

学位論文  
Doctor's Thesis

マウス終脳背側部の形成における *Emx1*, *Emx2* の機能解析  
(Studies of the function of *Emx1* and *Emx2* in mouse dorsal telencephalon)

篠崎 恒二  
Koji Shinozaki

指導教官  
熊本大学大学院 医学研究科 博士課程 形態形成学

相澤 慎一 (前) 教授

紹介教官  
熊本大学大学院 医学教育部 博士課程 形態形成学

嶋村 健児 教授

2004 年度

学 位 論 文  
Doctor's Thesis

論文題名： マウス終脳背側部の形成における *Emx1*, *Emx2* の機能解析  
(Studies of the function of *Emx1* and *Emx2* in mouse dorsal telencephalon)

著者名： 篠 崎 恒 二  
Koji Shinozaki

指導教官： 形態形成学分野 相澤慎一(前)教授

紹介教官： 形態形成学分野 嶋村健児教授

審査委員： 脳回路構造学分野 玉巻伸章教授  
転写制御分野 田賀哲也教授  
神経分化学分野 田中英明教授  
パターン形成分野 横内裕二教授

2004 年度

## 目次

1. 要旨	3
2. 学位論文の骨格となる参考論文	4
3. 謝辞	5
4. 略語一覧	6
5. 研究の背景と目的	7
第1節 マウス終脳背側内側部の領域形成	7
第2節 マウス終脳皮質領域の形成	11
第3節 本研究の目的	15
6. 実験方法	16
(1) <i>Emx1/2</i> 二重ホモ変異マウスの作製、及び遺伝子型の同定	16
(2) マウス胚の組織学的解析	16
(2.1) 一般的な組織切片の作製	16
(2.2) 超薄切片の作製	18
(3) <i>In situ</i> hybridization	18
(3.1) 切片を用いた <i>in situ</i> hybridization	18
(3.2) Whole mount <i>in situ</i> hybridization	21
(4) <i>Wnt1</i> knock in <i>Emx2</i> マウスおよび CA- <i>ALK3</i> knock in <i>Emx2</i> マウスの作製	22
(4.1) ノックインベクターの構築	22
(4.2) Primary fibroblast 細胞 (feeder 細胞) および ES 細胞の培養	22
(4.3) エレクトロポレーションによるベクターの導入	23
(4.4) G418 耐性 ES 細胞株のクローニング	24
(4.5) 相同組み換え体同定のための long-PCR および Southern hybridization	24
(4.6) ES 細胞のインジェクションによるキメラマウスの作製	26
(4.7) ノックインマウスの遺伝子型の同定	27
(5) BrdU を用いた細胞の増殖性の解析および birthdating study	27
(6) 細胞死の解析	28
(7) 免疫染色	28
(8) DNA 含有量の解析	29

(9) スライス培養法を用いた細胞移動の解析	29
7. 結果	31
第1節 <i>Emx1/2</i> 二重ホモ変異マウスの組織学的解析	31
第2節 マウス終脳背側内側部の領域形成における <i>Emx1, Emx2</i> の機能解析	36
(1) 終脳の領域形成に関する解析	36
(2) 天井板および脈絡叢の形成に関する解析	39
(3) 原皮質領域の形成に関する解析	43
(4) 終脳形成初期における背側内側壁の形成に関する解析	47
(5) <i>Wnt1</i> knock in <i>Emx2</i> マウスおよび	
<i>CA-ALK3</i> knock in <i>Emx2</i> マウスの解析	49
第3節 マウス終脳皮質領域形成における <i>Emx1, Emx2</i> の機能解析	56
(1) 細胞の増殖性の解析	56
(2) スライス培養法を用いた細胞移動の解析	60
(3) 神経細胞の分化に関する解析	64
(4) 皮質層構造の解析	66
(5) "inside-outside" パターン形成に関する解析	69
(6) Cajal-Retzius 細胞および	
皮質下層ニューロンの形成に関する解析	71
(7) 皮質形成開始時における Cajal-Retzius 細胞および	
皮質下層の形成に関する解析	75
8. 考察	78
第1節 マウス終脳背側内側部の領域形成における <i>Emx1, Emx2</i> の機能	78
(1) 天井板の拡大および脈絡叢の欠失	78
(2) 原皮質の形成	79
(3) <i>Gli3</i> および <i>Emx</i> の関係	83
(4) 終脳背側内側壁における <i>WNT</i> および <i>BMP</i> シグナルの役割	84
第2節 マウス終脳皮質領域形成における <i>Emx1, Emx2</i> の機能	86
(1) 終脳腹側部から背側部への細胞移動の異常	86
(2) 細胞分化の異常	87
(3) Cajal-Retzius 細胞および皮質下層ニューロンの欠失	87
(4) 細胞流入と皮質層構造形成	89
9. 結語	91
10. 参考文献	92

## 1. 要旨

*Emx1*, *Emx2* はショウジョウバエ頭部形成においてギャップ遺伝子として働く *empty spiracles(ems)* のマウス相同遺伝子で、終脳背側部で共に発現する。吉田等(Yoshida et al., 1997)は、*Emx1* ホモ変異マウスでは皮質形成の異常は認められず、*Emx2* ホモ変異マウス(以下、*Emx2*<sup>-/-</sup>)では終脳背側正中内側部に位置する歯状回が形成されず、皮質の層構造に軽微な異常が認められることを示した。このように *Emx1*, *Emx2* は終脳背側部で重複して発現し、各単独変異マウスでは軽微な異常しか認められないことから、皮質領域のほとんどで *Emx1*, *Emx2* はその機能を相補していることが推測された。そこで、本研究ではマウス終脳形成における *Emx1*, *Emx2* の相補的機能を明らかにするために *Emx1/Emx2* 二重ホモ変異マウス(以下、*Emx1/2*<sup>-/-</sup>)を作製し、その表現型を解析した。その結果、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> は *Emx2*<sup>-/-</sup> より重篤な異常を示すと共に、その異常は二つの皮質形成機構にわたって認められることを明らかにした。

