

# 新しい分泌因子Kielinによる眼発生制御 の分子解析

Molecular Regulation of Eye-Forming Field

by a Novel Secreted Factor Kielin

○笹井 芳樹

○Yoshiki SASAI

京都大学再生医科学研究所

Kyoto University

By signal peptide selection screening, we isolated a novel secreted factor, Kielin, which contains multiple cys-rich repeats similar to those in Chordin (Chd). Expression of *Kielin* starts at mid-gastrula stages in the notochord and is detected in the floor plate of neurula embryos. *Kielin* is induced in mesoderm and in ectoderm by nodal-related genes. *Chd* is sufficient to activate *Kielin* expression in mesoderm while *Shh* or *HNF3 $\beta$*  in addition to *Chd* is required for induction in ectoderm. *Kielin* has a distinct biological activity from that of *Chd*. Injection of *Kielin* mRNA causes dorsalization of ventral marginal zone explants and expansion of *MyoD* expression in neurula embryos. Kielin is a new signaling molecule that mediates inductive activities of the embryonic midline. We have also isolated a novel dorsalizing factor of the anterior CNS, *Xenopus Tiarin*, which belongs to the Olfactomedin-related family. Expression starts at the late gastrula stage in the non-neural ectoderm adjacent to the anterior neural plate. In the eye-forming field, *Tiarin* overexpression induces the retinal markers Rx and Pax6 and represses optic stalk markers.

## 1. 研究目的

本研究は我々の研究室で単離された新しい分泌性の細胞分化制御因子の作用機序を明らかにし、その活性の一つとしての眼発生への影響を分子レベルで明らかにすることにある。近年、発生学の研究に分子生物学の方法が導入されたことにより様々な組織・器官の分化制御因子が明らかになりつつある。眼の発生は実験発生生物学の最も好まれた対象の一つで、日本での江口・岡田博士らによる両性類を用いた再生実験は世界的な古典と言われている。このように眼の発生制御については多くの生物学的知

見が得られてきたが、これには複雑な組織相互作用が関わっていることが明らかになった。一方、眼の発生のスイッチを入れる転写因子が最近明らかになってきた。その典型例がPax6でこの遺伝子の欠損はマウスにおいて眼の発生を著しく障害する。面白いことにショウジョウバエのPax6に対応する遺伝子も眼の発生に必須であることが証明された。このようにPax6は眼の発生の初発段階を制御するスイッチであることが明らかになったが、では「なぜPax6が眼を発生する位置を含む一部の組織にしか発現しないか」の機序については未だに不明で

ある。この質問はどのようにして眼が正しい位置につくられるのかという古典的な問いに迫るものである。当研究室では中枢神経系に発現する神経の分泌性因子をシグナルペプチド選択法によって遺伝子スクリーニングし、複数の新規因子を単離した。そのうち新しい因子Kielinは、以前に申請者が発見した神経分化誘導因子 Chordinとよく似た分子構造をしていることがわかった。また、さらにスクリーニングを進める中で新規分泌因子Tiarinも単離された。本研究ではKielinなどの分泌因子による発生制御機構をとくに眼の発生を中心に明らかにし、上記の発生生物学の古典的問題への答えを探るとともに、その研究より眼の再生（レンズ、網膜）の人為的制御への医学応用の可能性を追及する。

## 2. 研究経過

眼の発生研究は長い歴史を有しており、その中で日本人の貢献は大きなものがある。最近では江口、小阪らのグループは両生類や魚類の一部にのみ知られていた眼組織の再生力（レンズや網膜組織を生む力）が、試験管内の培養系ではニワトリや哺乳類においても認められることを明らかにしている。一方、眼の組織発生を制御する核内因子はPax6、Six3、Sox2、Lmafなどが単離され、P.Gruss, W. Gehringなどの外国での仕事に加え、日本でも近藤、安田、大隅博士らが大きく貢献している。しかし、これらの因子の上流における制御因子は国内外とも未だ研究が進んでおらず、唯一sonic hedgehog因子の欠損が単眼症を引き起こすことがわかっているのみである。そこで、眼発生の制御の上流因子を問うべく、下記の研究を行った。

### 2. 1 新規分泌因子Kielinの単離と解析

細胞間の相互作用によって網膜などの中枢

神経系領域を規定する因子は分泌性因子または膜タンパクであることが考えられる。そこで初期神経板で働く領域特異的分泌タンパクを系統的にシグナル・ペプチド・セレクション法とin situ hybridizationによって用いて、初期神経板の領域で発現する分泌因子を単離した。これによりまず新規の分泌因子Kielinを単離に成功した。これは脊索・底板に早期から発現する新しい胚のパターン形成因子であることが明らかになり、アフリカツメガエルの系を用いて、解析を行った。

### 2. 2 新規分泌因子Tiarinの単離と解析

初期神経板で働く領域特異的分泌タンパクをさらに系統的に単離するため、シグナル・シーケンス・トラップ法に神経特異的遺伝子のためのデイファレンシャル・スクリーニングを組み合わせることによって、神経管の背側に位置する非神経外胚葉に早期から発現する新規の分泌因子Tiarinを単離に成功した。これをアフリカツメガエルの系を用いて、解析を行った。

### 2. 3 Tiarinの眼発生に対する効果の解析

新規の分泌因子Tiarinの眼原基発生に対する効果をアフリカツメガエルの系において、眼特異的マーカー遺伝子を用いて解析した。

### 2. 4 ES細胞からの網膜分化誘導

ES細胞を用いて、これを高効率に中枢神経系細胞に分化させることを試みた。そのために共培養系を用いて、分化誘導活性をスクリーニングした。さらにそれらの細胞から網膜組織の分化を解析した。

