

ニワトリ胚網膜色素上皮に発現する線維芽細胞増殖因子レセプター遺伝子

—第2報 In situ hybridization 法による検討—

藤原 美樹

岡山大学医学部眼科学教室

要 約

眼発生過程において、網膜色素上皮に発現する線維芽細胞増殖因子レセプター(FGFR)遺伝子のサブタイプに変化があるか否か、ニワトリ胚を用いて cek 1, cek 2, cek 3 遺伝子および網膜色素上皮からクローニングした新しい FGFR 遺伝子(chick pigment epithelium derived FGFR, CPE-FGFR)の発現を in situ hybridization 法により検討した。ふ卵3日、4日、5.5日の網膜色素上皮には cek 1, CPE-FGFR 遺伝子は発現していたが、cek 2, cek 3 遺伝子の発現はほとんど認められなかった。ふ卵7日、9日の網膜色素上皮には4種類すべての FGFR 遺伝子が発現していた。CPE-FGFR 遺伝子

は発生初期のニワトリ胚に広く発現しており、網膜色素上皮に特異的に発現する FGFR 遺伝子ではなかった。眼発生の時期により網膜色素上皮に発現する FGFR のサブタイプが異なることから、線維芽細胞増殖因子は FGFR の発現を調節することにより網膜色素上皮の分化に関与している可能性が示唆された。(日眼会誌 98: 630—635, 1994)

キーワード: FGF レセプター, In situ hybridization, 網膜色素上皮, ニワトリ胚

Analysis of Fibroblast Growth Factor Receptor Genes Expressed
in the Retinal Pigment Epithelium of Chick Embryos
by In Situ Hybridization

Miki Fujiwara

Department of Ophthalmology, Okayama University Medical School

Abstract

To study the expression pattern of fibroblast growth factor receptor (FGFR) genes cek 1, cek 2, cek 3, and a novel FGFR (chick pigment epithelium derived FGFR, CPE-FGFR) in the retinal pigment epithelium (RPE) during chick eye development, in situ hybridization was performed on sections of chick embryos. cek 1 and CPE-FGFR were expressed, but neither cek 2 nor cek 3 were expressed in 3-day, 4-day, or 5.5-day chick embryonic RPE. Four subtypes of FGFR were expressed in 7-day and 9-day chick embryonic RPE. CPE-FGFR was expressed

not only in RPE but also in whole embryos. The differential expression of FGFR subtypes in RPE at different stages suggests the possibility that FGFs influence the differentiation of RPE through the control of FGFR expression. (J Jpn Ophthalmol Soc 98: 630—635, 1994)

Key words: FGF receptor, In situ hybridization, Retinal pigment epithelium, Chick embryo

I 緒 言

眼組織では、さまざまな細胞成長因子が産生分泌されていることが知られている。その一つである線維芽細胞

増殖因子(fibroblast growth factor, FGF)は眼内の増殖性変化のみならず、水晶体や神経網膜の再生や脱分化の過程に関与しているといわれ、眼組織の形態形成に重要な役割を担っていると考えられている¹⁾。その受容体

別刷請求先: 700 岡山県岡山市鹿田町2-5-1 岡山大学医学部眼科学教室 藤原 美樹
(平成5年12月21日受付, 平成6年2月22日改訂受理)

Reprint requests to: Miki Fujiwara, M.D. Department of Ophthalmology, Okayama University Medical School,
2-5-1 Shikata-cho, Okayama-shi, Okayama-ken 700, Japan

(Received December 21, 1993 and accepted in revised form February 22, 1994)

