

## Mini Review

# アフリカツメガエル初期胚を用いた試験管内における眼の形成と移植実験系の確立

後原綾子<sup>1)</sup>, 浅島 誠<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup>東京大学大学院総合文化研究科生命環境科学系浅島研究室

<sup>2)</sup>ICORP (JST)

*In vitro induction and transplantation of eye during early Xenopus development*

We established a novel *in vitro* system to induce eye at high frequency using *Xenopus* early gastrulae. The eye formed *in vitro* is morphologically similar to the normal eye. Immunostaining showed that the eye induced *in vitro* had mature optic tissues. The cell lineage tracing revealed that eyes formed *in vitro* were derived from the animal cap cells. For functional analysis, we tried transplantation of eye induced *in vitro*. When eye induced *in vitro* was transplanted into stage 33 eyeless tadpole, the grafted eye rooted to the host tadpole and optic nerve was regenerated. Dil staining of the optic nerve showed that regenerated optic nerve reached the tectum of the host brain. The grafted eye was retained after metamorphosis. The resultant juvenile frogs could perceive brightness using the grafted eye and control their skin color, suggesting that the eye formed *in vitro* could function normally.

Rec.10/6/2004, Acc.11/1/2004, pp107-112

Ayako Sedohara<sup>1)</sup>, Makoto Asashima<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Life Sciences (Biology), Graduate school of Art and Sciences, University of Tokyo

<sup>2)</sup>International Cooperative Research Project (ICORP), Japan Science and Technology Corporation (JST)

**Key words** eye, organ engineering, regeneration, transplantation

## はじめに

脊椎動物全般において、眼が誘導される仕組みは広く保存されていることが知られている。この仕組みを解明し、さらに再生医療へと発展させていくためには、試験管内で眼の誘導を再現する実験系の確立が必要となる。私たちはアフリカツメガエルの胞胚期のアニマルキャップを用いて試験管内での器官形成を行ってきた。アニマルキャップとは、胞胚期の動物極に位置する未分化で、多分化能を持つ細胞からなる。現在までに、アニマルキャップに様々な因子を処理することにより、筋肉、神経、血球、腎臓、心臓、膵臓などを試験管内で形作ることに成功している<sup>1-6,13-16)</sup>。しかしながら、眼のような高次誘導の結果形作られる感覚器官を高率に誘導する実験系は得られていなかった。そこ

で私たちは、ツメガエル初期胚の未分化細胞を用いて試験管内で眼の発生を制御することを試み、その結果、高頻度で眼を誘導する系を確立した。さらに、試験管内で作った眼を幼生に移植することは可能であり、正常に機能するということがわかった<sup>18)</sup>。

## 試験管内において眼を誘導する実験系の模索

アフリカツメガエル後期胞胚(卵割が進んで細胞が小さくなり、卵割腔がみられる発生段階)の動物極から半径0.3mmに位置する細胞は、未分化で多分化能を持つ細胞からなり、アニマルキャップと呼ばれている。一方、アフリカツメガエル初期原腸胚(細胞が陥入し始め、三胚葉が形

