

学位論文  
Doctor's Thesis

NRTN-GFR $\alpha$ 2 シグナルはニワトリ胚における肝芽の移動を制御する  
(NRTN-GFR $\alpha$ 2 signaling controls liver bud migration in chick embryo)

辰 巳 徳 史  
Norifumi Tatsumi

熊本大学大学院医学教育部博士課程生体医科学専攻パターン形成学

指導教員

横内 裕二 教授  
熊本大学大学院医学教育部博士課程生体医科学専攻パターン形成学

2008年3月

# 学 位 論 文

## Doctor's Thesis

論文題名 : NRTN-GFR $\alpha$ 2 シグナルはニワトリ胚における肝芽の移動を制御する  
(NRTN-GFR $\alpha$ 2 signaling controls liver bud migration in chick embryo)

著者名 : 辰 巳 徳 史  
Norifumi Tatsumi

指導教員名 : 熊本大学大学院医学教育部博士課程生体医科学専攻パターン形成学  
横 内 裕 二 教授

審査委員名 : 神経分化学担当教授 氏 名 田中 英明 教授  
小児科学担当教授 氏 名 遠藤 文夫 教授  
初期発生学担当教授 氏 名 永淵 昭良 教授  
形態形成学担当教授 氏 名 嶋村 健児 教授

2008年3月

## 目次

1.要旨	3
2.関連論文	4
3.謝辞	5
4.略語一覧	6
5.研究背景と目的	7
5.1. はじめに	7
5.2. 肝臓発生の概要	7
5.3. 肝臓誘導メカニズム	7
5.4. 肝臓発生に関連する遺伝子群	8
5.5. ニワトリ胚における肝臓発生	9
5.6. <b>GNF</b> ファミリーについて	9
5.7. 研究目的	10
6.実験方法	11
6.1. 実験動物の採取と固定法	11
6.2. 遺伝子のクローニング	11
6.3. <b>Whole mount <i>in situ</i> hybridization (WM-ISH)</b>	13
6.4. ニワトリ胚における <i>NRTN</i> のクローニングと解析	13
6.5. 発現コンストラクトの構築・調整	15
6.6. 遺伝子導入と卵外全胚培養法	16
6.7. 凍結切片の作成	16
6.8. 蛍光免疫組織化学	16
6.9. 細胞増殖の測定と <b>TUNEL</b> 法による細胞死の測定	17
6.10. 組織培養	18
6.11. <b>siRNA</b> を用いた <i>Prox1</i> のノックダウン実験	18
6.12. マウス肝芽を用いた <i>GFR<math>\alpha</math>2</i> の発現解析	20
6.13. ニワトリ 7日胚肝臓における <i>NRTN</i> と <i>GFR<math>\alpha</math>2</i> の発現解析	20
7.実験結果	22
7.1. ニワトリ胚における <i>GFR<math>\alpha</math>1</i> , <i>GFR<math>\alpha</math>2</i> , <i>GFR<math>\alpha</math>4</i> , <i>GNF</i> , <i>Ret</i> の発現解析	22
7.2. ニワトリ胚における <i>GFR<math>\alpha</math>2</i> の詳細な発現パターン解析	22
7.3. ニワトリ <i>NRTN</i> のクローニング	23

7.4. ニワトリ胚における <i>NRTN</i> の発現解析	25
7.5. 機能解析用コンストラクトの作成と機能確認	26
7.6. 分泌型 <i>GFR<math>\alpha</math>2</i> を用いた <i>GFR<math>\alpha</math>2</i> の機能解析	27
7.7. <i>NRTN</i> の異所発現による機能解析実験	29
7.8. 肝芽と静脈管の共培養実験	34
7.9. 肝芽と <i>NRTN</i> タンパク質を用いた共培養実験	35
7.10. 肝芽における <i>NRTN</i> 反応性の部位差の検証	38
7.11. 肝芽周囲の基底膜の分布	39
7.12. <i>Prox1</i> と <i>GFR<math>\alpha</math>2</i> との関係	41
8. 考察	44
9. 結語	53
10. 参考文献	54

## 1. 要旨

肝臓は生体内で様々な恒常性の維持に重要な役割を担っている。しかしその発生機構は十分理解されておらず、今後の再生医療に関連する基盤研究の一つとして肝臓発生機構の詳細な解明が望まれている。本研究では肝臓発生機構の解明を目指し、遺伝子導入や胚操作の容易なニワトリ胚を用いて肝臓の形態形成機構の解明を試みた。ニワトリ胚の肝臓発生では前腸門から派生した肝芽が横中隔へ陥入し、静脈管に沿って伸長／移動を行い、最終的に肝芽は静脈管を取り囲み肝臓原基が形成される。しかしながら、肝芽の移動機構は現在までほとんど理解されていない。そこで本研究では神経軸索のガイダンスや尿管芽の形成などに関与する事が知られている GDNF ファミリーのリガンドである *neurturin* (NRTN) とそのレセプター *GFR $\alpha$ 2* の機能解析を行った。*GFR $\alpha$ 2* はニワトリ胚の肝臓発生初期より肝芽細胞で発現し、*NRTN* は静脈管血管内皮細胞で発現している事を見いだした。機能解析実験として *GFR $\alpha$ 2* のシグナル伝達阻害を行った結果、静脈管に沿った肝芽の伸長が抑制された。この伸長抑制は細胞増殖抑制や細胞死の増加によって誘起されたものではなかった。*NRTN* の異所発現実験では、肝芽の静脈管を取り囲みが阻害または十二指腸領域に異所的な肝芽形成が認められた。さらに培養実験では肝芽が *NRTN* を染み込ませたビーズに向かって選択的に誘引され伸長する事を見いだした。これらの実験結果から、*NRTN-GFR $\alpha$ 2* シグナル伝達が肝芽の伸長／移動を制御している事が立証された。

また肝芽の伸長方向と基底膜の関連性を調べた結果、肝芽の伸長方向の先端部で基底膜の減少が認められた。最後に、肝芽移動に関与する転写因子である *Prox1* と *GFR $\alpha$ 2* との関連性を *Prox1* ノックダウンにより解析した。その結果、*Prox1* が *GFR $\alpha$ 2* の発現調節の上位に位置する事が明らかとなった。

本研究の結果に基づき、ニワトリ胚肝臓発生の新しいモデルを提唱した。このモデルでは、静脈管から分泌される *NRTN* が伸長／移動の誘引物質として機能し *GFR $\alpha$ 2* を発現している肝芽の伸長／移動を引き起こす事で肝芽の静脈管を中心とした形態形成が制御されていることを提案する。さらに本モデルでは、基底膜など他の因子も肝芽移動制御に関与することも示した。

本研究で明らかとなった肝芽の伸長／移動に関連した分子機構は肝臓発生を理解する上で非常に重要であり、再生医療研究などの基礎的知見としても有用な示唆を与えるものである。

## 2. 関連論文

Neurturin-GFR $\alpha$ 2 signaling controls liver bud migration along the ductus venosus in the chick embryo

Tatsumi, N., Miki, R., Katsu, K., Yokouchi, Y.

*Developmental Biology*. 307: 14-28, 2007.

### 3. 謝辞

研究、論文作成等、多岐にわたり直接ご指導いただきました、熊本大学医学教育学部 生体医科学専攻 パターン形成分野 横内裕二教授に深く感謝致します。

勝賢二郎助教をはじめとする熊本大学 発生医学研究センター パターン形成分野の皆様には、本研究でのご指導及びご協力を頂きましたことに深く感謝致します。

今回本研究のWM-ISHに使用したニワトリ Ret プラスミドを Columbia University の Franklin D. Costantini 博士、ニワトリ GDNF, GFR $\alpha$ 1, GFR $\alpha$ 2 プラスミドを福島県立医科大学の本間俊作博士、発現ベクターの構築の際使用した La518 Fc vector は National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda の William J. LaRochelle 博士に快く分与していただいた事を深く感謝致します。

また、Fox Chase Cancer Center の Kenneth S. Zaret 博士に適切なご指摘等賜り論文が作成できました事に深く感謝致します。

この場をお借りして、私をこれまで育て、研究活動を支えてくれた両親に感謝の意を記したいと思います。

本研究が今後の肝臓発生のメカニズムの解明、発展の一助になることを願い、謝辞と致します。

#### 4. 略語一覽

Alb	albumin
AFP	$\alpha$ -fetoprotein
BMP	bone morphogenic protein
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
FGF	fibroblast growth factor
Fib	fibrinogen- $\gamma$
Flk-1	fetal liver kinase-1
Foxa2	forkhead box A2
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
GFLs	GDNF family ligands
GFR $\alpha$ (s)	GDNF family receptor alpha (s)
GPI	glycosylphosphatidylinositol
HGF	hepatocyte growth factor
HH	Hamburger and Hamilton's stage
Hhex	hematopoietically expressed homeobox
Hlx	h2.0-like homeobox
Met	met proto-oncogene
N-CAM	neural cell adhesion molecule
NRTN	neurturin
PHE	prospective hepatic endoderm
PME	prospective midgut endoderm
Prox1	prospero-related homeobox 1
Ret	ret proto-oncogene
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
siRNA	small interfering RNA
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
TGF- $\beta$	transforming growth factor $\beta$
VEGF	vascular endothelial growth factor
WM-ISH	whole mount in situ hybridization



## 5. 研究背景と目的

### 5.1. はじめに

肝臓は生体内において様々な代謝や生合成（解毒、アルコール分解、尿素サイクル、糖新生、血液の貯蔵と凝固作用）を行い、生体の恒常性維持の中心的な役割を担っている。そのため肝臓障害は個体の生存において極めて重大な問題である。近年、その治療法として再生医学的なアプローチが注目され、マウスなどを用いた実験系において、胚性幹細胞、体性幹細胞から肝細胞を*in vitro*で誘導する方法が報告されてきている (Schwartz et al., 2002; Chinzei et al., 2002; Ishii et al., 2005)。しかしながら、肝臓は肝実質細胞、胆管上皮細胞、血管内皮細胞、そして間葉組織からなる複雑な構造を有した臓器である。そのため肝細胞誘導が可能になっただけでは真の意味で肝臓を作り出せるとはいえない。将来再生医療などによる人工肝臓を作り出すには、肝臓発生過程の分子機構を解明する必要があると考えられている (Zaret, 2001)。近年の遺伝子破壊マウスなどを用いた解析により少しずつ肝臓発生に関連した遺伝子群が明らかになりつつある。

以下に現在までに報告されている主な肝臓発生メカニズムを示す。

### 5.2. 肝臓発生の概要

現在までにマウス胚を用いた詳細な形態学的解析が行われ、肝臓の初期発生は次のように進行すると考えられている。まず前腸内胚葉（または腹側内胚葉）が周辺の中胚葉性組織と相互作用することにより肝内胚葉へと誘導される（肝誘導）。肝内胚葉はシート状の上皮細胞構造から憩室状の肝芽（肝憩室）を形成し横中隔間充識中に突出する。肝芽はさらに周辺の間葉組織と混じり合いながら増殖し、原始的な肝臓（肝臓原基）を形作る。その後肝臓原基はさらに増殖を続け複雑かつ秩序だった構造を形成させ、代謝系酵素などを発現する機能的な肝臓へと発生していく (Lemaigre and Zaret, 2004)。

このように肝臓発生は、前腸内胚葉から肝芽細胞の誘導過程、肝芽が周辺組織との相互作用によって形態形成を行う過程、そして肝臓原基形成後の増殖過程などいくつかのステップに分けることができる。それぞれのステップは組織間相互作用を担うシグナル分子群によって仲介されていると考えられている。

### 5.3. 肝臓誘導メカニズム

肝臓の主な構成成分である肝細胞は前腸内胚葉から派生することが報告されている。その古典的な研究としては、Le Douarin によって行われた実験発生学的な手法による一連の研究が有名である。彼女はニワトリ胚を用いた胚組織の移植実験によって、6 体節期

(Hamburger and Hamilton's stage (HH) 8-9) (Hamburger and Hamilton, 1951)までに心臓中胚葉を裏打ちしている内胚葉がすでに肝誘導を受けていることを明らかにした (Le Douarin, 1975)。同様の実験が Houssaint (Houssaint, 1980)によって行われ、ニワトリ胚の間葉組織が、マウス胚の内胚葉を肝芽細胞へと誘導できることを示した。この内胚葉から肝細胞への分化誘導は周辺組織からの分泌物質によって行われることが、肝周囲中胚葉組織と前腸内胚葉の共培養実験により示唆されて来た。Cascio と Zaret (Cascio and Zaret, 1991)らはマウス胚を用いて、前腸内胚葉から肝芽が横中隔間充織に侵入することにより、*Albumin (Alb)* の発現量が増加することを発見した。さらに、心臓中胚葉と腹側内胚葉を共培養し、*Alb* の発現が誘導されることを発見した (Gualdi et al., 1996)。この2つの実験から肝細胞誘導には心臓中胚葉と横中隔間充織からの2つの誘導因子が関与する事が示唆された。その後、これらの因子は *Born morphogenic protein (BMP)s* と *Fibroblast growth factor (FGF)s* である事が同定された (Rossi et al., 2001; Jung et al., 1999)。現在、横中隔間充織由来の *BMPs* が腹側内胚葉に肝芽細胞分化へのコンピテンスを与え、心臓中胚葉由来の *FGFs* がそのコンピテント内胚葉を肝芽細胞へと誘導すると考えられている。

#### 5.4. 肝臓発生に関連する遺伝子群

近年の遺伝子破壊技術の進展により、肝発生に関連する遺伝子群がいくつか同定されてきている。肝細胞分化コンピテンスを有した内胚葉で発現するホメオボックス型転写制御因子 *Hhex* の欠損マウスでは、内胚葉形成は正常に進行するが肝芽形成が起こらず、その後の肝臓発生が停止する (Martinez Barbera et al., 2000)。この結果は肝臓に特異化された内胚葉領域が欠損することに起因している (Bort et al., 2006)。同様に肝芽細胞で発現するホメオボックス型転写制御因子 *Prox1* の欠損マウスでは肝芽は横中隔へ陥入するがその後の肝芽細胞の横中隔中の移動が細胞外マトリックスの異常蓄積によって著しく阻害され、肝臓形成阻害になる。(Sosa-Pineda et al., 2000)。

血管内皮細胞で発現する VEGF 受容体 *Flk-1* の欠損マウスでは肝上皮周囲の血管内皮細胞が欠損することで肝芽の陥入が起こらない (Matsumoto et al., 2001)。これらの血管内皮細胞は肝芽細胞移動の足場として機能すると考えられているがそのメカニズムは不明である。

横中隔間充織で発現するホメオボックス型転写制御因子 *Hlx* の欠損マウスでは間充織は正常に発生するものの肝臓の低形成が観察された。従って *Hlx* は肝細胞の増殖関連因子群の上流遺伝子として機能していることが示唆されている (Hentsch et al., 1996)。間充織から分泌される肝細胞増殖関連因子としては *BMPs*、*Wnt*、*HGF* などが知られているがこれらの因子と *Hlx* との関係はまだ明らかになっていない (Rossi et al., 2001; Hussain et al., 2004;

Schmidt et al., 1995)。

ここに示した欠損マウス胚はすべて発生初期に肝形成不全を示し致死となり、肝臓発生に関与するこれら転写因子に関連した下流の因子の解析が困難とされている。そのため、肝臓発生に関連する転写因子群の下流の因子の解析が種間を越えて望まれてきた。また、これら遺伝子破壊マウスは肝臓発生に関連するどの組織（肝内胚葉、横中隔間充織、血管内皮）が欠損しても肝臓が形成されない事を示し、さらに肝芽の横中隔への移動が組織間相互作用に重要である事が示唆されている (Zaret, 2002)。

### 5.5. ニワトリ胚における肝臓発生

ニワトリ胚は、組織移植などの胚操作を比較的容易に行うことが可能であり、観察も容易であったため生物学の研究対象として紀元前よりヒポクラテスやアリストテレスらによってすでに使用されていたという記載がある。それ以後も発生学における身近な実験動物として利用されてきた (Bellairs and Osmond, 2005)。ニワトリ胚の肝臓発生に関しては Romanoff により詳細な肝臓発生の形成過程が編纂されている (Romanoff, 1960)。その後、組織移植実験を用いて肝誘導メカニズムが提唱された (Le Douarin, 1975)。しかしながら、分子生物学的手法によるニワトリ胚を用いた肝臓発生研究はほとんど行われてこなかった。近年、我々の研究室で肝臓発生に関連したマーカー遺伝子の探索が行われ、それらを用いてより詳細な肝臓発生図が記載された (Yanai et al., 2005; Yokouchi., 2005)。ニワトリ胚の肝誘導は HH8-HH11 におこり、その誘導因子はマウス胚と同様に横中隔間充織からの BMPs や心臓中胚葉からの FGFs であると考えられている (Zhang et al., 2004)。誘導された肝内胚葉細胞は隣接する横中隔に突出し卵黄静脈の合流部分を挟むように二本の肝芽を形成し (HH12-14)、その後肝芽は静脈管に沿って前方向に伸長する (HH15-17)。HH18 より前方向伸長が停止し、肝芽は増殖を伴いながら側方向伸長を開始する。HH22 までに二本の肝芽は静脈管を完全に取り囲み、最終的に肝臓原基を形成する。この発生段階における肝芽細胞の増殖には Id3 が関与していることを我々の研究室では明らかにしている (Nakayama et al., 2006)。また、肝細胞の増殖には  $\beta$ -catenin が重要であることも示唆されている (Suksaweang et al., 2004)。

### 5.6. GDNF ファミリーについて

GDNF; Glial cell line-derived neurotrophic factor (グリア細胞株由来神経栄養因子) (Lin et al., 1993)は神経細胞の生存因子として同定され、現在までに Neurturin (NRTN), Artemin (ARTN), Persephin (PSPN)を含めた 4 種が GDNF family ligands (GFLs)として報告されている (Kotzbauer et al., 1996; Baloh et al., 1998; Milbrandt et al., 1998)。GFLs はホモ 2 量体を形成し、

GDNF family receptor $\alpha$  (GFR $\alpha$ ) 1-4 のホモ 2 量体と特異的な 4 量体を形成し、チロシンキナーゼ型レセプターである Ret と結合する事で、細胞内にシグナルを伝達することが報告されている (Sariola and Saarma, 2003)。また、近年 Ret ではなく N-CAM や Met を介した、新たな細胞内シグナル伝達機構が明らかになり、GDNF ファミリーの新しい機能が注目されている (Trupp et al., 1999; Popsueva et al., 2003; Paratcha et al., 2003)。GDNF ファミリーの胚発生における既知の機能として、外胚葉由来の神経細胞の生存や分化、神経軸索の伸張 (Airaksinen et al., 1999; Baloh et al., 2000; Enomoto et al., 2001; Ledda et al., 2002)、中胚葉由来の腎臓、尿管芽の形成 (Tang et al., 1998; Schedl et al., 2000)、精子形成 (Meng et al., 2000; Viglietto et al., 2000)などが報告されている。近年、ニワトリ胚において、*GDNF*, *GFR $\alpha$* , *Ret* の発現パターン解析が行われ、現在まで知られていた神経系、腎臓系などでの発現の他に内胚葉由来組織においてもそれらが発現することが報告された (Homma et al., 2000)。

## 5.7. 研究目的

肝臓は生体内において非常に重要な役割を担っているにも関わらず、分化や形態形成などの発生機構はまだ未解明な部分が多い。そこで、本研究では遺伝子操作や発生過程の観察が容易なニワトリ胚を使用して、肝臓発生機構の解明を目指した。私はニワトリ胚の内胚葉領域で発現する事が報告されていたGDNFファミリーに注目した。GDNFファミリーは神経軸索のガイダンスや腎臓尿管芽の分岐形成などの機能が知られており、肝臓発生においても肝細胞の移動や分枝形成などの形態形成運動に関与する可能性が推測された。そこで、GDNFファミリーの肝臓発生に関連した機能を解析するために、以下の2点を本研究の目的とした：①肝臓で発現するGDNFファミリーの同定。②①で同定された分子の機能解析。

## 6. 実験方法

### 6.1. 実験動物の採取と固定法

鶏卵 (White Leghorn 瀬戸口孵卵場、大分) は 38°C インキュベーターで孵卵し、の発生段階表 (Hamburger and Hamilton, 1951) をもとに目的の発生段階まで発生させ実験に使用した。Whole mount *in situ* hybridization (以後 WM-ISH) に用いる胚は PBS 中で卵黄膜などを取り除き、その後 4% PFA/PBS で 2 時間から一晩固定した。固定後、PBS、25% MeOH、50% MeOH、75% MeOH、100% MeOH に置換し、使用時まで -20°C で保存した。

ICR マウス胚は妊娠マウス (日本チャールズリバー) から胎齢 9.5 日マウス胚を取り出し実験に使用した。

### 6.2. 遺伝子のクローニング

Total RNA はニワトリ胚 (孵卵 48、72、116 時間後)、マウス 9.5 日胚を回収後、TRIzol Reagent (Invitrogen) を使用して抽出した。抽出した total RNA の一部 O.D を測定し、RNA の品質 (分解の程度) を電気泳動で判定した。

cDNA の合成には SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen) と oligo (dT) (GE Healthcare) を用いて合成した。相補的な RNA を除くため RNaseH (TaKaRa) を加え反応させた。