である FGF レセプター (FGFR) 遺伝子は現在までに 4 種類がクローニングされ、発生期の両生類、鳥類、哺乳類の眼を含めた脳神経系に広く発現していることが知られている²⁾³⁾。網膜色素上皮においても、鳥類、哺乳類で FGFR 1 遺伝子の存在が確かめられているが⁴⁾⁵⁾、網膜色素上皮に発現している FGFR 遺伝子のサブタイプについての詳細な検討はされていない。前報⁶⁾で著者は、reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)法を用いてニワトリ胚網膜色素上皮に発現する FGFR 遺伝子のサブタイプを検討し、ニワトリ 7.5 日胚には cek 2 (FGFR 3), cek 3 (FGFR 2) および今までの報告にはない新しい FGFR 遺伝子 (chick pigment epithelium derived FGFR, CPE-FGFR) が発現していることを報告した。そこで、今回著者は眼発生過程において網膜色素上皮に発現する FGFR 遺伝子のサブタイプの種類に変化があるか否か、ニワトリ胚を用いて cek 1 (FGFR 1), cek 2 (FGFR 3), cek 3 (FGFR 2), CPE-FGFR 遺伝子の発現を in situ hybridization 法により検討した。

II 実験方法

1. 組織切片の作製

実験動物にはニワトリ (white leghorn) 胚ふ卵 1 日、1.5 日、2.5 日、3 日、4 日、5.5 日、7 日、9 日を使用した。

各々 4% パラホルムアルデヒドで 4℃ 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, $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ free phosphate buffer saline, 以下 PBS (-)) で洗浄し、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。0.05% ポリリジン (poly-L-lysine, Sigma 社, MW. 30 万) で、表面を処理したスライドガラス上に 5 μm 厚の連続切片を作製した。

2. リボプローブの調整

リボプローブの鋳型となる cek 1, cek 2, cek 3 の相補的 DNA (cDNA) 断片は、ニワトリ 3 日胚 cDNA ライブラリー (川崎医科大学、濃野勉博士から供与) から前報⁶⁾の混合プライマーを用いて PCR 法により得た。CPE-FGFR については、前報⁶⁾で得られた cDNA を使用した。

各々の cDNA を鋳型にして RNA 合成酵素 (SP 6, T7 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⁷⁾により合成した。合成された RNA にアルカリ加水分解溶液 (40 mM 炭酸水素ナトリウム, 60 mM 炭酸ナトリウム, pH 10.2) を加え 60℃ でインキュベートし、約 150 塩基に分解しプローブとして使用した。

3. In situ hybridization 法

前述のように調整した組織切片をキシレンで脱パラフィンし、エタノール系列で親水し、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後、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、50% ホルムアミド, 2 $\times$ SSC, 10 mM dithiothreitol (DTT) 溶液中で 50℃ 1 時間プレハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション混合液 (2 $\times$ SSC, 10 mM DTT, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ yeast transfer RNA, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ sonicated salmon sperm DNA, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 牛血清アルブミン, 10% dextran sulfate, 50% ホルムアミド) を調整し、50,000 dpm/ μl リボプローブを加え、切片上に滴下し 50℃ 16 時間ハイブリダイゼーションを行った。

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ナトリウム) 中 37℃ で RNA 分解酵素 (RNaseA 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 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、現象、ヘマトキシリン・エオジン染色し、暗視野、明視野で検鏡した。

III 結果

1. 網膜色素上皮における FGFR 遺伝子の発現

すべての切片において、センスプローブによる in situ hybridization 法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を報告する。また、今回用いた cek 1, cek 2, cek 3, CPE-FGFR プローブは各々クロスハイブリダイズしないことを確認した。

眼の発生は胚発生のきわめて初期から始まり、ふ卵約 3.5 日ではほぼ眼のおおまかな構造が形成される。ふ卵 3 日 (図 1) では既に眼杯が完成しているが、眼杯外層にはまだ色素は認められない。ふ卵 3 日では cek 1 遺伝子、CPE-FGFR 遺伝子は眼杯外層、眼杯内層および眼杯周囲間葉組織にびまん性に発現していた。一方、cek 2 遺伝子は眼杯および周囲間葉組織においてはほとんど発現は認められなかった。cek 3 遺伝子は眼杯周囲の間葉組織に顕著にシグナルの集積を認めたが、眼杯には有意なシグナルは検出されなかった。したがって、ふ卵 3 日では将来網膜色素上皮層を形成する眼杯外層には cek 1, CPE-FGFR 遺伝子は発現しているが、cek 2, cek 3 遺伝子の発現はほとんど認められなかった。

