

博士学位論文

2016年度

神経性網膜からの水晶体への分化転換は、  
**Notch** シグナルからの脱抑制によっておきる

京都産業大学大学院

工学研究科生物工学専攻

博士後期課程3年

学生証番号 456014

氏名 飯田英明

## 目次

要旨 .....	3
序論 .....	5
方法および材料 .....	11
1. 神経性網膜細胞培養 .....	11
2. 免疫染色 .....	11
3. FACS (fluorescence activated cell sorting) 解析 .....	12
4. 免疫プロッティング .....	13
5. RNA 解析 .....	13
結果 .....	17
1. $\gamma$ -セクレターゼ阻害剤を神経性網膜の培養に加えると、水晶体分化 転換の開始が早まりまた分化転換が促進された .....	17
2. DAPT 処理した神経性網膜細胞における水晶体分化の特徴 .....	27
3. Notch シグナル阻害により、神経性網膜細胞において、通常の水晶体 発生に関与する遺伝子カスケードが活性化される .....	33
考察 .....	40
謝辞 .....	46
参考文献 .....	47
研究業績 .....	52

## 要旨

鳥類胚の神経性網膜は、細胞培養条件下において水晶体を生じる。ある細胞種から、細胞系譜から見て大きく隔たった細胞種に変化する現象は、「分化転換」と呼ばれるが、神経性網膜から水晶体への分化は分化転換の代表例として見なされてきた。私はこの分化転換の基礎となる機構を明らかにした。網膜から水晶体への分化転換は細胞間相互作用が低下する、平面的な培養条件において起こる。つまり、胚の中の神経性網膜とは異なった、細胞間相互作用のもとで起きる。そこで、私は網膜の神経分化の基礎をなす **Notch** シグナルが関与する可能性を検討した。**Notch** シグナルは細胞間の直接の接触によって成立する。

8日胚の網膜の細胞培養では培養20日後から  $\delta$ -クリスタリンを発現する少数の透明な水晶体細胞が生じ始める。一方、培養開始2日後から **Notch** シグナル阻害剤である **DAPT** を加えると、水晶体の分化が培養開始11日後から始まり、総タンパク量に対する  $\delta$ -クリスタリンの発現も、最終的には **35%** を占めるほどに高くなり、これは **DAPT** 不添加の場合の10倍のレベルである。

$\delta$ -クリスタリンの発現は培養皿に直接接着する扁平細胞のような大きな細胞だけでなく、神経細胞のような小さな細胞でも起こった。これは、神経性網膜における様々な細胞種が水晶体への分化能を内在している可能性を支持する。

**Notch** シグナル阻害後、眼の発生の初期段階を制御する転写因子である **Prox1**、**Pitx3** がこの順番で発現された。この結果は、神経性網膜が内在的に水晶体分化能を持つことを表し、この能力は通常の胚発生では **Notch** シグナルによって抑制されていることになる。

本研究と他の分化転換の例から、細胞には様々な分化能が維持されているが、正常な発生において必要でない分化過程が抑制機構によって抑えられることで、残った分化の経路を辿り、正常な分化が起こったと考えられる。

## 序論

ニワトリ胚における眼の発生は前脳の左右が胚の外側へ向かって突出することによって始まる。突出した領域を眼胞 (**optic vesicle, OV**) と呼び、眼胞が予定レンズ外胚葉 (**presumptive lens epithelium, PLE**) に接すると水晶体の発生が始まる (**Fig 1A, 1.5 日胚**)。続いて、予定レンズ外胚葉が肥厚し、レンズプラコードに分化する。レンズプラコードと眼胞はほぼ同時に胚の内側に向かって陥入し、レンズ胞 (**lens vesicle, LV**)、眼杯 (**optic cup, OC**) となる (**Fig 1A, E2.5**)。レンズ胞は表皮外胚葉からくびれ切れ、胚の外側の細胞は水晶体上皮細胞、内側は水晶体繊維細胞へ分化し、球状の成熟した水晶体 (**lens, L**) へ発生する。水晶体の発生過程において、水晶体特異的な  $\delta$ -クリスタリンはレンズプラコード形成の時期から発現が始まり、成熟した水晶体では水晶体繊維細胞で発現する。そのため、水晶体分化の開始から成熟までの指標とされている (**Kondoh et al., 1999**)。一方、眼杯の内側は、光を受容する視細胞や脳へ光の情報を伝達する神経細胞が多層構造を成した神経性網膜へ発生し、外側はメラニンを含有する網膜色素上皮 (**retinal pigment epithelium, RPE**) へ発生する (**Fig 1A, E8**)。8 日胚の神経性網膜は **Fig 1B** のように、神経細胞特異的な  $\beta$  III-チューブリンを強く発現することから神経性網膜の多くの細胞がすでに神経節細胞などの神経細胞に分化していることが分かる。

水晶体や神経性網膜の発生には、細胞間の直接の接触に依存した **Notch** シグナルによる制御が重要とされている。成熟した水晶体では、水晶体上皮細胞から水晶体繊維細胞の分化の中間段階である水晶体弓領域で **Notch** シグナルによる制御が必須である (**Rowan et al., 2008**)。また、**Notch** シグナル下流の転写因

子である **Rbpj** や **Notch** リガンドの **Jag1** をノックアウトしたマウスの研究から、初期の水晶体分化には **Notch** シグナルは必要ではないが、表皮外胚葉からレンズ胞が分離するために必要であることがわかった (**Le et al., 2012**)。しかし、レンズ胞における水晶体繊維細胞への分化に対する **Notch** シグナルの制御はほとんど知られていない。一方、神経性網膜においては、**Notch** シグナルは、神経細胞への分化を抑制することによって、ミュラー細胞や網膜幹細胞の維持に寄与している (**Furukawa et al., 2000**)。マウスでは胚発生期から成体期の神経性網膜にいたるまで、**Notch1** は発現を続け、網膜幹細胞の維持やミュラー細胞への分化を制御する (**Surzenko et al., 2013**)。またニワトリ 4.5 日胚の神経性網膜では、神経節細胞をはじめとする神経細胞の分化の直前に **Notch** シグナルの減少が起こる (**Nelson et al., 2006, 2007**)。

通常の胚発生の過程においては観察されないような系譜への分化を細胞が示す現象は「分化転換」と言われてきた。特別な培養条件下や損傷からの再生において起こる細胞の分化転換の研究は、分化状態の遷移、維持の機構を知るうえで、重要な知見である (**Okada et al., 1991**)。このような古典的な分化転換の例は、**MyoD** による筋形成のような、外来性の転写因子を発現することによって誘導される分化転換 (**Davis et al., 1987**) や複数の転写因子混合物を外来から細胞内で発現させることによって体細胞から多能性幹細胞 (**iPS**) を誘導する (**Takahashi and Yamanaka et al., 2006**) といった、現代の手法による人為的な分化転換とは区別される。実際に、転写因子の導入による人為的な分化転換は、内在性の調節機構を必ずしも反映していない。

古典的な分化転換は重要であるにもかかわらず、これらの現象はシグナルカ

スケードや調節遺伝子が解明される以前の時代に研究されていた。私はこの古典的な分化転換を細胞内調節の現代的な知見を基盤とした現代の手法を用い、再検討する必要性を感じた。これらを研究することは、特別な細胞種を生み出す制御機構を理解するうえで重要な知見を提供するだろう。

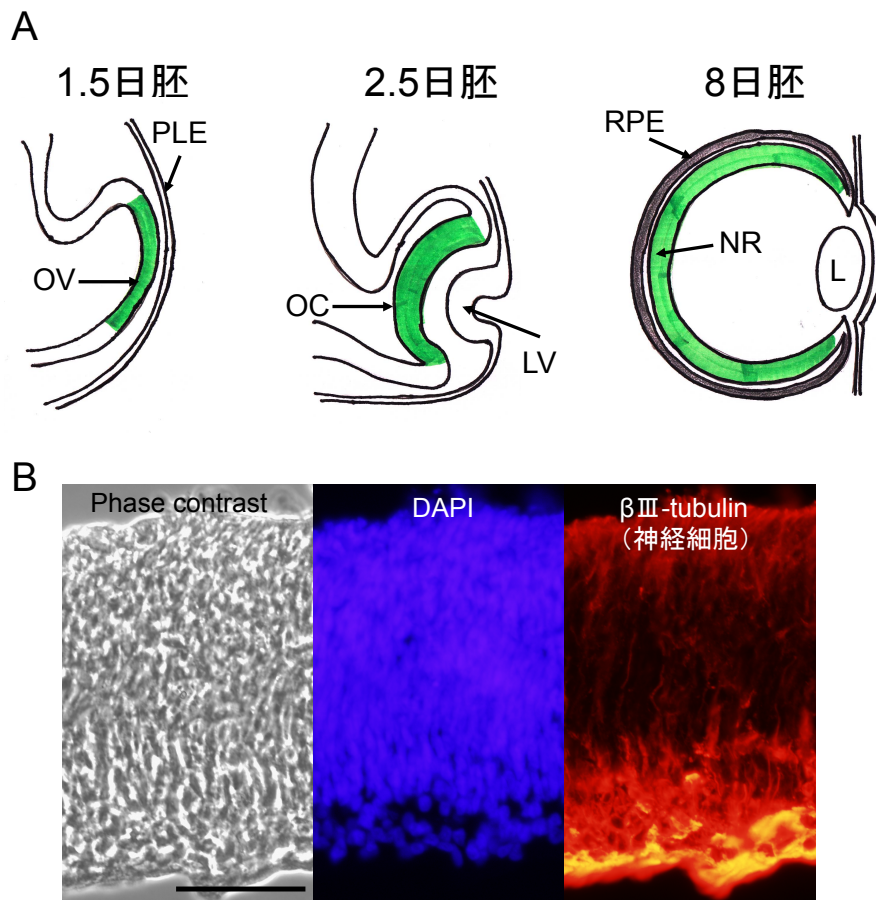
胚の神経性網膜の細胞培養によって起こる水晶体の分化転換 (Okada et al., 1975) は古典的な分化転換の例である。なぜなら、Fig. 1A のように、通常、水晶体は網膜組織からの影響下で頭部外胚葉から発生するからであり (Kondoh et al., 2010)、水晶体原基と網膜原基は完全に別の組織を起源としている。ニワトリ胚神経性網膜を解離し、平板培養 (培養した網膜細胞は、培養皿に接着した後、大きな扁平細胞とその上に、神経細胞の集団が生じ多層構造を示すため、以下、単層培養ではなく平板培養と表記する) すると、神経細胞の発生の後、かなりの日数を経て水晶体の発生が起こる (Araki and Okada, 1977; De Pomerai and Clayton et al., 1978)。8日胚神経性網膜は培養開始後7日で基層に広がる扁平細胞と、扁平細胞上で集団を形成する小さな神経細胞によって構成される。その後、培養開始から3週間後に典型的な水晶体の発生を起こす。

神経性網膜をトリプシン処理した後、凝集培養 (疎水性の培養皿を用いることで、細胞の培養皿への接着を阻害し、旋回培養で細胞を凝集させて培養する条件を以下、凝集培養と表記する) の条件下で培養した場合、水晶体への分化が起こらない。しかし、平板培養した後に凝集培養する方法を用いた以前の研究では、最低で10日間平板培養することが、8日胚神経性網膜から水晶体の分化転換を引き起こすには必要であることが示された (Okada et al., 1983)。無処理の網膜と比較すると、細胞間相互作用の変化が、胚の神経性網膜から水晶

体分化の調節に関与することが、これらの観察から示された。

前述した **Notch** シグナルの発現低下は初期のニワトリ胚神経性網膜において、神経細胞分化を促進する (Nelson et al., 2006; Nelson et al., 2007) ことから、私は **Notch** シグナルが水晶体分化転換の調節にも関与する可能性を考えた。**Notch** シグナルには、隣接細胞が発現する **Jagged** などの **Notch** リガンドが作用した後、**Notch** 分子の細胞内ドメインが  $\gamma$ -セクレターゼで切断される必要がある。私は  $\gamma$ -セクレターゼ阻害剤を神経性網膜培養に用いることで **Notch** シグナルの変化の影響を調べた。**Notch** シグナルの阻害は通常の水晶体初期発生に関わる転写因子を系列的に活性することで、より早く水晶体細胞分化を引き起こした。





**Figure. 1.** 水晶体および神経性網膜の発生。A. ニワトリ胚における眼の発生は前脳の左右が胚の外側へ向かって突出することによって始まる。突出した領域を眼胞 (optic vesicle, OV) と呼び、眼胞が予定レンズ外胚葉 (presumptive lens epithelium, PLE) に接すると水晶体の発生が始まる (1.5 日胚)。続いて、予定レンズ外胚葉が肥厚し、レンズプラコードに分化する。レンズプラコードと眼胞はほぼ同時に胚の内側に向かって陥入し、レンズ胞 (lens vesicle, LV)、眼杯 (optic cup, OC) となる (E2.5)。レンズ胞は表皮外胚葉からくびれ切れ、胚の外側の細胞は水晶体上皮細胞、内側は水晶体繊維細胞へ分化し、球状の成熟した水晶体 (lens, L) へ発生する。一方、眼杯の内側は光を受容する視細胞や脳へ光の情報を伝達する神経細胞が多層構造を構成し、神経性網膜へ発生し、外側はメラニンを含む網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) へ発生する (E8)。網膜原基から神経性網膜へ発生する領域を緑色で示した。B. 8 日胚神経性網膜を抗  $\beta$  III-チューブリン抗体によって免疫染色した画像。8 日胚