*Emx1/2*<sup>-/-</sup> の終脳背側内側領域では、背側皮質の形成にシグナルセンターとして働くと想定されている cortical hem が形成されず、また脈絡叢も形成されずに原皮質が天井板に形質転換した。この異常は 11.5 日目より前に認められた。よって *Emx1* と *Emx2* は原皮質と天井板の境界形成に協働しており、この過程は *Emx1* の発現が開始する神経管が閉じた直後に始まると考えられる。さらに、cortical hem が形成されるこの時期を中心として、様々な *Wnt* および *Bmp* の発現が起こる。これらのシグナルの終脳背側内側領域形成における役割を *Emx* との関連で明らかにするため、*Emx2* 遺伝子座に *Wnt1* および活性化型 *BMP* レセプター遺伝子を挿入したノックインマウス (*Emx2*<sup>+/Wnt1</sup>, *Emx2*<sup>+/CA-Alk3</sup>) を作製した。しかし、これらのノックインマウスが示す表現型の解釈は複雑で今後に残された課題である。

一方、11.5 日目以降、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> の皮質領域では細胞数の減少に伴って皮質の発達に異常が認められた。この原因について解析したところ、皮質を占める細胞の増殖能に異常は認められず、基底核隆起から皮質への接線方向の細胞移動が著しく阻害され、皮質領域の細胞数が増加しないことが明らかとなった。また、RC2 陽性の放射状グリア細胞はほぼ正常に形成され、プレプレートも形成されるが、Cajal-Retzius 細胞および皮質下層ニューロンが形成されないことが明らかとなった。この結果、皮質板の形成、"inside-outside" な層構造の形成は起こらず、皮質 - 視床間の神経線維連絡も失われていた。すなわち、*Emx1*, *Emx2* は皮質層構造の形成に重要な役割を果たすパイオニアニューロンの形成にも協働する。さらに、*Emx1* は終脳腹側部では発現しないので、層構造形成時、両遺伝子は皮質において協働し、基底核隆起から皮質への接線方向の細胞移動を制御していると考えられ、その詳細の解析が今後期待される。

## 2. 学位論文の骨格となる参考論文

- **Shinozaki K, Miyagi T, Yoshida M, Miyata T, Ogawa M, Aizawa S & Suda Y.** Absence of Cajal-Retzius cells and subplate neurons associated with defects of tangential cell migration from ganglionic eminence in *Emx1/2* double mutant cerebral cortex. *Development* 129 3479-3492 (2002).

**Shinozaki K, Yoshida M, Nakamura M, Aizawa S & Suda Y.** *Emx1* and *Emx2* cooperate in initial phase of archipallium development. *Mechanisms of Development* 121 475-489 (2004).

### 3. 謝辞

本研究は相澤慎一博士の指導のもと、熊本大学発生医学研究センター形態形成分野および理研発生・再生科学研究センターボディプラン研究グループで行ないました。研究を行なう上で、私に素晴らしい実験環境を与えてくださり、多面にわたってご指導を頂きましたことに、深く感謝いたします。また、学位論文審査申請の際、紹介教授を快く引き受けてくださいました熊本大学発生医学研究センター形態形成分野嶋村健児教授に心より感謝いたします。

理研発生・再生科学研究センター研究員須田容子博士ならびに熊本大学発生医学研究センター形態形成分野助手吉田道生博士には、本研究開始当初から論文作成に至るまで長期にわたり、ご指導・ご助言を頂きました。感謝いたします。また、ノックインマウスの作製には理研発生・再生科学研究センター研究員黒川大輔博士、熊本大学生命資源研究・支援センター動物資源開発研究部門技術開発分野助手竹田直樹氏、理研発生・再生科学研究センター変異マウス開発チーム清成寛氏にご協力いただきました。*In situ hybridization* に関しては理研発生・再生科学研究センターボディプラン研究グループ中村美和氏、超薄切片の作製には理研発生・再生科学研究センター細胞形態形成研究チーム米村重信博士にご協力いただきました。さらに、相澤慎一博士の研究室に所属する皆様には、常日頃から様々なご助言・ご協力を頂きました。この場を借りて御礼申し上げます。

最後に、私が研究生活を歩むことに全面的に協力し、支えてくれた両親そして妻に深く深く感謝いたします。

#### 4. 略語一覧

##### - molecular biology -

DEPC : diethyl pyrocarbonate  
neo : neomycin phosphotransferase  
PBS : phosphate - buffered saline  
SDS : sodium lauryl sulfate

##### - anatomy -

Ah : Ammon's horn     アモン角  
ChP : choroid plexus     脈絡叢  
CP : cortical plate     皮質板  
DG : dentate gyrus     齒状回  
DT : dorsal thalamus     視床背側部  
EP : epiphysis     松果体  
fi : fimbria     海馬采  
hip : hippocampus     海馬  
IC : internal capsules     内包  
IZ : intermediate zone     中間帯  
LGE : lateral ganglionic eminence     外側基底核隆起  
MGE : medial ganglionic eminence     内側基底核隆起  
MP : medial pallium     正中外套 (原皮質)  
MZ : marginal zone     辺縁帯  
NC : neocortex     新皮質  
OB : olfactory bulb     嗅球  
PA/GP : pallidum/globus pallidus     淡蒼球  
r : the roof between cerebral hemisphere     大脳半球間の天井板  
S : subiculum     鉤状回  
SP : cortical subplate     皮質下層  
ST/STR : striatum     線条体  
SV : subventricular zone     脳室下帯  
VZ : ventricular zone     脳室帯



## 5. 研究の背景と目的

### 第1節 マウス終脳背側内側部の領域形成

哺乳類の脳は生物の中で最も複雑な構造物である。その原基である終脳は皮質となる背側領域と基底核となる腹側領域から構成され、さらに腹側領域は外側の LGE と内側の MGE の2つに分けられる。一方、背側領域は6層構造を有する同種皮質 (isocortex ; = 新皮質) と6層構造を有しない、より原始的な層構造の原皮質や旧皮質を含む領域である異種皮質 (allocortex) に分類される (図 1A)。原始脊椎動物の終脳は嗅覚を司る旧皮質のみであり、両生類に至る系譜で原皮質、基底核が生じ、新皮質は爬虫類で生まれ、哺乳類で劇的に発達した (図 2)。