ふ卵 3.5 日になると、眼杯外層に色素が産生されてくるため、暗視野では色素粒子と in situ hybridization の銀粒子とは混同されやすいが、明視野強拡大での検鏡で識別可能である。ふ卵 4 日、ふ卵 5.5 日の網膜色素上皮

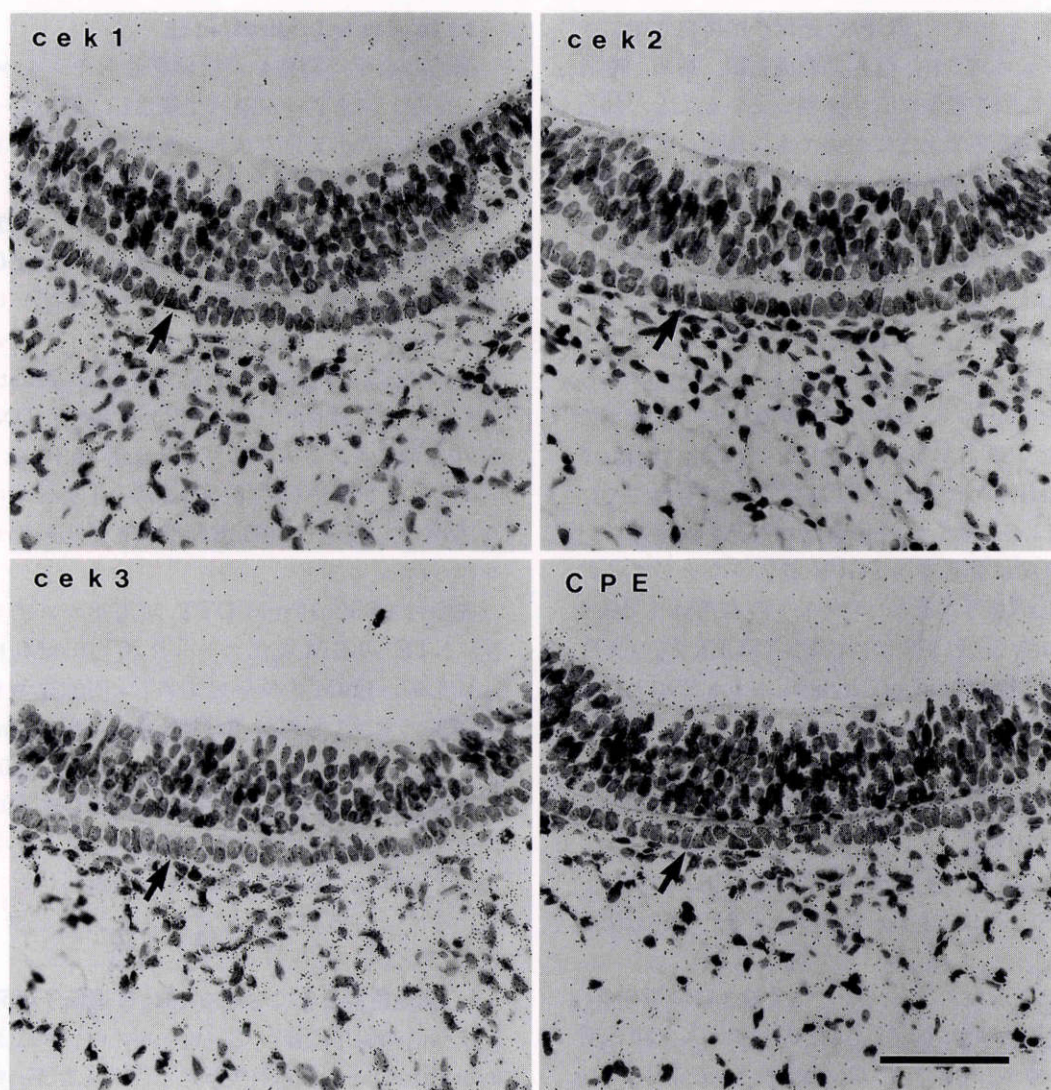


図1 ふ卵3日のニワトリ胚眼組織における cek 1, cek 2, cek 3, CPE-FGFR (CPE) 遺伝子の発現。
(明視野強拡大, HE 染色)

将来網膜色素上皮層を形成する眼杯外層(矢印)に cek 1, CPE-FGFR 遺伝子の発現を認めるが, cek 2, cek 3 遺伝子はほとんど発現していない。

CPE-FGFR: chick pigment epithelium derived FGFR. バーは 50 μ m

では cek 1, CPE-FGFR 遺伝子の発現を認めたが, cek 2, cek 3 遺伝子の発現はほとんど認めなかった。

ふ卵7日(図2)になると, 神経網膜, 網膜色素上皮, 脈絡膜に cek 1, cek 2, cek 3, CPE-FGFR の4種類すべての遺伝子がびまん性に発現していた。ふ卵9日でも網膜色素上皮に4種類すべての遺伝子の発現を認めた。