の神経性網膜は多くの細胞が神経細胞特異的な $\beta$  III-チューブリンを発現した。  
スケールバーは 50  $\mu$ m を示す。

## 方法および材料

### 1. 神経性網膜細胞培養

神経性網膜をニワトリ 8 日胚 (stage 33, Hamburger and Hamilton., 1951) から単離した後、0.125%トリプシンで 37°C、20 分間処理して解離した。解離した神経性網膜細胞は 35 mm 培養皿 (153066, Thermo Scientific) に  $3 \times 10^6$ /dish の密度で培養を開始し、10%ウシ胎児血清 (SH30070.03E, HyClone) を含んだ Dulbecco's modified Eagle's medium (043-30085, Wako) を用いて培養した。

tert-butyl (2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-(3,5-difluorophenyl)acetyl]amino]propanoyl]amino]-2-phenylacetate (以下 DAPT, sc-201315, Santa Cruz) および N2-[(2S)-2-(3,5-difluorophenyl)-2-hydroxyethanoyl]-N1-[(7S)-5-methyl-6-oxo-6,7-dihydro-5H-dibenzo[b,d]azepin-7-yl]-L-alaninamide (以下 LY411575, sc-364529, Santa Cruz) の 2 種類の  $\gamma$ -セクレターゼ阻害剤 (Fig. 2) は DMSO に溶解し、それぞれ 10  $\mu$ M もしくは 10 nM の濃度で培養開始から 2 日後に培地に添加した。培地は最長でも 2 日に 1 回の頻度で培地を交換し、培地交換の度に、DAPT もしくは LY411575 を新たに添加した。培養細胞は免疫染色のために固定、免疫ブロッキングのために SDS サンプルバッファーに溶解、RNA 解析のために Trizol reagent (15596026, Thermo Scientific) に溶解した。

### 2. 免疫染色

培養を 4% パラホルムアルデヒド/PBS により、室温で 1 時間固定した。固定後、PBS によって 3 回洗浄した。固定した細胞は、免疫染色を行うまで、TBS (20 mM Tris-HCl(pH 7.5), 150 mM NaCl) -20 mM EDTA 中で、4°C で保存した。

固定した細胞は 2% ロバ血清 (S30-100ML, Millipore) / 20 mM Tris-HCl (pH

7.5), 150 mM NaCl, 0.5% Tween 20 (P7949-500ML, Sigma))によって、室温、30分間ブロッッキングした。続いて、1%ロバ血清/TBST (20 mM Tris-HCl(pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1 % Tween 20)によって希釈した一次抗体 (Table. 1) を、室温で1時間反応させた。細胞は、TBSTによって15分間、室温で3回洗浄し、1%ロバ血清/TBSTによって希釈した二次抗体 (Table. 1) と、室温で1時間処理させた (最終濃度 1 µg/ml になるように 4',6-diamidino-2-phenylindole (以下 DAPI と略す) を二次抗体液に加えた)。TBSTによって15分間、室温で3回、TBSで1回洗浄した後、Aqua-Poly/Mount (PSI-1860620-20ML, Polysciences) によって封入した。

### 3. FACS (fluorescence activated cell sorting) 解析

FACS用の培養細胞はPBSで2回、PBS 1 mM EDTAで1回洗浄した後、0.125%トリプシンで37°C、20分間処理し、解離した。解離した細胞は4%パラホルムアルデヒド/PBSにより、室温で30分間固定した。最終濃度1 Mになるようにグリシンを加え、固定反応を止め、遠心し上澄みを除いた。1% BSA/PBSによって1回洗浄し、FACSのための免疫染色までの間、1% BSA/PBS 20 mM EDTA 中で、4°Cで保存した。

解離した細胞は平板培養の場合と同条件でブロッッキングした。次に、1% BSA/TBSTによって希釈した一次抗体 (Table. 1) と、室温で1時間反応させた。細胞は、TBSTによって5分間、室温で5回洗浄した。続いて、1% BSA/TBSTによって希釈した二次抗体 (Table. 1) と室温で1時間反応させ、TBSTによって5分間、室温で5回洗浄した。FACS解析を行うまで、1% BSA/TBS-20 mM

EDTA 中で、遮光し、4°Cで保存した。免疫染色した細胞は FACSCalibur (BD Biosciences) によって解析した。

#### 4. 免疫ブロッティング

培養細胞を PBS で 3 回洗浄し、SDS サンプルバッファー (0.05 M Tris-HCl (pH6.5), 10% グリセロール, 1% SDS) を 250 µl/3.5 cm 培養皿加え、溶解した細胞を 1.5 ml サンプリングチューブへ回収した。SDS-PAGE を行うまで、-20°C で保存した。回収した細胞懸濁液は 100°Cで 5 分間加熱した後、Pierce 660nm Protein Assay Reagent (22660, Thermo Fisher) および Ionic Detergent Compatibility Reagent (22663, Thermo Fisher) を用い、タンパク質量を測定した。全タンパク質量が一定量になるように希釈した細胞懸濁液は 12.5% ポリアクリルアミドゲル (13074-34, Nacalai) を用いて電気泳動し、PVDF 膜 (2322451, Atto) に転写した (Towbin et al., 1979)。転写した PVDF 膜は 4% スキムミルク/TBST-10 mM EDTA で 1 時間、室温でブロッキングした後、4% スキムミルク/TBST-10 mM EDTA で希釈した一次抗体 (Table. 1) を室温で 1 時間反応させた。TBST により 5 回洗浄した後、4% スキムミルク/TBST で希釈した二次抗体 (Table. 1) を室温で 1 時間反応させた。さらに、TBST により 5 回洗浄し、SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (34075, Thermo Fisher) を反応させて、LAS4000mini (Fuji film) を用い検出した。

#### 5. RNA 解析

培養細胞は 1 ml/3.5 cm 培養皿の Trizol reagent (15596026, Thermo Scientific)

で処理し、PureLink RNA Mini Kit (12183018A, Thermo Scientific) を用いて、指示書通り RNA 抽出を行った。抽出した RNA は使用まで-80°Cで保存した。

マイクロアレイ解析のために、培養開始から 1 2 日後の DAPT 処理もしくは DMSO 処理 (コントロール、以下無処理) の細胞から抽出した RNA を用いた。Agilent Gallus microarray ver. 2.0. Duplicate microarray data によってマイクロアレイ解析を行い、解析結果は the Gene Expression Omnibus database (accession number GSE86233)に公開した。

RT-qPCR のために、抽出した RNA は 70°C、5 分処理で 2 次構造を破壊した後、Verso cDNA Synthesis Kit (AB-1453/A, Thermo Scientific) によって、42°C、30 分の条件で逆転写した。逆転写した cDNA は Table. 2 に示したプライマーおよび SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (RR820A, Takara) を用い、95°C、20 秒を 1 サイクル、95°C、5 秒、60°C、30 秒を 40 サイクルの条件で、StepOnePlus Real time PCR system (Applied Biosystems) によって、定量化した。定量化は *Gapdh* cDNA の発現量を相対量として用いた  $\Delta\Delta C_t$  法により行った。

Table 1.

## Primary antibodies

Antigen	Host	Antibody	Source	Catalog number	Dilution for WB or IF
Glutamine synthetase	Mouse	IgG	BD Transduction Laboratories	610517	1:200
Visinin	Mouse	IgG	Developmental studies hybridoma bank	7G4	1:2000
$\alpha$ A-crystallin	Rabbit	IgG	Yoshimoto et al., 2005		1:500
$\beta$ A-crystallin	Rabbit	IgG	Yoshimoto et al., 2005		1:500
$\delta$ -crystallin	Rabbit	IgG	Kondoh et al., 1983		1:5000 or 1:2500

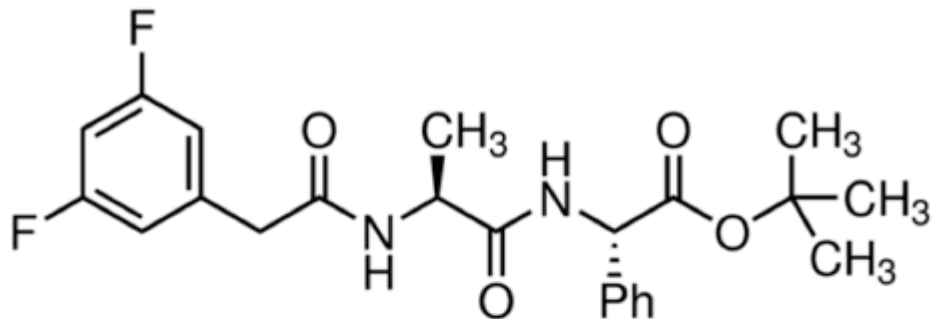
  

Secondary antibodies					
Name	Host	Antibody	Source	Catalog number	Dilution for WB or IF
Donkey Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor 568) preadsorbed	Donkey	IgG	abcam	ab175700	1:1000
Donkey Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor 488) preadsorbed	Donkey	IgG	abcam	ab150061	1:1000
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP)	Goat	IgG	abcam	ab97051	1:1000
F(ab') <sub>2</sub> -Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	Goat	IgG	Thermo	A-11017	1:200

Table 2.

Target gene	Forward primer	Tm (C)	Reverse primer	Tm (C)	Reference sequence (the range of coding sequence)	Target position	The length of PCR product (bp)
<i>Gapdh</i>	GCTGAGACGGGAACTTGTG	58	CAACATACTCAGCACTGCATCT	58	NM_204305.1 (58-1059)	379-481	103
<i>Pitx3</i>	TGAGCACCGGAGGAGATC	59	CTCTCCCCTTCTCCACTTAG	58	XM_421631.5 (290-1168)	680-779	100
<i>Chx10</i>	ATGGCCCTGIGTGTGAAA	58	GCACAAATCAGCCACTCCAA	58	AF178671.1 (9-1142)	1680-1779	100
<i>Isl1</i>	TCCTCTCAGCTCCAGATACG	58	TGAGGGTAAGGGCAGAAACAA	58	NM_205414.1 (283-1332)	1397-1499	103
<i>Hes1</i>	CTGAGATGACGGTGAAGCA	58	CCTCGTTCATGCACCTATTGA	58	AF032966.1 (3-875)	377-497	121
<i>Hes5</i>	CAGCAACACAGAAACTCAGATGA	58	TGAGTGGAAAGTGATGCAGAAG	59	NM_001012695.1 (40-513)	491-590	100
<i>Ascl1</i>	GCACCGAGCTGTCTACTTCATAG	59	CGTTTGGACAATAGTCGATAAA	58	NM_204412.1 (255-914)	1755-1856	102
<i>Hey1</i>	CAGCAGTGGAAAAGAGGGAGAA	59	ACATCACGTGCTGTGTATGAACAC	59	NM_181736.1 (46-978)	2518-2620	103
<i>MafA (L-Maf)</i>	GAGCGGATCTGTACAAAGAGAA	59	CATGAAGAAGTCAGCGGCAGTA	59	AF034570.1 (1126-1986)	2014-2121	108
<i>Crx</i>	GCTTTCACAATTACAGGCTGCTT	59	ACTGTGGACCCCTGTAAGTGAACA	59	AF285171.1 (34-1017)	1092-1238	147
<i>Prox1</i>	CTGTGAAGAGGGCGAACTC	59	GCCACCATTTTGTTCATGTTATT	59	NM_001005616.1 (68-2278)	406-507	102
<i>cMaf (S-Maf)</i>	CAGTCAAGGGCAGGAGAGATT	58	GGGATATGGTAGCGGTGTGAT	59	NM_001044671.1 (574-1683)	2489-2590	102
<i>Sox2</i>	GTCACCTCTCTCTCATTCTG	58	GGGCAGCTGGTCTGGTACTT	59	NM_205188.2 (74-1012)	954-1056	103
<i>Pax6</i>	CCAACAACCTGCTATGCAA	58	GTGTCATAGCTCCGCCATT	59	NM_205066.1 (330-1640)	1504-1603	100

DAPT



LY411575

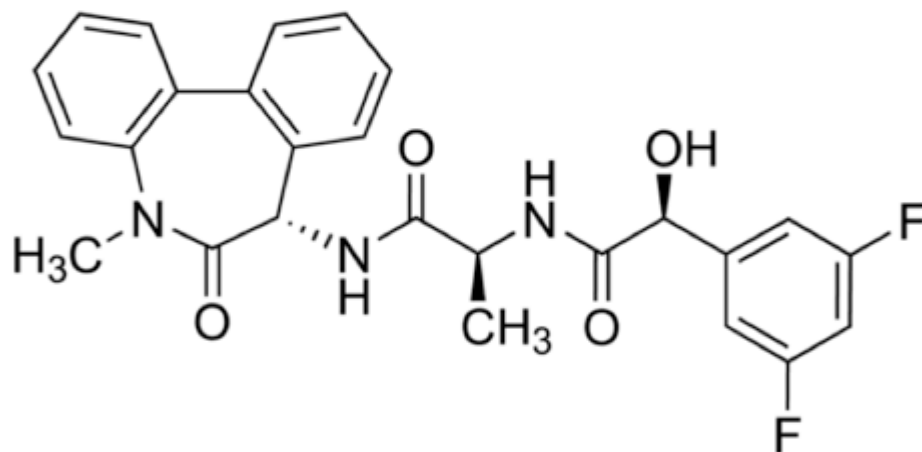


Figure. 2.