合成した cDNA を使用して、PlatinumPfx DNA polymerase (Invitrogen) を用いてサーマルサイクラー PTC-200 (MJ Research) で PCR を行い目的とする cDNA 断片を増幅した。GFR $\alpha$ 1、GFR $\alpha$ 2、GFR $\alpha$ 4 は塩基配列の決定を容易にし、かつ PCR による塩基合成のエラー率を下げるため 5'、3' の 2 つに分離した。ニワトリ *GDNF* の全長配列が明らかでないため、*GDNF*、*NRTN* はマウス cDNA をクローニングした。反応条件は denature 94°C 2 分、① 94°C 15 秒、② 50~60°C 30 秒、③ 68°C 1 分とし、①~③の過程を必要回数繰り返した (表 1)。その後電気泳動により目的遺伝子が増幅されていることを確認した。

表 1 <cDNA 断片増幅の PCR 条件>

クローン名	アニーリング温度	サイクル数	テンプレート
<i>cGFR<math>\alpha</math>1 5'</i>	60°C	35	ニワトリ 48 時間胚
sense primer 5'- TGCCATGGTCCTCGCGCTCCTCTAC -3' antisense primer 5'- CGGATCCAGGATTCTTGTAATTCAGGC -3'			
<i>cGFR<math>\alpha</math>1 3'</i>	60°C	35	ニワトリ 48 時間胚
sense primer 5'- CGGATCCATGCTCTTCTGCTCCTGTCGAG -3' antisense primer 5'- CGGATCCCTACAAGACGACTGATGAGC -3'			

<i>cGFR<math>\alpha</math>2 5'</i>	55°C	35	ニワトリ 116 時間胚
sense primer 5'- TGCCATGGTTTTGGCCAACGCCTTC -3' antisense primer 5'- GAGATAGTGATGCTGGTGGTGCT -3'			
<i>cGFR<math>\alpha</math>2 3'</i>	50°C	35	ニワトリ 48 時間胚
sense primer 5'- ATCTCCACCTGCAGCAAGGAG -3' antisense primer 5'- GGAATTCCTATAGCAGCAGCTTCAGCAG -3'			
<i>cGFR<math>\alpha</math>4 5'</i>	52°C	40×2	ニワトリ 72 時間胚
sense primer 5'- TGCCATGGGGGGCATCCTCTACTTC -3' antisense primer 5'- GGAATTCTCACATCATGAAGTGGCTCAG -3'			
<i>cGFR<math>\alpha</math>4 3'</i>	52°C	40	ニワトリ 116 時間胚
sense primer 5'- GGAATTCTGCAACGTGGACGAGATGTGCC -3' antisense primer 5'- GGAATTCTCACATCATGAAGTGGCTCAG -3'			
<i>mGDNF</i>	60°C	40×2	マウス 9.5 日胚
sense primer 5'- TGCCATGGGATTTCGGGCCACTTGG -3' antisense primer 5'- GGATATCTCAGATACATCCACACCGTTTAG -3'			
<i>mNRTN</i>	50°C	35	マウス 9.5 日胚
sense primer 5'- TGCCATGGGGCGCTGGAAGGCAG -3' antisense primer 5'- CGGAATTCACACGCACGCGCACTC -3'			

PCR 産物は制限酵素処理後、*pSlax21* ベクター（以下 *pSx21* と略す）へ挿入した（表 2）。その後、大腸菌 DH5 $\alpha$  に形質転換しプラスミド抽出を行った。プラスミド抽出は目的に応じて核酸自動分離装置 NA-2000 (KURABO)、QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) を使用し、操作は付属のプロトコルに従った。

表 2 < 酵素処理した PCR 産物、ベクターに用いた制限酵素の種類 >

PCR 産物名	制限酵素名	PCR 産物名	制限酵素名
<i>cGFR<math>\alpha</math>1 5'</i>	NcoI・BamHI	<i>cGFR<math>\alpha</math>4 5'</i>	NcoI・EcoRI
<i>cGFR<math>\alpha</math>1 3'</i>	BamHI	<i>cGFR<math>\alpha</math>4 3'</i>	EcoRI
<i>cGFR<math>\alpha</math>2 5'</i>	NcoI・EcoRI	<i>mGDNF</i>	NcoI・EcoRV
<i>cGFR<math>\alpha</math>2 3'</i>	EcoRI	<i>mNRTN</i>	NcoI・EcoRI

遺伝子解析は ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を使用し、場合によって発生医学研究センター { 使用機: ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) } に

配列決定を依頼した。シーケンス反応は Big Dye Terminator ver. 1.1 又は Big Dye Terminator ver. 3.1 (Applied Biosystems)を使用した。塩基配列決定の PCR には、T7, T3 プライマーを用いた。

サブクローニングされたプラスミドを制限酵素処理し、切り出された 3'側の cDNA 断片をそれぞれ *pSx21-5'*側に挿入し、各遺伝子の全長 cDNA を構築した (表 3)。

表 3 <全長 cDNA を作成するのに使用した制限酵素>

クローン名	使用する制限酵素	クローン名	使用する制限酵素
<i>pSx21-GFRα1 5'</i>	NdeI・BamHI	<i>pSx21-GFRα1 3'</i>	NdeI・BamHI
<i>pSx21-GFRα2 5'</i>	BglII・EcoRI	<i>pSx21-GFRα2 3'</i>	BglII・EcoRI
<i>pSx21-GFRα4 5'</i>	SmaI・EcoRI	<i>pSx21-GFRα4 3'</i>	SmaI・EcoRI

### 6.3. Whole mount *in situ* hybridization (WM-ISH)

RNA プローブの合成の鋳型となるプラスミド DNA を制限酵素処理し一本鎖にした (表 4 参照)。RNA プローブの合成には DIG (Digoxigenin) RNA ラベリングミックス (Roche), Ribonuclease Inhibitor (TaKaRa), RNA Polymerase (Roche)を加え合成反応を行った。WM-ISH は Riddle (1993)の方法をもとに行った。

表 4 <各遺伝子のプローブ合成に使用した制限酵素および RNA Polymerase>

クローン名	制限酵素	RNA Polymerase	クローン名	制限酵素	RNA Polymerase
<i>GFRα1</i>	ApaI	SP6	<i>GFRα2</i>	ApaI	SP6
<i>GFRα4</i>	NcoI	T7	<i>GDNF</i>	ApaI	SP6
<i>Ret</i>	SacI	T3	<i>Hhex</i>	SalI	T7
<i>Fibrinogen</i>	NcoI	SP6	<i>NRTN</i>	ApaI	SP6
<i>Prox1</i>	※	T3	<i>Foxa2</i>	XbaI	T7

※*Prox1* は *Prox1* プラスミドから PCR で得られた断片を使用してプローブ合成を行った。

### 6.4. ニワトリ胚における *NRTN* のクローニングと解析

ニワトリ *NRTN* をクローニングするにあたって、まず Degenerate プライマーの設計を行った。Degenerate プライマー配列はヒト、マウス、ラットの *NRTN* アミノ酸配列とニワトリ *GDNF* アミノ酸配列との間で比較を行い保存性の高い領域のアミノ酸配列から予測される塩基配列をもとに 4 種類の degenerate プライマーを設計した (表 5)。これら 4 種のプライマーをそれぞれ組み合わせ、FastStart Taq DNA Polymerase (Roche)、ニワトリ 116 時間胚 cDNA を使用し PCR を行った。反応条件は以下の通りである :denature 95°C 2 分、①95°C 15

秒、②55°C 30 秒、③72°C 1 分で①-③の過程を 40 回繰り返した。最終的に *cNTRN* Fwd1 と *cNTRN* Rev2 プライマーの組み合わせで期待された位置にバンドの増幅が確認された。PCR 産物は pGEM-T Easy Vector (Promega) に組み込んだ。その後塩基配列を解析し、増幅された PCR 産物がニワトリ *NRTN* の *cDNA* 断片であることを確認した。この断片を使用し WM-ISH を行った。

表 5 <*NRTN* のクローニングに用いたプライマー配列>

プライマー名	プライマー塩基配列
<i>cNTRN</i> Fwd1	5'-TGAG (C / T) GA (A / G) (C / T) TGGG (A / C / G / T) (C / T) TGGG (A / C / G / T) TAC -3';
<i>cNTRN</i> Fwd2	5'-TTCCG (G / C) TA (C / T) TGC (A / G) C (A / C / G / T) GG (A / C / G / T) (A / G) C (A / C / G / T) TG -3'
<i>cNTRN</i> Rev1	5'- CCA (A / G) (A / G) AAGGGACAC (C / T) TC (A / G) TC (C / T) TCA -3'
<i>cNTRN</i> Rev2	5'- GA (A / C / G / T) AG (C / T) TC (C / T) TGCAG (A / C / G / T) GTGTGGTA -3'

本研究室で  $\lambda$  ZAP Expression Vector (Stratagene) を使用して作成されたニワトリ胚肝臓 *cDNA* フェージライブラリー 10 万プラークをメンブレン Hybond-N+ (Amasham bioscience) に転写し、サブクローニングされたニワトリ *NRTN* をプローブとして終濃度 25 ng /  $\mu$ l で使用した。プローブは [<sup>32</sup>P]-dCTP, Rediprime II tube, ProbeQuant G-50 Micro Columns (すべて Amasham bioscience) を使用して標識し、メンブレンとハイブリダイゼーションした。メンブレンを X フィルムに感光し、得られた 8 つのポジティブプラークをさらに 2 次、3 次スクリーニングした。最後にフェージプラークから得られた  $\lambda$  フェージを ExAssist helper phage/SOLR strain system (Stratagene 社) を用いて *in vivo* excision を行うことによりプラスミドにリクローニングした。得られたプラスミドの塩基配列は M13 プライマーを用いて解析し、8 つのクローン中 1 つがニワトリ *NRTN* であることが確認された。全長配列は作成したプライマー (表 6) を用いて解読し、その中にニワトリ *NRTN* の翻訳領域の完全長も含まれていた。予想されるヒト、マウス、ニワトリの成熟タンパク質領域のアミノ酸配列比較は GENETYX-MAC Ver. 11.0 (GENETYX CORPORATION) により行った。

表 6 <塩基配列解析に用いたプライマー配列>

プライマー名	プライマー塩基配列
<i>cNRTN</i> primer Fwd1	5'-TGGATGCCTACAACCGCTAC -3'
<i>cNRTN</i> primer Fwd2	5'-TACACGTCGGATGAGACCGT -3'
<i>cNRTN</i> primer Rev	5'-TCTGTGTCACCTCCGTGG -3'



<i>cNRTN</i> primer Rev2	5'-GCTCAGGAAGGACACCTCGT -3'
<i>cNRTN</i> primer Rev3	5'-ACGCTCTTCAGCGAGAGGTC -3'

## 6.5. 発現コンストラクトの構築・調整

GFR $\alpha$ 1、GFR $\alpha$ 2 は GPI アンカーにより膜結合しているため、分泌型の作成は GPI 付加シグナル配列を除いたコンストラクトが必要であった。そこで GPI 付加シグナル配列の上流に位置するリバースプライマーを作成した (表 7)。6.2 の章でクローニングされた *pSx21-GFR $\alpha$ 1 3'*、*pSx21-GFR $\alpha$ 2 3'* を鋳型とし、PlatinumPfx DNA polymerase (Invitrogen) を使用して PCR により目的の cDNA 断片 (*GFR $\alpha$ 1 $\Delta$ GPI 3'*、*GFR $\alpha$ 2 $\Delta$ GPI 3'*) を増幅した。反応条件は: denature 94°C 2分、①94°C 15秒、②50~60°C 30秒、③68°C 1分とし、①~③の過程を 30-40 回繰り返した。増幅された PCR 産物は Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen) を用いて、*pCR-BluntIII-TOPO* ベクターに挿入した。塩基配列決定後、*pCR-BluntIII-GFR $\alpha$ 1 $\Delta$ GPI 3'* は *NdeI*、*BamHI*、*pCR-BluntIII-GFR $\alpha$ 2 $\Delta$ GPI 3'* は *BglIII*、*BamHI* で制限酵素処理し、*pSx21-GFR $\alpha$ 1 5'*、*pSx21-GFR $\alpha$ 2 5'* に挿入し *pSx21-GFR $\alpha$ 1 $\Delta$ GPI*、*pSx21-GFR $\alpha$ 2 $\Delta$ GPI* とした。さらにマウスの IgG の heavy chain Fc 鎖の配列をベクター-La518 (LaRoche et al., 1995) から制限酵素 (*XhoI*、*BamHI*) により抜き出し、*pSx21-GFR $\alpha$ 1 $\Delta$ GPI*、*pSx21-GFR $\alpha$ 2 $\Delta$ GPI* 配列の 3' 末端に組み込んだ。出来上がった *pSx21-GFR $\alpha$ 1 $\Delta$ GPI-Fc*、*pSx21-GFR $\alpha$ 2 $\Delta$ GPI-Fc* はそれぞれ制限酵素 (*ClaI*) により *-GFR $\alpha$ 1 $\Delta$ GPI-Fc*、*GFR $\alpha$ 2 $\Delta$ GPI-Fc* 領域だけ切り出し発現ベクター *pCAGGS* (Niwa et al., 1991) に組み込んだ。構築した発現コンストラクトはインサートの方向性を確認するために再度塩基配列を確認し正方向に入ったものを実験に用いた。

*mGDNF* と *mNRTN* はカルボキシル末端に制限酵素サイトを付加するためのプライマー (表 7) を用いて 6.2 の章でクローニングされた *pSx21-mGDNF*、*pSx21-mNRTN* を鋳型にし、PlatinumPfx DNA polymerase (Invitrogen) を用いて PCR を行い (反応条件は上記と同様)、制限酵素 (*NcoI*、*EcoRI*) 処理し *pSlax13-HA* に組み込んだ。但し *mGDNF* 中に *EcoRI* サイトが含まれるため、*mGDNF* の *EcoRI* 処理時間は 3-5 分とした。塩基配列決定後、制限酵素 (*ClaI*) により *mGDNF-HA*、*mNRTN-HA* を抜き出し、それぞれ発現ベクター *pCAGGS* に組み込んだ。構築した発現コンストラクトはインサートの方向性を確認するために再度塩基配列を調べ正方向に入ったものを実験に使用した。作成した発現コンストラクトおよび *pCAGGS-GFP* のプラスミドはそれぞれ JETSTAR 2.0 Plasmid Maxiprep Kit (Genomed) を用いて抽出し、フェノール / クロロホルム処理、エタノール沈殿後、すべてのプラスミドの終濃度が 5  $\mu$ g /  $\mu$ l になる様に TE で調節した。

表7 <発現コンストラクトを作成するために用いたプライマー配列>

プライマー名	プライマー配列
<i>cGFRα1</i> Δ <i>GPI</i> primer Fwd (表1)	(表1) <i>cGFRα1</i> 3' sense primer を参照
<i>cGFRα1</i> Δ <i>GPI</i> primer Rev	5'-CTCGAGGGCCAGAACGACTCCTGGTGTGTT-3'
<i>cGFRα2</i> Δ <i>GPI</i> primer Fwd	(表1) <i>cGFRα2</i> 3' sense primer を参照
<i>cGFRα2</i> Δ <i>GPI</i> primer Rev	5'-CTCGAGGGCCAGAACTGCCTTCTGATCCAC-3'
<i>mGDNF-HA</i> primer Fwd	(表1) <i>mGDNF</i> sense primer を参照
<i>mGDNF-HA</i> primer Rev	5'-CGAATTCATACATCCACACCGTTTAG-3'
<i>mNRTN-HA</i> primer Fwd	(表1) <i>mNRTN</i> sense primer を参照
<i>mNRTN-HA</i> primer Rev	5'-CGAATTCACGCACGCGCACTC-3'

#### 6.6. 遺伝子導入と卵外全胚培養法

遺伝子導入するにあたって卵外全胚培養法 (Flamme, 1987)を用いた。この方法では、胚腹側を上面に露出することが可能なため、内胚葉への遺伝子導入が非常に容易になる。ニワトリ胚への遺伝子導入は、エレクトロポレーターCUY21 (BEX)を用いた。導入条件は Nakamura と Funahashi (Nakamura and Funahashi, 2001)らの方法を参考にし、6 V, 25 ms, 4 回で行った。導入遺伝子には *pCAGGS-GFP* を 1 μg / μl と 1 % Fast Green (SIGMA) 1 mM MgCl<sub>2</sub> / PBS を適量入れたものを調整し使用した。導入部位は Matsushita (Matsushita, 1999)を参考にした。遺伝子導入胚は 38°Cインキュベーターで 24、48 時間培養し、6.1 の章と同様に回収、固定を行った。

#### 6.7. 凍結切片の作成

卵、卵外全胚培養法より回収された胚、または WM-ISH した試料を 4 % PFA / PBS, 4°C で 2 時間以上固定し(免疫組織化学に用いる場合は 2 時間以内)、その後 30 % スクロース / PBS に 4°C で置換した。置換された試料は Tissue Tek OCT compound (SAKURA)で包埋し、試料はクライオスタット (LEICA CM1900)を用いて 10-25 μm 厚で切片にした。

#### 6.8. 蛍光免疫組織化学

切片を -20°C のアセトンで 10 分間固定後、PBST (0.1 % (v/v) Triton X-100 / PBS) を溶液として使用した (表 8)。ブロッキング液は 10 % Goat serum / PBST で行った。1 次、2 次抗体は 5 % Goat serum / PBST に希釈し、4°C で一晩または室温で 2 時間反応させた。観察はグリセロールで封入後、倒立型顕微鏡 BX51 (OLYMPUS)で行った。E-cadherin 抗体を用いると

きの溶液は PBST ではなくすべて TBST (0.1 % (v/v) Triton X-100 / TBS, 10mM CaCl<sub>2</sub>)を使用した。

表 8 <蛍光免疫組織化学に使用した抗体と濃度>

使用目的	使用した抗体	希釈倍率
GFR $\alpha$ 2-Fc の検出	Alexa Fluor 546 goat anti-mouse IgG (Invitrogen)	2000 倍
mNRTN-HA の検出 (1 次抗体)	mouse anti-HA (Roche)	1000 倍
mNRTN-HA の検出 (2 次抗体)	Alexa Fluor 546 goat anti-mouse IgG (Invitrogen)	500 倍
E-cadherin の検出 (1 次抗体)	mouse anti-E-cadherin (BD)	300 倍
E-cadherin の検出 (2 次抗体)	Fluorolink Cy3-labeled goat anti mouse IgG (GE Helthcare)	300 倍
ラミニンの検出 (1 次抗体)	rabbit anti-laminin (SIGMA)	100 倍
ラミニンの検出 (2 次抗体) Fig.13A, B	Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (Invitrogen)	300 倍
ラミニンの検出 (2 次抗体) Fig.13C, D	Fluorolink Cy3-labeled goat anti rabbit IgG (GE Helthcare)	300 倍
GFP の検出 (1 次抗体)	mouse anti-GFP (SIGMA)	500 倍
GFP の検出 (2 次抗体)	Alexa Fluor 488 goat anti-mouse (Invitrogen)	300 倍

## 6.9. 細胞増殖の測定と TUNEL 法による細胞死の測定

切片作成に用いる遺伝子導入された胚は共導入した *pCAGGS-GFP* 由来の蛍光によって目的の位置に遺伝子導入された試料を選択した。細胞増殖と細胞死の測定には隣接切片を用いた。細胞増殖測定は rabbit anti-pH3 抗体 (Ser10) (SIGMA)、2 次抗体 Fluorolink Cy3-labeled goat anti rabbit IgG (GE Helthcare)を用いて、6.8 に示した方法により検出した。細胞死測定には TUNEL 法を用いて、ApogTag (Invitrogen)のマニュアルに従って行った。それぞれの切片は 2 次抗体時に DAPI (Nakarai)で核染色し、核の数により細胞数を測定した。細胞増殖率、細胞死率はそれぞれ以下の計算式に基づいて導きだした：細胞増殖率 = anti-pH3 抗体 (Ser10) 陽性細胞数 / 肝芽細胞数；細胞死率 = TUNEL 陽性細胞 / 肝芽細胞数。それぞれ独立した試料由来の計測値を統計ソフト StatView J-4.5 (Abacus Concepts inc., USA) を用いて t-検定により有意差の判定を行った。P 値は P<0.05 とした。