前方の神経板は 8.5 日目あたりに将来の前脳 - 中脳境界部で閉じ始め、9.0 日目までに菱脳部の天井板を除く神経管は閉じ、続いて終脳胞の発達が始まる。10.5 日目までには終脳背側内側領域が伸長し始め、終脳の左右の半球に挟まれた領域に内側壁を形成する。内側壁では天井板の隣に形成される非神経領域である脈絡叢と呼ばれる分泌上皮、海馬采、歯状回および CA 領域から成る海馬、新皮質内側辺縁体 (cingulate cortex, retrosplenial cortex) 近傍に位置する鉤状回より成る原皮質領域が形成される (図 1B)。形態学的には海馬領域は 14.5 日目から同定でき、14.5~15.5 日目までには海馬内の分子的・解剖学的な領域化が明らかになる。しかし、移植片の培養や変異マウスの解析から、原皮質内における領域化は 10.5 日目以降に起こることが示唆されている (Tole and Grove, 2001; Lee et al., 2000)。

海馬采は皮質から脈絡叢への移行部であり、皮質の縁 (cortical hem) に相当する領域である。cortical hem は皮質形成特に原皮質領域の形成に関してシグナルセンターとして機能していると推測されている (Grove et al., 1998; Tole and Grove, 2001)。一方、脈絡叢は 10.5 日目において正中に存在する薄い上皮から成る狭い領域であり、11.5 日目になると *transthyretin* (*TTR*) 陽性細胞になる。cortical hem は背側内側壁の形成期に様々な *Wnt* 遺伝子群を発現し、形成中の脈絡叢や天井板と共に *Msx* や *Bmp* 遺伝子群も発現する。*Bmp* や *Msx* は、神経管の閉塞直後、終脳が未だ左右に膨らんだ脳胞を形成していない 9.5 日目においては背側正中領域で発現している。cortical hem における一連の *Wnt* 遺伝子群の発現は、10.0 日目の *Wnt3a* 発現によって始まり、12.5 日目になると、cortical hem を中心とした背側内側壁で *Wnt* 遺伝子群が重なり合って勾配状に発現している。一方、*Wnt* 受容体や拮抗分子も背側内側壁において勾配状に発現している (Kim et al., 2001)。また、10.5 日目になると、内側壁で幾つかの *Tcf/Lef* や *Lhx* 遺伝子群が発現し始める (Porter et al., 1997; Galceran et al., 2000; Zhao et al., 1999; Bulchand et al., 2001; Monuki et al., 2001)。背側内側壁で重なり合って勾配状に発現しているこれらシグナル分子、それらの受容体/拮抗分子、転写因子は原皮質の各領域を形成するための形態的な勾配を構成していると想定される。しかしながら、

いつどのようにして原皮質領域が決定されるのかについては未だ明らかではない。

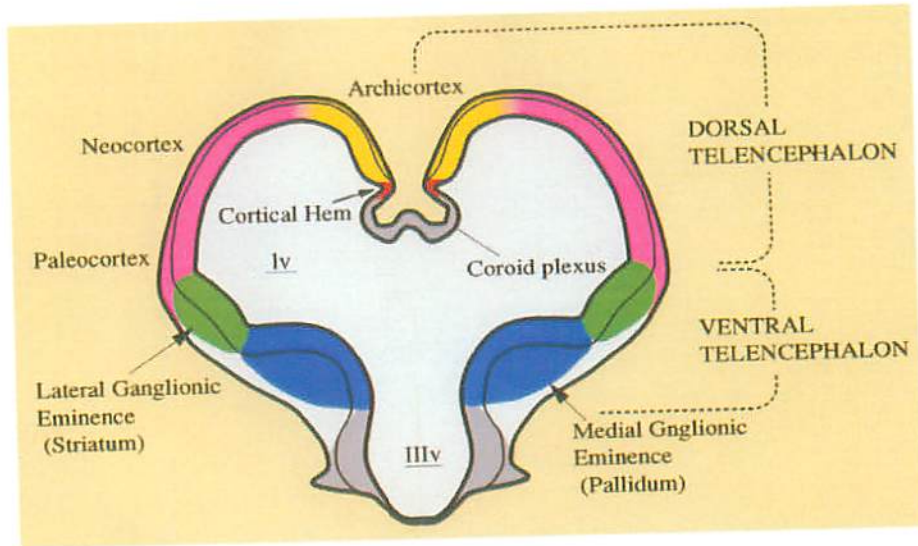
図 1.の説明 マウス 11.5 日目胚の終脳における各領域の名称を示す概略図。

(A)は終脳の前頭断面を、(B)はその背側正中内側領域の拡大図(概略)を示す。終脳は皮質となる背側領域と基底核となる腹側領域から構成され、さらに腹側領域は外側の LGE と内側の MGE の 2 つに分けられる。一方、背側領域は 6 層構造を有する新皮質と 6 層構造を有しない原皮質や旧皮質などの領域に分類される(A)。背側内側壁では天井板の隣に形成される脈絡叢、海馬采、歯状回および CA 領域から成る海馬、新皮質内側辺縁体近傍に位置する鉤状回より成る原皮質領域が形成される(B)。略語:lv; 側脳室、IIIv; 第三脳室。

図 2.の説明 大脳半球の進化を示す模式図。

(A)原始段階の大脳半球は嗅葉(Paleopallium)で、(B)両生類では背側に原皮質(Archipallium)、腹側に基底核(線条体: Basal nuclei)が分化している。(C)原始爬虫類になると基底核が大脳半球内部に移動し、(D)高等爬虫類で新皮質(Neopallium)の小部分が出現した。さらに、(E)原始哺乳類では原皮質が正中に押しやられる。しかし、新皮質はまだあまり大きくなく、嗅領域は嗅裂(Rhinal fissure)の下でかなり大きい。(F)高等哺乳類では原始的な嗅領域が腹側部に限局され、新皮質領域は非常に拡大する。