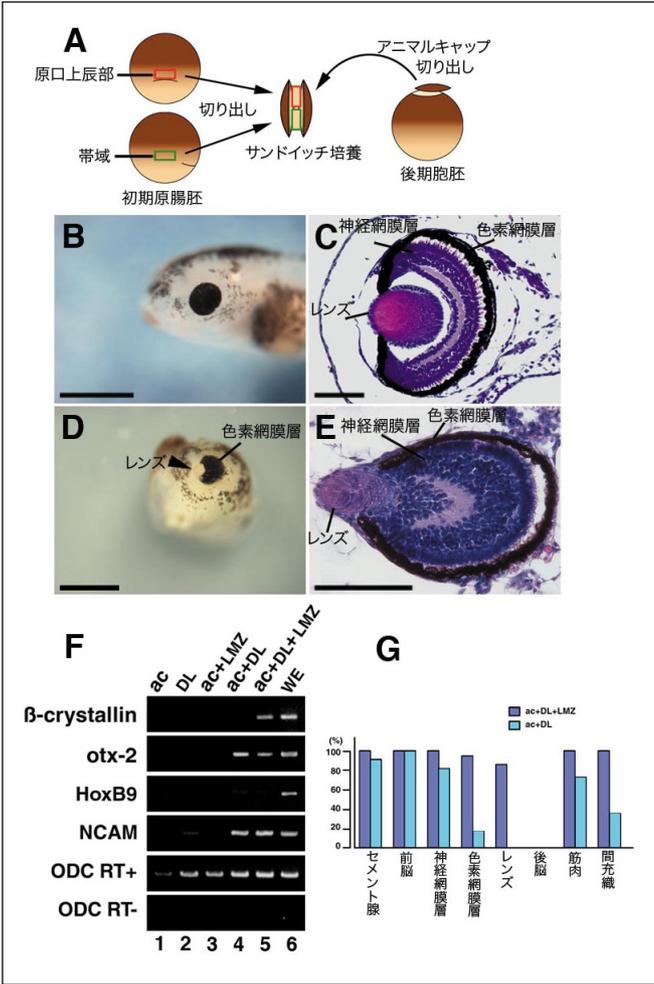


図1 試験管内で作った眼

A: 眼を作る方法. 初期原腸胚から原口上唇部と帯域の細胞をそれぞれ切り出し, 後期胞胚から切り出した2枚のアニマルキャップでサンドイッチ培養した.

B, D: ステージ 42 の幼生(B)と試験管内で作った眼の観察(D)の外形の観察. 試験管内で作った眼も, 正常な眼と同じようにレンズを伴う色素網膜層で囲まれた眼がみられた.

C, E: ステージ 42 の幼生(C)と試験管内で作った眼(E)の組織切片の観察. 正常な眼と同様に, レンズ, 神経網膜層, 色素網膜層がみられた. 染色法はヘマトキシリンとエオシンの対比染色. B, D のスケールバーは 1mm, C, E のスケールバーは 0.1mm を示す.

F: 処理条件の異なる外植体を4日間培養した時の部位特異的遺伝子マーカーの発現の解析. 本研究で確立した眼を作る条件でのみ  $\beta$ -crystallin の発現がみられた (レーン 5).  $\beta$ -crystallin (レンズのマーカー), *otx-2* (前脳のマーカー), NCAM (神経全体のマーカー), *HoxB9* (脊髄のマーカー). ac; アニマルキャップの単独培養, DL; 原口上唇部の単独培養, ac+LMZ; アニマルキャップと帯域を組み合わせて培養したもの, ac+DL; アニマルキャップと原口上唇部をサンドイッチ培養したもの, ac+DL+LMZ; 原口上唇部と帯域を組み合わせてアニマルキャップでサンドイッチ培養したもの(眼を作る条件), WE; ステージ 42 の幼生.

G: 組織分化率の棒グラフ ac+DL と ac+DL+LMZ の組織分化率を比較したところ, 眼を作る条件である ac+DL+LMZ ではレンズの形成率が高く, レンズ, 神経網膜層, 色素網膜層がそろった眼が高率に形成されているのがわかる.

成される時期)の原口上唇部(陥入する直前の細胞群)の領域はオーガナイザーと呼ばれ, 強い頭部誘導能を持つことが知られている. この初期原腸胚から切り出した原口上唇部を, 後期胞胚から切り出したアニマルキャップでサンドイッチ培養を行うと, サンドイッチ外植体はセメント腺などの前方構造に分化した. このとき, 眼の細胞はみられなかった. 一方, この強い前方誘導能を持つ原口上唇部を, 帯域(原口上唇部の真横の細胞群)を含む領域とともに切り出したアニマルキャップでサンドイッチ培養すると, 前方構造だけでなく, 脊髄やヒレなどの後方の構造も誘導された. この時には, どの外植体にも眼が分化しているのがみられた.