このように, 胚発生の時期によって網膜色素上皮に発現する FGFR 遺伝子のサブタイプは異なっていた(表1)。

2. CPE-FGFR 遺伝子の発現

CPE-FGFR 遺伝子は, ふ卵1日, 1.5日では胚全体に一樣に強い発現を認めた。ふ卵2.5日(図3)では眼杯外層, 眼杯内層, 水晶体胞, 眼杯周囲間葉組織, 間脳神経上皮, 表皮外胚葉に多くの発現を認めたが, 局在性は認められなかった。

表1 ニワトリ胚網膜色素上皮における線維芽細胞増殖因子レセプター遺伝子の発現

	cek 1	cek 2	cek 3	CPE-FGFR
3 日	+	—	—	+
4 日	+	—	—	+
5.5 日	+	—	—	+
7 日	+	+	+	+
9 日	+	+	+	+

+: 発現している。—: ほとんど発現していない。

ふ卵4日(図4)になると, 眼杯周囲の間葉組織ではふ卵2.5日に比べ, 眼杯背側に銀粒子の集積を顕著に認め, 発現が背側に移動する傾向が見られた。眼杯, 水晶体細胞, 表皮外胚葉では引き続き発現を認めたが, 眼杯内層においては視神経側(posterior)で発現が弱く, 水

