べ, 頭部間葉組織における発現が腹側に移動している. $\times 20$

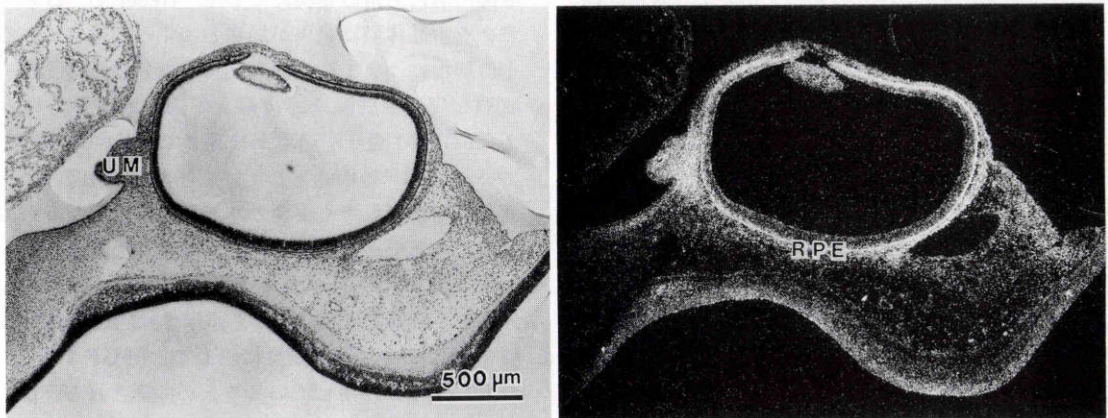


図 4 ふ卵約 4 日のニワトリ胚頭部横断面 (左: 明視野, HE 染色 右: 暗視野).
眼周囲と上顎突起 (UM) に強い発現を認める. 暗視野での網膜色素上皮 (RPE) の白い粒子は色素顆粒による粒子である. $\times 20$

顎突起, 下顎弓, 耳胞, 髄脳も示されているが, これらの部位には発現が少なかった.

ふ卵 3.5 日頃より眼杯外層に色素が出現し始め, ふ卵 4 日以降は, 暗視野では色素とハイブリダイゼー

ションの銀粒子とは混同されやすいが, 明視野強拡大で検鏡すれば識別可能である. ふ卵 3.5 日では (図 3), 頭部間葉組織において, ふ卵 2.5 日と比べ発現が腹側に移動しており, 眼杯の腹側の間葉組織, 上顎突起,

下顎弓に発現が見られた。眼杯外層、内層、水晶体の細胞には引き続き発現を認め、眼杯内層においては、視神経側より水晶体側に銀粒子の集積を顕著に認めた。

ふ卵4日(図4)では、眼杯内層の水晶体側における局在がより顕著になり、頭部間葉組織においては眼周囲、上顎突起に局在がみられた。

ふ卵5.5日では、水晶体側の眼杯内層にはFGFR1遺伝子の発現を認めたが、視神経側になるに従い発現がほとんどみられなくなった。頭部間葉組織においては、眼周囲に弱い発現がみられた。

IV 考 按

1. FGFRのリガンドについて

現在までにFGFファミリーは7種、FGFRは哺乳類では4種⁵⁾、ニワトリでは3種⁶⁾存在することが知られている。リガンドであるFGFとFGFRとの対応は一对一ではなく、一種のFGFRは複数のFGFと結合することが明らかにされている。FGFR1は少なくともbFGF, acidic FGF(aFGF), FGF4に結合しうることが報告されており⁵⁾、これらのFGFファミリーが眼の発生分化に関与していることが示唆された。

2. 眼発生におけるFGFの標的細胞について

胚発生におけるFGFR1遺伝子の発現パターンについて、Heuerら¹¹⁾はニワトリ胚を用いて、Wanakaら¹²⁾はラット胚を用いて研究している。両者とも、FGFR1遺伝子が発生途上の神経系に広く発現していることを報告している。特にHeuerらは眼の網膜について詳細な検討を行っているが、他の眼組織におけるFGFR1遺伝子の発現パターンについては詳細に検討されていない。そこで筆者は、網膜以外の眼組織においてもFGFR1遺伝子の発現パターンを詳細に検討した。その結果、神経網膜、RPE、水晶体における発現は彼らの結果と一致していた。ところが、彼らは着目していなかったが、FGFR1遺伝子は眼周囲の間葉組織にも強く発現していた。また、その発現部位の変移を検討してみると非常に複雑で、初期には背側の頭部間葉組織にびまん性に発現していたが、その後、発現が腹側に移動し顎部の間葉組織にも発現がみられた。更に発生が進むと、眼周囲や顎部の突起に発現が局在していた。以上の結果よりFGFR1およびそのリガンドは、ニワトリ胚の眼において、将来神経網膜、RPE、水晶体となる組織だけでなく中胚葉や神経堤由来の眼組織や顔面の形態形成に関与していることが推