次に, それぞれの培養条件において, 前脳や後脳など, どの領域の神経ができていのかを調べるために, 神経の部位特異的な遺伝子マーカーの発現をRT-PCR法により調べた. セメント腺のマーカーとして *AG1*, 前脳のマーカーとして *otx-2*, 中脳と後脳の境界で発現する *En2*, 後脳のマーカーとして *Krox20*, 脊髄のマーカーとして *HoxB9*, 神

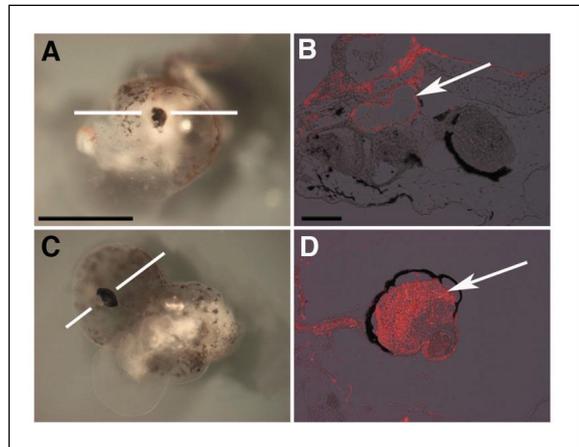


図2 細胞系譜実験

A, B: 原口上唇部をトレーサー TRDA (赤) で標識して試験管内で眼を作ったもの. 脊索で TRDA のシグナルがみられる.

C, D: アニマルキャップを TRDA で標識し, 試験管内で眼を作ったもの. 眼で TRDA のシグナルがみられる. 試験管内で作った眼は, アニマルキャップの細胞に由来することがわかった.