## 6.10. 組織培養

肝芽培養法はNogawaらの方法を参考に行った (Nogawa and Ito, 1995)。HH16-17 から切り出した肝芽、または静脈 (静脈管、静脈洞)を 0.25 mg / ml コラゲナーゼ (Worthington)で処理し、間充織などを取り除いた。ピペットで Type I コラーゲンゲル (新田ゼラチン)10  $\mu$ l を 35 mm ディッシュ (IWAKI)に滴下し、38°C, 5 % CO<sub>2</sub> インキュベーター中で 30 分間加温しゲルを固化させた。タンパク質を染み込ませるビーズは Affi-Gel Blue Gel (BIO-RAD)を使用し、ビーズの保存溶液を除くために Microcon (Amicon)を用いて PBS で 5 回洗浄した。洗浄後ビーズを Recombinant Human NRTN (Pepro Tech) は 1, 25, 50, 100 ng / ml、Recombinant Human GDNF (Pepro Tech)は 1, 25, 50, 100 ng / ml または 0.1 % BSA (SIGMA)に 4°C で 1 時間以上浸し目的のタンパク質をビーズに染み込ませた。固化したゲルに肝芽と静脈またはタンパク質を染み込ませたビーズを置き、上から新たにコラーゲンゲルを滴下して包埋した。培地 {D-MEM High glucose (Invitrogen), 1 % fetal bovin serum (FBS) (Invitrogen), ペニシリン・ストレプトマイシン(以下 P.S) (SIGMA)} 2 ml 加え、5 % CO<sub>2</sub> インキュベーター内で数日間培養した。また実験によっては Recombinant Human GFR $\alpha$ 1-Fc (R&D Systems, Inc.)を 300 ng / ml, Human GFR  $\alpha$  2-Fc proteins (R&D Systems, Inc.)を 300 ng / ml または 0.1 % BSA を培地に添加した。

腸管の培養は HH16-17 の腸管を上記と同様の方法で取りだし、コラーゲンゲルの中に包埋した。培地中に Recombinant Human NRTN (Pepro Tech)を 100, 200 ng / ml または 0.1 % BSA を加えて、3 日間培養後肝細胞マーカー *Hhex* または内胚葉マーカー *Foxa2* の *in situ* hybridization を行った。

## 6.11. siRNA を用いた *Prox1* のノックダウン実験

ニワトリ *Prox1* 遺伝子をノックダウンするためにInvitrogen社のStealth RNAiを用いた。配列はInvitrogen社のBLOCK-iT, RNAi Designerで推奨された2種類の配列 (siProx999、siProx1059)を使用した。ネガティブコントロールには同社が推奨するStealth RNAi Negative Control Medium GC Duplexを用いた。

siRNA の効果を検定するためにニワトリ胚 *Prox1* 全長配列 (本研究室においてスクリーニングにより単離されたもので、すでに登録されている *Prox1* の翻訳配列 (2211bp: accession no U46563) よりも長い 2907bp のもの。) を制限酵素 (EcoRI, KpnI)処理し 1843bp の断片を *pEGFP-N1* に組み込み *pEGFP-N1-Prox1 (kpn)* とした。さらにフレームを合わせるため *pEGFP-N1-Prox1 (kpn)* を制限酵素 (KpnI, ApaI)処理し T4 DNA polymerase (Roche) を使用し制限酵素による切断面を平滑化し、再度セルフライゲーションさせた。構築された *pEGFP-N1-Prox1* は midiprep キット (Qiagen) を用いてプラスミドを調整した。6cm dish

(Iwaki)にまいた COS7 細胞に  $1 \times 10^5$  細胞あたり  $1 \mu\text{g}$  の *pEGFP-N1-Prox1* を単独もしくは siRNA ( $20 \mu\text{M}$ )と同時にトランスフェクション(PolyFect Transfection Reagent Qiagen)し、24 時間培養して GFP の蛍光を観察し siRNA の効果を検定した。COS7 細胞の培地は{D-MEM High glucose (Invitrogen), 10 % FBS (Invitrogen), P.S (SIGMA)} を使用した。

Prox1 siRNA 配列を以下に示す:

siProx999, AUGGAAGGAAUUUGGCCCUUGGUCC;

siProx1059, UUGUGACAUGGCAGUGUUCAGUUCC.

Stealth RNAi Negative Control Medium GC Duplex の配列は公開されていない。

HH11-12 ニワトリ胚の前腸内胚葉領域に  $100 \mu\text{M}$  に調整した siRNA を導入し、48 時間培養した。導入する siRNA には  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  の pCAGGS-GFP, 0.1 % fast green を終濃度約 0.01 % なるよう調整したものを使用した。導入胚を固定後、GFP 蛍光により遺伝子導入部位を確認し、*Hhex*, *Prox1*, *GFR $\alpha$ 2* の WM-ISH を行った。また、それぞれの siRNA が導入された肝臓を 3 個体とり、mRNA を抽出した。抽出された total RNA は微量で測定が困難だったため全量を逆転写して cDNA を合成した。これを鋳型に Real time PCR を行い、内部標準遺伝子 *GAPDH* の増幅サイクル数に基づいて、各試料間の鋳型量が等量になるように調節した (表 9)。Real time PCR には ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (version 1.6) を使用し、SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用いて、以下の反応条件で行った: denature  $95^\circ\text{C}$  10 分、① $95^\circ\text{C}$  30 秒、② $56^\circ\text{C}$  30 秒、③ $72^\circ\text{C}$  30 秒で①-③の過程を 40 回繰り返した。PCR の結果は ABI PRISM 7700 の解析プログラムである relative standard curve method 法を用いて解析した。均一化された cDNA を用いて、肝細胞マーカー *Hhex*, *Fibrinogen*, *Prox1*, *GFR $\alpha$ 2* と内部標準遺伝子 *GAPDH* の半定量的 RT-PCR を行った (表 9)。PCR は Blend Taq (TOYOBO) を用い、反応条件は以下の通りである: denature  $95^\circ\text{C}$  10 分、① $95^\circ\text{C}$  1 分、② $60^\circ\text{C}$  1 分、③ $72^\circ\text{C}$  1 分で①-③の過程を各遺伝子の増幅量に合わせ 28-32 回繰り返した。その後電気泳動により各遺伝子の増幅を確認した。

表 9 <PCR に用いたプライマー配列>

遺伝子名		プライマー塩基配列	サイクル数
<i>GFR<math>\alpha</math>2</i>	Fwd	5'- ATCTCCACCTGCAGCAAGGAG -3'	27
	Rev	5'- GAGATAGTGATGCTGGTGGTGCT -3'	
<i>Prox1</i>	Fwd	5'- ATCAGGAGGATGTATGCAGC -3'	32
	Rev	5'- ATTGCCCTTAATGCCACCC -3'	
<i>Hhex</i>	Fwd	5'- ATGGAGTAATTTAAGTGCCTTCGCA -3'	26
	Rev	5'- AATGTGAGGTATAAAACCGCAAAGAC -3'	

<i>Fibrinogen</i>	Fwd	5'- TAGAATTGGAGGACTGGTTCTGGC -3'	26
	Rev	5'- ATGTAAAGAGGTAAGCGCTGCTCA -3'	
<i>GAPDH</i>	Fwd	5'- ACGCCATCACTATCTTCCAG -3'	26
	Rev	5'- CAGCCTTCACTACCCTCTTG -3'	

### 6.12. マウス肝芽を用いた *GFR $\alpha$ 2* の発現解析

マウス 9.5 日胚由来肝芽 cDNA は、タングステンニードルを使用して間充織を除去した肝芽より合成された。12.5, 14.5 日胚由来肝芽 cDNA は E-cadherin を指標とし autoMACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)により分離した肝細胞から合成した cDNA を用いた。*GFR $\alpha$ 2* の他に肝細胞マーカーとして *AFP* と *Alb*、内部標準マーカーとして *GAPDH* をそれぞれ用いた。9.5 日胚の場合にのみ他の組織が混入している可能性が考えられるので血管内皮細胞マーカーである *Flk-1* と横中隔間充織マーカーである *Hlx* も行った。PCR は Blend Taq (TOYOBO)を用い、反応条件は以下の通りである： denature 95°C 10 分、①95°C 1 分、② 55°C 1 分、③72°C 1 分で①-③の過程を 40 回繰り返した。その後電気泳動により各遺伝子の増幅を確認した。使用したプライマーを表 11 に示した。

表 11 <PCR に用いたプライマー配列>

プライマー名	プライマーの塩基配列
<i>GFR<math>\alpha</math>2</i> primer Fwd	5'- ATGATCTTGGCAAACGCCTTCT -3'
<i>GFR<math>\alpha</math>2</i> primer Rev	5'- GATGTAGGAGGAGCGGAGCTT -3'
<i>AFP</i> primer Fwd	5'- AAAGCTGCGCTCTCTACCAG -3'
<i>AFP</i> primer Rev	5'- GAGTTCACAGGGCTTGCTTC -3'
<i>Alb</i> primer Fwd	5'- AAGCTGAGACCTTCACCTTC -3'
<i>Alb</i> primer Rev	5'- CAGCAGCCTTGCAACATGTA -3'
<i>Hlx</i> primer Fwd	5'-GAGATCTCACATCGCTGCTA -3'
<i>Hlx</i> primer Rev	5'- GCTTGGTCACGTA CTCTGGAT -3'
<i>Flk-1</i> primer Fwd	5'- TGGTCAAACAGCTCATCATCCTAGA -3'
<i>Flk-1</i> primer Rev	5'- GAGATGGTGACCAATGTGGATGA -3'
<i>GAPDH</i> primer Fwd	5'- ACCACAGTCCATGCCATCAC -3'
<i>GAPDH</i> primer Rev	5'- TCCACCACCCTGTTGCTGTA -3'

### 6.13. ニワトリ 7 日胚肝臓における *NRTN* と *GFR $\alpha$ 2* の発現解析

7 日目まで孵卵させたニワトリ胚から肝臓を切り出し、固定後包埋して凍結切片を作成し

た。隣接した切片を用いて *GFR $\alpha$ 2* と *NRTN* の ISH を行い、固定後切片をグリセロールに封入し観察した。

## 7. 実験結果

### 7.1. ニワトリ胚における *GFR $\alpha$ 1*, *GFR $\alpha$ 2*, *GFR $\alpha$ 4*, *GDNF*, *Ret* の発現解析

ニワトリ胚において GDNF 関連因子が肝臓領域で発現することがすでに報告されている (Homma et al., 2000)。そこでまず GDNF 関連因子の発現が肝臓領域で認められるのかを再確認するために肝臓の観察が容易な 4 日胚を用いて、*GFR $\alpha$ 1*, *GFR $\alpha$ 2*, *GFR $\alpha$ 4*, *GDNF*, *Ret* の whole mount *in situ* hybridization (WM-ISH)を行った。その結果、*GFR $\alpha$ 1*, *GFR $\alpha$ 2*, *GFR $\alpha$ 4*, *GDNF*, *Ret* の中で、*GFR $\alpha$ 2* のみが 4 日胚の肝臓領域で発現することが認められた(Fig.1)。GFLs-GFR $\alpha$ s 複合体の細胞内伝達に必須なレセプターである *Ret* の発現は認められなかった

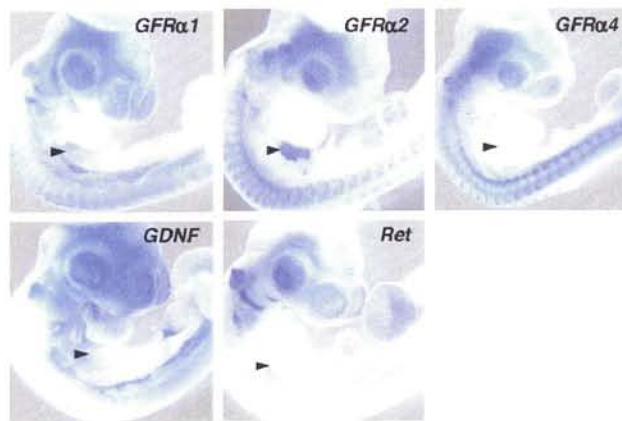


Fig.1 肝臓領域における *GFR $\alpha$ 1*, *GFR $\alpha$ 2*, *GFR $\alpha$ 4*, *GDNF*, *Ret* の発現様式

ニワトリ 4 日胚 WM-ISH による *GFR $\alpha$ 1*, *GFR $\alpha$ 2*, *GFR $\alpha$ 4*, *GDNF*, *Ret* の発現パターンを示す *GFR $\alpha$ 2* の発現が肝臓領域に認められた。矢鏃は肝臓領域を示す。

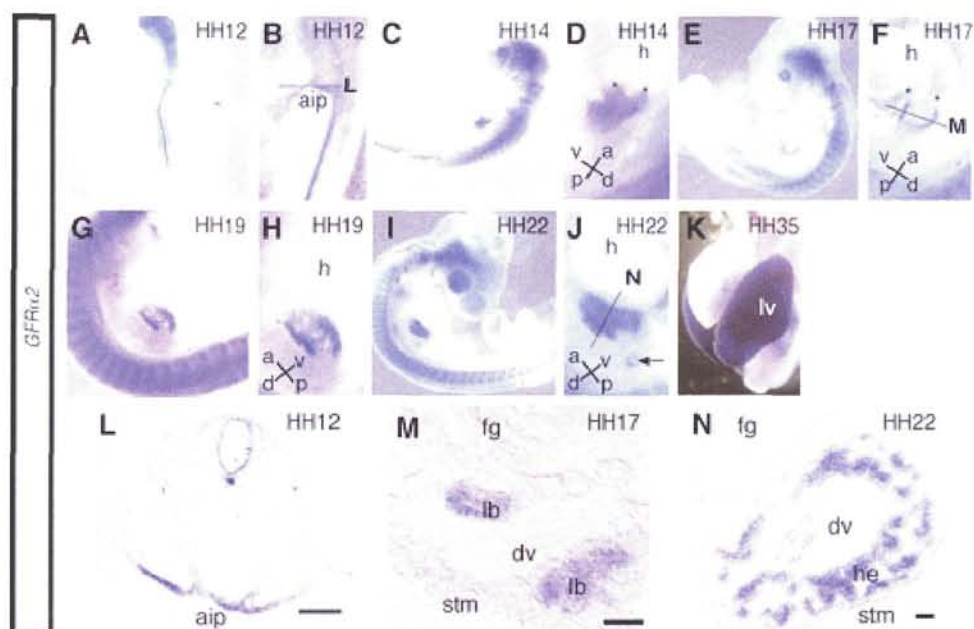
### 7.2. ニワトリ胚における *GFR $\alpha$ 2* の詳細な発現パターン解析

*GFR $\alpha$ 2* の発現がニワトリ 4 日胚の肝臓領域で確認された。このことから、*GFR $\alpha$ 2* が肝臓発生の中のどの段階から発現しているのかを明らかにするために、さらに詳細な発現パターン解析を Hamburger and Hamilton's stage (HH) 10-24, 35 胚で行った (Fig.2)。その結果、*GFR $\alpha$ 2* は HH11 胚の前腸内胚葉の極めて狭い範囲で初めて検出され、HH12 胚では前腸内胚葉全体で発現が観察された (Fig.2A, B)。HH12 胚の横断切片において *GFR $\alpha$ 2* が内胚葉で発現している事が確認された (Fig.2L)。さらにステージを追って発現を観察した結果、2 本の肝芽が間充織に陥入する HH14 (Fig.2C, D)、および肝芽が静脈管に沿って前方に伸長する HH17 では肝芽に発現が認められた (Fig.2E, F)。HH17 の横断切片において、*GFR $\alpha$ 2* の発現は静脈管に隣接した 2 本の肝芽で観察された (Fig.2M)。2 本の肝芽が静脈管を側面方向に分枝しながら伸長している HH19 では分枝したすべての肝芽で *GFR $\alpha$ 2* の発現が認められた (Fig.2G, H)。HH22 では *GFR $\alpha$ 2* は肝臓全体で発現し、その横断切片では肝細胞索で発現が見られた



(Fig.2I, J, N)。また、この時期では背側腭臓領域でも *GFR $\alpha$ 2* は発現していた (Fig.2J 矢印)。さらに、*GFR $\alpha$ 2* の発現がどの発生段階まで持続して発現しているのかを確認するために HH35 (8.5-9 日) 胚の肝臓における *GFR $\alpha$ 2* の発現を調べたところ、この時期の肝臓でも *GFR $\alpha$ 2* の強い発現が認められた (Fig.2K)。

これらの発現パターン解析の結果から *GFR $\alpha$ 2* は肝臓発生初期より肝内胚葉で発現し、肝臓発生を通じて継続的に発現する事が明らかとなった。この結果は *GFR $\alpha$ 2* が肝臓発生に関与することを示唆した。



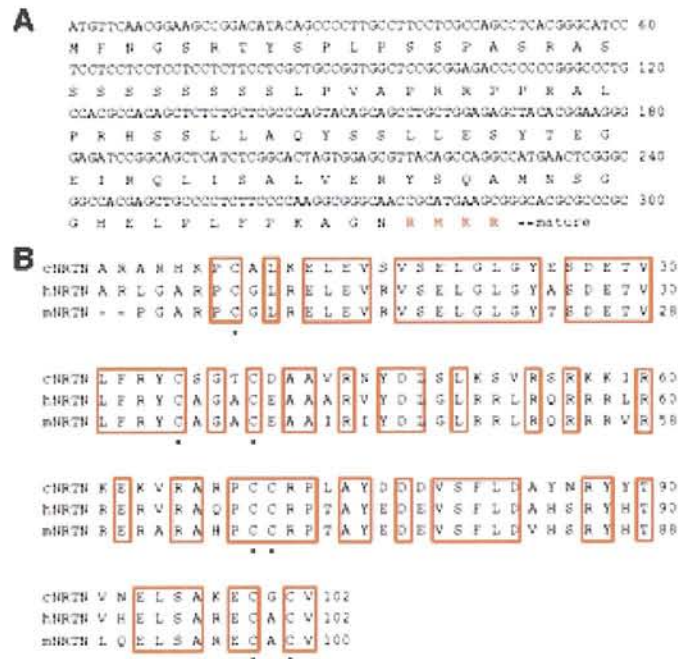
**Fig.2** ニワトリ胚における *GFR $\alpha$ 2* の発生段階ごとの詳細な発現パターン

(A-K)はそれぞれ HH12 (A, B), HH14 (C, D), HH17 (E, F), HH19 (G, H), HH22 (I, J), HH35 (K) の発生段階における *GFR $\alpha$ 2* の WM-ISH の結果を示す。(B, F, J)中の直線はそれぞれの試料の横断切片 (L, M, N)の位置を示している。図中の a, p, v, d は胚の方向を示す。a は anterior、p は posterior、v は ventral、d は dorsal をそれぞれ示している。(D, F)中のアスタリスクは肝芽を示す。(J)中の矢印は背側腭臓領域を示している。略語: aip, anterior intestinal portal (前腸門) ; h, heart (心臓) ; lv, liver (肝臓) ; fg, foregut (前腸) ; stm, septum transversum mesenchyme (横中隔間充織) ; dv, ductus venosus (静脈管) ; lb, liver bud (肝芽) ; he, hepatoblast (肝芽細胞) 。スケールバー, 100  $\mu$ m.