Tert-butyl

(2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-(3,5-difluorophenyl)acetyl]amino]propanoyl]amino]-2-phenylacetate (DAPT) および

N2-[(2S)-2-(3,5-difluorophenyl)-2-hydroxyethanoyl]-N1-[(7S)-5-methyl-6-oxo-6,7-dihydro-5H-dibenzo[b,d]azepin-7-yl]-L-alaninamide (LY411575)の構造式



## 結果

### 1. $\gamma$ -セクレターゼ阻害剤を神経性網膜の培養に加えると、水晶体分化転換の開始が早まりまた分化転換が促進された

私はまず神経性網膜細胞培養において、これまで観察されてきた水晶体の分化転換のプロセスを確かめた(Araki and Okada, 1977; De Pomerai and Clayton, 1978; Okada et al., 1975)。解離した8日胚神経性網膜を平板培養すると、培養開始から2日後では、神経細胞のような小さな細胞や少し平に広がった細胞が、培養皿にまばらに培養され、細胞集団間には空間が存在した (Fig. 3, day 2)。7日目には、2種類の形態的にはっきりと識別できる細胞が生じた。大きな扁平細胞は培養皿に直接接着し、軸索を伸ばした神経細胞は扁平細胞上で次第に細胞体による集団を形成した (Fig. 3, day 7, 矢印)。細胞集団間の隙間はほとんどなく、培養皿上全体に細胞が広がった。免疫染色によって神経細胞様の小さな細胞と扁平細胞の細胞種を調べたところ、培養開始から7日後の神経細胞様の小さな細胞集団の一部は錐体視細胞特異的なビジニンを発現した (Fig. 4A)。扁平細胞の一部 (ca. 20%) は網膜のグリア細胞であるミュラー細胞が発現するグルタミン合成酵素を発現した (Fig. 4B)。しかし、グルタミン合成酵素陽性細胞の割合は培養14日後までには5%以下に減少した。また、ビジニン陽性細胞も培養14日後には2%以下に減少した。これらの細胞は $\delta$ -クリスタリン陽性細胞と共局在することはなかった (Fig. 4C)。培養開始21日後に、培養中に $\delta$ -クリスタリンを発現する透明な水晶体細胞塊が生じ始めた (Fig. 3, day 21, 白矢頭)。

この間の細胞数の増減を調べると、培養開始から2日後には、最初にまいた細胞数の140%まで細胞数は増加し、以降は、小さな神経細胞が失われていくこ

とによって、全体の細胞数は減少した。10日後で、細胞数の変化は一定になった (Fig. 5)。 $\gamma$ -セクレターゼ阻害剤の溶媒であるジメチルスルホキシド (DMSO) の添加の有無は、細胞数や水晶体の分化転換の時期に影響を与えなかった。

次に、私は  $\gamma$ -セクレターゼ阻害剤を用いて、Notch シグナルを阻害した場合の影響を検証した。培養開始から2日後に、 $\gamma$ -セクレターゼ阻害剤である DAPT を培養細胞に加えた。(それ以前の段階で DAPT を加えると、ほとんどの細胞が死んだので、2日後からの添加になった)。細胞数やグルタミン合成酵素陽性細胞の割合 (ca. 13% at day 8 and <5% at day 14) は無処理の培養とほとんど変わらなかった (Fig. 4B, 5)。ビジニンを発現する細胞 (錐体視細胞) は、小さな神経細胞の一部で観察されたが、その割合も変化しなかった (後述)。しかし、DAPT 処理は有意に水晶体分化を促進した。形態的に識別可能な水晶体様細胞集団は DAPT 処理した培養において、14日後までに生じた (Fig. 4C, 6A)。水晶体様細胞集団だけでなく、多くの扁平細胞、そして神経細胞のサイズの小さな細胞の多くも、 $\delta$ -クリスタリンを発現していた。DAPT 処理によって生じた水晶体様細胞集団は21日後の無処理の培養と比較し、より大きく個数も遥かに多かった (Fig. 4C, 6A)。また、培養22日の細胞の大多数が  $\delta$ -クリスタリンを発現したため (Fig. 6A)、共焦点顕微鏡によって個々の細胞を識別しつつ解析を行った。Fig. 6A の点線で四角に囲った領域を共焦点顕微鏡によって解析したところ、白矢頭で示した大きな水晶体様の細胞集団が  $\delta$ -クリスタリンを強く発現しただけでなく、周囲の神経細胞様の小さな細胞集団も  $\delta$ -クリスタリンを発現した (Fig. 6B)。このことから、神経性網膜における様々な細胞種が水晶体への分化能を持つことが示された。

この結論を確認しつつ、私は水晶体分化に伴うクリスタリン発現細胞の割合の変化を定量するために、**FACS** を用いて調べた。細胞をそれぞれ神経細胞と扁平細胞であると予想される小さい細胞集団と大きい細胞集団に分けた (**Fig. 7**)。培養において神経細胞集団の一部にビジニン陽性細胞がみられ (**Fig. 4A, C**)、それらの細胞が解離細胞のなかの小さい細胞集団に分布したことから、この区分は裏付けられる (**Fig. 7**)。DAPT 処理は小さい細胞と大きい細胞の比率や小さい細胞集団に含まれるビジニン陽性細胞の割合に有意な影響を与えなかった。これらの結果は、8日胚由来の神経性網膜において、**Notch** シグナル阻害は神経細胞の分化に影響しないことを示す。

培養開始から14日後の培養では、DAPT 処理は大きい細胞集団のなかの  $\delta$ -クリスタリン陽性細胞の数を顕著に増加した (**Fig. 8**)。しかし、 $\delta$ -クリスタリン陽性細胞は小さい細胞集団においても有意に増加した (**Fig. 8**)。この結果は DAPT 処理した培養では、小さい細胞が  $\delta$ -クリスタリンを発現したという、平板培養の免疫染色による観察結果と一致する (**Fig. 4C, 6A, B**)。培養開始から20日後、細胞の大きさに関わらず、より多くの細胞が  $\delta$ -クリスタリンを発現した (**Fig. 8**)。したがって、DAPT 処理後、扁平細胞と小さい細胞の両方が水晶体の特徴を示し始めた。無処理の培養では、培養開始から20日後に、主に大きい細胞集団が  $\delta$ -クリスタリンを発現した。しかし、 $\delta$ -クリスタリン陽性細胞の集団は DAPT 処理した培養と比べ少なかった。 (**Fig. 8**)

DMSO

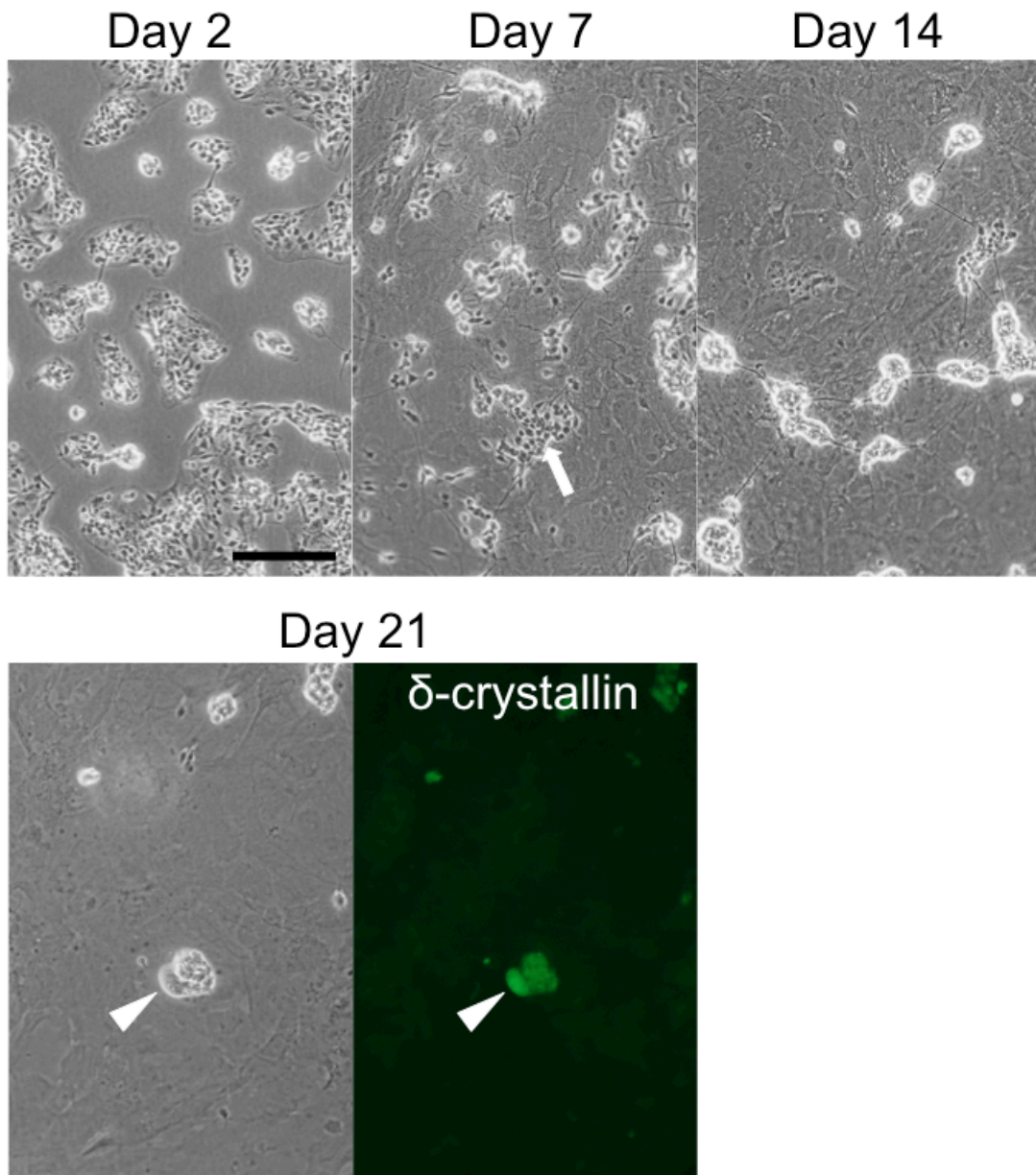
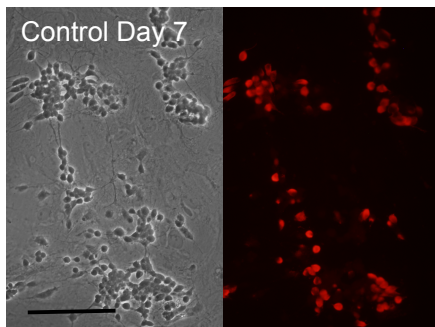
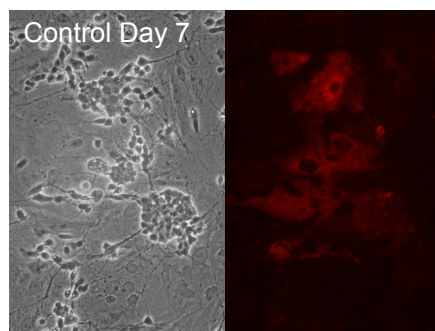


Figure. 3. 8日胚 (st. 33) 神経性網膜の無処理平板培養の時系列ごとの位相差画像。培養日数は画像の上に示した。21日の画像のみ DMSO 添加の培養。培養開始から21日後の細胞を抗  $\delta$ -クリスタリン抗体によって免疫染色した。矢印によって神経細胞の集団を、白矢頭によって  $\delta$ -クリスタリンを発現する大きい水晶体様細胞を示す。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  を示す。

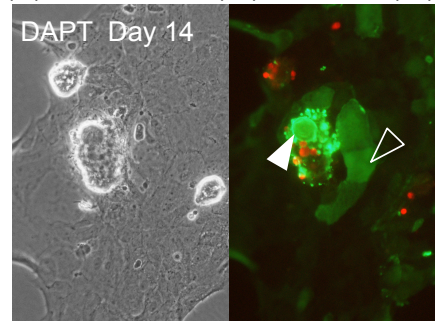
(A) ビジニン



(B) グルタミン合成酵素



(C)  $\delta$ -クリスタリン (緑)、ビジニン (赤)



**Figure 4.** 抗グルタミン合成酵素 (GS)、ビジニン、 $\delta$ -クリスタリン抗体を用いた免疫染色の例。A, B. DMSO 処理した培養を抗ビジニンもしくは GS 抗体によって免疫染色した。神経細胞のみビジニン (A) を扁平細胞のみ GS (ミューラー細胞) (B) を発現した。C. DAPT 処理した培養を抗  $\delta$ -クリスタリン (緑) およびビジニン (錐体視細胞、赤) 抗体を用い免疫染色した。水晶体様細胞 (白矢頭) だけでなく多くの扁平細胞 (無色矢頭) およびいくつかの小さな細胞が  $\delta$ -クリスタリンを発現した。また、 $\delta$ -クリスタリンおよびビジニンは同じ細胞で発現されないことが分かった。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  を示す。