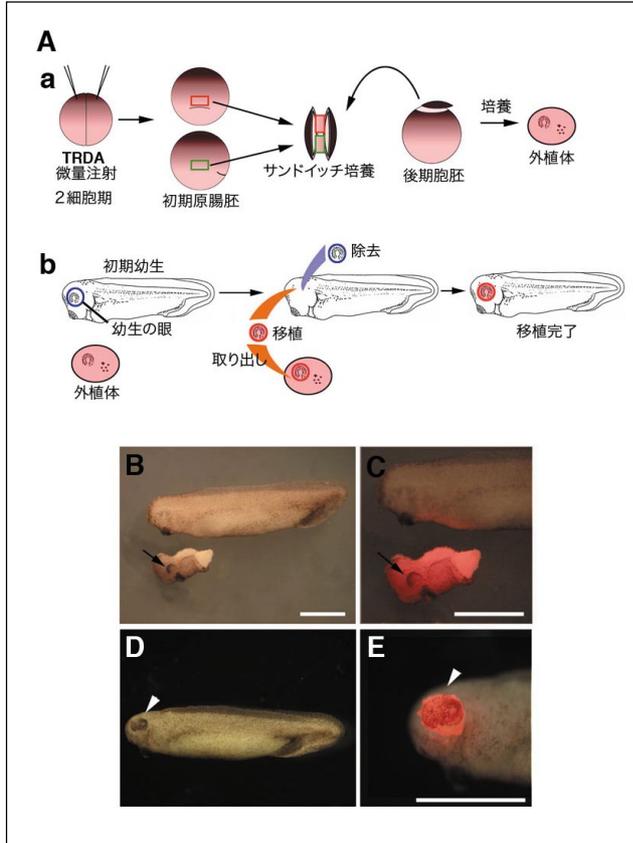


図3 移植実験方法

A-a: 人工媒精により得たツメガエル2細胞期胚の動物極側にTRDAを微量注射して標識した。この胚を用いて試験管内で眼を作り、幼生の発生段階がステージ33に達するまで2日間培養した。A-b: ステージ33の幼生の左眼を外科的手術によって除去し、試験管内で作った眼を移植した。  
 B: ステージ33の幼生(上)と試験管内で作った眼(下、黒い矢印)。幼生の眼はすでに外科的手術によって除去されている。  
 C: Bの拡大図。試験管内で作った眼はTRDAで標識されている。  
 D: 移植直後の様子(白い矢頭)。  
 E: Dの拡大図。移植した眼でのみTRDAのシグナルがみられる。B,C,Eのスケールバーは1mmを表す。

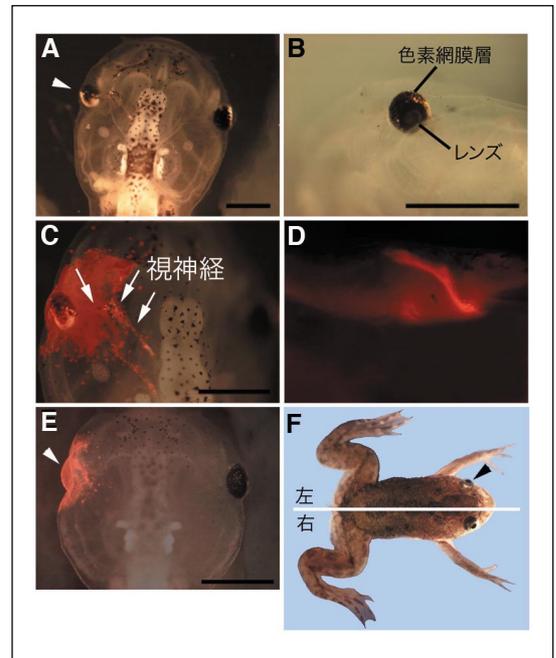


図4 試験管内で作った眼は幼生に生着し、変態後も維持された。

A-F: 移植後10日後の観察。(A)背側から見た様子。移植した眼は幼生に生着している(白い矢頭)。(B)側面から見た移植した眼。レンズや色素網膜層がみられる。(C)Aの拡大図。移植した眼から視神経が幼生の脳へ向かって伸びているのが観察される。TRDAのシグナルが移植した眼と再構成された視神経で見られることから、再構成された視神経は移植した眼由来の細胞であることが分かる。(D)視神経のDii染色。再構成された視神経は、幼生の脳の視交叉に投射している。(E)移植実験の対照実験。無処理のアニマルキャップを移植したもの(白い矢頭)。眼などの構造はみられない。(F)移植後2ヵ月経過したもの。移植した眼は変態後も維持される(黒い矢頭)。A, B, C, Eのスケールバーは1mmを表す。

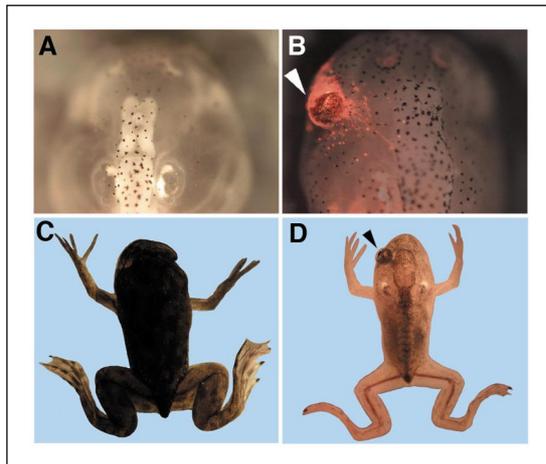


図5 試験管内で作った眼の機能実験

A,C: ステージ33の幼生の両眼を外科的手術によって除去したもの。(A)術後10日後。(C)術後2ヵ月後。眼がないため外界の明るさが認識できず、暗い体色をしている。  
 B,D: ステージ33の幼生の両眼を除去後、試験管内で作った眼を移植したもの。(B)移植後10日後。(D)移植後2ヵ月後。移植した眼を使って外界の明るさを認識し、明るい体色をしている。