### 7.3. ニワトリ *NRTN* のクローニング

*GFR $\alpha$ 2* が肝発生初期から発現していたことから、次にそのリガンドとして知られている *NRTN* の肝発生における発現を確認する必要がある。しかし、ニワトリ *NRTN* の塩基配列は現在まで報告されていないことから、ニワトリ *NRTN* のクローニングを行った。まず、マ

ウス、ラット、ヒト NRTN とニワトリ GDNF のアミノ酸配列の比較を行い、種間で保存されているアミノ酸残基に対応した塩基配列をもとに **degenerate** プライマーを作製し、PCRにより 180bp の遺伝子断片を得た。次にその断片をプローブとして用いて、ニワトリ胚肝臓 cDNA フェージライブラリーよりスクリーニングを行った結果、8つの独立したクローンを得た。それら8つのクローンの塩基配列を決定した結果、そのうちの1つにニワトリ NRTN の完全長配列をもつクローンが存在していた。クローニングされたニワトリ NRTN は 2,457 塩基対でその中の翻訳領域は 597 塩基対 (199 アミノ酸残基) であった (Accession Number. AB257073)。ニワトリ NRTN のアミノ酸配列を解析したところ、そのプロ領域にプロテアーゼ認識配列である RXXR が存在していた。このことより、他種の NRTN や GFLs と同様にニワトリ NRTN はこの位置でプロセシングされ、そのカルボキシル末端側領域が成熟タンパク質として分泌されることが推測された (Fig.3A 赤文字)。成熟タンパク質のアミノ酸配列中には TGF- $\beta$ スーパーファミリー間で保存されている7つのシステイン残基が存在しており、TGF- $\beta$ スーパーファミリーの特徴を示していた (Fig.3B)。さらにニワトリ NRTN の成熟タンパク質領域のアミノ酸配列をヒト、マウス NRTN のものと比較したところ、ニワトリ NRTN はヒト NRTN と 69%、マウス NRTN と 64%の比較的高い相同性があることが明らかになった (Fig.3B)。このことから、今回得られたニワトリ NRTN の成熟タンパクにおけるアミノ酸配列は種間でよく保存されている事がわかった。一方、プロセシングによって生じるアミノ末端側領域のアミノ酸配列の種間による保存性は低かった。



**Fig.3** クローニングしたニワトリ *NRTN* の解析

(A)ニワトリ *NRTN* のプロ領域の塩基配列とアミノ酸配列を示している。赤字 (RMKR)はプロテアーゼによって認識され、プロセッシングをうける配列を示す。(B)ニワトリ (c*NRTN*)、ヒト (h*NRTN*)、マウス (m*NRTN*)の成熟タンパク質間のアミノ酸配列比較。赤枠で囲まれた領域が3種間で相同なアミノ酸配列を示している。アスタリスクはTGFβスーパーファミリーで保存され、そのファミリーで特徴的な7つのシステイン残基を示している。

#### 7.4. ニワトリ胚における *NRTN* の発現解析

*NRTN* のニワトリ胚肝臓発生における発現パターンを明らかにするために、クローニングされた *NRTN* をテンプレートとして用いて DIG 標識 RNA プローブを作成し WM-ISH を行った。HH12 において *NRTN* の発現は前腸内胚葉に隣接した卵黄静脈で認められた (Fig.4A 矢鏃)。HH17 において *NRTN* の発現は肝芽が取り囲んでいる静脈管で認められた (Fig.4B 矢鏃)。さらに詳細に確認するため横断切片を作成したところ、HH17 では *NRTN* は静脈血管内皮細胞で発現していることが明らかとなった (Fig.4E 矢鏃)。HH22 においても、*NRTN* は肝臓の中心に位置した静脈管に発現し (Fig.4D 矢鏃)、さらに静脈管の血管内皮細胞に発現していることが横断切片より確認された (Fig.4F 矢鏃)。これらのことから、*GFRα2* のリガンドである *NRTN* は *GFRα2* と同様に肝臓発生初期より肝芽が取り囲む静脈管の血管内皮細胞で発現していることが明らかとなった。これら2つの実験結果から *GFRα2* と *NRTN* が肝臓発生に関与する可能性が強く示唆された。



肝臓領域以外における*NRTN*発現は、HH17では神経堤細胞由来の腸管神経の投射領域である内臓中胚葉領域 (Fig.4B 矢印)で認められ、HH22では耳胞、第二咽頭弓、腎間充織などで強く認められた (Fig.4C)。これらの*NRTN*発現はマウス胚などですでに報告されている*NRTN*発現領域と同様であった (Golden et al., 1999; Yan et al., 2004)。

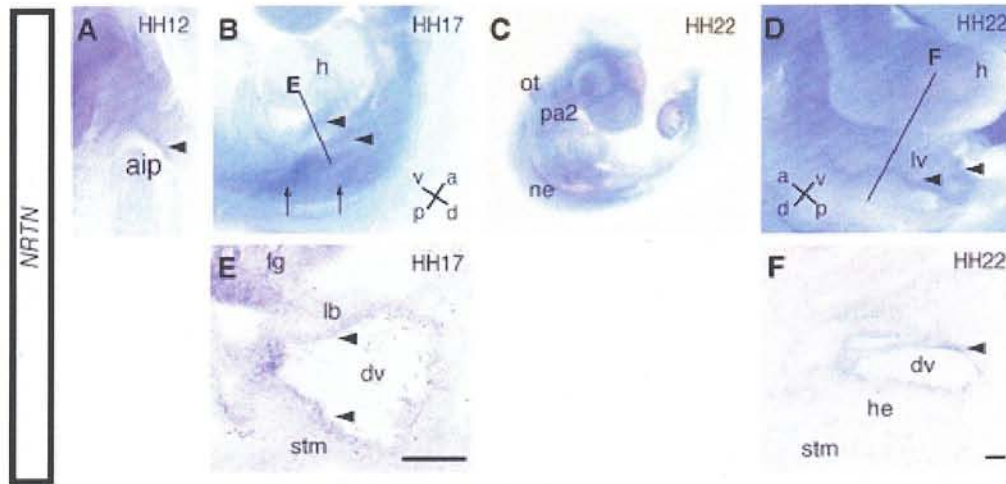


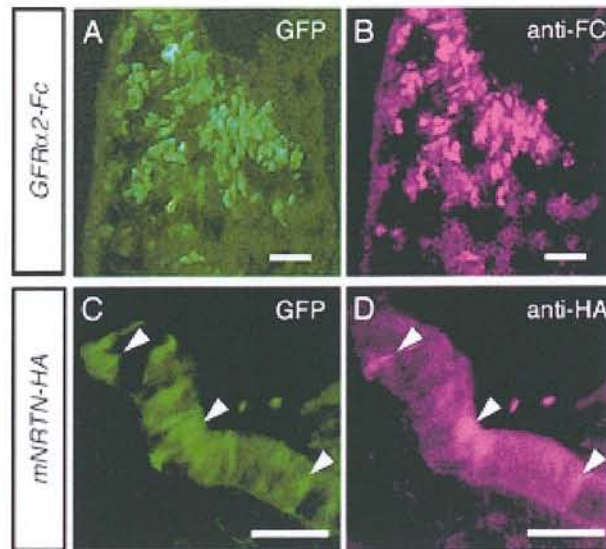
Fig.4 ニワトリ胚における *NRTN* の発生段階ごとの発現パターン

(A-F)はそれぞれHH12 (A)、HH17 (B, E)、HH22 (C, D, F)の発生段階における*NRTN*の発現パターンを示している。図中 (B, D)の直線はそれぞれの横断切片 (E, F)を示している。図中のa, p, v, dはニワトリ胚の方向を示す。aはanterior、pはposterior、vはventral、dはdorsal方向をそれぞれ示している。図中の矢鏃は*NRTN*が発現している血管内皮細胞を示し (A, B, D, E, F)、矢印 (B)は腸管に移動してきた神経堤由来細胞の存在する中胚葉領域における発現を示している。略語: aip, anterior intestinal portal (前腸門); h, heart (心臓); ot, otic vesicle (耳胞); pa2, pharyngeal arch2 (第二咽頭弓); ne, nephrogenic mesenchyme (腎間充織); lv, liver (肝臓); fg, foregut (前腸); stm, septum transversum mesenchyme (横中隔間充織); dv, ductus venosus (静脈管); lb, liver bud (肝芽); he, hepatoblast (肝芽細胞)。スケールバー、100  $\mu$ m。

#### 7.5. 機能解析用コンストラクトの作成と機能確認

*GFR $\alpha$ 2* と *NRTN* の肝臓発生における機能を明らかにするために、機能阻害型実験と機能獲得型実験のためのコンストラクトを構築した。機能阻害型実験としては、Mikaels-Edman によって行われた方法を参照し *GFR $\alpha$ 2*の分泌型{*GFR $\alpha$ 2* の GPI アンカーリング部位を除いた領域とマウスの IgG-Fc の融合タンパク(*GFR $\alpha$ 2*-Fc)}を *in vivo* で強制発現することでシグナル伝達阻害を行うこととした (Mikaels-Edman et al., 2003)。機能獲得型実験として、マウス *NRTN* を利用することとし、カルボキシル末端に HA-Tag を付加した。その後 *GFR $\alpha$ 2*-Fc または *mNRTN*-HA を発現ベクター *pCAGGS* に挿入した。それら発現ベクターをニワトリ胚

にエレクトロポレーションにより導入後、融合タンパクが正常に翻訳されたのかを蛍光免疫組織化学法で確認した (Fig.5)。その結果、*pCAGGS-GFR $\alpha$ 2-Fc* と *pCAGGS-mNRTN-HA* からそれぞれ正常にタンパク質が翻訳されていることが確認できた (Fig.5A-D)。



**Fig.5** 機能解析コンストラクトの発現確認

(A, B)は *pCAGGS-GFR $\alpha$ 2-Fc* を (C, D)は *pCAGGS-mNRTN-HA* を導入し、48 時間培養した胚の肝臓 (A, B)、胃 (C, D)の横断切片を示す。同時に導入した *pCAGGS-GFP* から産生される GFP の蛍光により導入箇所を確認し、それぞれの融合タンパクのタグを Alexa546 標識二次抗体により検出した。矢鏃は GFP と *mNRTN-HA* が同時に発現している部位を示す (C, D)。スケールバー、100  $\mu$ m。

#### 7.6. 分泌型 GFR $\alpha$ 2 を用いた GFR $\alpha$ 2 の機能解析

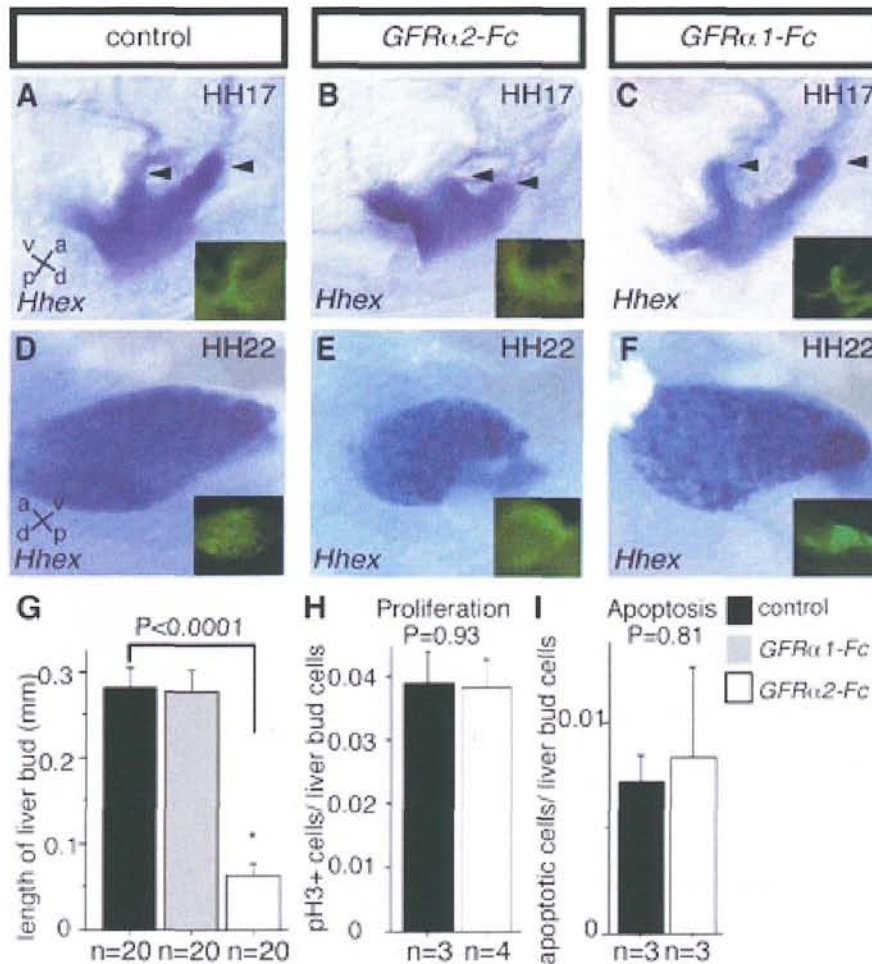
分泌型 GFR $\alpha$ 2 である *GFR $\alpha$ 2-Fc* をニワトリ胚肝臓領域に導入し内在性 GFR $\alpha$ 2 とリガンド NRTN の *in vivo* における結合を阻害することで、シグナル伝達阻害を行い、肝臓発生における GFR $\alpha$ 2 の機能を解析した。HH12 の前腸内胚葉に遺伝子発現ベクター *pCAGGS*、*pCAGGS-GFR $\alpha$ 1-Fc*、*pCAGGS-GFR $\alpha$ 2-Fc* を導入し、HH17、24 まで発生させた。その後、肝細胞マーカーである *Hhex* (Yanai et al., 2005) をプローブとして用いた WM-ISH によって、遺伝子導入胚における肝芽 / 肝臓の形態を可視化し観察を行った。コントロールとして *pCAGGS* のみ、または NRTN と同じ GDNF ファミリーの GDNF に対する選択的レセプターである GFR $\alpha$ 1 の分泌型 *GFR $\alpha$ 1-Fc* を利用した。各遺伝子が目的領域に導入されているのかを判定するために *pCAGGS-GFP* を共導入し、その GFP 蛍光により導入部位を確認した (Fig.6A 各写真の右下)。培養 24 時間後の HH17 において、*pCAGGS-GFR $\alpha$ 2-Fc* 導入胚では静脈管に沿った肝芽の伸長が抑制されていた (Fig.6B; 100%, n=20)。しかし *pCAGGS* または

*pCAGGS-GFR $\alpha$ 1-Fc* 導入胚では肝芽は静脈管に沿って正常に伸長し、*pCAGGS-GFR $\alpha$ 2-Fc* 導入胚で見られたような表現型は観察されなかった (Fig.6A; 100%, n=20, 6C; 100%, n=20)。

肝芽の基部から最先端部までの長さ (以下、肝芽長)を測定した結果、*pCAGGS-GFR $\alpha$ 2-Fc* 導入胚における肝芽長はコントロールと比べて 78%短縮していた(Fig. 6G)。

培養 48 時間後の HH22 において、*pCAGGS* (Fig.6D, n=20)または*pCAGGS-GFR $\alpha$ 1-Fc* (Fig.6F, n=20)導入胚では肝臓は正常に発生していたが、*pCAGGS-GFR $\alpha$ 2-Fc* 導入胚では肝臓の前後軸長はコントロールに比べ約 30%短縮していた(Fig.6E, n=20)。これは *pCAGGS-GFR $\alpha$ 2-Fc* 導入 24 時間後 HH17 に観察された表現型に起因すると思われる (Fig.6B)。この表現型が細胞増殖抑制や細胞死の増加などに起因する可能性が考えられた。そこで、遺伝子導入 24 時間後の肝芽の細胞増殖を観察した。細胞増殖は抗リン酸化 H3 抗体を用いて検出した。その結果、肝芽の細胞増殖率はコントロールと *pCAGGS-GFR $\alpha$ 2-Fc* 導入胚との間で有意差は見られなかった (Fig.6H)。さらに、肝芽の細胞死を観察するため TUNEL 法を用いて解析した結果、これもコントロールと *GFR $\alpha$ 2-Fc* 導入胚との間に大きな差は見られなかった (Fig.6I)。これらの結果から、*GFR $\alpha$ 2-Fc* 強制発現によって引き起こされた肝芽の伸長阻害は細胞増殖の抑制や細胞死に起因しないことが明らかとなった。





**Fig.6** *GFRα2Fc* 強制発現による *GFRα2* シグナル伝達阻害

(A-F)は *pCAGGS* (コントロール) (A, D), *pCAGGS-GFRα2-Fc* (B, E), *pCAGGS-GFRα1-Fc* (C, F) 導入胚における HH17 の肝芽、または HH22 の肝臓の形態を *Hhex* で WM-ISH し可視化したものを示す。外来遺伝子と共導入した *pCAGGS-GFP* 由来の GFP 蛍光像を各図の右端に示す。矢鏃は肝芽を示している (A-C)。図中の a, p, v, d はニワトリ胚の方向を示す。a は anterior, p は posterior, v は ventral, d は dorsal 方向をそれぞれ示している。(G)は遺伝子導入胚の HH17 における肝芽長を示す。コントロール、*GFRα2-Fc*、*GFRα1-Fc* をそれぞれ黒、白、グレーで示している。(H)は HH17 における肝芽の細胞増殖率を抗 pH3 抗体により検出し計測した値を、(I)は HH17 における肝芽の細胞死を TUNEL 法により検出し計測した値を示す。

### 7.7. NRTN の異所発現による機能解析実験

*GFRα2* のシグナル伝達阻害によって、肝芽の静脈管に沿った伸長が抑制されたことから、そのリガンドである NRTN が肝芽の伸長に関与することが推測された。この作業仮説を検証するため (1) *NRTN* を肝内胚葉領域に導入して *NRTN* の過剰発現を行なう、(2) 肝臓の隣接

領域に *NRTN* を導入し、*NRTN* の異所的発現を行なう、という2つの実験が考えられる。このような実験を行った場合、(1)の過剰発現では肝芽の伸張が促進され、(2)の異所的発現では肝芽が異所的発現領域に伸長することが予想される。

そこでまず(1)の過剰発現を行うために前腸内胚葉のうち、予定肝内胚葉領域 (PHE; prospective hepatic endoderm)に *pCAGGS-mNRTN-HA* を導入し HH17、HH22 まで培養後、肝細胞マーカーである *Hhex* で WM-ISH を行い、遺伝子導入胚における肝芽 / 肝臓の形態観察を行った。コントロールとして *pCAGGS* のみを導入した。また各遺伝子の導入部位を検出するために全ての実験において *pCAGGS-GFP* を共導入した。その結果、HH17 の *mNRTN-HA* 導入胚ではコントロール胚と比べ特に変化は見られず正常に発生していた (Fig.7A; 100%, n=20、B; 100%, n=17)。しかし HH22 の *mNRTN* 導入胚では肝芽による静脈管の取り囲みが強く抑制されていた (Fig.7E, 7I; 73%, n=15)。このような表現型はコントロールでは全く観察されなかった (Fig.7D, 7I; 0%, n=15)。これら試料の横断切片を作成したところ、コントロール胚では肝芽細胞は静脈管を完全に包囲していたが、*mNRTN-HA* 導入胚では肝芽細胞は静脈管側方に停滞し、静脈を取り囲んでいなかった (Fig.7G, H)。さらに *GFR $\alpha$*  ファミリーの *GFR $\alpha$ 1* のリガンドである *GDNF* を PHE 領域に導入した場合でも、表現型はコントロールと同様に正常であった (Fig.7F, 7I; 100%, n=10)。NRTN 過剰発現による肝芽の伸長促進は全く観察されなかった。



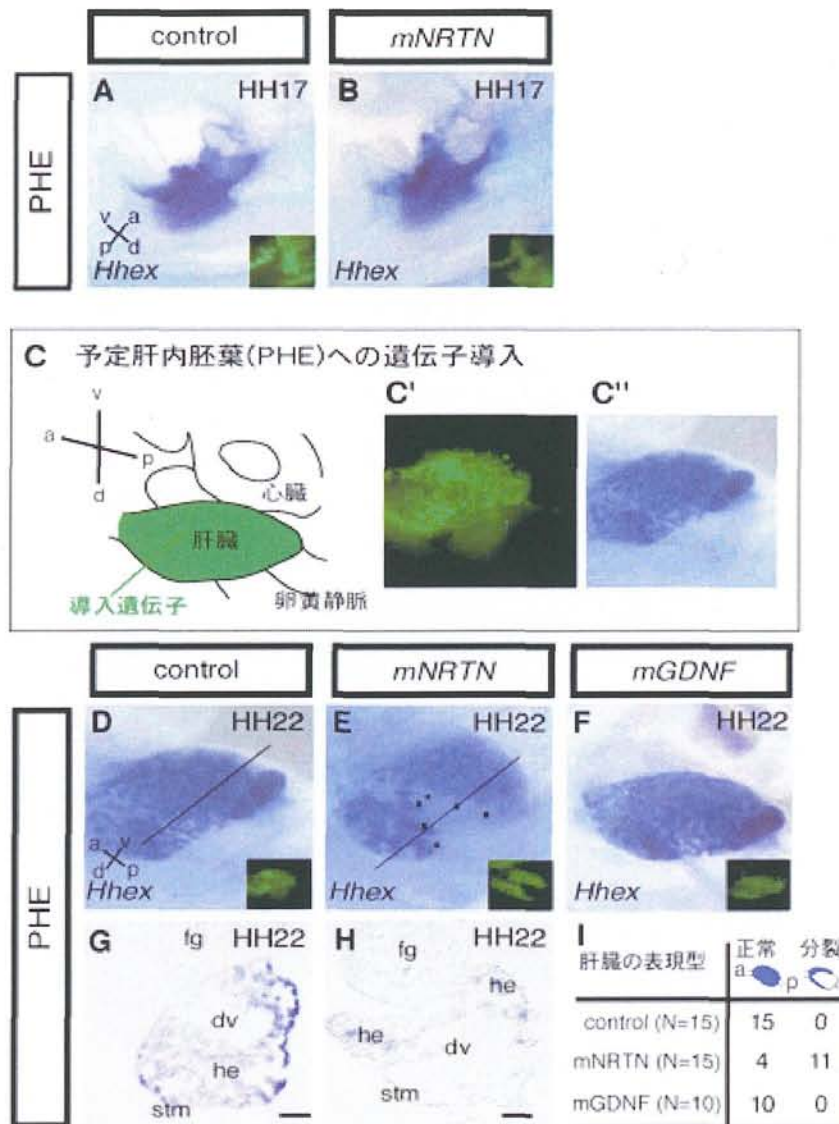
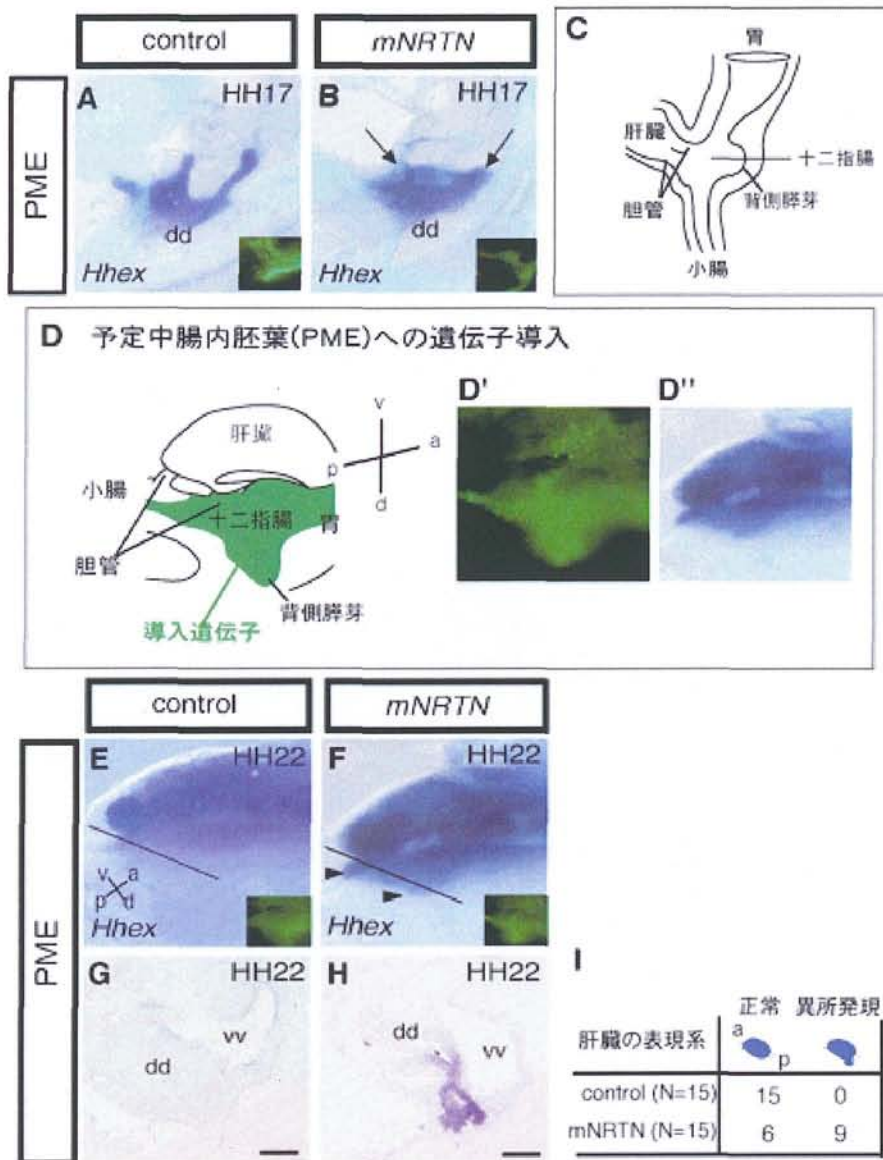