☒ 1.A



1.B

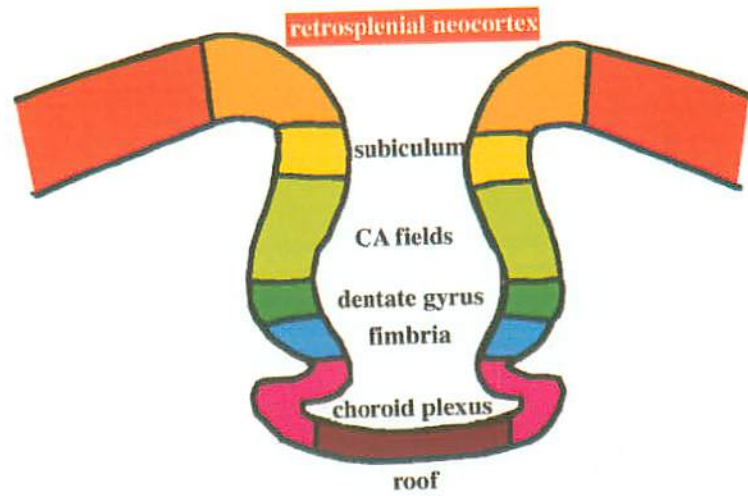
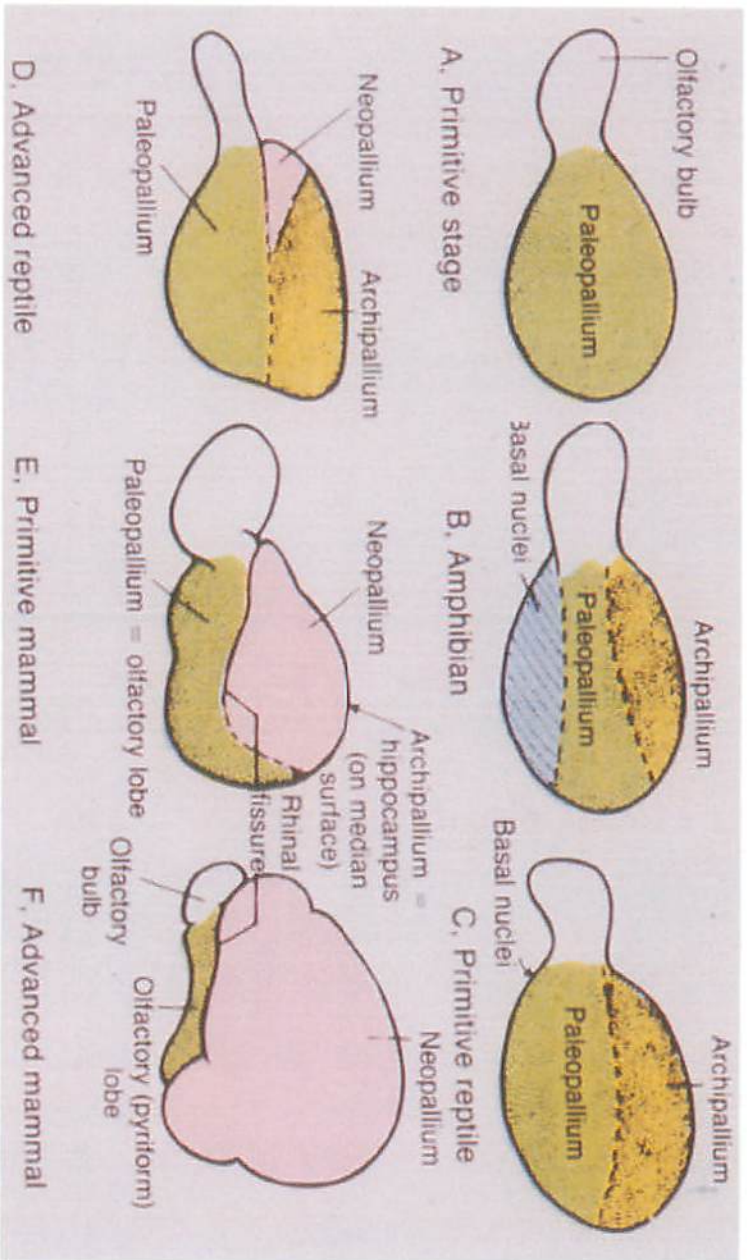


图2



AS Romer 图 9

## 第2節 マウス終脳皮質領域の形成

放射状グリア細胞は様々なニューロンを生じ最終的にはアストロサイトに分化する多能性前駆細胞であり、その細胞体は脳室帯（内辺層）に存在するが、そこから出る繊維は脳室帯表面から軟膜表面まで皮質全体にわたって垂直方向に伸びる(Chans-Sacre et al., 2000; Malatesta et al., 2000; Hartfuss et al., 2001; Miyata et al., 2001; Noctor et al., 2001)。マウスでは、11.5 日目辺りから神経分化が始まり、12 日目から 18 日目に分化の最盛期を迎える(Marin-Padilla, 1998)。Cajal-Retzius 細胞(以下、CR 細胞)と皮質下層ニューロンは最も早く分化するパイオニアニューロンであり、これらはまずプレプレートを形成する(図3)。プレプレートは13.5 日目までに辺縁帯と皮質下層に分かれ、続いて脳室帯で分化した投射ニューロンは放射状グリア細胞の繊維に沿って垂直方向に移動し、皮質下層を通過して辺縁帯と皮質下層の間に皮質板を形成する。この際、あとに産生された投射ニューロンは先に生まれたニューロンを追い越して皮質板のより上層に次々に蓄積する。このような過程を経て、皮質板には5つの層が形成され、この”inside-outside の皮質形成勾配”は哺乳類の皮質形成における一般的な特徴となっている(Angevine and Sidman, 1961; Caviness and Rakic, 1978)。

CR 細胞は辺縁帯に局在し、投射ニューロンの垂直方向への移動および皮質の層構造形成に不可欠な役割を担っている。細胞外基質タンパクをコードする *reelin* はCR 細胞で発現し、投射ニューロンの垂直方向への移動に対して鍵となる分子である(D'Arcangelo et al., 1995; Ogawa et al., 1995; Alcántara et al., 1998; Curran and D'Arcangelo, 1998; Rice and Curran, 1999)。自然発生的な突然変異マウスで *reelin* 遺伝子に変異が認められる *reeler* では、CR 細胞は形成されるものの、*reelin* は発現せず、プレプレートから辺縁帯と皮質下層が形成されず、皮質の最も表層に”superplate”を形成する。そして、皮質板のニューロンは皮質下層の下層に蓄積していく。つまり、あとで産生されたニューロンは先に産生されたニューロンを追い越して上層に移動できない(Caviness, 1982)。

皮質下層ニューロンは、前駆ニューロンとして視床 - 皮質求心性神経のような皮質求心性神経のガイドをしていると考えられている(Allendoerfer and Shatz, 1994; Molnar and Blakemore, 1995; Nothias et al., 1998; Mackarehtschian et al., 1999; Zhou et al., 1999)。下等哺乳類では、視床からの神経繊維の多くは辺縁帯を経由して皮質に入るのに対して、高等哺乳類では皮質下層を経由して皮質に入る(O'Leary, 1989; Super et al., 1998)。進化を通して辺縁帯は比較的厚みを減らしたのに対して、皮質下層はその厚みを増したと思われる。さらに、皮質下層ニューロンは運動野、感覚野など皮質領域野の形成を制御していることが示唆されている(Rakic et al., 1991; Nothias et al., 1998; Mackarehtschian et al., 1999; Zhou et al., 1999)。第IV層に位置するニューロンの形成は、視床から皮質下層への神経線維の繋がりが始まる時期と一致して起こる(Kennedy and Dehay, 1993; Zhou et al., 1999)。しかしながら、皮質下層