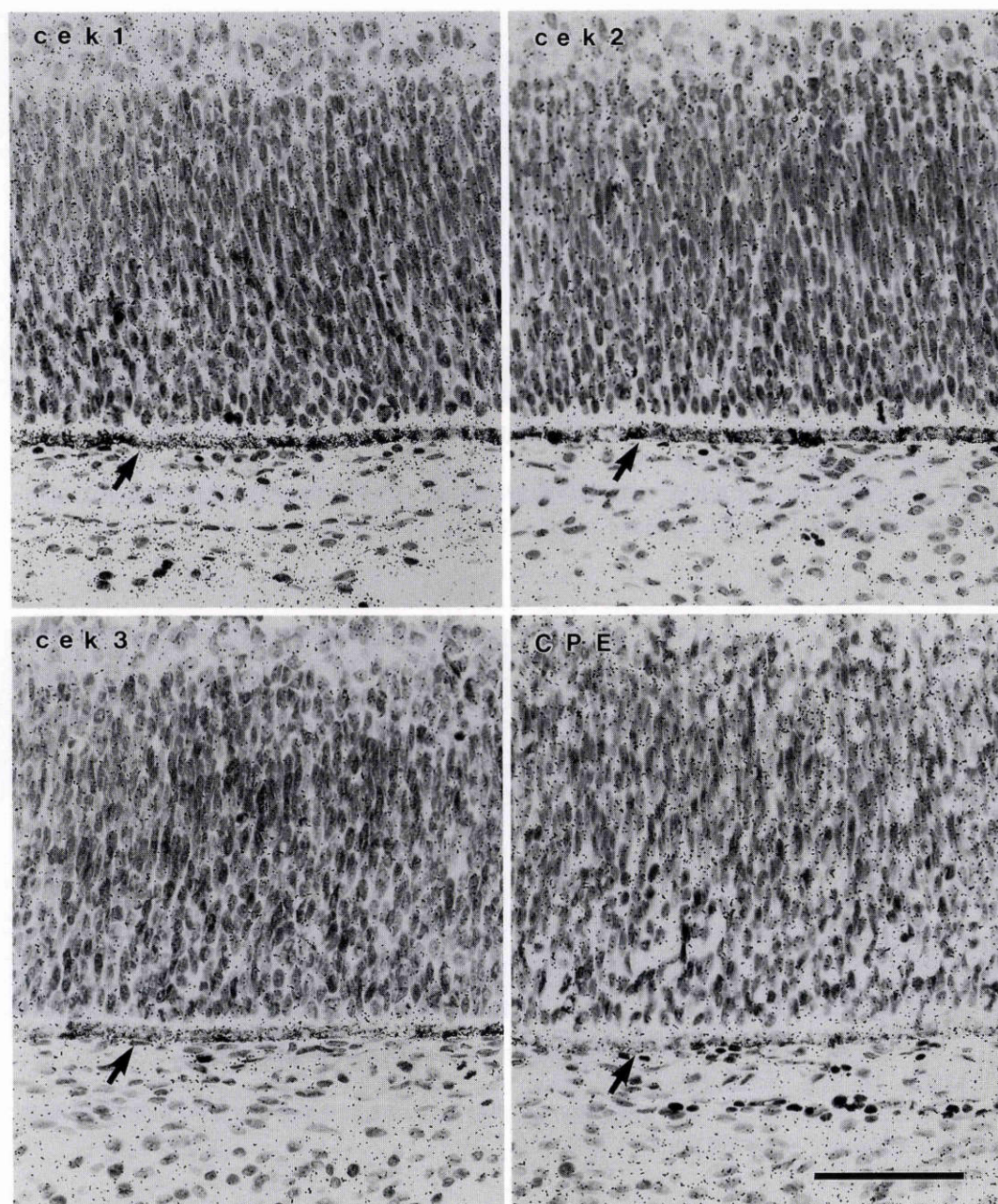


図 2 ふ卵 7 日のニワトリ胚眼組織における cek 1, cek 2, cek 3, CPE-FGFR (CPE) 遺伝子の発現。

(明視野強拡大, HE 染色)

神経網膜, 網膜色素上皮 (矢印), 脈絡膜にびまん性に cek 1, cek 2, cek 3, CPE-FGFR 遺伝子の発現を認める。バーは 50 μ m

晶体側 (anterior) できわめて強く発現する傾向が認められた。

ふ卵 5.5 日以降では発現は弱くなり, ふ卵 7 日, ふ卵 9 日 (図 5) では一様に弱く発現し, 明らかな局在性は認められなかった。

IV 考 按

1. 網膜色素上皮に発現する FGFR のサブタイプについて

近年, 網膜色素上皮からの網膜再生に FGF や transforming growth factor type β (TGF- β) をはじめとす

る細胞成長因子の関与が指摘されている¹⁾。Park ら⁷⁾は, ふ卵 4 日のニワトリ胚で網膜色素上皮が basic FGF (bFGF) の存在下で神経網膜へ分化転換したと報告している。一方, 阿形ら⁸⁾は, ふ卵 9 日のニワトリ胚で網膜色素上皮が bFGF の存在下で水晶体細胞への分化転換することを報告している。つまり, bFGF は胚発生の異なった時期の網膜色素上皮に作用することにより神経網膜や水晶体細胞へ別々の分化転換を誘導したことになる。