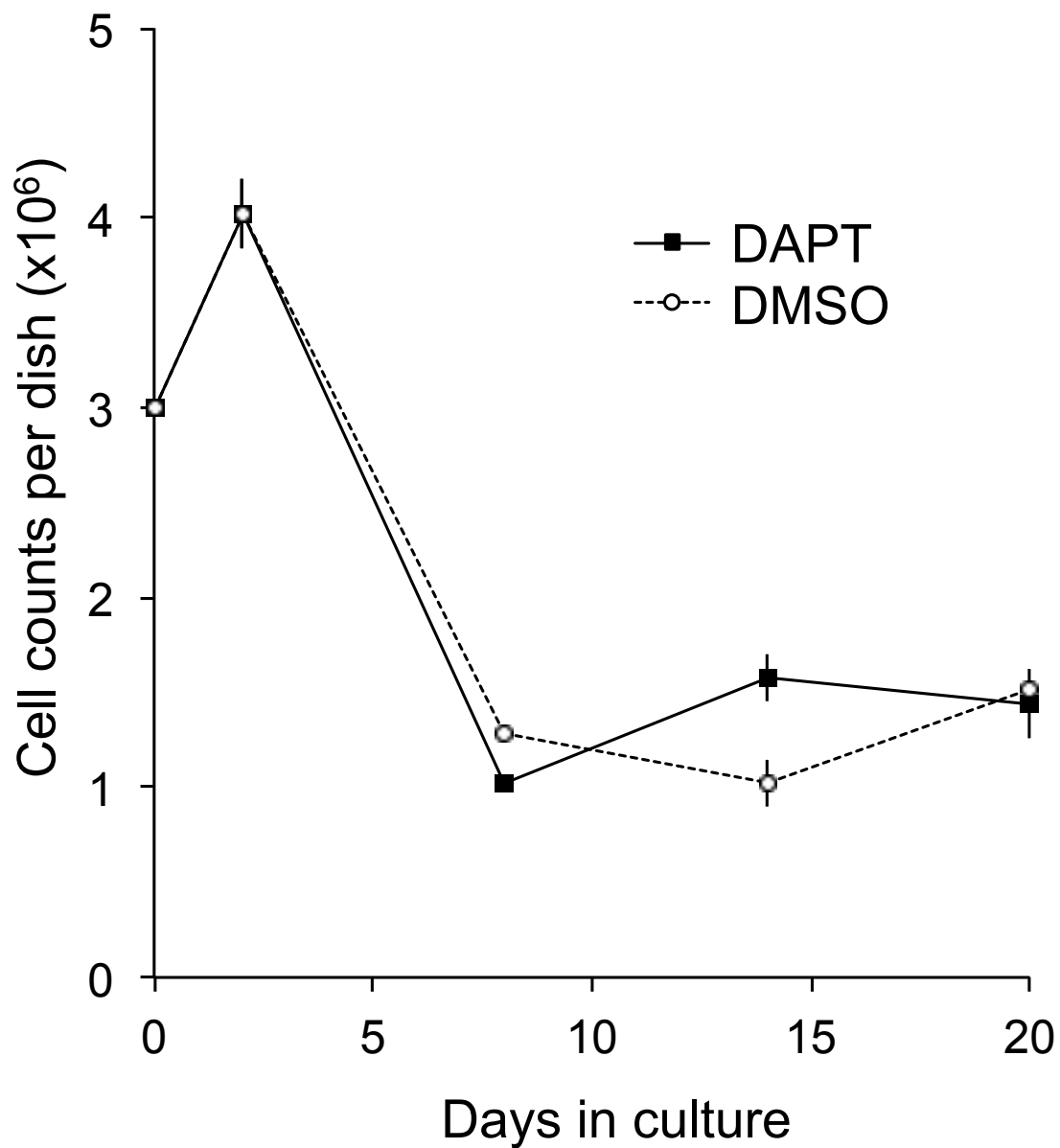
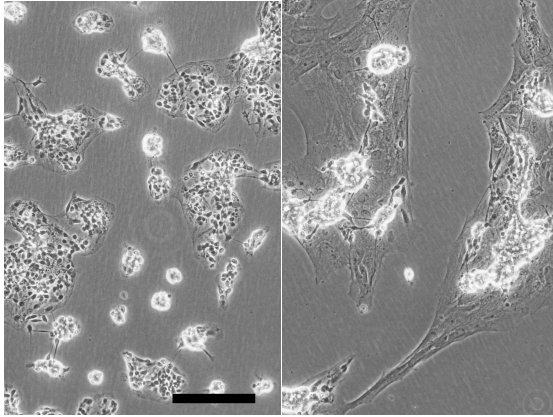


Figure. 5. 培養日数の経過に伴う細胞数の変化。全ての計測を2回行い、標準誤差をエラーバーとして示した

A

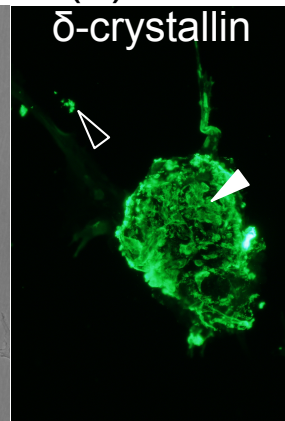
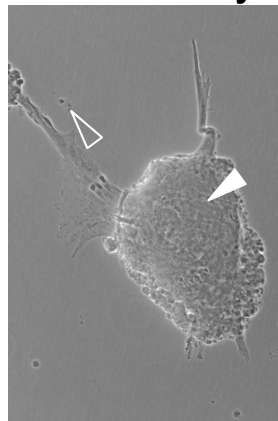
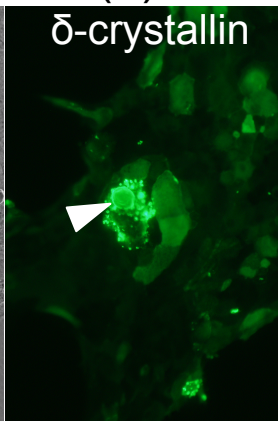
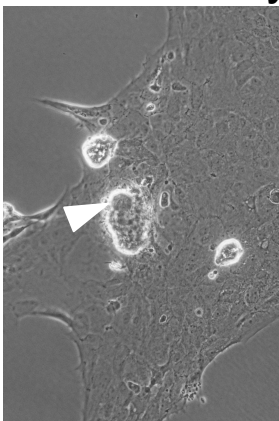
Day 2

Day 7

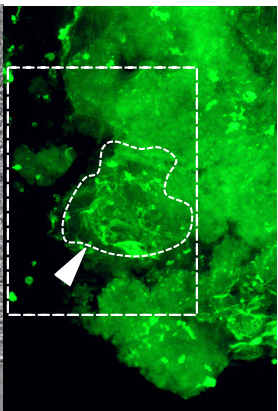
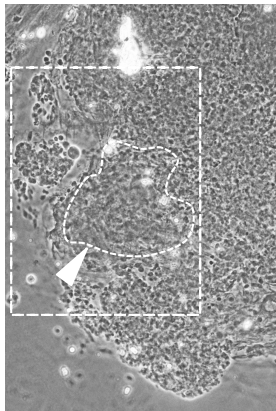


Day 14 (a)

Day 14 (b)



Day 22



B

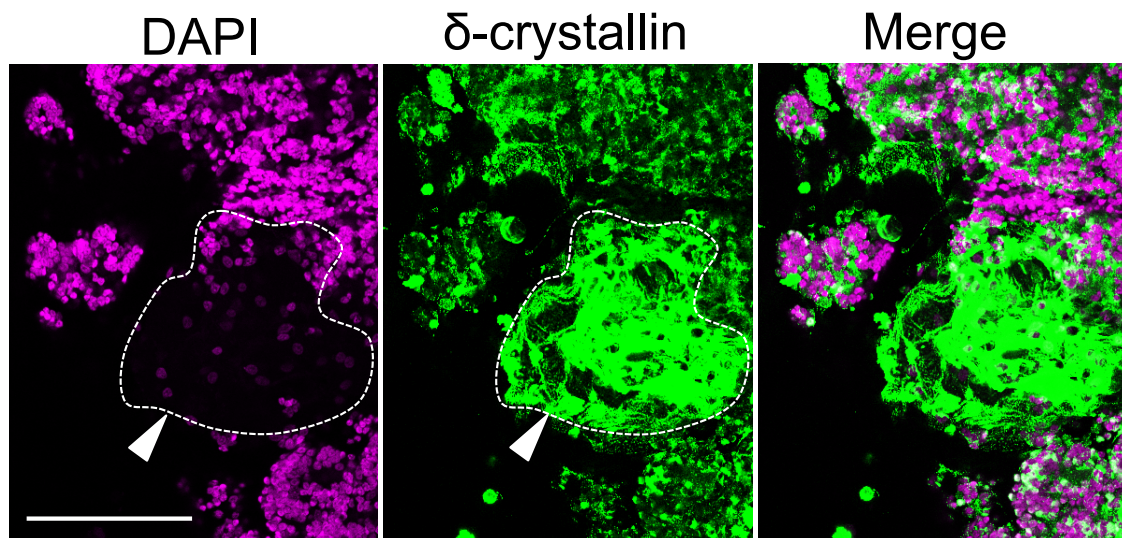
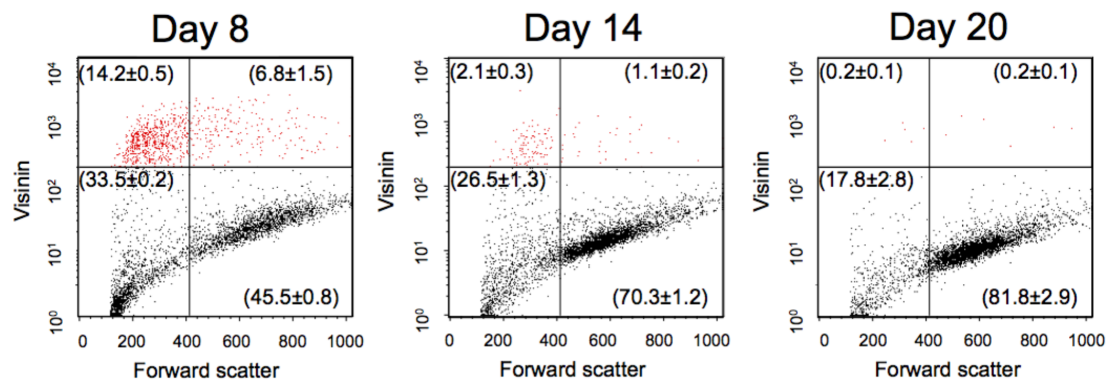


Figure. 6. A. 8日胚 (st. 33) 神経性網膜の DAPT 処理平板培養の時系列ごとの位相差画像。培養開始2日目から DAPT を継続的に加えた。培養日数は画像の上を示した。培養開始から14、22日後の細胞を抗  $\delta$ -クリスタリン抗体によって免疫染色した。白矢頭によって  $\delta$ -クリスタリンを発現した大きい細胞を示し、無色矢頭によって  $\delta$ -クリスタリンを発現した神経細胞の大きさの細胞を示した。B. 22日の点線で囲った細胞を拡大し、共焦点顕微鏡によって撮影した画像。白矢頭によって  $\delta$ -クリスタリンを発現した大きい細胞を示した。マゼンタで DAPI、緑色で  $\delta$ -クリスタリンを示した。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  を示す。



## DMSO



## DAPT

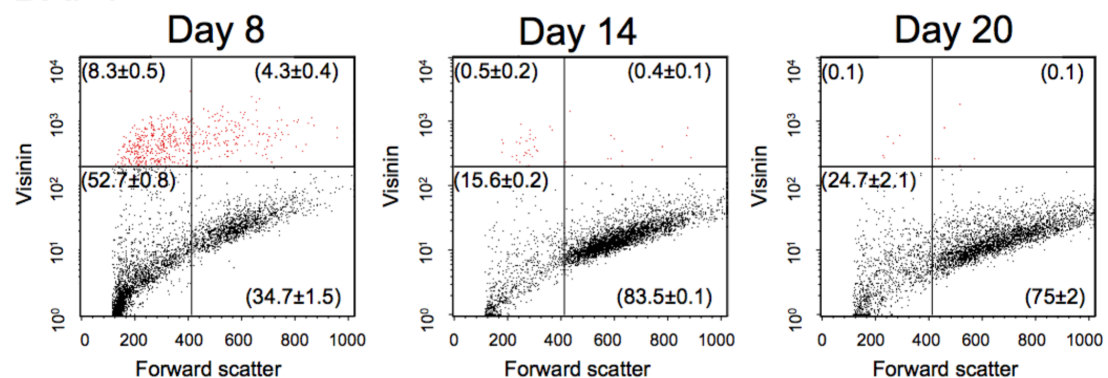
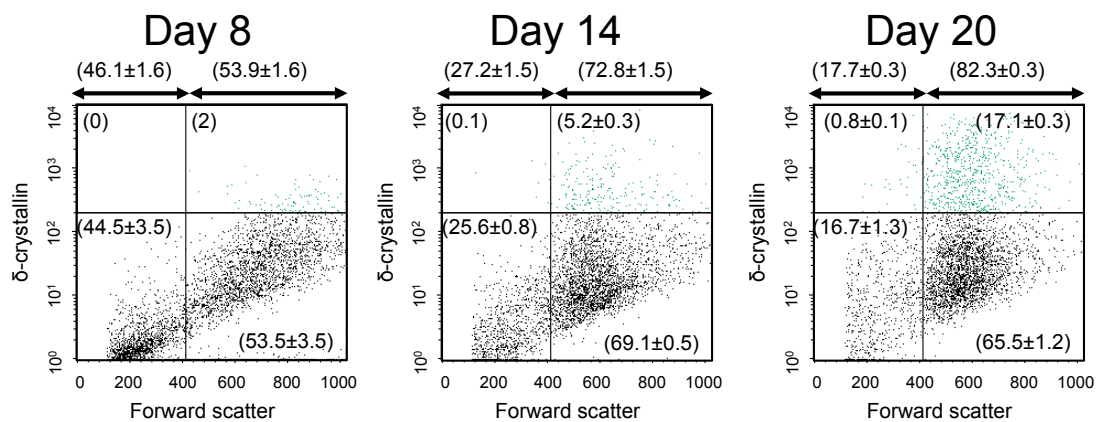


Figure. 7. FACS による、細胞の大きさとビジニン発現細胞の蛍光強度による細胞集団の時系列変化。無染色のサンプルを用いて、quadrant areas を決定した。ビジニン発現細胞は赤色で示した。それぞれの quadrant areas における平均および 2 回の異なる実験の標準誤差であるパーセンテージは括弧内に示した。

## DMSO



## DAPT

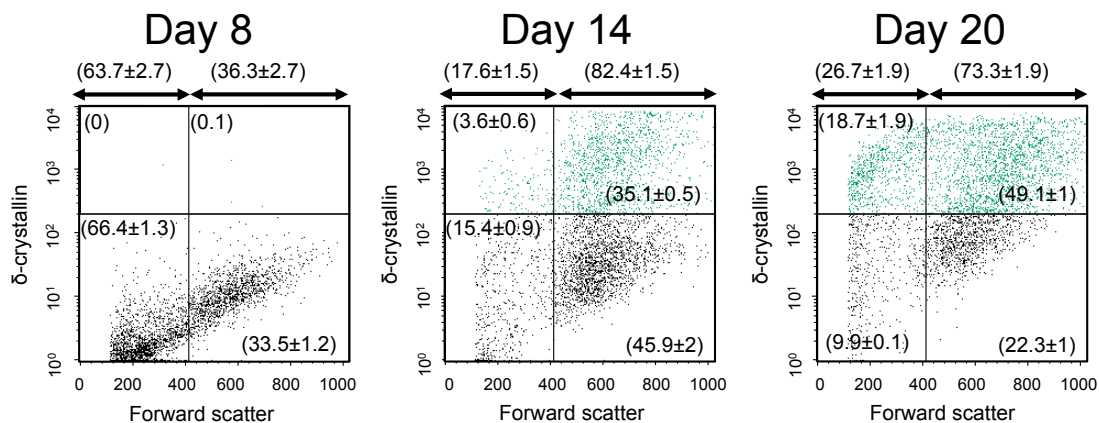


Figure. 8. FACSによる、細胞の大きさと $\delta$ -クリスタリン発現細胞の蛍光強度による細胞集団の時系列変化。 $\delta$ -クリスタリン発現細胞は緑色で示した。それぞれのquadrant areasにおける平均および2回の異なる実験の標準誤差であるパーセンテージは括弧内に示した。