ニューロンの形成に関わる分子についてはほとんど明らかになっていない。

これら皮質脳室帯で生まれ、垂直方向の移動をする glutamate 陽性な投射ニューロンに加え、介在ニューロンも皮質内に存在する別の主要な細胞集団である。GABA 陽性の介在ニューロンは基底核隆起で産生され、接線方向へ移動して皮質に入る(図 4; de Carlos et al., 1996; Anderson et al., 1997; Anderson et al., 1999; Tamamaki et al., 1997; Lavdas et al., 1999; Marin et al., 2000; Corbin et al., 2001; Marin and Rubenstein, 2001)。オリゴデンドロサイトも終脳腹側で産生され、接線方向へ移動して皮質へ入る(Spassky et al., 1998; Olivier et al., 2001)。しかし、皮質を占める細胞の起源となる領域がどれくらい存在し、それらの領域からどの程度流入してくるかにについての詳細は明らかになっていない。

図 3. マウス終脳の新皮質領域における層構造の形成過程。

マウスでは、11.5 日目辺りから神経分化が始まり、12 日目から 18 日目に分化の最盛期を迎える。Cajal-Retzius 細胞と皮質下層ニューロンは最も早く分化するパイオニアニューロンであり、これらはまずプレプレートを形成する。プレプレートは 13.5 日目までに辺縁帯と皮質下層に分かれ、続いて脳室帯で分化した投射ニューロンは放射状グリア細胞の繊維に沿って垂直方向に移動し、皮質下層を通過して辺縁帯と皮質下層の間に皮質板を形成する。この際、あとに産生された投射ニューロンは先に生まれたニューロンを追い越して皮質板のより上層に次々に蓄積する。このような “inside-outside の皮質形成勾配” は哺乳類の皮質形成における一般的な特徴である。略語：CP: 皮質板、IZ: 中間帯、MZ: 辺縁帯、PP: プレプレート、SP: 皮質下層、VZ: 脳室帯。

図 4. 14.5 日目における投射ニューロンおよび介在ニューロンの移動経路。

glutamate 陽性の投射ニューロン(Glu)は皮質内の脳室帯で産生され(赤)、垂直方向へ移動して形成されるのに対し、GABA 陽性の介在ニューロン(GABA)は基底核隆起で産生され(青色)、接線方向へ移動して皮質に入る。また、コリン陽性ニューロンは前方内側脚領域で産生され(緑)、接線方向へ移動して線条体へ入る。略語：Cx: 皮質、GP: 淡蒼球、H: 海馬、STR: 線条体。

图3

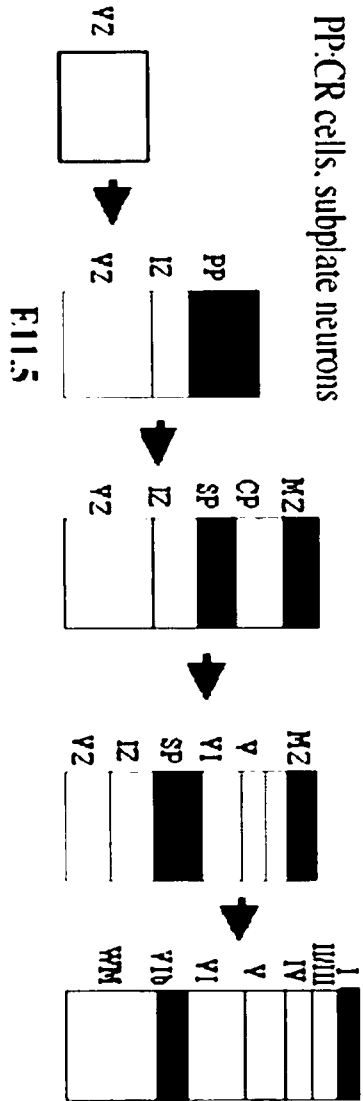
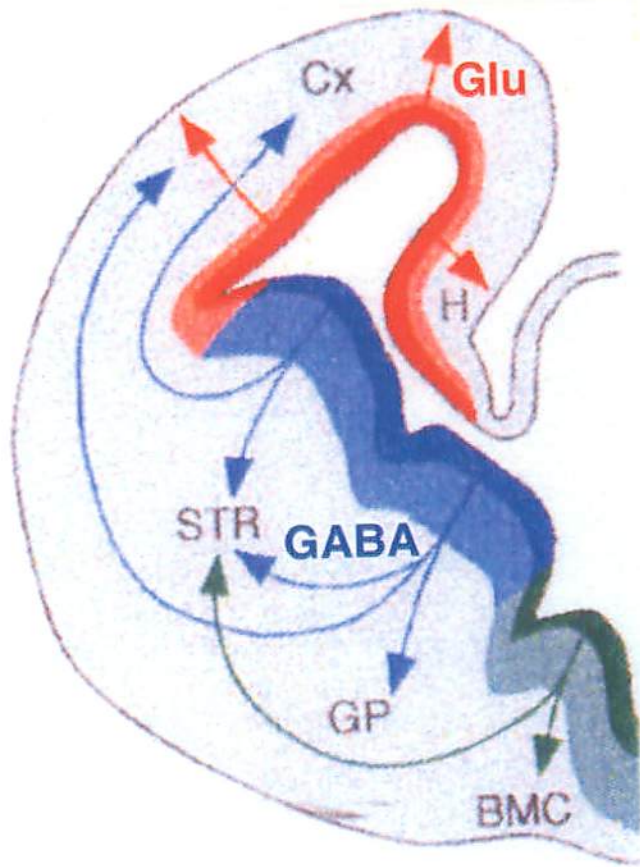