## 3. 研究成果

### 3. 1 新規分泌因子Kileinの単離と解析

Kielinをアフリカツメガエル胚で強制発現したところ、中胚葉の背側化、異所性のNCAMの発現誘導、Pax6の中脳での異所性発現誘導が認められた。中胚葉の背側化活性は単離した中胚葉前駆組織でも認められた。

### 3. 2 新規分泌因子Tiarinの単離と解析

アフリカツメガエルの初期胚での強制発現では、神経管の腹側の分化を抑制し、背側の分化を促進することが明らかとなった。過剰発現実験では神経管の背腹軸に沿った神経パターン形成因子として、領域化に関与していることが強く示唆された。Tiarinの強制発現は腹側の神経管のマーカーの発現を強く抑制し、逆に背側の神経管のマーカーの発現を強く誘導した。さらにSHHの腹側化活性に強く拮抗した。Tiarinは神経管の背腹軸の位置情報を与える新規の分泌シグナルであると考えられた。

### 3. 3 Tiarinの眼発生に対する効果の解析

Tiarinを強制発現したアフリカツメガエル胚において、眼発生への影響を分子マーカーを用いて解析したところ、網膜でのRx, Pax6発現は誘導がかかり、一方、眼柄マーカーであるPax2, Vax2などは強く抑制がかかることが明らかとなった。このことは上記のShhとの拮抗関係とよく整合性を持ち、Shhの各マーカーへの影響と反対の活性を有することが判明した。このことは、網膜から眼柄という眼原基内の極性の決定にTiarinが重要な役割を果たしていることを示唆する。

### 3. 4 ES細胞からの網膜分化誘導

以前にアフリカツメガエルを用いて、その未分化胚性細胞から神経前駆細胞を分化誘導する因子（神経誘導因子）としてChordinを単離していたが、アフリカツメ

ガエルとは異なり、マウスのES細胞の場合BMP4の不活性化だけでは効率の良い神経分化は得られなかった。そこでBMP4非存在下に無血清培地でES細胞を培養する系を開発し、これを用いて様々な株化細胞、初代培養細胞とES細胞との共培養にして神経分化誘導活性を探索した。その結果、ある種の間葉系細胞（ストローマ細胞）にES細胞の試験管内神経分化をサポートする活性があることを発見した。特にPA6細胞ではその活性は強く、誘導条件では90%以上の細胞を神経細胞または神経前駆細胞に分化させた。我々はこのストローマ細胞による神経誘導活性をSDIA(Stromal cell-Derived Inducing Activity)と呼び、このSDIAを用いてES細胞の試験管内分化制御を解析した。SDIAはストローマ細胞の表面に蓄積する活性で、予備的なデータからは一旦細胞から分泌されたのち細胞表面のプロテオグリカンに結合する可能性が高いことも明らかになった。この系をサルES細胞に適用したところ、3週間の培養で数%のコロニーに網膜色素上皮細胞が分化してることが確認された。形態的な解析に加え、Pax6の発現からもこのことが示唆された。

## 4. 今後の課題と発展

KielinやTiarinの胚発生での役割をさらに詳細に解析するためには、遺伝子破壊法による機能喪失実験が重要である、そのためマウスのKielinやTiarinを単離し、現在ノックアウトマウスの作成を進めている。

また、サルのES細胞から網膜色素上皮細胞の分化誘導に成功したことは、網膜疾患に対する移植療法の可能性を開くものである。たとえば、常染色体劣性型の網膜色素変性症には、網膜色素上皮細胞の先天的機能異常のため視細胞の死滅につながるもの

が知られており、これに対してヒトES細胞からの網膜色素上皮細胞の分化誘導は移植治療に結びつけうる可能性を持っている。また、網膜色素上皮細胞は加齢黄斑変性症の外科治療でも傷つく組織であり、応用は広いと考えられる。そのことから、京都大学眼科と共同研究で網膜疾患へのES細胞治療の技術開発を進める計画である。

*Xenopus* Kielin: A novel patterning factor containing multiple Chd-type repeats secreted from the embryonic midline.

**PNAS** 97, 5291-5296

## 5. 発表論文リスト

Hiroshi Tsuda, Noriaki Sasai, Mami Matsuo-Takasaki, Makoto Sakuragi, Yoshinobu Murakami and Yoshiki Sasai (2002)

Dorsalization of the Neural Tube by *Xenopus* Tiarin, a Novel Patterning factor Secreted by the Flanking Non-Neural Head Ectoderm.

**Neuron** 33, 515-528.

Hiroshi Kawasaki, Hirofumi Suemori, Kenji Mizuseki, Kiichi Watanabe, Fumi Urano, Hiroshi Ichinose, Masatoshi Haruta, Masayo Takahashi, Kanako Yoshikawa, Shin-ichi Nishikawa, Norio Nakatsuji and Yoshiki Sasai (2002)

Generation of TH+ Dopaminergic Neurons and Pax6+ Pigment Epithelia from Primate ES cells by SDIA.

**PNAS** 99, 1580-1585

Kawasaki, H., Mizuseki, K., Nishikawa, S., Kaneko, S., Kuwana, Y., Nakanishi, S., Nishikawa, S.-I. and Sasai, Y. (2000). Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by Stromal Cell-Derived Inducing Activity.

**Neuron** 28, 31-40.

Matsui, M., Mizuseki, K., Nakatani, J., Nakanishi, S. and Sasai, Y. (2000)