経全体のマーカーとして *NCAM*, 筋肉のマーカーとして *ms-actin* を用いた。その結果, 初期原腸胚から切り出した原口上唇部をアニマルキャップでサンドイッチ培養したときには, 前方の神経マーカーの発現のみが強くみられたのに対し, 同じ原口上唇部を帯域とともに切り出したアニマルキャップでサンドイッチ培養したときには, 前方だけでなく後方の神経マーカーの発現がみられた。このことから, 強い前方誘導能を持つ原口上唇部と帯域の細胞をとともにサンドイッチ培養すると, 前方だけでなく後方の構造も誘導されることが示唆された<sup>7,9,11,17,20</sup>。

正常発生においては, 神経胚中期に間脳の一部が表皮に向かって膨らみ, 眼杯となって接している表皮に働きかけてレンズを誘導する。眼杯はやがて眼胞となり, 神経網膜層と色素網膜層に分化する。試験管内で高率に眼を誘導するためには, 眼の誘導の中心となる間脳領域を試験管内で作ることが必要であると考えられる。そして, その結果として眼が高率に誘導されるのではないかという仮説を立てた。これまでに得られた知見から, 間脳領域を試験管内で誘導するためには, 強い前方誘導活性を持つ原口上唇部だけでなく, 後方化の活性を持つ帯域と組み合わせてサンドイッチ培養することが必要であると考えられる。

## 試験管内で眼を作る方法

初期原腸胚から前方神経を誘導する原口上唇部を切り出し(0.4mm × 0.4mm), これを後方化の活性を持つ帯域の細胞(0.3mm × 0.3mm)と組み合わせてから, 後期胞胚から切り出した2枚の無処理のアニマルキャップ(0.7mm × 0.7mm)でサンドイッチ培養を行った(図1A)。その結果, 高頻度に眼を誘導することができた(図1G, 19/22, 86%)。試験管内で作った眼には, レンズや視細胞, 色素網膜層などの分化した眼の細胞がみられた(図1B-E)。

次に, 本研究で確立した実験系でのみレンズを含む眼が形作られることを確認するため, 私たちは部位特異的遺伝子マーカーの発現をRT-PCR法で調べた。レンズのマーカーとして *-crystallin*, 前脳のマーカーとして *otx-2*, 脊髄のマーカーとして *HoxB9*, 神経全体のマーカーとして *NCAM* を用いた。その結果, 強い前方誘導能を持つ原口上唇部を2枚のアニマルキャップでサンドイッチ培養し, 時には前脳のマーカーである *otx-2* の発現はみられたが, レンズのマーカーである *-crystallin* の発現は認められなかった(図1F, レーン4)。

一方, 本研究で確立した眼を作る条件である原口上唇部と帯域を2枚のアニマルキャップでサンドイッチ培養したものでは, 前脳のマーカー *otx-2* とともに, レンズのマーカーである *-crystallin* の発現がみられた(図1F, レーン

5)。また, 眼を作る条件では, *HoxB9* (脊髄のマーカー) の発現がみられなかったことから(図1F, レーン5), 眼の誘導の中心となる領域が形成されており, 脊髄などの後方の神経は含まれないことがわかった。このことから, 本実験で確立した実験系は, レンズ, 神経網膜層, 色素網膜層からなる完全な眼を形作るのに最も適した系であることがわかった。