今回著者は, 胚発生の時期によって網膜色素上皮に発現する FGFR 遺伝子のサブタイプの種類に違いがあるか in situ hybridization 法により検討した。ふ卵 3 日,

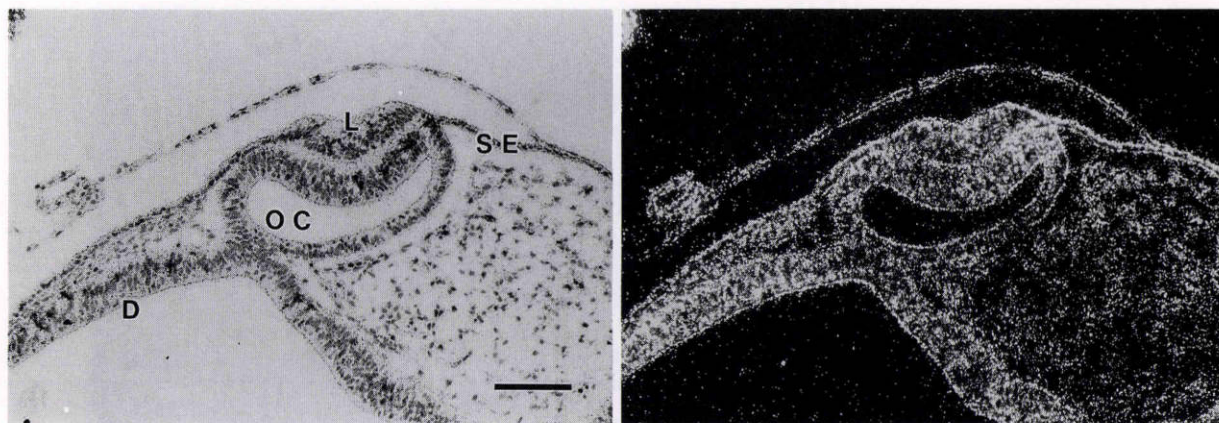


図3 ふ卵2.5日のニワトリ胚頭部横断面における CPE-FGFR 遺伝子の発現.

(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), 眼杯周囲間葉組織, 表皮外胚葉 (SE), 間脳の神経上皮 (D) に白い銀粒子の集積を認め CPE-FGFR 遺伝子が発現している. パーは 100 μ m

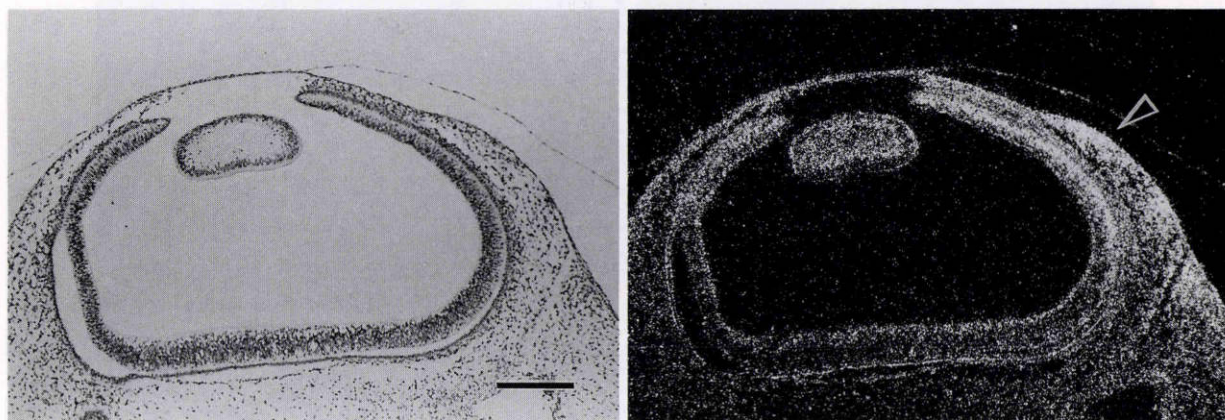


図4 ふ卵4日のニワトリ胚眼組織における CPE-FGFR 遺伝子の発現.