## 2. DAPT 処理した神経性網膜細胞における水晶体分化の特徴

水晶体分化を詳細に解析するために、私は免疫ブロッティングを用い、ニワトリ胚の水晶体で最も早くかつ多量に合成されるクリスタリンである  $\delta$ -クリスタリンの発現の経時変化を調べた (Fig. 9A, B) 培養開始から 20 日後、無処理の神経性網膜細胞は少量の  $\delta$ -クリスタリンを発現した。DAPT 処理された細胞は 11 日後までに同等の量の  $\delta$ -クリスタリンを発現していた。続いて、DAPT 処理された細胞は、全タンパク質の 35% を占めるほどの大量の  $\delta$ -クリスタリンを発現した。これは無処理の細胞の 21 日目のサンプルの  $\delta$ -クリスタリン量の 10 倍に相当する (Fig. 9B)。別の  $\gamma$ -セクレターゼ阻害剤である LY-411575 を用いても同じ結果が得られたことから、水晶体分化の促進は Notch シグナル阻害によるものであることが確認された (Fig. 9A)。

神経性網膜から分化転換してできた  $\delta$ -クリスタリン発現細胞は、免疫ブロッティングを用いることで、14 日胚水晶体と同レベルの  $\alpha A$ -、 $\beta A$ -クリスタリンを発現することが分かった (Fig. 10)。

私はマイクロアレイを用いて、培養開始から 11 日後、すなわち、 $\delta$ -クリスタリン発現が始まった直後の、培養 12 日後において、DAPT 処理した細胞群での水晶体関連遺伝子の発現を調べ、無処理の細胞群と比較した (Fig. 11)。DAPT 処理した細胞では、 $\alpha A$ -、 $\alpha B$ -、 $\beta A1$ -、 $\beta A2$ -、 $\beta A4$ -、 $\beta B1$ -、 $\beta B2$ -、and  $\beta B3$ -クリスタリンを無処理の細胞に対し 10-100 倍発現した。水晶体特異的な中間系フィラメントである *filensin*、*pharkin* の発現も促進された (Fig. 11)。

私は DAPT 処理期間を変えることで水晶体分化に影響を与えるか検証した。DAPT 処理を 10 日間 (培養開始後 2 日~12 日, b) 行った培養では、12 日

間処理した培養（通常条件, a）と同程度であった（Fig. 12）。一方で、2日間から12日間の間で DAPT 処理の期間を短くした他の培養では、 $\delta$ -クリスタリンの発現の減少から水晶体の分化が有意に減少した（Fig. 12）。したがって、最も効果的な神経性網膜から水晶体の分化には、Notch シグナルの継続的な阻害が必要であった。この10日間の中間の数日間に DAPT 処理が必要であるかどうかは判定出来なかった。

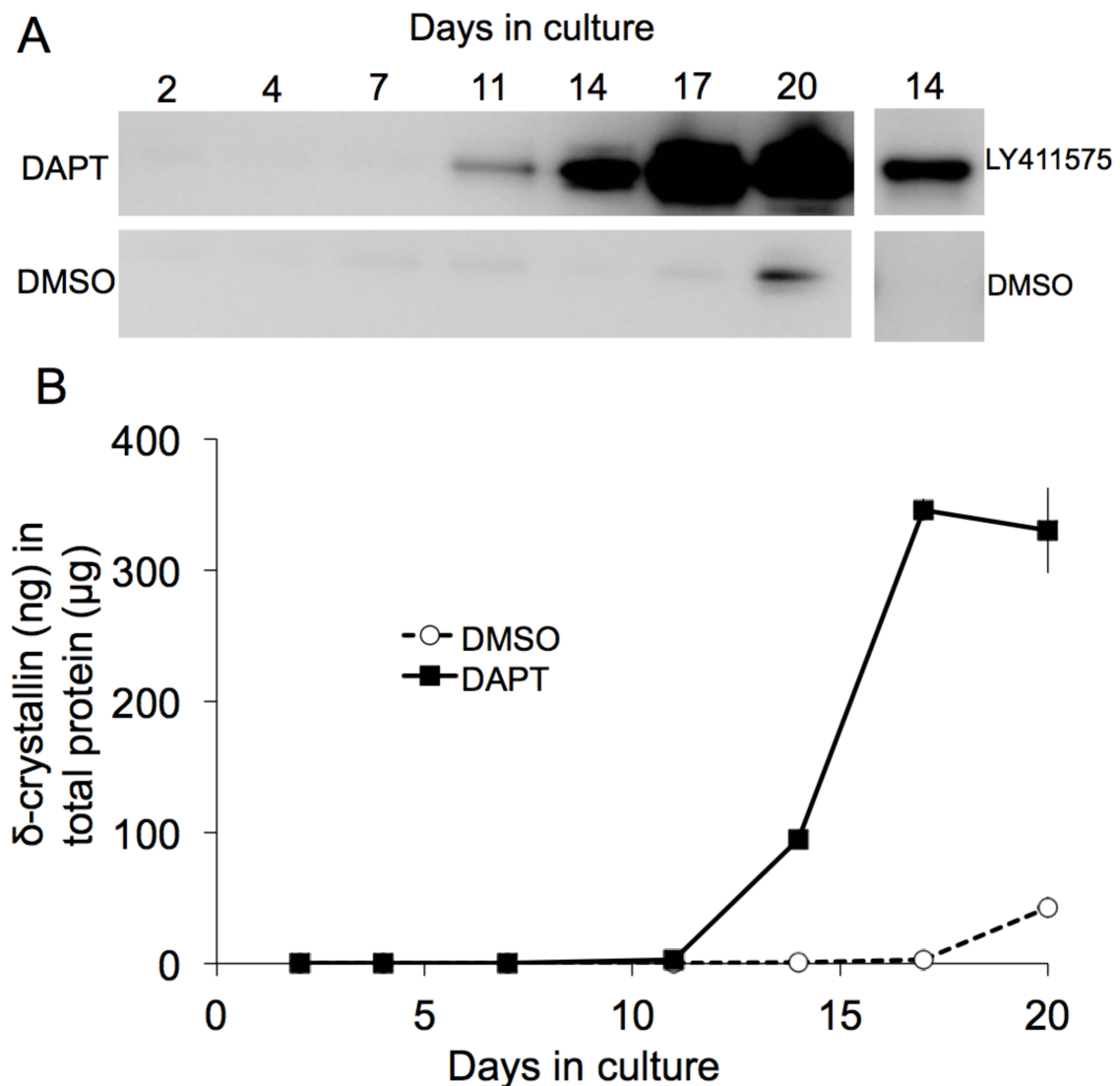


Figure. 9. 神経性網膜初代培養におけるクリスタリン発現のウエスタンブロッティングによる定量的解析。A. DAPT 処理もしくは無処理の培養における  $\delta$ -クリスタリンのウエスタンブロッティングの代表的な画像。14日、17日、および20日は5倍に希釈したサンプルを用いた。DAPT 処理した細胞では11日から  $\delta$ -クリスタリンの発現が上昇し始めた。一方 DMSO 処理した細胞では20日から発現が上昇した。LY411575 処理した細胞でも DAPT 処理した細胞と似たように、 $\delta$ -クリスタリンの発現が促進された。B. 2回の異なるサンプルを用いたウエスタンブロッティングから  $\delta$ -クリスタリンの発現量をシグナル強度により定量的に解析した。DAPT 処理した細胞における  $\delta$ -クリスタリンの発現量は DMSO 処理した細胞と比較し10倍以上発現量が上昇し、プラトーに達した。標準誤差をエラーバーで示した。

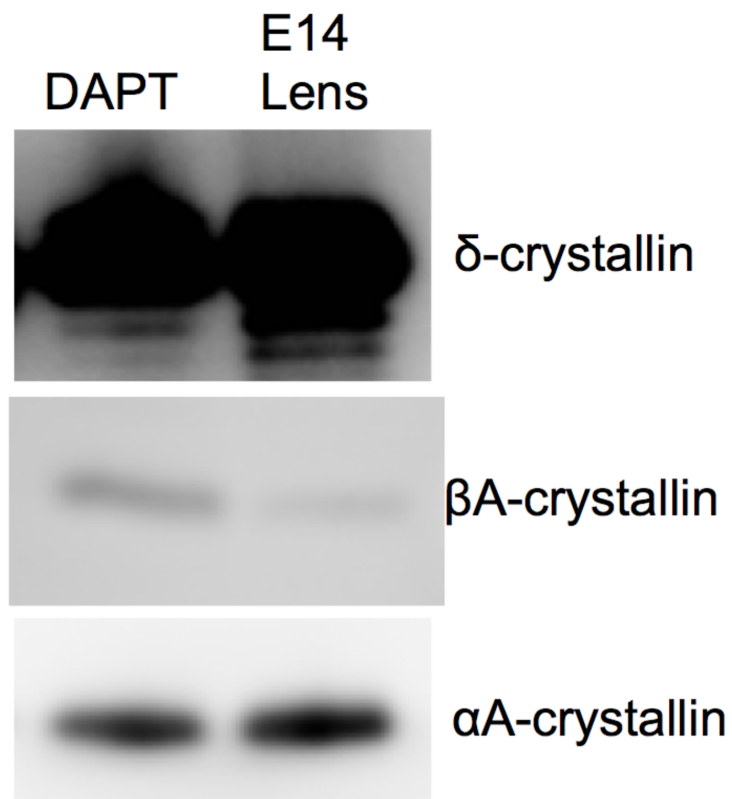


Figure. 10. 14日胚の水晶体と神経性網膜から生じた水晶体における $\delta$ -（20日）、 $\alpha$ A-（21日）、 $\beta$ A-（20日）クリスタリンの発現の比較。 $\delta$ -、 $\alpha$ A-、 $\beta$ A-クリスタリンはそれぞれ総タンパク質量10、1050、200 ngを電気泳動した。

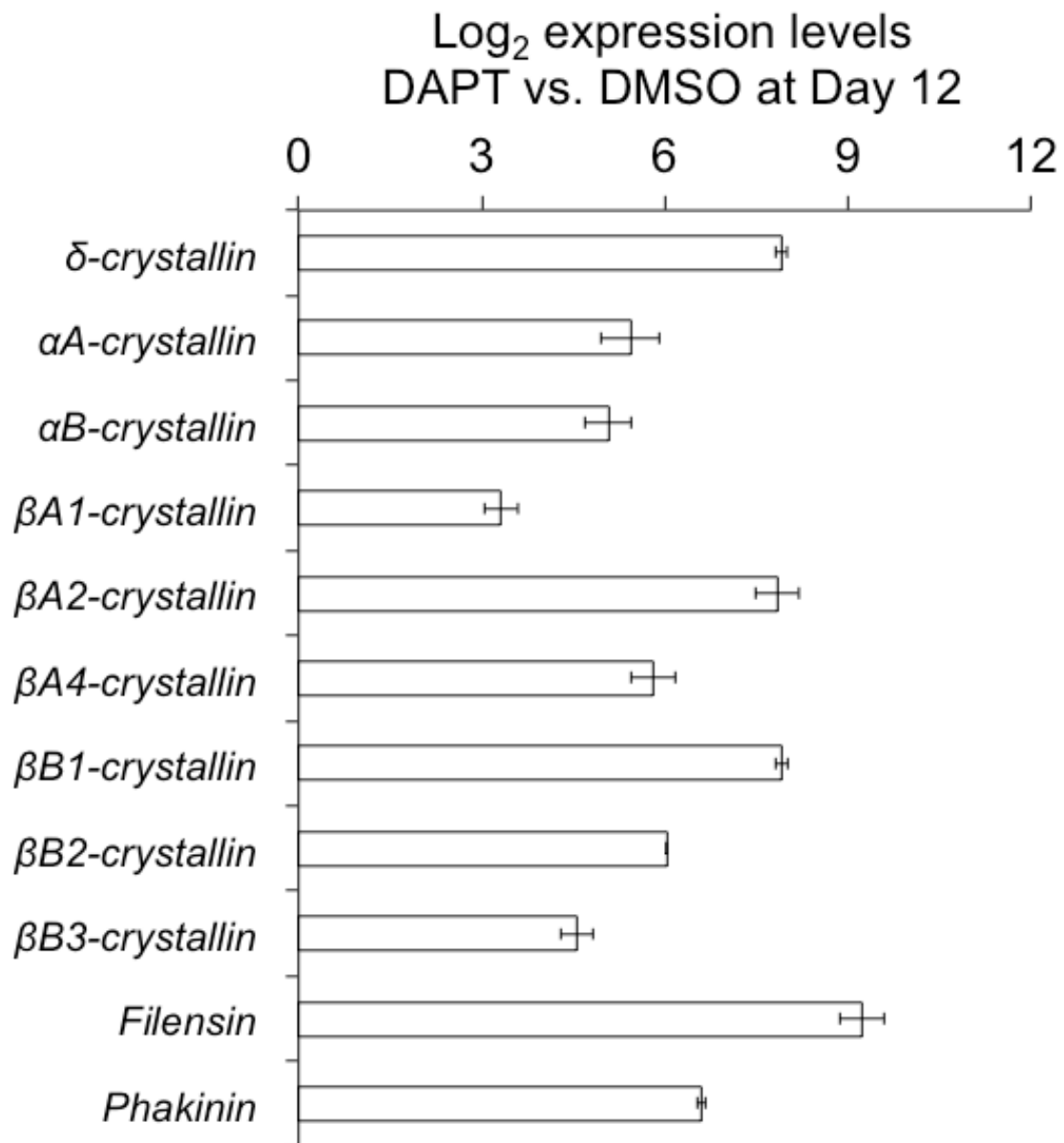


Figure. 11. 神経性網膜培養 1 2 日目において、DMSO 処理した細胞に対して DAPT 処理した細胞の水晶体特異的な遺伝子発現量をマイクロアレイにより解析した。マイクロアレイ解析は 2 つの異なるサンプルを用いて行った。エラーバーにより標準誤差を示した。