図4



JL Rubensteinより



### 第3節 本研究の目的

*Emx1*, *Emx2* はショウジョウバエのヘッドギャップ遺伝子である *empty spiracle (ems)* のマウス相同遺伝子である(Simeone et al., 1992)。*Emx2* は前脳原基の側方 - 後方で3体節期(8.5日目)辺りから発現を開始し、10.5日目までには皮質全体および腹側の一部で発現する(Shimamura et al., 1995)。一方、*Emx1* は神経管が閉じた直後の9.5日目から皮質全体で発現する。このように皮質形成期において *Emx1*, *Emx2* は重なって発現し、その発現は内側 - 後方で強い(Simeone et al., 1992; Gulisano et al., 1996; Mallamaci et al., 1998)。以前、吉田等(Yoshida et al., 1997)は *Emx1* ホモ変異マウス(以下、*Emx1*<sup>-/-</sup>)および *Emx2* ホモ変異マウス(以下、*Emx2*<sup>-/-</sup>)の解析を行なった。その結果、*Emx1*<sup>-/-</sup> では皮質形成の異常は認められず、*Emx2*<sup>-/-</sup> でも歯状回を欠失するのみで、*Emx1*, *Emx2* がともに発現する皮質領域はほぼ正常に形成されていた。また、形成された皮質での層構造形成にも多少の異常が認められるだけであった(Yoshida et al., 1997; Tole et al., 2000a)。すなわち *Emx1*, *Emx2* は、皮質領域の形成あるいは皮質層構造の形成に際して相補的に機能していることが推測された。他方 Mallamaci 等は、*Emx2*<sup>-/-</sup> において *reelin* 陽性の CR 細胞が最初 12 日目には形成されるが、その後消失することを報告している(Mallamaci et al., 2000)。また、これに付随して *Emx2*<sup>-/-</sup> では皮質板を構成するニューロンが異常な移動パターンを示すと報告しているが、いずれにしても *Emx2* の発現範囲に比し認められた異常は軽微であった。そこで、今回我々は *Emx* の相補的機能を解明すべく、*Emx1/2* 二重ホモ変異マウス (以下、*Emx1/2*<sup>-/-</sup>) を作製し、検討を行った。

18.5 日目における *Emx1/2*<sup>-/-</sup> の皮質異常は複雑であったが、発生時期を遡って解析することにより、11.5 日以前には背側内側壁の欠失のみが認められ、側方部では皮質が正常に形成されていること、しかし 11.5 日以降、その皮質では層構造形成に異常が生じることが明らかとなった。また、背側内側壁の形成における *WNT* や *BMP* シグナルの役割を *Emx* の機能との関連で明らかにする目的で、*Emx2* 遺伝子座に *Wnt1* あるいは活性化型 *Bmp* 受容体をノックインしたマウス (*Emx2*<sup>+/Wnt1</sup>, *Emx2*<sup>+/CA-Alk3</sup>) を作製し、解析した。

## 6. 実験方法

### (1) *Emx1/2* 二重ホモ変異マウスの作製、及び遺伝子型の同定

*Emx1/2* 二重ホモ変異マウス(以下、*Emx1/2*<sup>-/-</sup>)は、相澤慎一博士、須田容子博士(理研発生・再生科学研究センターボディプラン研究グループ) および吉田道生博士(熊本大学発生医学研究センター形態形成分野) が遺伝子相同組換えにより作製した *Emx1* 変異マウスと *Emx2* 変異マウス (Yosida et al., 1997) を交配することにより作製した。まず、*Emx1* ホモ変異マウス (以下、*Emx1*<sup>-/-</sup>) と *Emx2* ヘテロ変異マウス (以下、*Emx2*<sup>+/-</sup>) を交配し、*Emx1* と *Emx2* の変異遺伝子座をそれぞれヘテロに持つ雌雄の *Emx1/2* 二重ヘテロ変異マウス (以下、*Emx1*<sup>+/-</sup> *Emx2*<sup>+/-</sup>) を得た。さらに、それらを交配することにより *Emx1/2*<sup>-/-</sup> を得た。また、*Emx1*<sup>-/-</sup> は成獣となり、生殖能力も有するため、交配により得られる *Emx1* ホモ/*Emx2* ヘテロ変異マウス (以下、*Emx1*<sup>-/-</sup> *Emx2*<sup>+/-</sup>) から *Emx1/2*<sup>-/-</sup> を得た。これら全てのマウスは熊本大学および理研で定められた指針に従い、それぞれの実験動物施設内の調節された環境下で飼育された。本文中に示したマウス胚の各胎仔期については、交配により膈栓が認められた日を 0.5 日として計算を行なった。

得られた子孫マウスの遺伝子型は、マウスの尾または羊膜から抽出した鋳型 DNA を用いて Polymerase Chain Reaction (以下、PCR)法により同定した。鋳型 DNA はマウスの尾または羊膜を 100 μL の蒸留水と共に 95°C で 10 分間加熱処理後、1mg/mL の Proteinase K (Sigma 社) 10 μL を加え、55°C で 123 分間消化し、その後 95°C で 10 分間加熱処理することにより調製した。この溶液 5 μL を鋳型として PCR を行なった。プライマーは *Emx1* CS1/*Emx1* AS2 により *Emx1* 正常 allele の同定、AGN3/*Emx1* AS2 により *Emx1* 変異 allele の同定、*Emx2* GS2/*Emx2* Δ6TV により *Emx2* 正常 allele の同定、AGN3/*Emx2* Δ6TV により *Emx2* 変異 allele の同定を行なった。各プライマーの配列は以下の通りであり、PCR は①95°C で 10 分間加熱後、②~④ (②94°C, 45 秒、③62°C, 25 秒、④72°C, 90 秒) の反応を 34 サイクル行ない、最後に⑤72°C で 15 分間反応させた。