Fig.7 *NRTN* の予定肝内胚葉領域 (PHE)における機能解析

(A, D) *pCAGGS* (コントロール)、(B, E) *pCAGGS-mNRTN-HA*、(F) *pCAGGS-mGDNF-HA* 導入胚における HH17 の肝芽、または HH22 の肝臓の形態を *Hhex* で WM-ISH し可視化したものを示す。外来遺伝子と共導入した *pCAGGS-GFP* 由来の GFP 蛍光像を各図の右端に示す。(C)では HH22 における遺伝子導入部位を図式化したものと GFP の蛍光分布像 (C') と WM-ISH 像 (C'')を示す。(G)と (H)はそれぞれ (D)と (E)の直線部分の横断切片を示す。(I)は表現型の表をしめす。図中の a, p, v, d はニワトリ胚の方向。a は anterior、p は posterior、v は ventral、d は dorsal 方向をそれぞれ示す。略語: fg, foregut (前腸); stm, septum transversum mesenchyme (横中隔間充織); dv, ductus venosus (静脈管); he, hepatoblast (肝芽細胞)。スケールバー、100  $\mu$ m。

次に (2)の作業仮説を検証するために、肝臓隣接領域である予定中腸内胚葉領域 (PME;

prospective midgut endoderm)に *pCAGGS-mNRTN-HA* を導入し HH17、HH22 まで培養後、肝細胞マーカーである *Hhex* で WM-ISH を行い、遺伝子導入胚における肝芽 / 肝臓の形態の観察を行った。その結果、HH17 の *NRTN* 導入胚において肝芽の前方向への伸長が抑制され十二指腸領域に *Hhex* 陽性細胞が停滞しているような表現型が観察された (Fig.8B; 83%, n=12)。コントロール胚では肝芽は正常に伸長し十二指腸領域における *Hhex* 陽性細胞の停滞は見られなかった (Fig.8A; 100%, n=14)。HH22 では *NRTN* 導入胚において肝臓は正常に発生していたが、十二指腸領域に異所的な *Hhex* の発現が認められた (Fig.8E; 60%, n=15 矢鏃)。コントロール胚ではこのような表現型は観察されなかった (Fig.8F; 100%, n=15)。また *NRTN* 導入胚の横断切片を作成したところ、コントロール胚では観察されない *Hhex* 陽性細胞が十二指腸領域に確認された (Fig.8G H)。これらの細胞はその形態から肝芽細胞だと考えられた。これらの結果より、(2)の作業仮説どおり異所的な *NRTN* の発現は異所的な肝芽細胞の伸長を誘導することが明らかになった。



**Fig.8** *NRTN* の予定中腸内胚葉領域 (PME)における機能解析

(A, E) *pCAGGS* (コントロール)、(B, F) *pCAGGS-mNRTN-HA*、導入胚における HH17 の肝芽、または HH22 の肝臓を肝細胞マーカーである *Hhex* で WM-ISH し可視化したものを示す。外来遺伝子と共導入した *pCAGGS-GFP* 由来の GFP 蛍光像を各図の左端に示す。(C)は肝臓周囲の内臓の位置関係を図式化したものを示す。(D)は HH22 の胚の遺伝子導入部位を図式化したものと GFP の蛍光分布像 (D')と WM-ISH 像 (D'')を示している。(G)と (H)はそれぞれ (E)と (F)の直線部分の横断切片を示す。(I)は表現型の表を示す。図中の a, p, v, d はニワトリ胚の方向を示し、a は anterior、p は posterior、v は ventral、d は dorsal 方向をそれぞれ示している。略語: dd, duodenum (十二指腸); vv, vitelline vein (卵黄静脈)。スケールバー、100 $\mu$ m。

十二指腸領域における異所的な *NRTN* の発現により、異所的な肝芽が十二指腸領域に出



現したが、NRTN によって予定中腸内胚葉細胞が分化転換して *Hhex* 陽性細胞になったとも考えられる。そこで、HH16-17 の十二指腸を培養し、培地に NRTN タンパク質を添加した。コントロールには 0.1%BSA を添加した。培養後、十二指腸を含む内胚葉マーカーである *Foxa2* と肝細胞マーカーの *Hhex* で WM-ISH を行った。その結果 *Foxa2* の発現はコントロール、NRTN タンパク質を添加した十二指腸の両方で認められたが、*Hhex* の発現はどちらにも観察されなかった (Fig.9A-D)。このことから NRTN によって、十二指腸内胚葉が *Hhex* 発現細胞へと分化転換したのではなく、異所的な NRTN の発現によって肝芽細胞が隣接する肝臓領域から誘引された可能性が高くなった。

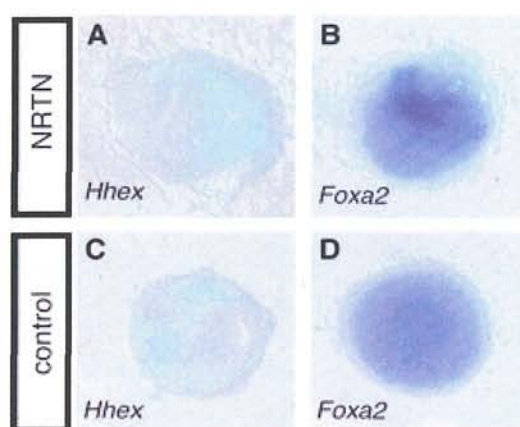
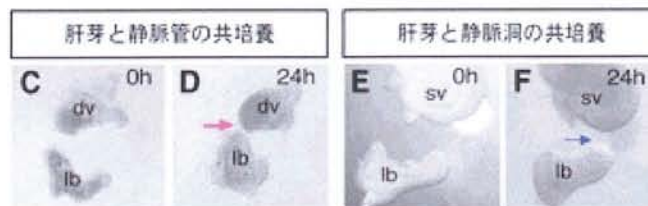
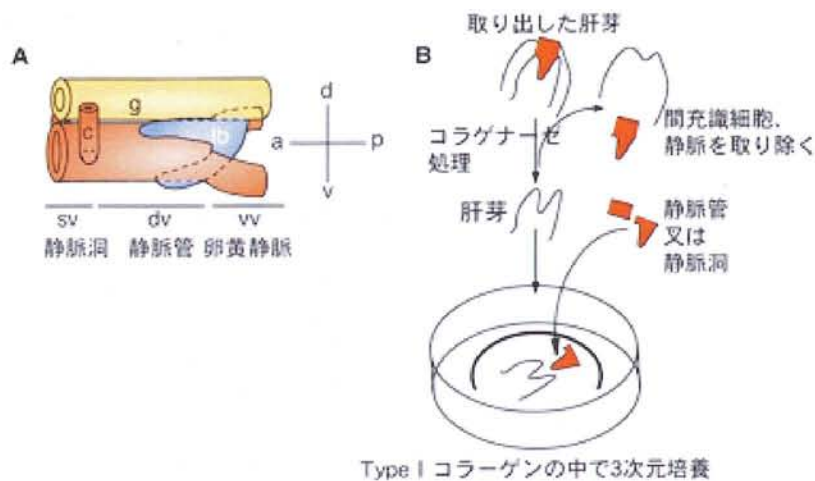


Fig.9 NRTN による十二指腸の分化転換実験

HH16-17 由来の十二指腸を、(A, B) NRTN タンパク質を培養液に添加して培養したものと (C-D) コントロールとして 0.1%BSA を培養液に添加して 3 日間培養したものを示す。培養した十二指腸は肝細胞マーカー *Hhex* (A, C) または内胚葉マーカー *Foxa2* (B, D) を WM-ISH で検出した。

### 7.8. 肝芽と静脈管の共培養実験

これまでに示したとおり、*in vivo* における NRTN の異所発現が異所的な肝芽形成を誘引したことなどから、NRTN は肝芽細胞の伸長/移動を誘引する物質であることが推測された。そこでまず、静脈管と肝芽をそれぞれ単離して共培養を行うことにより静脈管が肝芽の伸長/移動を誘引する能力があるのかを検証した。培養 24 時間後、肝芽は静脈管に向かって伸長し接着した (Fig.10C, D; 100%, n=7 マゼンタ矢印)。同様の共培養実験を静脈管の前方に形成される静脈洞 (Fig.10A, SV) と行ったところ、培養 24 時間後において肝芽は全く伸長しなかった (Fig.10E, F; 100%, n=9 青矢印)。NRTN は静脈管に多く静脈洞ではほとんど発現していないことから、肝芽の伸長を誘引する因子は NRTN である可能性が考えられた。



**Fig.10** 静脈と肝芽の共培養実験

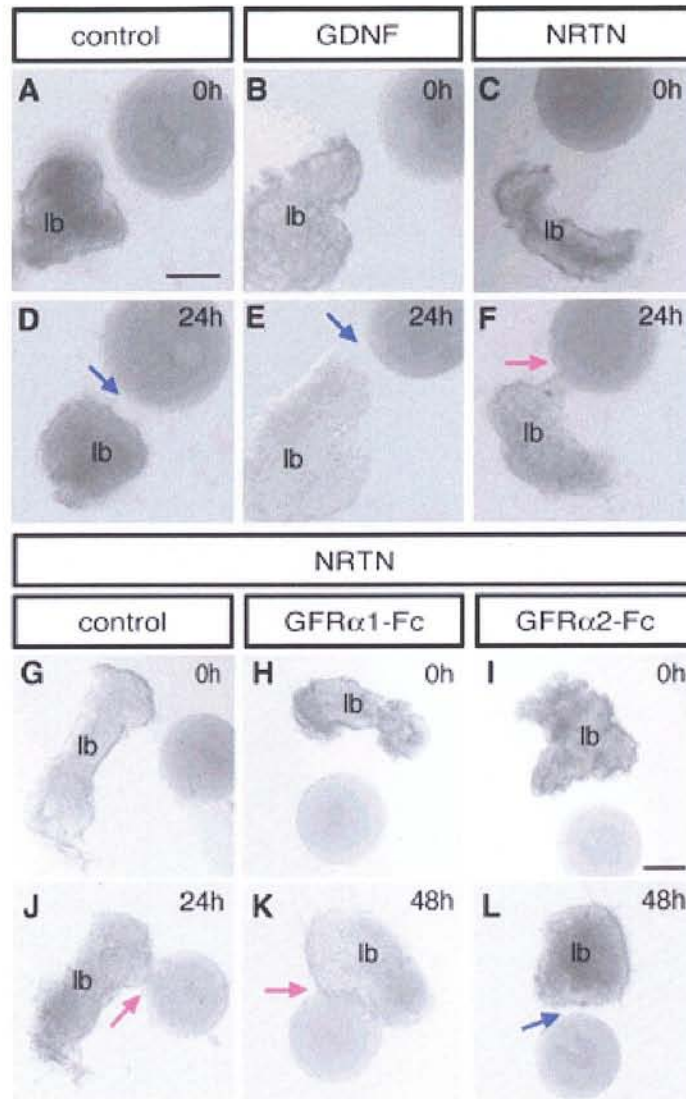
(A)HH16-17における肝芽と血管（静脈）の関係を模式図で示した。(B)共培養の方法を示す。(C-F)はそれぞれ肝芽を静脈管 (C, D)または静脈洞 (E, F)と共培養したもので、培養 0 時間後 (C, E)、培養 24 時間後 (D, F)を示している。培養 24 時間後、肝芽は静脈管に向かって伸長し接着した(C マゼンタ矢印)、静脈洞との共培養では肝芽は静脈洞に向かって伸長しなかった(F 青矢印)。(A)の a, p, v, d はニワトリ胚の方向を示し、a は anterior、p は posterior、v は ventral、d は dorsal 方向をそれぞれ示している。略語: g, gut (腸管)、lb, liver bud (肝芽)、sv, sinus venosus (静脈洞)、dv, ductus venosus (静脈管)、vv, vitelline vein (卵黄静脈)。

### 7.9. 肝芽と NRTN タンパク質を用いた共培養実験

肝芽の伸長／移動を誘引する因子が NRTN であることを直接検証するために肝芽と NRTN タンパク質を染み込ませたビーズ（以下 NRTN ビーズ）との共培養実験を行った。コントロールとして 0.1%BSA ビーズ、または、GFR $\alpha$ 1 のリガンドである GDNF ビーズを用いた (Fig.11A-F)。肝芽の先端部がビーズの方向を向くように配置し、ビーズと肝芽間の距離を 40-80  $\mu$ m に設定した。培養 24 時間後、肝芽が NRTN ビーズに向かって伸長し接着していた (Fig.11F; 88%, n=16 マゼンタ矢印)。BSA や GDNF ビーズへの肝芽の伸長は観察されなかった (Fig.11D; 100%, n=12、11E; 100%, n=9 青矢印)。

NRTN が肝芽伸長を誘引した可能性をさらに検証するために、肝芽と NRTN ビーズとの共培養中に GFR $\alpha$ 2-Fc を添加して培養を行った。これにより、NRTN と肝芽表面で発現して

いる内在性 GFR $\alpha$ 2 との結合を *in vitro* で阻害することが可能である。この条件下で肝芽が NRTN ビーズに向かって伸長しなければ、NRTN が肝芽伸長誘引因子である事が証明される。コントロールとして 0.1%BSA、GFR $\alpha$ 1-Fc を培養液中に添加した (Fig.11G と J, H と K)。培養 24 時間後、BSA を添加したものでは肝芽の NRTN ビーズへの伸長と接着が観察された (Fig.11J; 接着した肝芽の出現率 80%, n=5 マゼンタ矢印)。GFR $\alpha$ 1-Fc の添加では、培養 24 時間後において肝芽の NRTN ビーズへの伸長は観察されなかったが、培養 48 時間後において肝芽の NRTN ビーズへの伸長および接着が観察された (Fig.11K; 接着した肝芽の出現率 78%, n=18 マゼンタ矢印)。GFR $\alpha$ 1-Fc 添加における肝芽伸長の遅れは過剰量の GFR $\alpha$ 1 が NRTN と非常に弱くではあるが結合する事に起因していると考えられる (Klein et al, 1997)。GFR $\alpha$ 2-Fc 添加では、培養 48 時間後において肝芽の NRTN ビーズへの伸長、接着の強い抑制が観察された (Fig.11L; 接着した肝芽の出現率 29%, n=17 青矢印)。これらの実験結果から、NRTN は肝芽の伸長を誘引している事が明らかとなり、静脈管による肝芽の誘引は NRTN によるものであることが証明された。



**Fig.11** 肝芽とタンパク質を染み込ませたビーズとの共培養実験

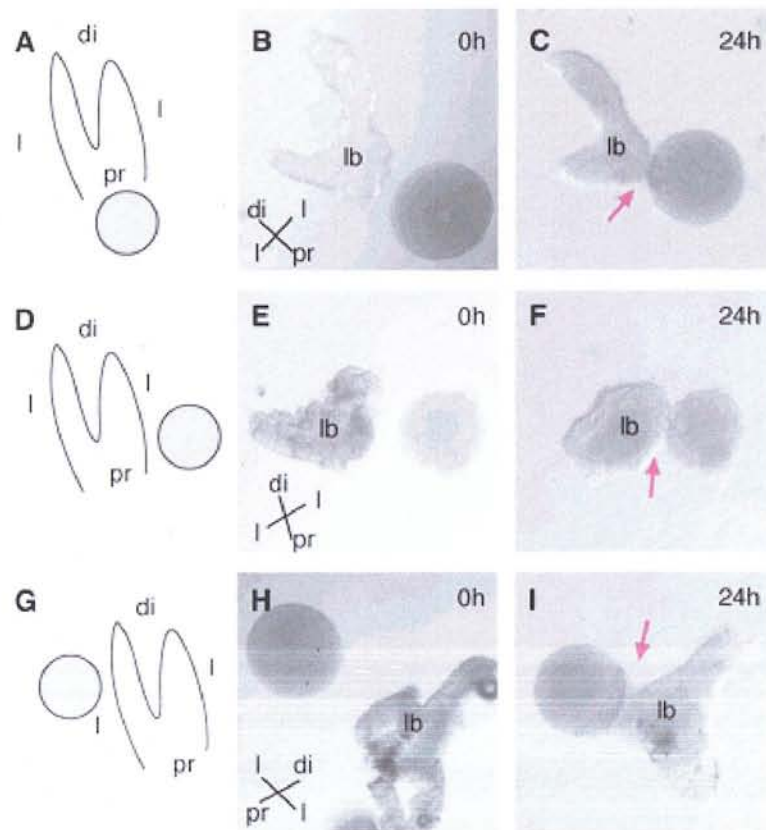
肝芽の先端部がビーズの方向を向くように配置し肝芽と微小ビーズ間距離を 40-80 $\mu$ m に設定した。(A, D)は 0.1%BSA (コントロール)、(B, E)は GDNF (50 ng / ml)、(C, F)は NRTN (50 ng / ml) を染み込ませた微小ビーズと肝芽とを共培養したもの示している。(A-C)培養 0 時間後、(D-F)培養 24 時間後を示す。肝芽がビーズに向かって伸長し接着したものをマゼンタ矢印で示した (F)。肝芽が伸長しなかったものを青矢印で示した (D, E)。

(G-L)肝芽と NRTN ビーズとの共培養系に、0.1%BSA (G, J)、GFR $\alpha$ 1-Fc (300 ng / ml H, K)、GFR $\alpha$ 2-Fc (300 ng / ml I, L)を添加したもの示している。(G-I)培養 0 時間後、(J)培養 24 時間後、(K, L)培養 48 時間後をそれぞれ示す。肝芽がビーズに向かって伸長し接着したものをマゼンタ矢印で示した (J, K)。肝芽が伸長しなかったものを青矢印で示した (L)。



### 7.10. 肝芽における NRTN 反応性の部位差の検証

正常発生において、ニワトリ胚肝芽はその先端部のみが伸長する。実際、すでに示した通り、肝芽先端部を NRTN ビーズへ向けて培養すると、肝芽は NRTN ビーズに向かって伸長した。一方、NRTN レセプターである *GFRα2* は肝芽全体で均一に発現していることから、肝芽のすべての部位は NRTN に対して反応性を有している可能性が考えられた。そこで、NRTN ビーズを肝芽の様々な部位に面するように配置し共培養を行うことで肝芽の NRTN への反応性に部位差が存在するののかについて検証した。その結果、肝芽のどの位置に NRTN ビーズを配置して共培養を行っても、肝芽はビーズに向かって伸長し接着した (Fig.12B-C, E-F, H-I)。これらの結果より *in vitro* で肝芽のすべての部位は、NRTN 反応能を持つことが明らかになった。