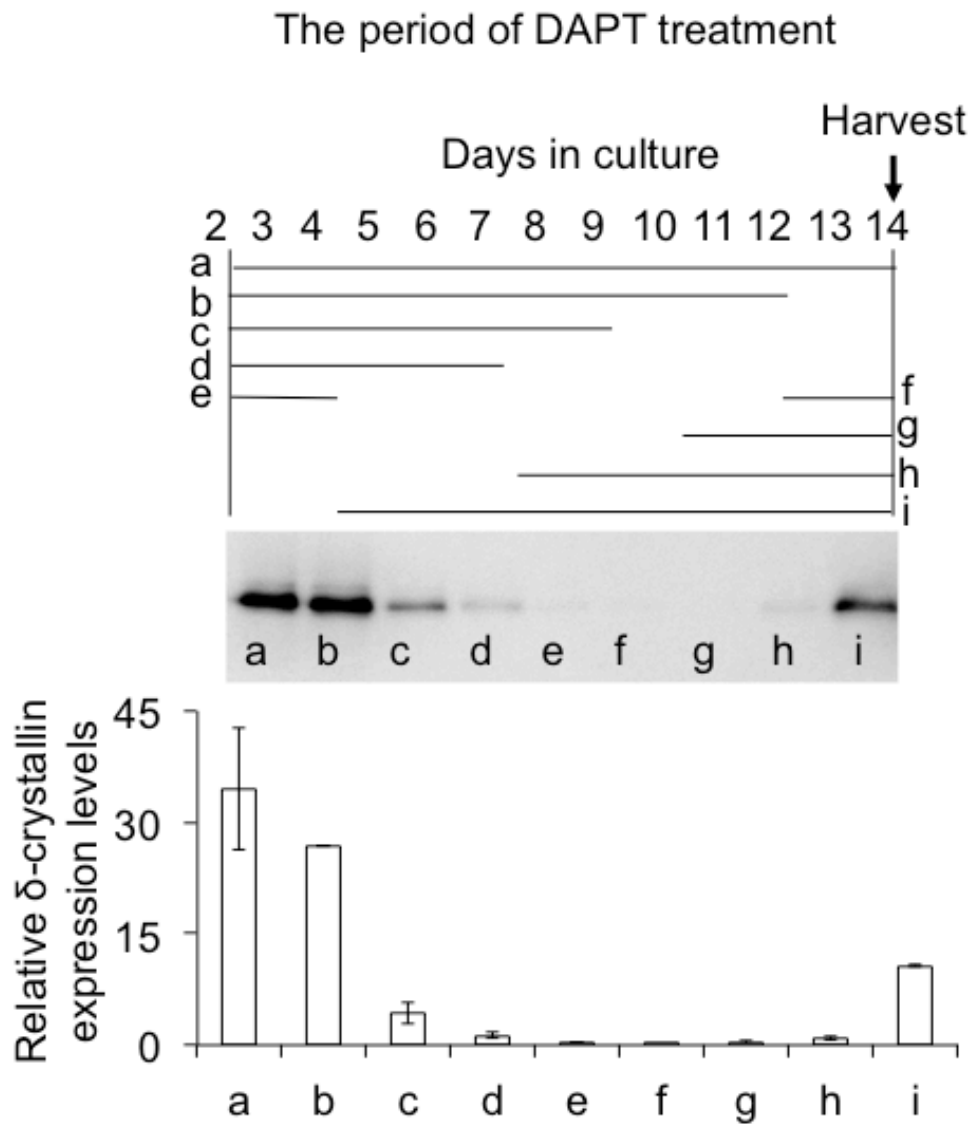


Figure. 12. 神経性網膜から水晶体への分化転換は継続的な DAPT 処理に依存する。8 日胚神経性網膜培養に DAPT 処理する期間を変えた。処理した期間を線によって示した (上段)。ウエスタンブロッティングにより  $\delta$ -クリスタリンの発現量を定量化した。ウエスタンブロッティングの代表的な画像 (中段)。ウエスタンブロッティングにより、 $\delta$ -クリスタリンの発現量の相対値をグラフによって示した。異なる 2 つのサンプルを用い実験し、標準誤差をエラーバーによって示した (下段)。



### 3. Notch シグナル阻害により、神経性網膜細胞において、通常の水晶体発生に関与する遺伝子カスケードが活性化される

私は DAPT 処理によって Notch シグナル阻害した 8 日胚神経性網膜の培養において、初期の水晶体発生や網膜の神経細胞の発生に関わる転写因子の変化を RT-qPCR 解析を用いて調べた。

Notch シグナルに依存して発現されることが知られている *HeyL* が DAPT 処理した神経性網膜培養において急激に減少したことから、DAPT 処理によって Notch シグナル抑制が効果的であることが確認できた (Fig. 13)。続いて、正常の水晶体発生ではレンズ胞から水晶体繊維細胞への移行に関与する転写因子である *Prox1*, *Pitx3* がこの順序で発現された (Medina-Martinez et al., 2009; Rieger et al., 2001; Semina et al., 2000; Wigle et al., 1999)。*Prox1* の発現は DAPT 処理後 2 から 4 日でピークとなった。一方で、*Pitx3* は 8 日で発現が強まり、その後、増加し続けた (Fig. 13)。これらの結果から、神経性網膜から水晶体への分化転換には、通常の水晶体分化の過程に必要な転写因子群の活性が関与することが示された。

網膜の神経前駆体で発現される転写因子の遺伝子である *Vsx2* (*Chx10*) (Belecky-Adams et al., 1997) および *Isl1* (Elshatory et al., 2007) もそれぞれ DAPT 添加後 5 日から 6 日でピークとなった (Fig. 14)。しかし、*Vsx2* および *Isl1* の活性化によっては神経細胞を増加しなかった (Fig. 7)。その他の転写因子である *Ascl1* (神経前駆体で発現される転写因子), *Crx* (視細胞の分化に関与する転写因子), *Hes1*, *Hes5* (Notch シグナル標的遺伝子), *Pax6*, *Sox2* (*Pax6*, *Sox2* の 2 つの転写因子の発現によってレンズプラコードからレンズ胞の分化が起こ

る) , **c-Maf** および **MafA** (水晶体分化に関わる転写因子で、 $\alpha$  ,  $\delta$ -クリスタリンの発現に関わる) は DAPT 処理による有意な影響は受けなかった (Fig. 15)。

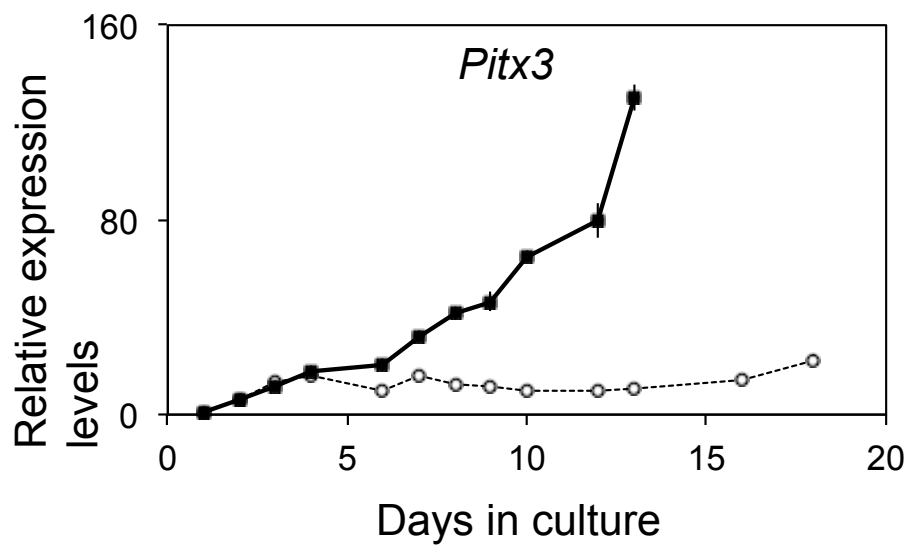
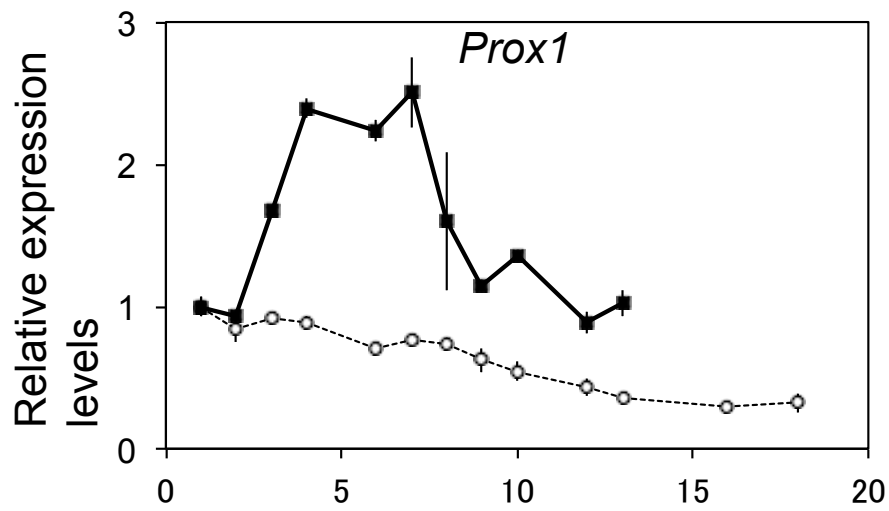
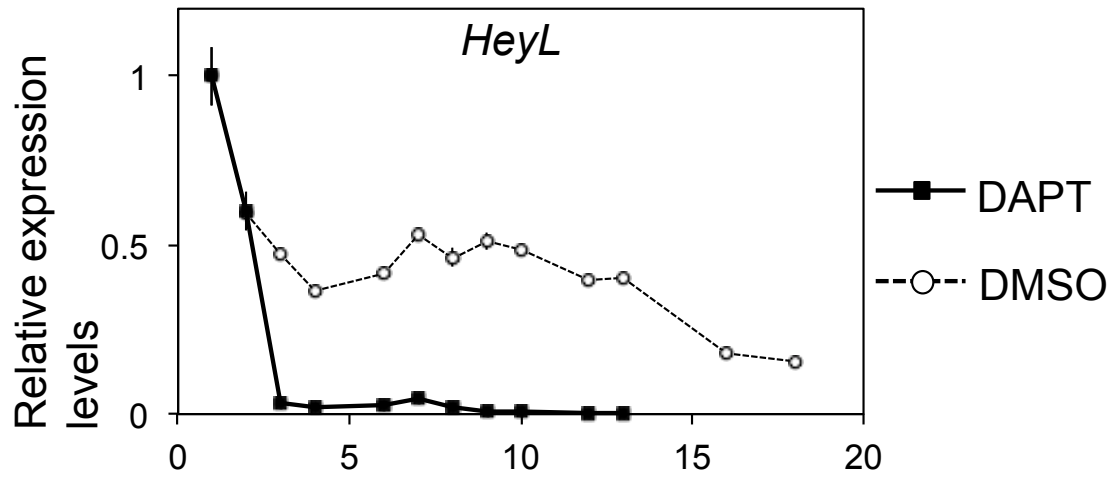


Figure 13. DAPT もしくは DMSO 処理した神経性網膜培養における転写因子の発現量の時系列的変化を RT-qPCR によって解析した。DAPT 処理した培養における RT-qPCR の結果を四角形および実線、DMSO 処理した培養における RT-qPCR の結果を無色丸および点線によってグラフとして示した。DAPT 処理直後に、Notch シグナル標的遺伝子である *HeyL* の発現は減少した。続いて、水晶体の発生に関与する転写因子である *Prox1*、*Pitx3* の発現が上昇した。培養開始 1 日後の発現量を 1 とした。異なる 2 つのサンプルの発現量の標準誤差をエラーバーとして示した。

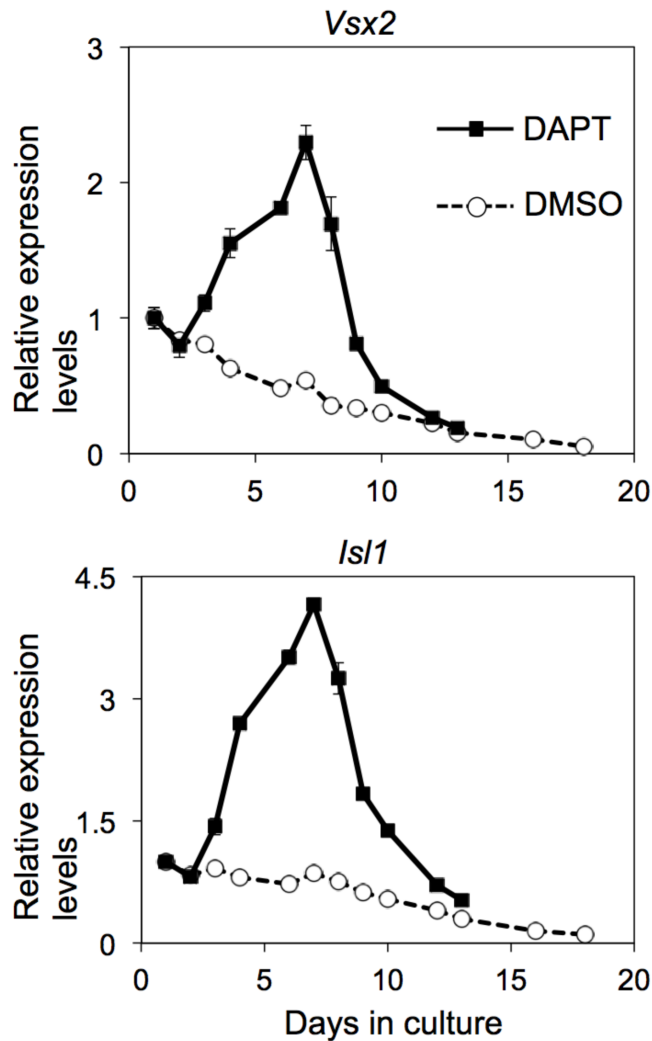


Figure. 14. DAPT もしくは DMSO 処理した神経性網膜培養における転写因子の発現量の時系列的变化を RT-qPCR によって解析した。DAPT 処理した培養における RT-qPCR の結果を四角形および実線、DMSO 処理した培養における RT-qPCR の結果を無色丸および点線によってグラフとして示した。神経前駆体で発現される転写因子である *Vsx2*、*Isl1* の発現量が DAPT 処理直後に上昇し、7 日から減少した。培養開始 1 日後の発現量を 1 とした。異なる 2 つのサンプルの発現量の標準誤差をエラーバーとして示した。