#### プライマー配列

*Emx1* CS1 : 5'- AAGCGACGTTCCCCAGGACGGGCTGC

AGN3 : 5'- GCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAAT

*Emx1* AS2 : 5'- CTGACAGCTCCCTAGACACTCTTGG

*Emx2* GS2 : 5'- CCGAGAGTTTCCTTTTGCACAACGC

*Emx2* Δ6TV : 5'- GTTGCTATACTCTGCCTACAAACGTAAC TG

### (2) マウス胚の組織学的解析

#### (2.1) 一般的な組織切片の作製

解剖により取り出したマウス胚の頸部を PBS 溶液中で切断し、得られた頭部をブアン固定液またはカルノア固定液で固定した。その後、エタノールで段階的に脱水し、ブアン固定の場合は安息香酸メチルと安息香酸、カルノア固定の場合はメチルベンゼンとベンゼンを用いて透徹した。そして、60°Cに加熱したパラフィン (Paraplast; Oxford 社) を加え浸透させた後、パラフィン中に包埋した。包埋した頭部のサンプルはマイクロトーム (Microm 社) を用いて 10 $\mu$ m の厚さに切り、42°Cの伸展機上で伸展させ、卵白アルブミンを溶かした蒸留水によりスライドグラス上に固定した。切片はキシレンによりパラフィンを除き、エタノールに通して段階的に加水し、水洗後に染色を行った。染色は、ヘマトキシリン/エオジン染色またはニッスル染色を行なった。ヘマトキシリン/エオジン染色の場合、切片を Mayer's ヘマトキシリン液中で 3 分間染色し、30 分間流水に浸したのち、1% エオジンアルコール液 (武藤化学薬品社) 中で 1 分間染色後、70% エタノール中で弁色した。一方、ニッスル染色の場合、42°Cに温めた 0.1% Cresyl violet (Sigma 社) 水溶液中で切片を 5 分間染色し、70% エタノールで弁色した。染色した切片はエタノールに通して脱水し、キシレンにより透徹後、非水溶性封入剤 (Eukitt; O.Kindler 社) で封入し、組織標本として光学顕微鏡下で観察した。以下に PBS 溶液, ブアン固定液, カルノア固定液およびヘマトキシリン染色液の組成を示す。

#### PBS 溶液

NaCl	8g
KCl	0.2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	2.89g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2g
D.W.で 1L にメスアップした。	

#### ブアン固定液

ピクリン酸水飽和液	75mL
ホルマリン	25mL
氷酢酸	5mL

#### カルノア固定液

100% EtOH	60mL
クロロホルム	30mL
氷酢酸	10mL

#### Mayer's ヘマトキシリン液

ヘマトキシリン	2.5g
硫酸カリウムアルミニウム	50g
酸化水銀	1.25g
エタノール	25mL
蒸留水	500mL
氷酢酸	20mL

## (2.2) 超薄切片の作製

PBS 溶液中で解剖して取り出したマウス胚頭部を 0.1M sodium cacodylate buffer (pH7.3)に溶解した 2.5% グルタルアルデヒド/2% パラホルムアルデヒド (以下、PFA) で固定し、1% OsO<sub>4</sub> 中で 2 時間再固定した。次に Poly Bed 812 に包埋したのち、ガラス製の刃を用いて超薄切片 (厚さ 0.1 $\mu$ m) を作製した。その後、0.5% トルイジンブルーで染色し、観察した。

## (3) *In situ* hybridization

### (3.1) 切片を用いた *in situ* hybridization

*In situ* hybridization は Wilkinson 等によって記載された方法 (Wilkinson et al., 1993) を用い、幾つかの変更を加えて行なった。使用した溶液、器具は可能な限り 0.1% DEPC 処理または 180°C, 8 時間の乾熱滅菌により、RNase 活性を不活化した。方法は以下に示す。

マウス胚を冷 1×PBS 中で解剖し、頭部を 4% PFA/PBS を用いて 4°C で一晩固定した。その後、エタノールで段階的に脱水し、-20°C で保存した。サンプルを切片にするときは、安息香酸メチルおよび安息香酸により透徹した後、60°C のパラフィンに入れ、4~5 回交換した後、包埋した。包埋したサンプルはマイクロトームを用いて 10 $\mu$ m の厚さに切り、シランコーティングしたスライドガラス (DAKO 社) に乗せて DEPC 処理水で 4 時間から一昼夜かけて伸展器上で伸展させた。伸展した切片は染色バスケットに詰め、底に molecular sieves を敷いたドーゼに入れ、フタをして -80°C で保存した。*In situ* hybridization は、まずキシレンにより切片からパラフィンを除き、エタノールにより段階的に加水し、1×PBS で洗浄した。そして、6% 過酸化水素水で 30 分、4% PFA/PBS で 20 分、20 $\mu$ g/mL Proteinase K で 5 分、4% PFA/PBS で 10 分、0.1M Triethanol amine (pH 8.0) で 10 分、順次処理した。その後、エタノールを用いて脱水および乾燥させ、0.1 $\mu$ g/mL (終濃度) のジゴキシゲニン (以下、DIG; Roche 社) 標識した RNA プロブ入りのハイブリダイゼーションバッファー中で、70°C で一晩ハイブリダイゼーションした。ハイブリダイゼーション後、5×SSC (pH 5.0) 中で 70°C, 30 分間、solution 1 中で 70°C, 1 時間、solution 2 中で室温, 30 分間洗浄後、25 $\mu$ g/mL RNase A/solution 2 中で 37°C, 45 分間処理した。ついで、solution 3 中で 70°C, 1

時間、PBT 中で室温, 20 分間洗浄し、blocking solution 中で室温, 2 時間処理した。その後、0.6% (W/V) マウス胚粉/PBT 中で 1 時間アフィニティー精製して、1% 正常ヒツジ血清/PBT にて 1/2000 希釈したアルカリフォスタターゼ標識ヒツジ抗 DIG ポリクローナル抗体 (Boehringer Mannheim 社) と 4°C で一晩反応させた。反応後、PBT で洗浄し、最後に BM purple アルカリホスファターゼ基質あるいは NBT/BCIP (いずれも Boehringer Mannheim 社) を用いて発色を行ない、水溶性封入剤 (Crystal Mount; Biomedica 社) を用いて封入した。使用した溶液の組成は以下に示す。

4% パラホルムアルデヒド (PFA)

DEPC 水	90mL
5N NaOH	200 $\mu$ L
PFA	4g
10×PBS	10mL
11.6N HCl	86.2 $\mu$ L

hybridization buffer

50% ホルムアミド
5×SSC (pH 5.0)
50 $\mu$ g/mL yeast RNA
1% SDS
50 $\mu$ g/mL ヘパリン
1 $\mu$ g/mL DIG 標識 RNA プローブ

20×SSC (pH 5.0)

3M NaCl
0.3M sodium citrate
citric acid で pH5.0 に調整

solution 1

50% ホルムアミド
5×SSC (pH 5.0)
1% SDS

solution 2

0.5M NaCl
-----------

10mM Tris·HCl (pH 7.5)  
0.1% Tween 20

solution 3

50% ホルムアミド  
2×SSC (pH 5.0)