(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. 眼杯背側の周囲間葉組織 (矢じり) に銀粒子が集積し発現に局在を認める. パーは 100 μ m

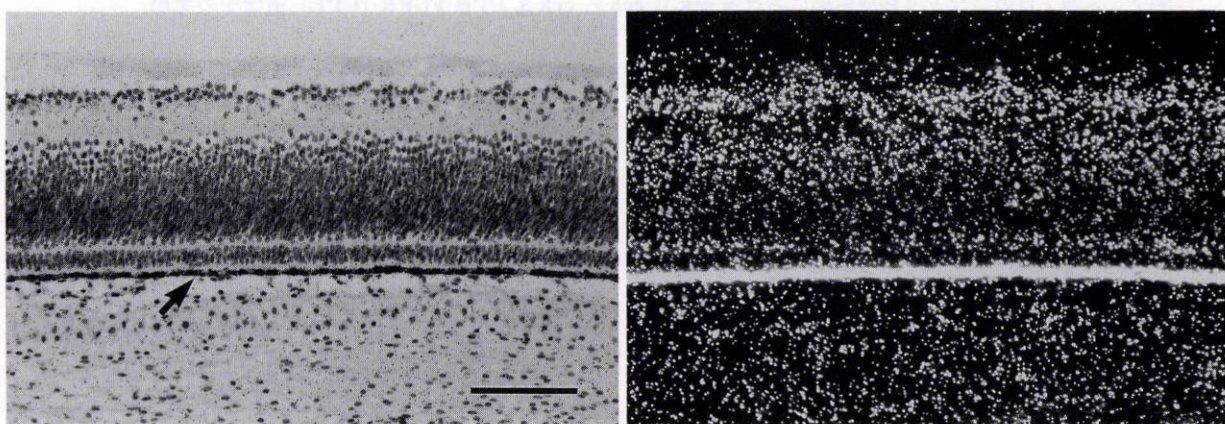


図5 ふ卵9日のニワトリ胚眼組織における CPE-FGFR 遺伝子の発現.

(左:明視野, HE 染色, 右:暗視野)

CPE-FGFR 遺伝子がびまん性に発現している. 網膜色素上皮層 (矢印) の暗視野での白い粒子は色素顆粒による粒子である. パーは 100 μ m

4日, 5.5日の網膜色素上皮にはcek 1, CPE-FGFR 遺伝子が発現していたが, cek 2, cek 3 遺伝子の発現はほとんど認められなかった。ふ卵7日, 9日の網膜色素上皮では4種類すべてのFGFR 遺伝子が発現しており, 胚発生の時期により網膜色素上皮に発現するレセプターのサブタイプは異なることが確認できた。

FGFR のリガンドであるFGF は現在までに9種類が報告され, FGF とFGFR は1対1の対応ではなく, 多対多対応をなして結合することが明らかとなっている。bFGF はcek 1, cek 3 と高親和性で結合することが知られている²⁾。したがって, ふ卵4日の網膜色素上皮ではcek 1 を介して作用し, ふ卵9日の網膜色素上皮ではcek 1, cek 3 両者を介して作用し, 別々の分化転換を誘導したと考えられる。このようにFGF は, 眼発生の過程において発現するレセプターのサブタイプの種類を調節することにより, 網膜色素上皮の分化をはじめ眼の形態形成に関与している可能性が示唆された。