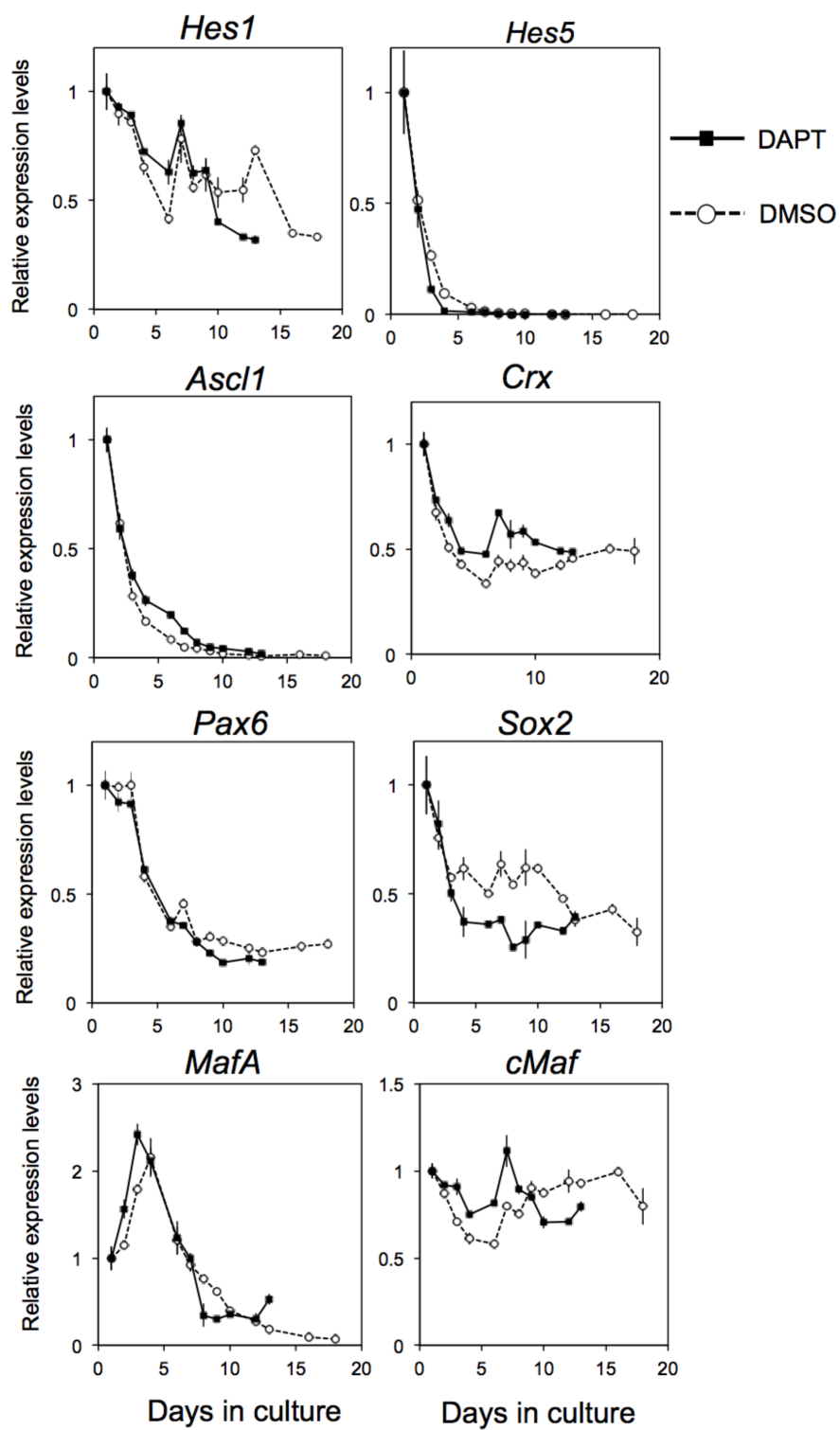


Figure. 15. DAPT もしくは DMSO 処理した神経性網膜培養における転写因子の発現量の時系列的変化を RT-qPCR によって解析した。DAPT 処理した培養における RT-qPCR の結果を四角形および実線、DMSO 処理した培養における RT-qPCR の結果を無色丸および点線によってグラフとして示した。Figure. 13 と同様の方法で示した。

## 考察

この研究において、私はニワトリ胚神経性網膜が **Notch** シグナルによって抑制される内在性の水晶体分化能を持つことを示した (Fig. 16A)。Notch シグナルを抑制する  $\gamma$ -セクレターゼ阻害剤の添加はレンズ胞から成熟した水晶体繊維細胞への移行に必須である転写因子、*Prox1*, *Pitx3* (Medina-Martinez et al., 2009; Wigle et al., 1999) を活性化した (Fig. 13)。それに引き続いて、調べたうちの成熟した水晶体細胞に含まれる全タンパク質の遺伝子が発現された (Fig. 11)。したがって、水晶体の分化転換は神経性網膜に内在する水晶体への分化能の抑制の破綻が原因であると考えられる。注目すべきことに、 $\delta$ -クリスタリン陽性細胞が小さい細胞 (神経細胞の大きさ) および大きい細胞 (扁平細胞) の両方の細胞集団で増加した (Fig. 8)。これは、培養した神経性網膜細胞の中で水晶体分化能を持つ細胞が特別な細胞集団に限定される訳ではないことを示している。

おそらく神経性網膜の通常の平板培養では、その一部で **Notch** シグナルが弱まり、内在性の水晶体分化能を抑制できなくなり、低頻度で水晶体分化が起こるのであろう (Fig. 16B)。8日胚神経性網膜を用いた以前の研究は、平板培養と凝集培養を組み合わせた方法を用いることで、水晶体への分化には10日以上の平板培養が必要であることが示されていた (Okada et al., 1983)。この水晶体分化に必要な平板培養の期間は、水晶体分化に最大の影響を与える DAPT 処理期間と似ている (Fig. 12)。したがって、無処理の長期の平板培養は、Notch シグナル抑制の状態によって水晶体分化能を活性化できる条件を確保しているのだろう。DAPT 処理期間12日間 (Fig. 12a, 14日間で形態的に識別可能な水晶体が生じる条件) だけでなく、10日間の処理 (Fig. 12b, i) においても、



$\delta$ -クリスタリンの発現上昇は起こっているが、12日間処理の場合に比べると $\delta$ -クリスタリンの発現量は低かった。Okadaらの結果から、平板培養の期間が10日より15日の培養の方がより多くの $\delta$ -クリスタリンを発現した。また、DAPT処理期間が10日間では形態的に識別可能な水晶体が培養14日で生じなかったことから、より長期間のNotchシグナルの抑制が水晶体への分化転換に必要である。

RT-qPCRの解析から、DAPT処理した細胞ではレンズ胞から水晶体繊維細胞への分化に必要な*Prox1*と*Pitx3*の発現が上昇し分化転換が起こったことがわかった (Fig. 13)。生体における水晶体の分化では、表皮外胚葉での*Pax6*, *Sox2*の発現が上昇することがもとになってレンズプラコード-レンズ胞への分化がおこり、さらに*Prox1*と*Pitx3*の発現が上昇することによって、レンズ胞から水晶体繊維細胞への分化が起こる (Kondoh et al., 2004; Medina-Martinez et al., 2009; Wigle et al., 1999)。しかし、DAPT処理した神経性網膜では、無処理の培養と比較し、*Pax6*, *Sox2*の有意な発現上昇起こらず、*Prox1*と*Pitx3*の発現上昇が起こった。したがって、レンズ胞から水晶体繊維細胞への分化の過程のみが起こることで、神経性網膜から水晶体への分化転換が起こった。レンズプラコードの分化の過程では、N-カドヘリンの上昇が起こる (Matsumata et al., 2005) しかし、マイクロアレイの結果において、DAPT処理した培養で、N-カドヘリンの上昇も起こっていない。胚の網膜では、*Pax6*, *Sox2*はすでに十分のレベルにまで発現されていて、N-カドヘリンも発現されていることから、形態的には異なっているが、細胞内の状態としては水晶体プラコードにかなり似た状態になっていると考えられる。

神経性網膜における神経細胞への分化の直前には、Notch シグナルの減少が起こる (Nelson et al., 2006, 2007)。DAPT 処理した神経性網膜において、無処理の培養と比較し、Notch 標的遺伝子である *HeyL* の発現の減少は起こったが、他の Notch 標的遺伝子である *Hes1*, *Hes5* の発現に有意な差はなかった。これは、平板培養を行なった時点で、これら 2 つの遺伝子はすでに限界まで発現が減少しているため、DAPT 処理による有意な減少が起こらなかった可能性がある。また、Notch1 変異マウスにおいて、中枢神経系における *Hes1* の発現に変化がなかった (Yoon et al., 2005)。したがって、*Hes1* は Notch シグナル以外のカスケードによってもコントロールされている可能性が考えられる。また、DAPT 処理した細胞において、*Isl1* と *Vsx2* の 2 種類の神経前駆細胞で発現される転写因子の発現が活性化され、DAPT 添加後 5 日から 6 日でピークとなった (Fig. 14)。しかし、FACS の解析結果から、神経細胞への分化は促進されなかった。Nelson らの結果では、ニワトリ 4.5 日胚の神経性網膜に DAPT 処理を行うと、神経細胞への分化が促進された (Nelson et al., 2006, 2007)。本研究では、 $\beta$  III-チューブリンの免疫染色によって示したように (Fig. 1B)、すでに神経分化の進んだニワトリ 8 日胚の神経性網膜を用いたため、DAPT 処理によって *Isl1* と *Vsx2* の活性化が起きても、もはや神経分化が促進されなかったと考えられる。また、神経前駆細胞で発現される転写因子 *Ascl1* (哺乳類では *Mash1*) や視細胞分化を調節する転写因子 *Crx* の発現が上昇していないことから神経分化が促進されなかったことが確認された。

通常神経性網膜の発生において、なぜ水晶体の発生は抑制されているのだろうか。網膜組織から生じた水晶体組織はおそらく構造的に視覚機能への障害

となるのだろう。したがって、この水晶体組織への分化は抑制されなければならない。この仮説に従うと、神経性網膜に組織的な水晶体が発生可能性はあり得る。実際に、野生のワシミミヅクや野生のオウムはしばしば神経性網膜に水晶体様細胞塊を持っていることが報告されている(Zeiss and Dubielzig, 2006)。この観察結果は、神経性網膜が水晶体への分化能を内在的に持つというモデルを支持する (Fig. 16)。

この潜在能力を利用したと思われる生物現象として、イモリにおける背側虹彩（網膜の前側の周縁部の組織）からの水晶体の再生が挙げられる。水晶体の再生は、虹彩外周の全体において、*Prox1* を含む初期水晶体発生に関与する転写因子を活性化する *Fgf2* シグナルによって開始され(Hayashi et al., 2004)、*Wnt* シグナルの局所的な揺らぎが水晶体を再生する領域を決定する(Hayashi et al., 2006)。

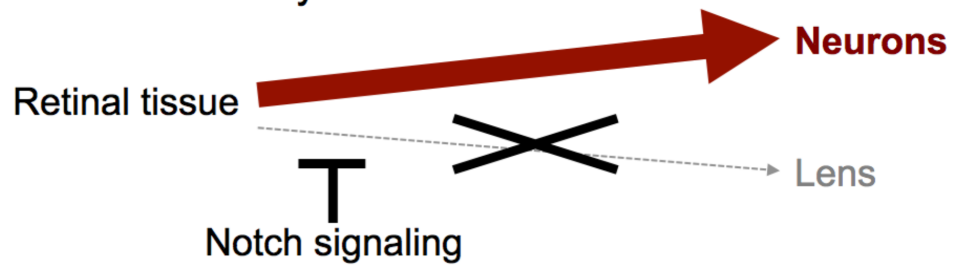
網膜由来の分化転換による水晶体分化と比較される他の例としては、ヘッジホッグシグナルの欠損(Davey et al., 2006; Karlstrom et al., 1999; Sekimizu et al., 2004)を持つ *talpid3* 変異ニワトリ (Ede and Kelly, 1964)や *you-too, iguana* 変異ゼブラフィッシュ(Kondoh et al., 2000)における下垂体原基からの水晶体分化が挙げられる。これらの報告に基づくと、下垂体原基も通常はヘッジホッグシグナルによって抑制される水晶体分化能を持つかもしれない。

したがって、通常は抑制されている内在的な水晶体分化能を元の組織が持つという共通した原理に基づいて水晶体への分化転換が起こる。培養条件や組織の損傷、遺伝子変異もしくは欠損による抑制機構の破綻は、内在性の水晶体分化能の活性を引き起こす。私は抑制機構の脱抑制が分化転換現象を引き起こす