**Fig.12** 肝芽における NRTN 反応性の部位差の検証

(A, D, G)は肝芽と NRTN ビーズとの位置関係を示した模式図を示す。(B, C)NRTN ビーズを肝芽の後方、(E, F)肝芽の後側方、(H, I)肝芽の前側方にそれぞれ配置し共培養したものを示す。(B, E, H)は培養 0 時間後、(C, F, I)は培養 24 時間後を示している。肝芽が NRTN ビーズに伸長して接着したものをマゼンタ矢印で示した (C, F, I)。イラスト中の di, pr, l は肝芽の部位を示し、di は distal、p は proximal、l, lateral 部位をそれぞれ示している。略語; lb, liver bud (肝芽)。



### 7.11. 肝芽周囲の基底膜の分布

培養実験より肝芽のすべての部位はNRTNに反応できることが明らかとなった。正常発生において、NRTNは静脈管全体の血管内皮細胞で発現しているにもかかわらず、肝芽は静脈管に対してまず前方向へ、その後側方向へ伸長する。このことからNRTN-GFR $\alpha$ 2経路以外に肝芽の伸長／移動を制御している因子が存在する可能性が示唆された。そこで、マウス胚肝臓において、肝細胞の移動に関与することが報告されている基底膜の分布を、肝芽の前方向への伸長／移動が行われるHH16と、側方向への伸長／移動が開始されるHH18の2つの時期で確認した(Sosa-Pineda et al., 2000; Shiojiri and Sugiyama, 2004; Bort et al., 2006)。基底膜は基底膜構成分子であるラミニンを指標とし観察を行った (Fig.13A-B 緑)。肝芽はE-cadherinを指標とし検出した (Fig.13A-B マゼンタ)。その結果、HH16胚肝芽の先端部においてのみ基底膜が減少している様子が観察された (Fig.13A, A' 矢鏃)。またHH18では肝芽の側方部で基底膜が減少していた (Fig.13B, B' 矢鏃)。この結果から、肝芽が移動する方向の基底膜の減少が肝芽の移動方向を制御している可能性が示唆された。

肝芽における *GFR $\alpha$ 2-Fc* 強制発現により肝芽の伸長が抑制されるため、GFR $\alpha$ 2 シグナル伝達経路がこの基底膜分布制御に関与している可能性が考えられた。そこで、*GFR $\alpha$ 2-Fc* を強制発現した肝芽における基底膜の分布を調べた。遺伝子導入部位を抗 GFP 抗体により検出し (Fig.13C, D 緑)、基底膜を抗ラミニン抗体によって検出した (Fig.13C, D マゼンタ)。その結果、*GFR $\alpha$ 2-Fc* 導入肝芽ではコントロールと同様に肝芽の先端部で基底膜が減少しており、*GFR $\alpha$ 2-Fc* による肝芽の伸長阻害には基底膜の分布は関与しないことが明らかとなった。

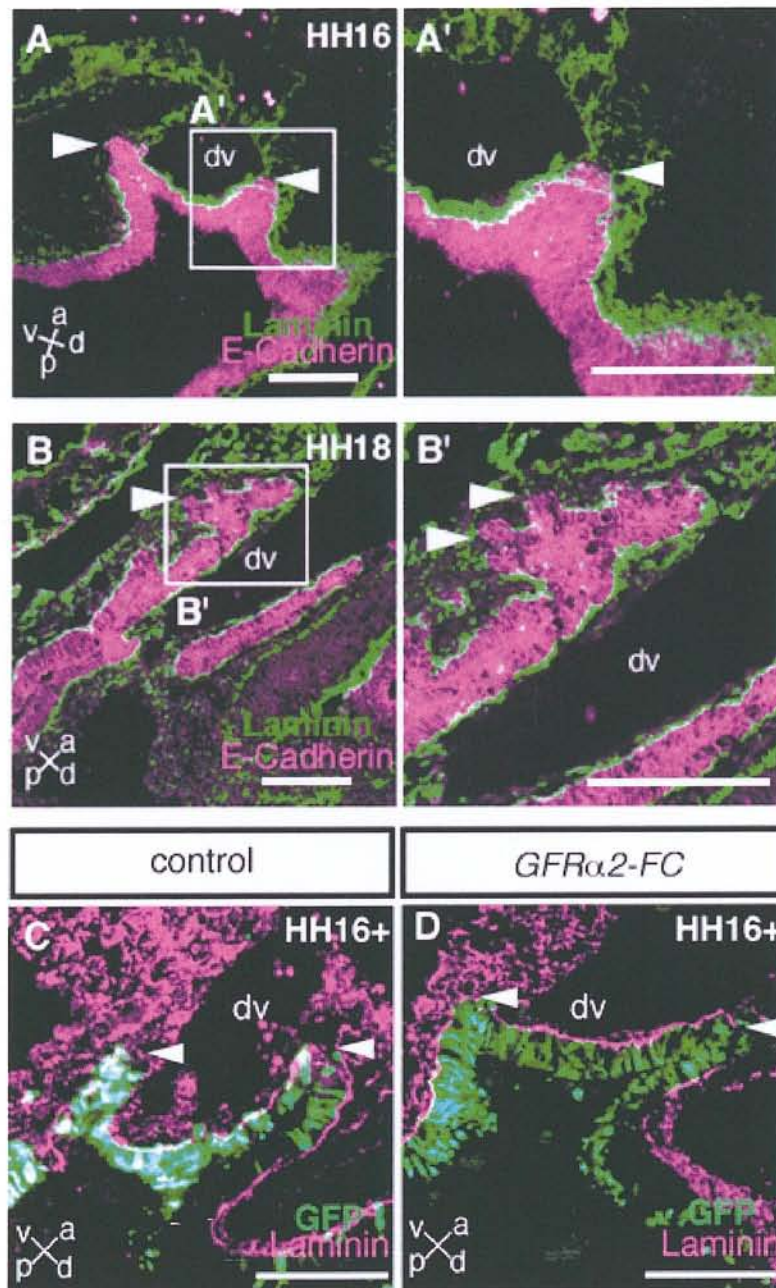
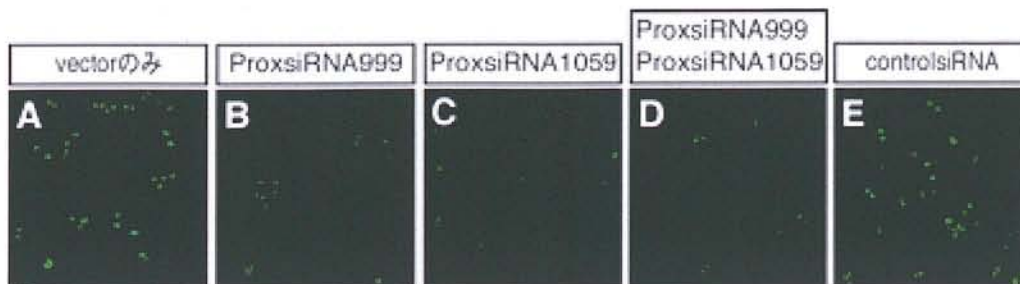


Fig.13 肝芽周囲の基底膜の分布

(A)は HH16 肝芽を (B)は HH18 肝芽の矢状切片を基底膜構成分子であるラミニンに対する抗体 (緑)と内胚葉マーカーである E-cadherin (マゼンタ) に対する抗体を用いてそれぞれ免疫組織化学染色したものを示している。(A', B')は図中枠を拡大表示したもの。(C)は *pCAGGS*、(D)は *pCAGGS-GFR $\alpha$ 2-Fc* 導入した肝芽の矢状切片を抗ラミニン抗体 (マゼンタ) と抗 GFP 抗体 (緑) を用いてそれぞれ免疫組織化学染色したものを示している。図中の矢頭はラミニンの減少部位を示す。図中の a, p, v, d はニワトリ胚の方向を示し、a は anterior、p は posterior、v は ventral、d は dorsal 方向をそれぞれ示している。略語: dv, ductus venosus (静脈管)。スケールバー、100 $\mu$ m。

## 7.12. *Prox1* と *GFRα2* との関係

これまでに、肝芽の伸長 / 移動を制御する唯一の遺伝子としてホメオボックス型転写調節因子 *Prox1* が報告されている (Sosa-Pineda et al., 2000)。*Prox1* は肝芽細胞で発現し、そのホモ欠損マウス胚では肝芽細胞の移動が著しく抑制され、肝臓が非常に縮小する。その作用機序は *Prox1* の欠損による肝芽周囲の基底膜蓄積と肝細胞の E-cadherin 発現増加であると考えられている。しかしながら *Prox1* によって直接制御される標的遺伝子群、下流遺伝子群は現在までに同定されていない。今回の NRTN、*GFRα2* の機能解析により肝芽で発現する *GFRα2* が肝芽の伸長 / 移動に関与していたことから、*Prox1* と *GFRα2* との間で関連性が推測された。そこで、*Prox1* に対する siRNA による RNA 干渉法を用いて、内在性 *Prox1* をノックダウンする事で *Prox1* と *GFRα2* の関連性を解析した。siRNA はインビトロジェン社の Stealth RNAi を用い、配列は推奨された 2 種類の配列 (siProx999、siProx1059) を使用した。ネガティブコントロールには同社が推奨する Stealth RNAi Negative Control Medium GC Duplex を用いた。まずこれら siRNA が *Prox1* をノックダウンできるか確認するために *Prox1* を *pEGFP-N1* ベクターにインサートしたコンストラクト (*pEGFP-N1-Prox1*) を作成し、COS7 細胞にトランスフェクションした。培養 24 時間後、細胞核に蛍光が確認できたことから、このコンストラクトは正常に機能する事が確認できた (Fig.14A)。次に *pEGFP-N1-Prox1* と前述の siRNA を同時にトランスフェクションし蛍光により siRNA の RNA 干渉能を検討した。培養 24 時間後、コントロール siRNA を共導入した細胞は *pEGFP-N1-Prox1* 単独導入細胞と同程度の蛍光が観察された (Fig.14E)。*Prox1* に対する siRNA を共導入した細胞では、2 種類のどちらの siRNA を導入した場合でも、蛍光はほとんど検出されなかった (Fig.14B, C)。また 2 種類を同時に導入した場合でも蛍光がほとんど観察されなかった (Fig.14D)。これらの結果から、2 種類の siRNA は共に *in vitro* の実験では *Prox1* を効率良くノックダウンできることが明らかになった。

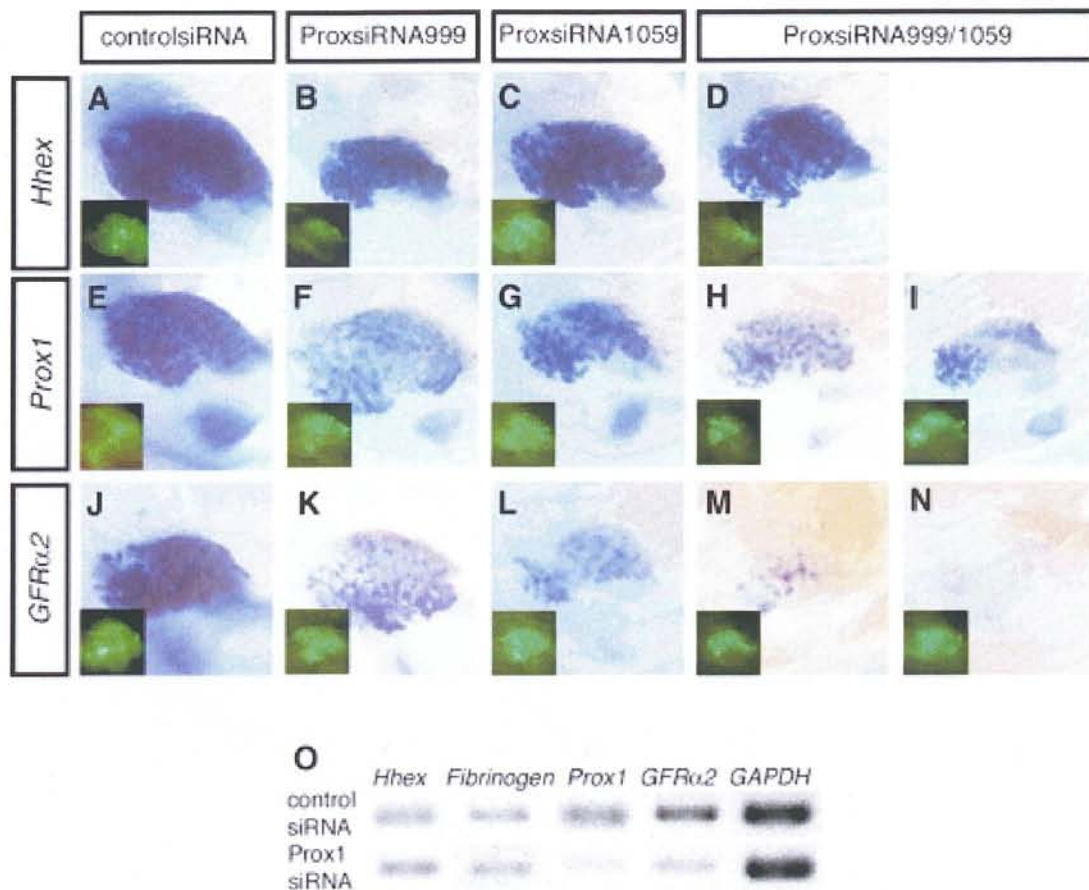


**Fig.14 Prox1siRNA の検証**

(A-E)は COS7 細胞に *pEGFP-N1-Prox1* を導入したものを示している。(B)は Prox1siRNA (siProx999)、(C)は Prox1siRNA (siProx1059)、(D)は Prox1siRNA (siProx999 / siProx1059)、(E)はコントロール siRNA (Stealth RNAi Negative Control Medium GC Duplex)を同時に共導入したものを示している。培養 24 時間後、*pEGFP-N1-Prox1* 由来の *EGFP-Prox1* 融合タンパクの蛍光を検出した。

次に HH12 の前腸内胚葉領域に siRNA を導入し、培養 48 時間後の HH22 において *Hhex*, *Prox1*, *GFRα2* に関して ISH を行い各遺伝子の発現観察を行った。*Prox1*siRNA 導入胚では *Hhex* 発現はコントロールと同様であったが、*Prox1* の発現は減少し、さらに *GFRα2* の発現もコントロールに比べて明らかに減少していた (Fig.15A-N)。2 種類の Prox1siRNA カクテル導入胚ではより顕著な *Prox1*, *GFRα2* 発現減少が見られた (Fig.15H, I, M, N)。さらに、Prox1siRNA カクテル導入胚肝臓とコントロール胚肝臓由来の cDNA を用いて半定量的 RT-PCR を行った。検出した遺伝子は、肝細胞マーカーである *Hhex*, *Fibrinogen*, *Prox1* および *GFRα2* と発現量の内部標準として用いた *GAPDH* である。その結果 RT-PCR においても Prox1siRNA 導入胚の肝臓における *Prox1*, *GFRα2* の発現量が減少していた (Fig.15O)。これらのことから、*in vivo* においても Prox1siRNA は内在性 *Prox1* をノックダウンできた。さらに *Prox1* 発現量の減少により *GFRα2* の発現も減少する事が明らかになった。この結果は *Prox1* 制御カスケード下流に *GFRα2* が存在することを示している。





**Fig.15** ニワトリ胚を用いた *Prox1* のノックダウン実験

(A, E, J)はコントロール siRNA (Stealth RNAi Negative Control Medium GC Duplex)、(B, F, K) は *Prox1* siRNA (siProx999)、(C, G, L) は *Prox1* siRNA (siProx1059)、(D, H-I, M-N)は *Prox1* siRNA (siProx999 / 1059)をそれぞれ HH12 の前腸内胚葉に導入し、HH22 まで培養したもの示している。導入領域の判定のため共導入した *pCAGGS-GFP* 由来の GFP 蛍光像をそれぞれの図の左下に示した(A-N)。(A-D)は *Hhex*、(E-I)は *Prox1*、(J-N)は *GFR $\alpha$ 2* に関する WM-ISH の結果を示している。(O)は siRNA 導入肝臓における RT-PCR の結果を示す。肝細胞マーカーの *Hhex*、*Fibrinogen*、*Prox1*、*GFR $\alpha$ 2* と内部標準マーカー *GAPDH* をそれぞれ示している。

## 8. 考察

肝臓発生は多くの発生過程から成り立ち、それらの過程の一つでも欠けてしまうと肝臓は正常に形成されない。マウス胚の肝臓発生では、前腸内胚葉から肝内胚葉への誘導後、肝芽の横中隔間充識への陥入、肝芽細胞の上皮間充織転換、細胞移動、増殖の過程が順序だっで行われる (Lemaigre and Zaret, 2004; Zhao and Duncan, 2005; Bort et al., 2006)。ニワトリ胚では肝内胚葉への誘導後、肝芽の横中隔間充識への陥入、そして肝芽の伸長/移動が起こる。この伸長/移動過程は2つのステップに分けられ、1つ目は静脈管に沿った前方向 (心臓側)への伸長、2つ目は側方向へ伸長であり、肝芽は最終的に静脈管を取り囲む (Romanoff, 1960)。

マウス胚、ニワトリ胚に共通して、肝芽細胞とその周囲の組織との相互作用が肝臓発生過程に重要であるが、各過程の肝芽に対する周囲組織からの相互作用を仲介する因子は現在までほとんど明らかにされていなかった。さらに、周囲組織との相互作用を行うためには肝芽の移動が特に重要な現象として考えられている (Zaret, 2002)。

今回、ニワトリ胚を用いた実験より、肝臓発生初期から GDNF ファミリーの受容体遺伝子群の一つである *GFR $\alpha$ 2* が肝芽細胞で発現し、そのリガンドである *NRTN* が静脈管で発現していることを見いだした。また静脈管からは肝芽の伸長を誘引する因子が分泌されていることをはじめて示した。さらに *NRTN* が *GFR $\alpha$ 2* を介して肝芽の伸長/移動を誘引することを *in vitro*, *in vivo* の実験系で証明した。最後に、肝芽移動を制御すると考えられている転写因子 *Prox1* (Sosa-Pineda et al., 2000) が *GFR $\alpha$ 2* の発現制御に関与することを発見した。以下にそれぞれの項目について考察を行なう。

**NRTN-GFR $\alpha$ 2** シグナル伝達経路は直接的に肝芽の伸長/移動を制御する。

*GFR $\alpha$ 2* の機能解析より、*GFR $\alpha$ 2-Fc* の強制発現は肝芽の静脈管に沿った伸長を抑制した (Fig.6B, G)。しかしながら、この伸長が抑制された肝芽において細胞増殖抑制や細胞死の増加は認められなかった (Fig.6H, I)。この発生段階の正常胚肝芽の細胞増殖を解析したところ、HH16-17 胚の肝芽は細胞増殖をほとんどしていなかった (Fig.6H)。さらにこの発生段階付近の肝芽における肝芽細胞の分布様式を細胞核染色によって検討したところ、陥入前の肝芽では肝芽細胞が非常に高密度に集積されていたのに対し、前方向移動時の肝芽では肝芽細胞は上皮構造を形成し一定の間隔をとって整列していた。これらのことから、肝芽伸長の初期段階は脊椎動物胚の原腸陥入時の細胞運動である **convergent extension** に類似した機構によって制御されている可能性が示唆された (Gerhart and Kellar, 1986)。

NRTN の機能解析実験より、*NRTN* の導入位置を変えることにより異なった表現型が得ら

れた。*NRTN* を予定肝内胚葉領域 (PHE)に導入した場合、肝芽による静脈管の取り囲みが抑制され (Fig.7E)、予定中腸内胚葉領域 (PME)に導入した場合、十二指腸領域における異所的な肝芽の形成が観察された (Fig.8F, H)。しかし *NRTN* には十二指腸を肝芽細胞に分化転換する能力はなかった (Fig.9)。さらに肝芽とビーズの共培養実験では、肝芽は *NRTN* ビーズに向かって伸長した (Fig.11, Fig.12)。これらの実験結果を総合的に考察すると、肝芽の静脈管上の伸長／移動現象は *NRTN*-*GFRα2* シグナル伝達経路によって直接的に制御されていることが証明された。

#### ***NRTN*-*GFRα2* シグナル伝達経路は *Ret* 非依存的経路である。**

通常 *GFLs*-*GFRαs* 複合体は細胞内にシグナルを伝達するために *Ret* チロシンキナーゼを必要とする (Sariola and Saarma., 2003)。しかしニワトリ胚肝芽または肝臓において *Ret* の発現はまったく検出されなかった。マウス胚においても肝臓発生を通じて *Ret* は発現していないという報告があり (Golden et al., 1999)、これらのことから、肝臓発生における *NRTN*-*GFRα2* シグナル伝達は *Ret* 非依存的な経路を介して行われていることが推測される。近年、神経細胞において *GDNF*-*GFRα1* 複合体が *N-CAM* と結合し細胞内にシグナルを伝達することが示された (Paratcha et al., 2003)。さらに、*HGF* レセプターであるチロシンキナーゼ *Met* も *GFL*-*GFRα* 複合体のレセプター候補とされている (Popsueva et al., 2003)。しかし *N-CAM* や *Met* の *WM-ISH* を行ったが、それらはニワトリ胚肝芽で発現していなかった (data not shown)。これらのことから、肝臓発生における *NRTN*-*GFRα2* 複合体は未知のシグナル伝達経路を介して細胞内にシグナルを伝達している可能性が高い。今後そのようなシグナル伝達因子の同定と機能解析が必要である。