2. CPE-FGFR 遺伝子の発現パターンについて

CPE-FGFR はニワトリふ卵7.5日胚網膜色素上皮からクローニングした新しいFGFR で, アミノ酸レベルではイモリのPFR 4 と最も高い相同性を認め, ニワトリにおけるFGFR 4 である可能性があることを前報⁹⁾で報告した。イモリのFGFR 4 であるPFR 4 はノーザンブロット法による検討で, 原腸胚外胚葉, 尾芽胚の神経組織に主に発現していることが報告されている⁹⁾。一方, マウスのFGFR 4 の発現パターンはStark ら¹⁰⁾により *in situ hybridization* 法を用いて検討されているが, 骨, 横紋筋などの中胚葉, 肝, 肺などの内胚葉に発現し, 脳における発現はなかったと報告されている。CPE-FGFR 遺伝子は発生初期の眼杯, 水晶胞体といった神経外胚葉, 表皮外胚葉由来の眼組織および周囲間葉組織に強く発現し, 胚発生が進むにつれ発現が弱くなる傾向があった。CPE-FGFR は網膜色素上皮からクローニングされた遺伝子であるが, 網膜色素上皮に特異的に発現するわけではなかった。このように, その胚発生期における発現パターンからもCPE-FGFR はイモリのPFR 4 により近縁であると考えられる。FGFR 1 遺伝子, FGFR 2 遺伝子の発現については大内¹¹⁾¹²⁾が以前ニワトリ胚で報告しているが, CPE-FGFR 遺伝子の発現パターンはFGFR 1 の発現パターンと比較的似ていた。大内は, FGFR 1 は3.5日から水晶胞体の眼杯内層に発現が偏り, 眼形成過程において前後軸の決定に関与していると考察しているが, CPE-FGFR 遺伝子もほぼ同時期(ふ卵4日)に眼杯内層において水晶胞体側へ発現の局在を認めた。したがって, CPE-FGFR もFGFR 1 とともに前後軸の決定に関与している可能性がある。また, ふ卵4日でFGFR 1 遺伝子が眼杯腹側の間葉組織に発現が強くなるのに対し, CPE-FGFR 遺伝子は眼杯背側の間葉組織に発現が強く

なり, 眼形成過程における発現に違いが認められ, 相補的な役割が示唆された。CPE-FGFR 遺伝子については全長のクローニングを含め, 今後さらに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。

本論文要旨は第97回日本眼科学会総会で発表した。

本論文は岡山大学審査学位論文である。

文 献

- 1) 篠崎尚史, 平形明人: TGF- β と網膜. 宮園浩平, 他(編): 実験医学増刊, 第10巻, 第15号, 羊土社, 東京, 1877—1885, 1992.
- 2) 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.
- 3) 和中明生, 塩坂貞夫: FGF レセプターと神経系の分化. 遠山正彌, 他(編): 細胞工学, 11: 315—322, 秀潤社, 東京, 1992.
- 4) Heuer JG, 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.
- 5) Wanaka A, Milbrandt J, Johnson EM: Expression of FGF receptor gene in rat development. *Development* 111: 455—468, 1991.
- 6) 藤原美樹: ニワトリ胚網膜色素上皮に発現する線維芽細胞増殖因子レセプター遺伝子. 第1報. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法による検討. 日眼会誌 98: 625—629, 1994.
- 7) Park CM, Hollenberg MJ: Basic fibroblast growth factor induces retinal regeneration *in vivo*. *Dev Biol* 134: 201—205, 1989.
- 8) 阿形清和, 江口吾朗: 分子転換の分子機構. 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.
- 9) Shi DL, Feige JJ, Riou JF, Desimone DW, Boucaut JC: Differential expression regulation of two distinct fibroblast growth factor receptors during development of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. *Development* 116: 261—273, 1992.
- 10) Stark KL, McMahon JA, McMahon AP: FGFR-4, a new member of the fibroblast growth factor family, expressed in the definitive endoderm and skeletal muscle lineages of the mouse. *Development* 113: 641—651, 1991.
- 11) 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, 1992.
- 12) 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, 1992.