察される。したがって眼発生期のFGFファミリーの標的細胞は、神経外胚葉、表皮外胚葉、中胚葉、神経堤由来の細胞であることが明らかになった。

3. 眼の発生分化におけるFGF, FGFRの役割について

ふ卵3.5日より眼杯内層におけるFGFR1遺伝子の発現が一様でなくなり、水晶体側により顕著な発現がみられた。発生がすすむに従い、水晶体にいちばん近い眼杯内層からは虹彩毛様体上皮が分化し、他の大部分の眼杯内層から分化する神経網膜においても視細胞の構成など前眼部(水晶体側)網膜と後極部(視神経側)網膜とでは性質を異にするようになる。このような“位置”による細胞の分化の違いは位置情報という概念で解釈されている¹³⁾。位置情報は、3次元座標として細胞に与えられ、背腹軸、前後軸、遠近軸(眼球の場合、放射軸)の3軸によって決定されるとされている¹³⁾。水晶体側か、視神経側かによる眼杯内層の分化の違いは、鼻・側頭軸(前後軸)にそった細胞の分化様式の違いととらえることができ、網膜ではこの前後軸が初めに決定される¹⁴⁾。今回の筆者の結果より、ニワトリ胚ではふ卵3.5日で眼杯内層の前後軸が決定され始め、FGFR1のリガンド、すなわち少なくともbFGF, aFGFやFGF4がこの前後軸の決定に関与しているのではないかと考えられる。FGFR1遺伝子の眼杯内層における発現について、Heuerら¹¹⁾はふ卵4日より水晶体側に発現が局在してくると述べている。その理由について、後極部網膜から分化が始まり、未成熟な周辺部網膜ほど後期まで細胞増殖しているため、FGFR1遺伝子発現が後期まで残存すると考察している。FGFの機能として、細胞増殖の調節という側面はいうまでもなく重要であるが、未分化な細胞に位置情報をあたえる因子である可能性も示唆される。

ところで、今回の結果よりニワトリ胚のRPEにFGFR1が発現していることが示され、RPEの神経網膜や水晶体への分化転換に際して、bFGFがRPE上のFGFR1に作用していることが推察される。しかしながら、FGFR2もbFGFと高親和性で結合することが知られ⁵⁾、FGFR2がRPEに存在するならばFGFR2を介する作用であることも考えられる。最近Guillemotら¹⁵⁾は、aFGFがbFGFより強力にRPEに網膜特異抗原の発現を誘導すると報告しており、aFGFもFGFR1に作用している可能性がある。もっとも、aFGFのレセプターにはFGFR1以外に角化細胞増殖因子レセプター(keratinocyte growth factor

receptor, KGFR)およびFGFR 4があり⁵⁾, これらのFGFR サブタイプのRPEにおける発現の有無も検討する必要がある。

稿を終えるにあたり, 御指導と御校閲を賜りました松尾信彦教授に深謝致します。また, 本研究にあたり終始激励いただいた白神史雄講師, 松尾俊彦講師, 直接御指導いただいた徳島大学工学部生物工学科野地澄晴教授, 岡山大学歯学部口腔生化学教室谷口茂彦教授および西川 清大学院生, 同歯科麻酔室小山英樹助手, 同第二保存学教室明貝文夫大学院生, 川崎医科大学薬理学教室濃野 勉助手に御礼申し上げます。

本論文の要旨は第8回国際眼研究会議日本部会で発表した。

文 献

- 1) Green JBA, Smith JC: Growth factors as morphogen. Trends Genet 7: 245—250, 1991.
- 2) Park CM, Hollenberg MJ: Basic fibroblast growth factor induces retinal regeneration *in vivo*. Dev Biol 134: 201—205, 1989.
- 3) Jones CPM, Reh TA: Basic fibroblast growth factor induces retinal pigment epithelium to generate neural retina *in vitro*. Development 113: 577—588, 1991.
- 4) 阿形清和, 江口吾朗: 分化転換の分子機構. 村松 喬, 他(編): 実験医学増刊, 第9巻, 第7号, 羊土社, 東京, 686—691, 1991.
- 5) 服部 豊: ヘパリン結合性増殖因子受容体(FGF受容体)の構造と機能. 寺田雅昭, 他(編): 実験医学, 第10巻, 第1号, 羊土社, 東京, 25—31, 1992.
- 6) 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.
- 7) Pasquale EB: A distinctive family of embryonic protein-tyrosine kinase receptors. Proc Natl Acad Sci USA 87: 5812—5816, 1990.
- 8) Pardue ML: *In situ* hybridization. In: Hames BD, et al (Eds): Nucleic Acid Hybridization. IRS Press, Oxford, 179—202, 1985.
- 9) Freeman WH, Bracegirdle B: An Atlas of Embryology. 3rd ed, Heinemann Educational Books, London, 43—83, 1982.
- 10) Hamburger V, Hamilton HL: A series of normal stages in the development of the chick embryo. J Morph 88: 49—92, 1951.
- 11) Heuer JG, von Bartheld CS, 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.
- 12) Wanaka A, Milbrandt J, Johnson EM: Expression of FGF receptor gene in rat development. Development 111: 455—468, 1991.
- 13) Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD(著), 中村桂子, 松原謙一(監修): 細胞の分子生物学, 2版, 教育社, 東京, 911—920, 1990.
- 14) Carlson BM(著), 白井敏雄(監訳): パッテン発生学, 5版, 西村書店, 新潟, 355—368, 1990.
- 15) 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.