#### ***NRTN* の効果は距離に依存する**

*NRTN* ビーズと肝芽との共培養実験において、*NRTN* 濃度を固定し (50 ng / ml)、ビーズと肝芽の距離を変えて培養した場合、肝芽とビーズ間の距離が 40-80 μm の範囲では肝芽のビーズへの伸長が観察されたが、それ以上距離を離すと肝芽は *NRTN* に反応しなかった。同様の現象は、*in vivo* における *NRTN* 異所発現実験でも観察された (Fig.8H)。*NRTN* 強制発現による異所的肝芽形成は、*NRTN* を肝芽隣接領域に発現させたときのみ観察され、*NRTN* 強制発現部位が肝芽から離れると異所的な肝芽形成は誘導されなかった。これらの結果から、*NRTN* を分泌する静脈管の血管内皮細胞と *GFRα2* を発現する肝芽との距離が肝芽の伸長／移動範囲の決定に重要であることが示唆された。肺芽と *FGF* ビーズの共培養実験では 150 μm の距離で肺芽は *FGF* に反応するという報告がある (Weaver et al., 2000)。このことは、*NRTN* は *FGF* よりも作用範囲が狭いことを示している。

NRTN ビーズと肝芽との共培養実験において、肝芽とビーズ間の距離を 40-60  $\mu\text{m}$  に設定しビーズに染み込ませる NRTN 濃度を 1, 25, 50, 100 ng/ml と変えて共培養した場合、NRTN 濃度が 50 ng/ml 以上の場合にのみ肝芽の伸長が観察された。この結果より、肝芽は NRTN の高濃度領域に対してのみ伸長/移動する可能性が示唆された。では NRTN の胚組織内における濃度制御にはどのような分子が関与しているのだろうか。GFLs は細胞外基質であるヘパラン硫酸と結合し、また GFLs-GFR $\alpha$  の複合体の活性化にもヘパラン硫酸が重要であることが報告されている (Hamilton et al., 2001; Rickard et al., 2003; Ai et al., 2007)。ヘパラン硫酸は FGF をはじめとする様々なモルフォゲンの濃度勾配制御に関与している。従って、NRTN の組織内における濃度制御もまたヘパラン硫酸を介して行われている可能性が考えられる。

### 肝芽の移動方向の決定

発現パターン解析より NRTN と GFR $\alpha$ 2 は静脈管全体の血管内皮細胞と肝芽細胞全体でそれぞれ発現し、*in vitro* 共培養実験では肝芽のすべての部位は NRTN への反応能を有することが明らかになった (Fig.12)。しかし正常発生において肝芽は静脈管全体を包み込むように伸長するのではなく、異なった方向性を有した二段階の伸長/移動過程 (HH15-HH17 の前方向伸長過程と HH17-HH21 の側方伸長過程) をたどる。従って他の因子が肝芽の伸長方向制御を行っている可能性が考えられた。マウス胚における肝芽の移動制御では、肝芽の基底膜分布が関連していると考えられており、この基底膜が肝芽の移動方向決定因子の候補として考えられる (Sosa-Pineda et al., 2000)。今回、基底膜の分布を調べた結果、肝芽のほとんどの部位は基底膜に取り囲まれていたのに対し、肝芽の移動方向先端部 (HH16 では肝芽の前方先端部で、HH18 では側方先端部) で基底膜が減少していた (Fig.13A, B)。しかしながら、この基底膜の分布は GFR $\alpha$ 2-Fc で伸長抑制された肝芽でも正常胚と変わらなかった (Fig.13C, D)。このことから、NRTN-GFR $\alpha$ 2 シグナルは基底膜の分布に影響しないことが分かった。

これらの結果を総合的に考察すると、ニワトリ胚肝芽において基底膜の分布が肝芽伸長/移動方向の決定因子である可能性が示唆された。今後、基底膜の分布を制御する機構や肝芽の移動を制御する未知の分子の探索が肝芽の移動方向の決定機構の深い理解にとって重要である。

### Prox1 と GFR $\alpha$ 2 の関連性について

Prox1 はマウス胚において肝芽細胞の移動制御に関与する転写調節因子として知られていたが、その直接的な標的遺伝子および下流遺伝子は現在まで明らかにされていない



(Sosa-Pineda et al., 2000)。今回 *Prox1* siRNA を用いてニワトリ胚において内在性 *Prox1* をノックダウンしたところ、*GFRα2* の発現減少が観察された (Fig.15M, N, O)。この結果から、*GFRα2* は *Prox1* の標的遺伝子または *Prox1* カスケードの下流に位置する可能性が考えられた。*GFRα2* と *Prox1* の発現時期を比較してみると *GFRα2* は HH11 から発現しはじめるのに対し、*Prox1* の発現は HH13-14 以降である (Yanai et al., 2005)。このことから、*Prox1* は *GFRα2* の発現維持に必要であり、*GFRα2* の発現誘導には関与していないと推測される。また *Prox1* siRNA 導入胚の表現型は *GFRα2-Fc* 強制発現胚の表現型とやや異なり、肝上皮表面が荒く乱れていた (Fig.15B-D)。これらのことから *Prox1* は *GFRα2* だけではなく他の様々な肝芽細胞の形態形成に関連した遺伝子群を調節し、肝臓形成を制御していると思われる。

#### ニワトリ胚の肝臓発生モデル

本研究結果より、HH12-HH22 を通して、*NRTN* は静脈管全体の血管内皮細胞で発現し、*NRTN* の特異的なレセプターである *GFRα2* はすべての肝芽細胞で発現している事が明らかになった。さらに *in vivo*、*in vitro* における機能解析より、*NRTN* が肝芽の伸長/移動において誘引的作用を持っていることが示された。また基底膜の部分的な減少が肝芽の移動方向と関連していること、転写制御因子 *Prox1* が *GFRα2* 発現を調節していることが明らかとなった。

これらの結果を総合し、ニワトリ胚肝臓発生の形態形成における新しいモデルを提案する (Fig.16)。*NRTN* は HH12-HH14 では卵黄静脈で HH15 以降では静脈管内皮で発現する。一方 *GFRα2* は HH12-22 において肝内胚葉で発現する。HH15-HH17 では、2本の肝芽が横中隔間充織に突出し、その後静脈管に沿って前方向へ伸長する。この伸長は静脈管で発現する *NRTN* によって誘引される。*Prox1* の発現は HH14 以降に認められるため、*Prox1* はこの時期から *GFRα2* の発現維持に関連する (Fig.16 上段右)。HH17-HH19 の時期では肝芽は静脈管を側方向に伸長するが、この伸長もまた静脈管で発現する *NRTN* によって誘引される (Fig.16 下段左)。HH19-HH21 では2本の肝芽は静脈管を取り囲み (Fig.16 下段中)、最終的に HH22 で見られるような静脈管が肝芽細胞によって完全に取り囲まれた円筒状の肝原基が形成される (Fig.16 下段右)。肝芽の伸長方向の制御には肝芽の伸長方向先端部における基底膜の減少が関与する可能性が高い (Fig.16 緑線の破断部分)。

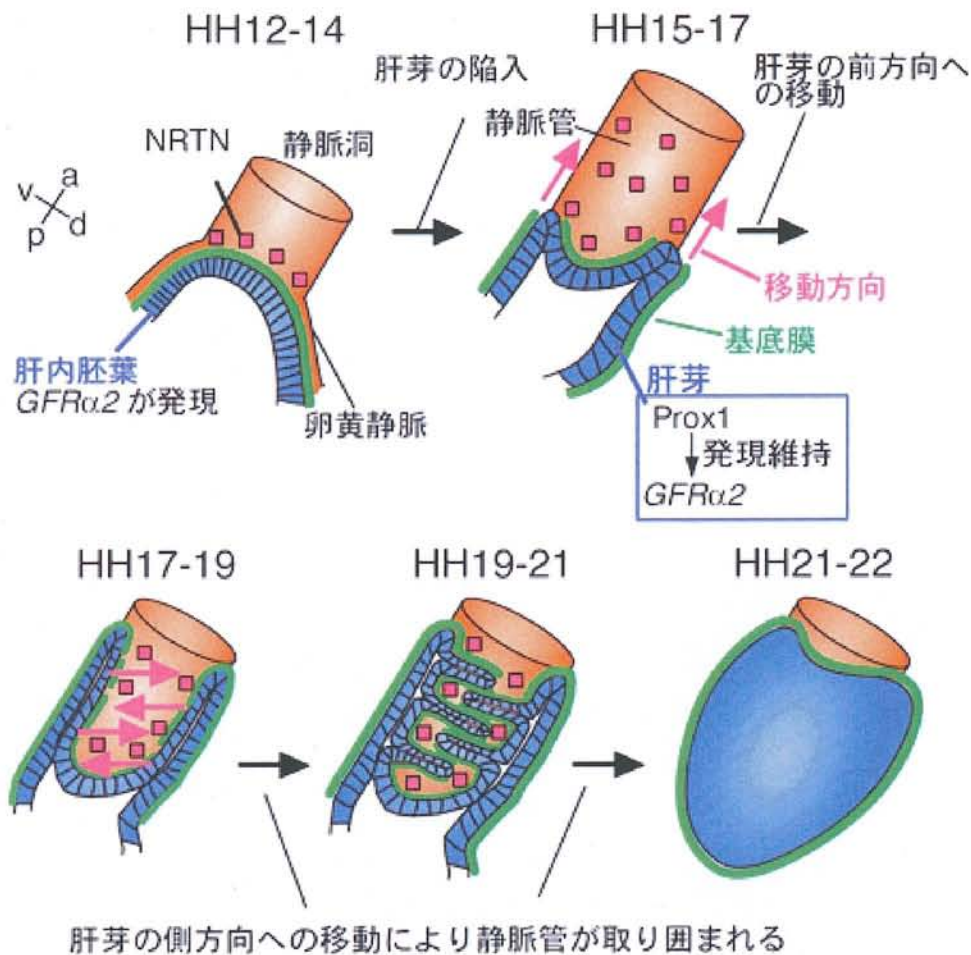


Fig.16 ニワトリ胚肝臓発生における肝芽形態形成モデル

本図は本研究の解析結果を取り入れた HH12-22 間におけるニワトリ胚の肝臓発生過程を示す。*GFRα2* が発現している肝内胚葉 (HH12-14) または *GFRα2* と *Prox1* が発現している肝芽細胞 (HH15-22) を青色で示している。各発生段階における赤四角は血管内皮細胞から分泌される *NRTN* を示している。各発生段階の肝芽を取り巻く緑線は基底膜を示している。矢印 (赤) は肝芽の移動方向を示している。図中の a, p, v, d はニワトリ胚の方向を示し、a は anterior、p は posterior、v は ventral、d は dorsal 方向をそれぞれ示している。

マウス胚の肝芽移動に *NRTN-GFRα2* シグナルは関係するのか？

本研究で *NRTN-GFRα2* シグナル伝達経路によるニワトリ胚の肝芽の伸長／移動誘引機構が明らかとなった。同様なメカニズムがマウス胚でも保存されている可能性が考えられた。すでに *GFRα2* および *NRTN* のノックアウトマウスが作成されているが、肝臓は正常であったと報告されている (Rossi et al., 1999; Heuckeroth et al., 1999)。このことからマウスの *GFRα2* や *NRTN* は肝芽の伸長／移動制御に関わっていない可能性が考えられた。この点を考察する上で、ニワトリ胚とマウス胚の肝臓発生様式の違いを明らかにする必要がある。

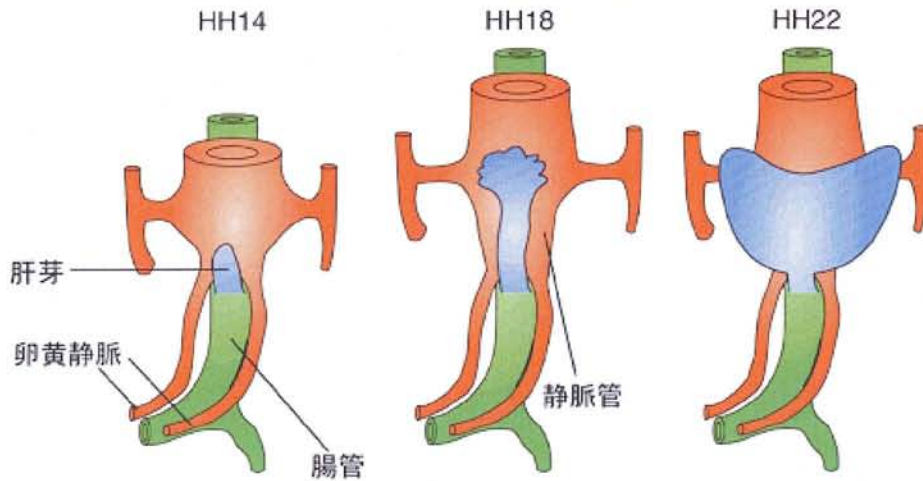
ニワトリ胚の場合、前腸内胚葉から生じた肝芽は静脈管に沿って伸長し、最終的に静脈管を取り囲むことで肝臓原基が形成される (Fig.17 上段) (Romanoff, 1960)。一方マウス胚の場合、前腸の腹側内胚葉から生じた肝芽は横中隔間充織に突出し、その直後に肝芽から肝芽細胞の横中隔間充織への移動が開始される。移動した肝芽は横中隔間充織と相互作用した結果活発な増殖を行い、それに伴って肝芽細胞が卵黄静脈を肝臓内に取り込む。発生が進むにつれこの卵黄静脈が肝臓内で再構成され静脈管になる (Fig.17 下段) (Zaret, 1996; Kaufman and Bard, 1999)。それぞれの静脈管の形成時期を比較すると明らかなように、マウス胚では静脈管は肝芽移動後に形成されるのでニワトリ胚で見られるような静脈管に沿った肝芽の移動は行われない。この事実はマウス胚では *NRTN-GFR $\alpha$ 2* シグナル経路が肝芽の移動に関連しないことが示唆される。

さらに、マウス胚における *NRTN* や *GFR $\alpha$ 2* は肝芽の移動が顕著に認められる 9.0 日胚から 10.5 日胚の時期では発現せず、*NRTN* の場合 12 日胚以降、*GFR $\alpha$ 2* の場合 16 日胚以降に発現するという報告がある (Golden et al., 1999)。本報告を再検証するためにマウス 9.5 日胚、12.5、14.5 日胚の肝芽細胞における RT-PCR を行った結果 *GFR $\alpha$ 2* の発現は 12.5 日胚以降に認められた (Fig.18A, B)。この結果は *GFR $\alpha$ 2* がマウス胚の肝芽移動時に発現していないことを示しており、マウス胚において *NRTN-GFR $\alpha$ 2* シグナル経路は肝芽細胞の移動に関連していないことを支持する。

マウス胚の肝臓発生において肝芽に隣接する血管内皮細胞が肝芽細胞の横中隔への移動に必須であることから (Matsumoto et al., 2001)、ニワトリ胚の場合とは異なった肝芽の移動を誘引する因子が他に存在している事が推測される。マウス胚における肝芽移動関連因子の探索が今後必要であると考えられる。

ではマウス胚で肝芽の移動後に発現が認められる *NRTN*、*GFR $\alpha$ 2* はどのような役割を担っているのだろうか。*NRTN* は 16 日胚マウス胚の類洞内皮で発現することが報告されている (Golden et al., 1999)。またマウス胚において *NRTN* と *GFR $\alpha$ 2* の発現は 12.5 日胚で認められる (Golden et al., 1999, *GFR $\alpha$ 2* の発現については Fig.18 PCR 結果より) から、マウス胚における *NRTN*、*GFR $\alpha$ 2* の機能は類洞内皮細胞と肝細胞との相互作用に関わる可能性が考えられた。またニワトリ胚類洞構造が確認できるニワトリ 7 日胚の肝臓を用いて *NRTN* と *GFR $\alpha$ 2* の発現を確認したところ、*NRTN* と *GFR $\alpha$ 2* は 類洞血管内皮細胞と肝細胞でそれぞれ発現していた (Fig.19A-D)。これらの事から、マウス胚、ニワトリ胚の肝臓発生における *NRTN-GFR $\alpha$ 2* シグナル経路は肝芽移動が終了後において、類洞内皮と肝細胞の相互作用に関わる可能性が残されている。今後肝臓発生後期における *NRTN-GFR $\alpha$ 2* 経路の解析が望まれる。

### ニワトリの肝臓発生図



### マウスの肝臓発生図

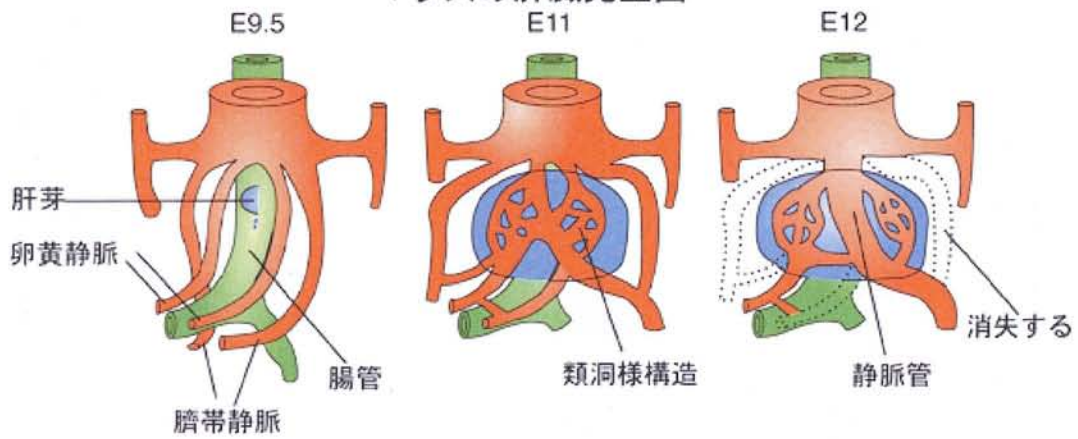
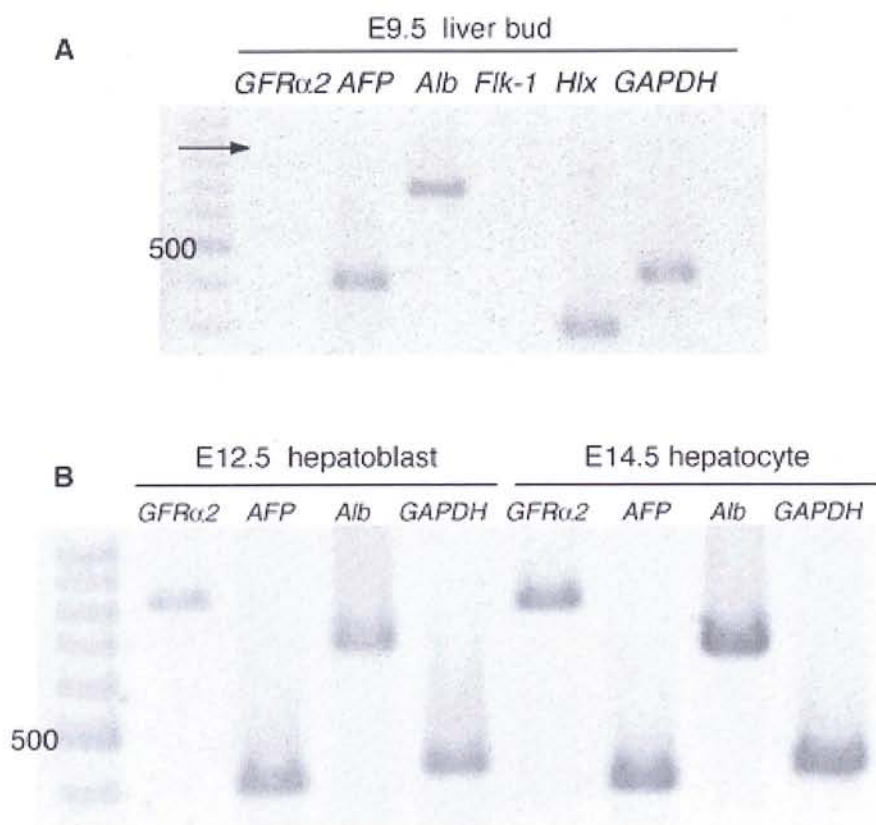


Fig.17 ニワトリ、マウスの静脈管に注目した肝臓発生図

図はニワトリ胚の肝臓発生 (上段)、マウスの肝臓発生 (下段)をそれぞれ示している。ニワトリ胚では肝発生初期より静脈管が認められるが、マウス胚では静脈管は肝臓形成後卵黄静脈がリモデリングして形成される。