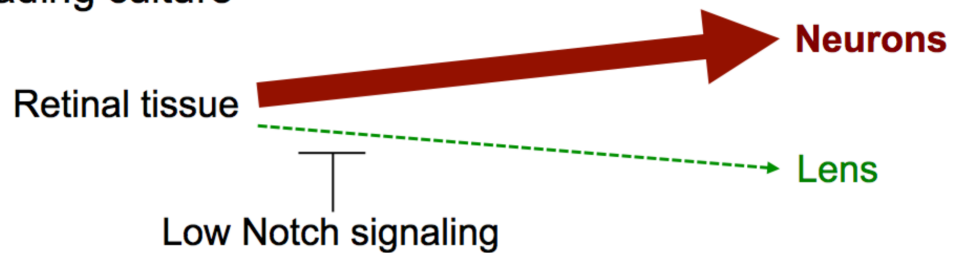
広く共通した機構ではないかと考えている。

これまでの分化の定説としては、細胞が分化する場合、その分化が積極的に促進されるような機構によって制御されると考えられてきた。しかし、本研究は、細胞には様々な分化能が維持されているが、正常な発生において必要でない分化過程が抑制機構によって抑えられることで、残った分化の経路を辿り、正常な分化が起こる可能性を積極的に支持している。

### A. Neural retina in embryos



### B. Spreading culture



### C. Spreading culture with DAPT

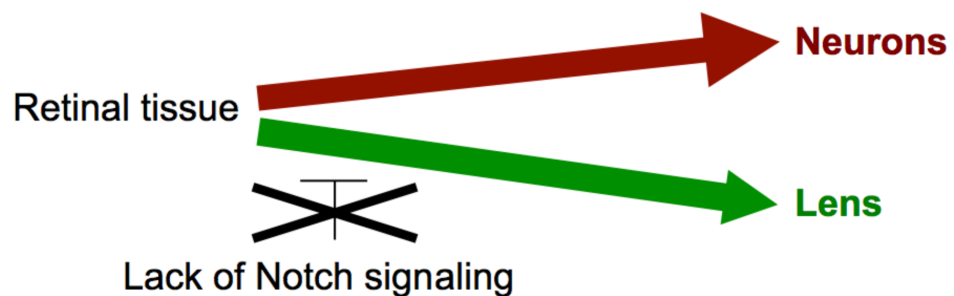


Figure. 16. 神経性網膜組織における Notch シグナル依存的な水晶体分化の調節のモデル。 A. 胚の正常な神経性網膜において、水晶体分化能は Notch シグナルによって強く抑制される。 B. 神経性網膜の平板培養では Notch シグナル依存的な抑制が弱くなり、低頻度で水晶体分化が起こった。 C. DAPT 処理した培養では Notch シグナルが強く抑制され、高頻度で水晶体分化が起こった。

## 謝辞

私は近藤寿人教授また発生生物学研究室の皆様に、熱心なご指導、意義深い議論を賜りましたことに、深く感謝致します。

また、板野教授ならびに研究室の皆様に、**FACS** の使用にあたって、機器の操作等、懇切丁寧なご指導を賜りましたことを深くお礼申し上げます。

## 参考文献

- Araki, M. and Okada, T. S.** (1977). Differentiation of lens and pigment cells in cultures of neural retinal cells of early chick embryos. *Dev Biol* **60**, 278-286.
- Belecky-Adams, T., Tomarev, S., Li, H. S., Ploder, L., McInnes, R. R., Sundin, O. and Adler, R.** (1997). Pax-6, Prox 1, and Chx10 homeobox gene expression correlates with phenotypic fate of retinal precursor cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **38**, 1293-1303.
- Furukawa T1, Mukherjee S, Bao ZZ, Morrow EM, Cepko CL.** (2000). rax, Hes1, and notch1 promote the formation of Müller glia by postnatal retinal progenitor cells. *Neuron*. 26, 383-394.
- Davey, M. G., Paton, I. R., Yin, Y., Schmidt, M., Bangs, F. K., Morrice, D. R., Smith, T. G., Buxton, P., Stamatakis, D., Tanaka, M., et al.** (2006). The chicken talpid3 gene encodes a novel protein essential for Hedgehog signaling. *Genes Dev* **20**, 1365-1377.
- Davis, R. L., Weintraub, H. and Lassar, A. B.** (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* **51**, 987-1000.
- De Pomerai, D. I. and Clayton, R. M.** (1978). Influence of embryonic stage on the transdifferentiation of chick neural retina cells in culture. *J Embryol Exp Morphol* **47**, 179-193.
- Ede, D. A. and Kelly, W. A.** (1964). Developmental Abnormalities in the Head Region of the Talpid Mutant of the Fowl. *J Embryol Exp Morphol* **12**, 161-182.
- Elshatory, Y., Everhart, D., Deng, M., Xie, X., Barlow, R. B. and Gan, L.** (2007).

Islet-1 controls the differentiation of retinal bipolar and cholinergic amacrine cells. *J Neurosci* **27**, 12707-12720.

**Fischer, A., Steidl, C., Wagner, T. U., Lang, E., Jakob, P. M., Friedl, P., Knobloch, K. P. and Gessler, M.** (2007). Combined loss of Hey1 and HeyL causes congenital heart defects because of impaired epithelial to mesenchymal transition. *Circ Res* **100**, 856-863.

**Hamburger, V. and Hamilton, H. L.** (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* **88**, 49-92.

**Hayashi, T., Mizuno, N. and Kondoh, H.** (2008). Determinative roles of FGF and Wnt signals in iris-derived lens regeneration in newt eye. *Dev Growth Differ* **50**, 279-287.

**Hayashi, T., Mizuno, N., Takada, R., Takada, S. and Kondoh, H.** (2006). Determinative role of Wnt signals in dorsal iris-derived lens regeneration in newt eye. *Mech Dev* **123**, 793-800.

**Hayashi, T., Mizuno, N., Ueda, Y., Okamoto, M. and Kondoh, H.** (2004). FGF2 triggers iris-derived lens regeneration in newt eye. *Mech Dev* **121**, 519-526.

**Karlstrom, R. O., Talbot, W. S. and Schier, A. F.** (1999). Comparative synteny cloning of zebrafish you-too: mutations in the Hedgehog target gli2 affect ventral forebrain patterning. *Genes Dev* **13**, 388-393.

**Kondoh, H.** Transcription factors for lens development assessed in vivo. (1999). *Curr Opin Genet Dev.* **9**, 301-308.

**Kondoh, H.** (2010). Lens induction. In *Encyclopedia of life sciences (ELS)*, pp.



a0001142 Chichester: John and Wiley & Sons.

**Kondoh H, Uchikawa M, Kamachi Y.** (2004). Interplay of Pax6 and SOX2 in lens development as a paradigm of genetic switch mechanisms for cell differentiation. *Int J Dev Biol* 48, 819-827

**Kondoh, H., Uchikawa, M., Yoda, H., Takeda, H., Furutani-Seiki, M. and Karlstrom, R. O.** (2000). Zebrafish mutations in Gli-mediated hedgehog signaling lead to lens transdifferentiation from the adenohypophysis anlage. *Mech Dev* 96, 165-174.

**Kondoh, H., Yasuda, K. and Okada, T. S.** (1983). Tissue-specific expression of a cloned chick delta-crystallin gene in mouse cells. *Nature* 301, 440-442.

**Le TT, Conley KW, Mead TJ, Rowan S, Yutzey KE, Brown NL.** (2012). Requirements for Jag1-Rbpj mediated Notch signaling during early mouse lens development. *Dev Dyn.* 241, 493-504.

**Matsumata M, Uchikawa M, Kamachi Y, Kondoh H.** (2005). Multiple N-cadherin enhancers identified by systematic functional screening indicate its Group B1 SOX-dependent regulation in neural and placodal development. *Dev Biol.* 15, 601-617.

**Medina-Martinez, O., Shah, R. and Jamrich, M.** (2009). Pitx3 controls multiple aspects of lens development. *Dev Dyn* 238, 2193-2201.

**Nelson, B. R., Gumuscu, B., Hartman, B. H. and Reh, T. A.** (2006). Notch activity is downregulated just prior to retinal ganglion cell differentiation. *Dev Neurosci* 28,

128-141.

**Nelson, B. R., Hartman, B. H., Georgi, S. A., Lan, M. S. and Reh, T. A. (2007).**

Transient inactivation of Notch signaling synchronizes differentiation of neural progenitor cells. *Dev Biol* **304**, 479-498.

**Okada, T. S. (1991).** *Transdifferentiation*. Oxford: Clarendon Press.

**Okada, T. S., Ito, Y., Watanabe, K. and Eguchi, G. (1975).** Differentiation of lens in cultures of neural retinal cells of chick embryos. *Dev Biol* **45**, 318-329.

**Okada, T. S., Nomura, K. and Yasuda, K. (1983).** Commitment to transdifferentiation into lens occurs in neural retina cells after brief spreading culture of the dissociated cells. *Cell Differ* **12**, 85-92.

**Rieger, D. K., Reichenberger, E., McLean, W., Sidow, A. and Olsen, B. R. (2001).**

A double-deletion mutation in the Pitx3 gene causes arrested lens development in aphakia mice. *Genomics* **72**, 61-72.

**Rowan S, Conley KW, Le TT, Donner AL, Maas RL, Brown NL. (2008).** Notch

signaling regulates growth and differentiation in the mammalian lens. *Dev Biol.* **321**, 111-122.

**Sekimizu, K., Nishioka, N., Sasaki, H., Takeda, H., Karlstrom, R. O. and**

**Kawakami, A. (2004).** The zebrafish iguana locus encodes Dzip1, a novel zinc-finger protein required for proper regulation of Hedgehog signaling. *Development* **131**, 2521-2532.

**Semina, E. V., Murray, J. C., Reiter, R., Hrstka, R. F. and Graw, J. (2000).**

Deletion in the promoter region and altered expression of Pitx3 homeobox gene

in aphakia mice. *Hum Mol Genet* **9**, 1575-1585.

**Surzenko N, Crowl T, Bachleda A, Langer L, Pevny L.** (2013). SOX2 maintains the quiescent progenitor cell state of postnatal retinal Muller glia. *Development*. **140**, 1445-1456.

**Takahashi, K. and Yamanaka, S.** (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676.

**Towbin H, Staehelin T, Gordon J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354.

**Wigle, J. T., Chowdhury, K., Gruss, P. and Oliver, G.** (1999). Prox1 function is crucial for mouse lens-fibre elongation. *Nat Genet* **21**, 318-322.

**Yoon K, Gaiano N.** (2005). Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants. *Nat Neurosci.* **8**, 709-715.

**Yoshimoto, A., Saigou, Y., Higashi, Y. and Kondoh, H.** (2005). Regulation of ocular lens development by Smad-interacting protein 1 involving Foxe3 activation. *Development* **132**, 4437-4448.

**Zeiss, C. J. and Dubielzig, R. R.** (2006). Lentoid bodies in the avian retina. *J Comp Pathol* **135**, 243-248.

## 研究業績

項目	題名	年・月	発表の方法
学会発表	<u>飯田英明</u> 、石井泰雄、近藤寿人 ニワトリ胚神経性網膜細胞の水晶体細胞への分化転換に関わる制御	2014・11	第37回日本分子生物学会年会 ポスター発表
	<u>飯田英明</u> 、ヨウテンテン、八杉貞雄、石井泰雄 ニワトリ胚眼における形態形成運動のタイミング制御、	2014・12	第181回例会日仏生物学会 口頭発表
	<u>Iida Hideaki</u> , Ishii Yasuo, Kondoh Hisato. Investigating mechanisms underlying lens differentiation from embryonic neural retina	2015・6	48th Annual Meeting of Japanese Society of Developmental Biologists Flash talk and poster presentation
	<u>飯田英明</u> 、石井泰雄、近藤寿人 神経性網膜から水晶体への分化遷移の機構	2015・6	日仏生物学会 182 回例会 口頭発表
	<u>飯田英明</u> 、石井泰雄、近藤寿人 神経性網膜から水晶体への分化転換の機構	2015・12	第38回日本分子生物学会・第88回日本生化学会合同大会 ポスター発表

項目	題名	年・月	発表の方法
学会発表	<u>飯田英明</u> 、石井泰雄、近藤寿人 Notch シグナル阻害によるニワトリ胚神経性網膜から水晶体への分化転換の促進	2015・12	日仏生物学会 183 回例会 口頭発表
	<u>Iida Hideaki</u> , Yasuo Ishii, Hisato Kondoh Simultaneous promotion of neuronal and lens development from chicken embryonic neural retina	2016・6	Special symposium of Japanese Society of Developmental Biologists Poster presentation
	<u>飯田英明</u> 、石井康雄、近藤寿人 神経性網膜に内在する水晶体分化能を抑制する Notch シグナル：その破綻が水晶体への「分化転換」をもたらす	2016・10	日本発生生物学会、秋シンポジウム 口頭発表およびポスター発表
	<u>Iida Hideaki</u> , Yasuo Ishii, Hisato Kondoh Intrinsic lens potential of neural retina inhibited by Notch signaling as the cause of lens transdifferentiation	2016・12	第39回日本生物学会年会 口頭発表およびポスター発表
助成金	<u>飯田英明</u> 網膜から水晶体への分化転換をもたらす転写制御とシグナル制御	2015・4	平成27年度笹川科学助成金、助成金額 72 万円 研究者番号 27-421
原著論文	<u>Hideaki Iida</u> , Yasuo Ishii, Hisato Kondoh* Intrinsic lens potential of neural retina inhibited by Notch signaling as the cause of lens transdifferentiation	2016・11	Developmental Biology doi:10.1016/j.ydbio.2016.11.004.
	<u>Hideaki Iida</u> , Tiantian Yang, Sadao Yasugi, Yasuo Ishii* Temporal dissociation of organ morphogenesis under low temperature conditions in chick	2016・12	Development, Growth and Differentiation doi:10.1111/dgd.12330.