## 試験管内で作った眼はアニマルキャップの細胞に由来する

本研究では, 試験管内で眼を作るために, 原口上唇部, 帯域, アニマルキャップの3種類の細胞を組み合わせた。これらのうち, 試験管内で作った眼はどの細胞由来であるか調べるため, 細胞系譜実験を行った。トレーサーとして, 赤い蛍光色素(TRDA; Texas Red-dextra-amine)を用いた。原口上唇部を標識する場合には, TRDAでラベルされた胚から原口上唇部を切り出して眼を作り, アニマルキャップを標識する場合には, TRDAでラベルされた胚からアニマルキャップを切り出して眼を作った。これらを培養し, 組織切片を作製して細胞の系譜を観察した。その結果, 原口上唇部をラベルした場合, 脊索でTRDAのシグナルがみられたのに対し(図2A,B), アニマルキャップをラベルした場合は, 眼でシグナルがみられた(図2C,D)。このことから, 試験管内で作った眼は, アニマルキャップの細胞由来であることがわかった。

## 試験管内で作った眼の幼生への移植実験

次に, 私たちは試験管内で作った眼を幼生に移植することは可能かどうかについて検討した。移植をする細胞と移植を受ける細胞とを見分けるため, 細胞系譜トレーサー(TRDA)でラベルした胚を用いて試験管内で眼を作った(図3A-a)。この試験管内で作成した眼球を外植体から摘出し, 外科的手法により両眼を除去したステージ33の幼生の左眼の位置に移植した(図3A-b)。その結果, 未分化細胞から試験管内で作った眼球は幼生に生着し(図4A-C), 移植した眼から幼生の間脳領域に向けて視神経を伸ばすことが観察された(図4C)。この再構成された視神経はTRDAのシグナルがみられたことから, 移植した眼由来の組織であることが示唆された(図4C)。

次に, この移植した眼から再構成された視神経が幼生の脳の視蓋に正しく投射しているかどうか調べるため, 私たちは視神経をDilの結晶(脂溶性の赤い蛍光色素)で染色した<sup>8,10,19</sup>。その結果, 再構築された視神経は幼生の間脳に達し, 間脳の腹側に位置する視交叉を通り, 視蓋に到達していることがわかった(図4D)。

これらの移植を受けた幼生を飼育したところ 幼生に移植した眼は正常な眼と同じ速度で成長した。移植後2カ月後、幼生が変態を終えた後も移植された眼が生着し続けることがわかった(図4F)。このことから、試験管内で作った眼はステージ33の幼生に移植可能であり、また変態後も維持されることがわかった。

### 試験管内で作った眼は移植後機能する

次に私たちは、試験管内で作った眼が正常に機能するかどうかについて調べた。通常、ツメガエルは外界の明るさを眼で感知し、その体色を調節している。明るい場においては体色は明るくなり、暗い場においては暗い体色となる<sup>12)</sup>。一方、両眼を除去したカエルは外界の明るさを感知することができないので、明るい場においても暗い体色のままである。これをもとに、両眼を除去した幼生に試験管内で作った眼を移植し、その変態後のカエルの体色を観察することによって、試験管内で作った眼が光を受容する感覚器官として機能するかどうか調べた。その結果、両眼を除去した後移植を行わなかったカエルは眼からの光の刺激がないために暗い体色になったのに対し(図5A,C)、移植を受けたカエルは移植した眼から光の刺激を受け取るため、明るい体色となった(図5B,D)。このことから、試験管内で作った眼は移植後実際に光を受容する感覚器官として機能することが示唆された。

### おわりに

本研究により、試験管内における眼の誘導に必要な基礎的な条件を見つけることができた。将来これをもとに因子を処理することにより、未分化細胞のみから高率に眼を誘導する実験系を確立することが望まれる。