**Fig.18** マウス肝臓発生の各発生段階における **GFR $\alpha$ 2** の発現解析

(A) 9.5日胚 (E9.5), (B) 12.5日胚 (E12.5), 14.5日胚 (E14.5)のマウス胚肝芽細胞の各遺伝子のRT-PCRの結果を示す。肝細胞マーカーとして*AFP*, *Alb*, 内部標準マーカーとして*GAPDH*をそれぞれ用いた。9.5日胚の場合にのみ血管内皮細胞マーカーである*Flk-1*と横中隔間充織マーカーである*Hlx*を検出した。各泳動写真の最左レーンは100bpの遺伝子マーカー。(A)の矢印は*GFR $\alpha$ 2*が増幅された場合の位置を示している。



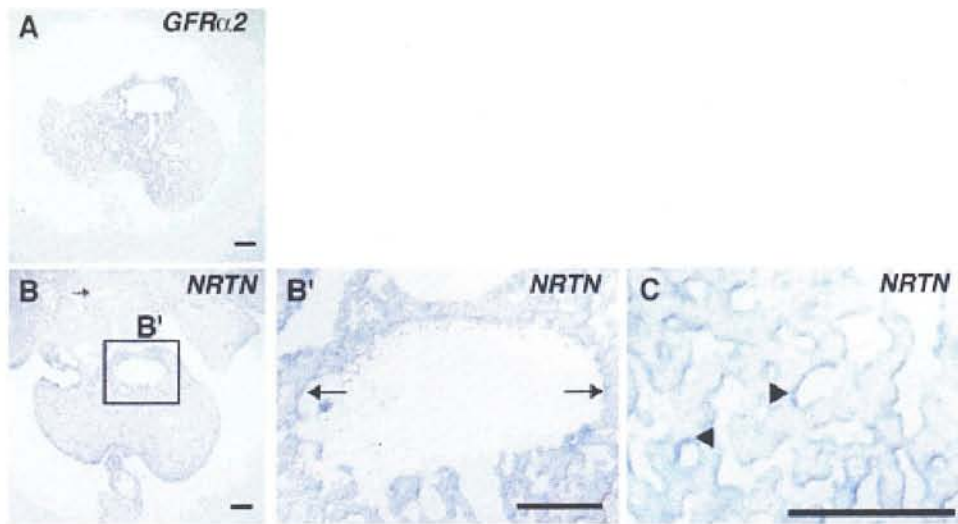


Fig.19 ニワトリ 7日胚肝臓における *NRTN* と *GFRα2* の発現解析

(A-C)はニワトリ7日胚の肝臓のISH。(A)は*GFRα2*, (B-C)は*NRTN*の発現パターンをそれぞれ示している。矢印は静脈管血管内皮細胞における*NRTN*の発現を、矢頭は類同血管内皮細胞における*NRTN*の発現をそれぞれ示している。スケールバー、100 μm。

#### 進化的な観点から見たニワトリ、マウスの肝臓発生

すでにFig.17でニワトリとマウス間にみられる肝臓発生の違いについて述べたが、種間によるこれら発生様式の違いは卵生と胎生の発生様式の違いに起因するかもしれない。その理由としては、卵生であるニワトリ以外の鳥類および爬虫類においても肝芽形成に先立って静脈管が形成されること、マウス以外のヒトなどの哺乳類では、皆同様に肝形成後に肝内血管のリモデリングによって静脈管が形成されることが知られているからである(Alfred and Thomas, 1977; Rouiller, 1963)。卵生と胎生の発生様式の違いが、両者に共通した祖先的様式から、静脈管依存性の肝臓発生様式(ニワトリ胚式)と静脈管非依存性の肝臓発生様式(マウス胚式)への進化を促したのかもしれない。

卵生であるニワトリ胚の場合、卵黄静脈を經由した血液と栄養を胚に運搬するため、卵黄静脈の集合管である静脈管が肝臓発生に先立って発生初期から形成されるのだろう。その後肝臓は静脈管を足場として初期形態形成を行うと考えられる(Romanoff, 1960)。一方、胎生であるマウス胚の場合、栄養は臍帯静脈を經由して供給されるため、静脈管は発生初期から形成される必要が無い(Kaufman and Bard, 1999)。

これらの事から、ニワトリ胚肝臓発生における*NRTN*-*GFRα2*経路の利用はニワトリ胚において肝芽が静脈管を確実に取り囲むためにその進化過程で獲得されたものと推測され、また静脈管が後から肝発生後に形成されるマウス胚ではこの経路は必要とされていないと考えられた。

## 9. 結語

本研究では、ニワトリ胚肝臓の形態形成過程において、肝芽の伸長／移動が静脈管内皮細胞から分泌される誘引物質 NRTN によって制御されている事をはじめて明らかにした。肝芽または肝芽細胞の伸長／移動が誘引物質によって制御されているという事象は現在までに報告がなく、肝臓発生における組織形成過程を理解する上で非常に重要な研究結果である。また、このような肝芽細胞の伸長／移動誘引物質の同定は 将来期待される肝臓の試験管内における三次元構築法の確立に必須であり、今後同様な機能を持つ因子群の探索が重要な研究テーマとなることが予想される。そして、さらに研究を進展させるために NRTN-GFR $\alpha$ 2 経路の細胞内伝達に関連する受容体の同定も必要であると考えられる。

GFR $\alpha$ 2 は肝細胞だけでなく背側腭臓でも発現が認められた。腭臓は腹側、背側の 2 カ所から腭芽が現れ、発生進行に伴って腭芽が移動、融合し 1 つの腭臓を形成することが知られている。このことから、NRTN-GFR $\alpha$ 2 経路が腭臓発生においても腭芽移動に関連している可能性が考えられる。また、今回 GFR $\alpha$ 2 の発現制御を行う事が明らかになった *Prox1* も腭臓に発現する事から腭臓においても *Prox1* と GFR $\alpha$ 2 の関連性が期待される (Bruke et al., 2002)。

今後、本研究をもとにさらに肝臓発生が理解されていく事を期待する。

## 10. 参考文献

- Ai, X., Kitazawa, T., Do, A. T., Kusche-Gullberg, M., Labosky, P. A., and Emerson, C. P., Jr. (2007). SULF1 and SULF2 regulate heparan sulfate-mediated GDNF signaling for esophageal innervation. *Development* **134**, 3327-3338.
- Airaksinen, M. S., Titievsky, A., and Saarma, M. (1999). GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant? *Mol Cell Neurosci* **13**, 313-325.
- Alfred, S. R., and Thomas, S. P. (1977). The vertebrate body fifth edition. *W.B.Saunders Company*.
- Baloh, R. H., Tansey, M. G., Lampe, P. A., Fahrner, T. J., Enomoto, H., Simburger, K. S., Leitner, M. L., Araki, T., Johnson, E. M., Jr., and Milbrandt, J. (1998). Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFRalpha3-RET receptor complex. *Neuron* **21**, 1291-1302.
- Baloh, R. H., Enomoto, H., Johnson, E. M., Jr., and Milbrandt, J. (2000). The GDNF family ligands and receptors - implications for neural development. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 103-110.
- Bellairs, R., and Osmond, M. (2005). The atlas of chick development. second edition *New York: Academic Press*.
- Bort, R., Signore, M., Tremblay, K., Martinez Barbera, J. P., and Zaret, K. S. (2006). Hex homeobox gene controls the transition of the endoderm to a pseudostratified, cell emergent epithelium for liver bud development. *Dev Biol* **290**, 44-56.
- Burke, Z., and Oliver, G. (2002). Prox1 is an early specific marker for the developing liver and pancreas in the mammalian foregut endoderm. *Mech Dev* **118**, 147-155.
- Cascio, S., and Zaret, K. S. (1991). Hepatocyte differentiation initiates during endodermal-mesenchymal interactions prior to liver formation. *Development* **113**, 217-225.
- Chinzei, R., Tanaka, Y., Shimizu-Saito, K., Hara, Y., Kakinuma, S., Watanabe, M., Teramoto, K., Arai, S., Takase, K., Sato, C., Terada, N., and Teraoka, H. (2002). Embryoid-body cells derived from a mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional hepatocytes. *Hepatology* **36**, 22-29.
- Enomoto, H., Crawford, P. A., Gorodinsky, A., Heuckeroth, R. O., Johnson, E. M., Jr., and Milbrandt, J. (2001). RET signaling is essential for migration, axonal growth and axon guidance of developing sympathetic neurons. *Development* **128**, 3963-3974.
- Flamme, I. (1987). Prolonged and simplified in vitro culture of explanted chick embryos. *Anat Embryol (Berl)* **176**, 45-52.
- Gerhart, J., and Keller, R. (1986). Region-specific cell activities in amphibian gastrulation. *Annu Rev Cell Biol* **2**, 201-229.



- Golden, J. P., DeMaro, J. A., Osborne, P. A., Milbrandt, J., and Johnson, E. M., Jr. (1999). Expression of neurturin, GDNF, and GDNF family-receptor mRNA in the developing and mature mouse. *Exp Neurol* **158**, 504-528.
- Gualdi, R., Bossard, P., Zheng, M., Hamada, Y., Coleman, J. R., and Zaret, K. S. (1996). Hepatic specification of the gut endoderm in vitro: cell signaling and transcriptional control. *Genes Dev* **10**, 1670-1682.
- Hamburger, V., and Hamilton, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* **88**, 49-92.
- Hamilton, J. F., Morrison, P. F., Chen, M. Y., Harvey-White, J., Pernaute, R. S., Phillips, H., Oldfield, E., and Bankiewicz, K. S. (2001). Heparin coinfusion during convection-enhanced delivery (CED) increases the distribution of the glial-derived neurotrophic factor (GDNF) ligand family in rat striatum and enhances the pharmacological activity of neurturin. *Exp Neurol* **168**, 155-161.
- Hentsch, B., Lyons, I., Li, R., Hartley, L., Lints, T. J., Adams, J. M., and Harvey, R. P. (1996). Hlx homeo box gene is essential for an inductive tissue interaction that drives expansion of embryonic liver and gut. *Genes Dev* **10**, 70-79.
- Heuckeroth, R. O., Enomoto, H., Grider, J. R., Golden, J. P., Hanke, J. A., Jackman, A., Molliver, D. C., Bardgett, M. E., Snider, W. D., Johnson, E. M., Jr., and Milbrandt, J. (1999). Gene targeting reveals a critical role for neurturin in the development and maintenance of enteric, sensory, and parasympathetic neurons. *Neuron* **22**, 253-263.
- Homma, S., Oppenheim, R. W., Yaginuma, H., and Kimura, S. (2000). Expression pattern of GDNF, c-ret, and GFRalphas suggests novel roles for GDNF ligands during early organogenesis in the chick embryo. *Dev Biol* **217**, 121-137.
- Houssaint, E. (1980). Differentiation of the mouse hepatic primordium. I. An analysis of tissue interactions in hepatocyte differentiation. *Cell Differ* **9**, 269-279.
- Hussain, S. Z., Sneddon, T., Tan, X., Micsenyi, A., Michalopoulos, G. K., and Monga, S. P. (2004). Wnt impacts growth and differentiation in ex vivo liver development. *Exp Cell Res* **292**, 157-169.
- Ishii, T., Yasuchika, K., Fujii, H., Hoppo, T., Baba, S., Naito, M., Machimoto, T., Kamo, N., Suemori, H., Nakatsuji, N., and Ikai, I. (2005). In vitro differentiation and maturation of mouse embryonic stem cells into hepatocytes. *Exp Cell Res* **309**, 68-77.
- Jung, J., Zheng, M., Goldfarb, M., and Zaret, K. S. (1999). Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* **284**, 1998-2003.
- Kaufman, H. M., and Bard, B. L. J. (1999). *The Anatomical Basis of Mouse Development*. Academic Press, San Diego, CA.

- Klein, R. D., Sherman, D., Ho, W. H., Stone, D., Bennett, G. L., Moffat, B., Vandlen, R., Simmons, L., Gu, Q., Hongo, J. A., Devaux, B., Poulsen, K., Armanini, M., Nozaki, C., Asai, N., Goddard, A., Phillips, H., Henderson, C. E., Takahashi, M., and Rosenthal, A. (1997). A GPI-linked protein that interacts with Ret to form a candidate neurturin receptor. *Nature* **387**, 717-721.
- Kotzbauer, P. T., Lampe, P. A., Heuckeroth, R. O., Golden, J. P., Creedon, D. J., Johnson, E. M., Jr., and Milbrandt, J. (1996). Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor. *Nature* **384**, 467-470.
- LaRochelle, W. J., Dirsch, O. R., Finch, P. W., Cheon, H. G., May, M., Marchese, C., Pierce, J. H., and Aaronson, S. A. (1995). Specific receptor detection by a functional keratinocyte growth factor-immunoglobulin chimera. *J Cell Biol* **129**, 357-366.
- Le Douarin, N. M. (1975). An experimental analysis of liver development. *Med Biol* **53**, 427-455.
- Ledda, F., Paratcha, G., and Ibanez, C. F. (2002). Target-derived GFRalpha1 as an attractive guidance signal for developing sensory and sympathetic axons via activation of Cdk5. *Neuron* **36**, 387-401.
- Lemaigre, F., and Zaret, K. S. (2004). Liver development update: new embryo models, cell lineage control, and morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev* **14**, 582-590.
- Lin, L. F., Doherty, D. H., Lile, J. D., Bektesh, S., and Collins, F. (1993). GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* **260**, 1130-1132.
- Martinez Barbera, J. P., Clements, M., Thomas, P., Rodriguez, T., Meloy, D., Kioussis, D., and Beddington, R. S. (2000). The homeobox gene Hex is required in definitive endodermal tissues for normal forebrain, liver and thyroid formation. *Development* **127**, 2433-2445.
- Matsumoto, K., Yoshitomi, H., Rossant, J., and Zaret, K. S. (2001). Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function. *Science* **294**, 559-563.
- Matsushita, S. (1999). Fate mapping study of the endoderm in the posterior part of the 1.5-day-old chick embryo. *Dev Growth Differ* **41**, 313-319.
- Meng, X., Lindahl, M., Hyvonen, M. E., Parvinen, M., de Rooij, D. G., Hess, M. W., Raatikainen-Ahokas, A., Sainio, K., Rauvala, H., Lakso, M., Pichel, J. G., Westphal, H., Saarma, M., and Sariola, H. (2000). Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science* **287**, 1489-1493.
- Mikaels-Edman, A., Baudet, C., and Ernfors, P. (2003). Soluble and bound forms of GFRalpha1 elicit different GDNF-independent neurite growth responses in primary sensory neurons. *Dev Dyn* **227**, 27-34.
- Milbrandt, J., de Sauvage, F. J., Fahrner, T. J., Baloh, R. H., Leitner, M. L., Tansey, M. G., Lampe, P. A., Heuckeroth, R. O., Kotzbauer, P. T., Simburger, K. S., Golden, J. P., Davies, J. A., Vejsada, R., Kato, A. C., Hynes, M., Sherman, D., Nishimura, M., Wang, L. C., Vandlen, R., Moffat, B., Klein, R. D.,

- Poulsen, K., Gray, C., Garces, A., Johnson, E. M., Jr., and et al. (1998). Persephin, a novel neurotrophic factor related to GDNF and neurturin. *Neuron* **20**, 245-253.
- Nakamura, H., and Funahashi, J. (2001). Introduction of DNA into chick embryos by in ovo electroporation. *Methods* **24**, 43-48.
- Nakayama, M., Matsumoto, K., Tatsumi, N., Yanai, M., and Yokouchi, Y. (2006). Id3 is important for proliferation and differentiation of the hepatoblasts during the chick liver development. *Mech Dev* **123**, 580-590.
- Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* **108**, 193-199.
- Nogawa, H., and Ito, T. (1995). Branching morphogenesis of embryonic mouse lung epithelium in mesenchyme-free culture. *Development* **121**, 1015-1022.
- Paratcha, G., Ledda, F., and Ibanez, C. F. (2003). The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell* **113**, 867-879.
- Popsueva, A., Poteryaev, D., Arighi, E., Meng, X., Angers-Loustau, A., Kaplan, D., Saarma, M., and Sariola, H. (2003). GDNF promotes tubulogenesis of GFRalpha1-expressing MDCK cells by Src-mediated phosphorylation of Met receptor tyrosine kinase. *J Cell Biol* **161**, 119-129.
- Rickard, S. M., Mummery, R. S., Mulloy, B., and Rider, C. C. (2003). The binding of human glial cell line-derived neurotrophic factor to heparin and heparan sulfate: importance of 2-O-sulfate groups and effect on its interaction with its receptor, GFRalpha1. *Glycobiology* **13**, 419-426.
- Riddle, R. D., Johnson, R. L., Laufer, E., and Tabin, C. (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* **75**, 1401-1416.
- Romanoff, A. L. (1960). The Avian Embryo: Structural and Functional Development. *The Macmillan Company: New York*.
- Rossi, J., Luukko, K., Poteryaev, D., Laurikainen, A., Sun, Y. F., Laakso, T., Eerikainen, S., Tuominen, R., Lakso, M., Rauvala, H., Arumae, U., Pasternack, M., Saarma, M., and Airaksinen, M. S. (1999). Retarded growth and deficits in the enteric and parasympathetic nervous system in mice lacking GFR alpha2, a functional neurturin receptor. *Neuron* **22**, 243-252.
- Rossi, J. M., Dunn, N. R., Hogan, B. L., and Zaret, K. S. (2001). Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev* **15**, 1998-2009.
- Rouiller, C. (1963). The Liver. *Academic Press, New York and London*.
- Sariola, H., and Saarma, M. (2003). Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J Cell Sci* **116**, 3855-3862.

- Schedl, A., and Hastie, N. D. (2000). Cross-talk in kidney development. *Curr Opin Genet Dev* **10**, 543-549.
- Schmidt, C., Bladt, F., Goedecke, S., Brinkmann, V., Zschiesche, W., Sharpe, M., Gherardi, E., and Birchmeier, C. (1995). Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* **373**, 699-702.
- Schwartz, R. E., Reyes, M., Koodie, L., Jiang, Y., Blackstad, M., Lund, T., Lenvik, T., Johnson, S., Hu, W. S., and Verfaillie, C. M. (2002). Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* **109**, 1291-1302.
- Shiojiri, N., and Sugiyama, Y. (2004). Immunolocalization of extracellular matrix components and integrins during mouse liver development. *Hepatology* **40**, 346-355.
- Sosa-Pineda, B., Wigle, J. T., and Oliver, G. (2000). Hepatocyte migration during liver development requires Prox1. *Nat Genet* **25**, 254-255.
- Suksaweang, S., Lin, C. M., Jiang, T. X., Hughes, M. W., Widelitz, R. B., and Chuong, C. M. (2004). Morphogenesis of chicken liver: identification of localized growth zones and the role of beta-catenin/Wnt in size regulation. *Dev Biol* **266**, 109-122.
- Tang, M. J., Worley, D., Sanicola, M., and Dressler, G. R. (1998). The RET-glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) pathway stimulates migration and chemoattraction of epithelial cells. *J Cell Biol* **142**, 1337-1345.
- Trupp, M., Scott, R., Whittemore, S. R., and Ibanez, C. F. (1999). Ret-dependent and -independent mechanisms of glial cell line-derived neurotrophic factor signaling in neuronal cells. *J Biol Chem* **274**, 20885-20894.
- Viglietto, G., Dolci, S., Bruni, P., Baldassarre, G., Chiariotti, L., Melillo, R. M., Salvatore, G., Chiappetta, G., Sferratore, F., Fusco, A., and Santoro, M. (2000). Glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin can act as paracrine growth factors stimulating DNA synthesis of Ret-expressing spermatogonia. *Int J Oncol* **16**, 689-694.
- Weaver, M., Dunn, N. R., and Hogan, B. L. (2000). Bmp4 and Fgf10 play opposing roles during lung bud morphogenesis. *Development* **127**, 2695-2704.
- Yan, H., Bergner, A. J., Enomoto, H., Milbrandt, J., Newgreen, D. F., and Young, H. M. (2004). Neural cells in the esophagus respond to glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin, and are RET-dependent. *Dev Biol* **272**, 118-133.
- Yanai, M., Tatsumi, N., Endo, F., and Yokouchi, Y. (2005). Analysis of gene expression patterns in the developing chick liver. *Dev Dyn* **233**, 1116-1122.
- Yokouchi, Y. (2005). Establishment of a chick embryo model for analyzing liver development and a search for candidate genes. *Dev Growth Differ* **47**, 357-366.

- Zaret, K. S. (1996). Molecular genetics of early liver development. *Annu Rev Physiol* **58**, 231-251.
- Zaret, K. S. (2001). Hepatocyte differentiation: from the endoderm and beyond. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 568-574.
- Zaret, K. S. (2002). Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis. *Nat Rev Genet* **3**, 499-512.
- Zhang, W., Yatskievych, T. A., Baker, R. K., and Antin, P. B. (2004). Regulation of Hex gene expression and initial stages of avian hepatogenesis by Bmp and Fgf signaling. *Dev Biol* **268**, 312-326.
- Zhao, R., and Duncan, S. A. (2005). Embryonic development of the liver. *Hepatology* **41**, 956-967.