### 文 献

- 1) Ariizumi T, Sawamura K, Uchiyama H, Asashima M: Dose and time-dependent mesoderm induction and outgrowth formation by activin A in *Xenopus laevis*. *Int J Dev Biol*, 35: 407-414, 1991.
- 2) Ariizumi T, Asashima M: In vitro control of the embryonic form of *Xenopus laevis* by activin A: Time and dose-dependent inducing properties of Activin-treated ectoderm. *Develop Growth & Differ*, 36: 499-507, 1994.
- 3) Ariizumi T, Kinoshita M, Yokota C, Takano K, Fukuda K, Moriya N, Malacinski GM, Asashima M: Amphibian in vitro heart induction: a simple and reliable model for the study of vertebrate cardiac development. *Int J Dev Biol*, 47: 405-410, 2003.
- 4) Asashima M, Nakano H, Simada K, Kinoshita K, Ishii K, Shibai H, Ueno N: Mesodermal induction during early amphibian development. *Roux's Arch Dev Biol*, 198: 330-335, 1990.
- 5) Asashima M, Ariizumi T, Malacinski GM: In vitro control of organogenesis and body patterning by activin during early amphibian development. *Comp Biochem Physiol*, 198: 330-335, 2000.
- 6) Chan TC, Ariizumi T, Asashima M: A model system for organ engineering: transplantation of in vitro induced embryonic kidney. *Naturwissenschaften*, 86: 224-227, 1999.
- 7) Fujii H, Nagai T, Shirasawa H, Doi J, Yasui K, Nishimatsu S, Takeda H, Sakai M: Anteroposterior patterning in *Xenopus* embryos: egg fragment assay system reveals a synergy of dorsalizing and posteriorizing embryonic domains. *Dev Biol*, 252: 15-30, 2002.
- 8) Fujisawa H, Takagi S: Development of retinal central projection in *Xenopus* tadpoles. *Prog Clin Biol Res*, 217B: 109-112, 1986.
- 9) Gamse JT, Sive H: Early anteroposterior division of the presumptive neuroectoderm in *Xenopus*. *Mech Dev*, 104: 21-36, 2001.
- 10) Holt CE, Harris WA: Position, guidance, and mapping in the developing visual system. *J Neurobiol*, 24: 1400-1422, 1993.
- 11) Koshida S, Shinya M, Mizuno T, Kuroiwa A, Takada H: Initial anterior-posterior pattern of the zebrafish central nervous system is determined by differential competence of the epiblast. *Development*, 125: 1957-1966, 1998.
- 12) Kolk SM, Kramer BM, Cornelisse LN, Scheenen WJ, Jenks BG, Roubos EW: Multiple control and dynamic response of the *Xenopus* melanotrope cell. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 132: 257-268, 2002.
- 13) Moriya N, Uchiyama H, Asashima M: Induction of pronephric tubules by activin and retinoic acid in presumptive ectoderm of *Xenopus laevis*. *Dev. Growth Differ*, 35: 123-128, 1993.
- 14) Moriya N, Komazaki S, Takahashi S, Yokota C, Asashima M: In vitro pancreas formation from *Xenopus* ectoderm treated with activin and retinoic acid. *Develop Growth Differ*, 42: 593-602, 2000.
- 15) Okabayashi K, Asashima M: Tissue generation from amphibian animal caps. *Curr Opin Genet Dev*, 13: 502-507, 2003.
- 16) Osafune K, Nixhimakamura R, Komasaki S, Asashima M:

- In vitro induction of the pronephric duct in *Xenopus* explants. *Dev Growth Differ*, 44: 161-167, 2002.
- 17) Sedohara A, Fukui A, Michiue T, Asashima M: Role of BMP-4 in the inducing ability of the head organizer in *Xenopus laevis*. *Zoolog Sci*, 19: 67-80, 2002.
- 18) Sedohara A, Komazaki S, Asashima M: In vitro induction and transplantation of eye during early *Xenopus* development. *Develop Growth Differ*, 45: 463-471, 2003.
- 19) Taylor JSH: The directed growth of retinal axons towards surgically transposed tecta in *Xenopus*; an examination of homing behavior by retinal ganglion cell. *Development*, 108: 147-158, 1990.
- 20) Woo K, Fraser SE: Specification of the zebrafish nervous system by nonaxial signals. *Science*, 277: 254-257, 1997.