PBT

1×PBS  
0.1% Tween 20

blocking solution

1×PBS  
0.1% Tween 20  
10% 正常ヒツジ血清

NTMTL

100mM NaCl  
100mM Tris·HCl (pH 9.5)  
50mM MgCl<sub>2</sub>  
0.1% Tween 20  
2mM levamisole

各 RNA プローブは、以下に示すプラスミドを用いて作製した。*BF1* (*Kpn1/Xho1* fragment of cDNA; Tao and Lai, 1992), *Big1* (Yoshihara et al., 1994), *Bmp4/6/7* (Furuta et al., 1997), *Dlx1* (Bulfone et al., 1993), *Emx1/2* (Yoshida et al., 1997), *Ephb1* (IMAGE clone AA058194), *Fgf8* (Crossley and Martin, 1995), *Gli3* (Hui et al., 1994), *Lef1* (Galceran et al., 2000), *Lhx2* (Porter et al., 1997), *Lhx5* (*EcoRI/BamHI* fragment; Sheng et al., 1997), *Msx1* (*EcoRI/Xba1* fragment; Hill et al., 1989), *Msx2* (Catron et al., 1996), *Ng2* (Sommer et al., 1996), *Nkx2.1* (Kimura et al., 1996), *noggin* (Shimamura et al., 1995), *NP2* (Chen et al., 1997), *NT3* (Freidman et al., 1991), *Otx2* (Matsuo et al., 1995), *Pax6* (Walther and Gruss, 1991), *Prox1* (Oliver 1993), *SCIP* (Frantz et al., 1994), *Steel* (Yoshida et al., 1996), *Tcf3* (IMAGE clone 444295), *TTR* (Wakasugi et al., 1985), *Wnt1* (McMahon and Bradley, 1990), *Wnt2b* (IMAGE clone W44010), *Wnt3a* (Roelink and Nusse, 1991), *Wnt5a* (Parr et al., 1993), *Wnt8b* (IMAGE clone AA170920)

*BF1* は Lai 博士より戴いたプラスミドを鋳型として用いた。また、*Lhx5* および *Msx1* プ

ローブの作製に関しては、以下のように行なった。まず、データベースに登録されている塩基配列からオリゴヌクレオチドプライマーを作製し、マウス胚より抽出した total RNA から逆転写させて得た cDNA を用いて RT-PCR (Reverse Transcription - PCR) 法により増幅させた。増幅させた DNA 断片は制限酵素で消化し、プラスミドベクター pBluescript II CSK<sup>+</sup> (Stratagene 社) に連結してクローニングした。プラスミド DNA はアルカリ溶菌法により回収し、アンチセンスプローブが得られるように制限酵素処理により線状化した後、DIG 標識を行なった。

### (3.2) Whole mount *in situ* hybridization

使用した溶液、器具は上記同様に 0.1% DEPC 処理又は 180°C, 8 時間の乾熱滅菌により、RNase 活性を不活化した。方法は以下に示す。

マウス胚を冷 1×PBS 中で解剖し、4% PFA/PBS で一晩、4°C で固定した。その後、メタノール/PBT で段階的に脱水し、-20°C で保存した。*In situ* hybridization を行なうときは PBT で段階的に加水したのち、6% 過酸化水素水/PBT で 1 時間処理し、10µg/mL Proteinase K で 10 分間、2mg/mL グリシン/PBT で 5 分間、0.2% グルタルアルデヒド/4% PFA / PBT で 20 分間処理した。次に、RNA プローブを含まないハイブリダイゼーションバッファー中で 70°C, 1 時間 rocking しながら処理し、その後ハイブリダイゼーションバッファー中で 70°C, 一晩 rocking しながらハイブリダイゼーションを行なった。ハイブリダイゼーション後、solution 1 で 70°C, 30 分間× 2 回、solution 1/solution 2 (1:1) で 70°C, 30 分間洗浄後、100 µg/mL RNase A/solution 2 で 37°C, 30 分間×2 回処理した。その後 solution 3 で 70°C, 30 分間×2 回、TBSTL で室温, 5 分間×3 回洗浄し、blocking solution 中で室温, 1 時間処理した。その後、0.6% (W/V) マウス胚粉/PBT 中で 1 時間アフィニティー精製して 1% 正常ヒツジ血清/PBT にて 1/2000 希釈したアルカリフォスタファーゼ標識ヒツジ抗 DIG ポリクローナル抗体と 4°C で一晩反応させた。反応後、TBSTL で 1 時間× 5 回洗浄し、2mM levamisole と 0.1% Tween 20 を加えた BM purple アルカリホスファターゼ基質あるいは NBT/BCIP で発色を行なった。発色後は NTMTL で 10 分間×2 回、PBT (PH 5.5) で 10 分間、PBT (1mM EDTA 入り) で 5 分間×2 回洗浄し、10% ホルマリン/TBSTL あるいは PBT 中で 4°C に保存した。

以下に使用した溶液の組成を示すが、下に記載した溶液以外は「(3.1) 切片を用いた *in situ* hybridization」で用いた溶液と同一なので省略する。

#### TBSTL

140mM NaCl

2.7mM KCl

25mM Tris·HCl (PH7.5)

0.1% Tween 20

2mM levamisole

#### (4) *Wnt1* knock in *Emx2* マウスおよび *CA-ALK3* knock in *Emx2* マウスの作製

##### (4.1) ノックインベクターの構築

*Wnt1* cDNA (Fung et al., 1985) および活性化型 *Bmp* 受容体(*CA-ALK3*) cDNA (Suzuki et al., 1994) は、それぞれ京都大学高田慎治博士および基礎生物学研究所上野直人博士より戴いた。なお、*CA-ALK3* は *Bmp* type1 受容体のうち、*Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp7* をリガンドとする受容体である *ALK3* の 233 番アミノ酸であるグルタミン酸をアスパラギン酸へ置換することによって構造的に活性化型にされている。

まず、*Emx2* のゲノム DNA 断片の第 1 エクソン内にある ATG 以下の配列 (ATGTTTCAGCCGCGCCCAAG) を PCR によって *SphI* サイトを持った配列 (ATGTTTCAGCCGCGGTACGAG) に変えた。そして、*Wnt1* あるいは *CA-Alk3* の全長 cDNA と SV40 由来の *polyA* 配列および両端に *loxP* 配列を持った *neo* 遺伝子を含む遺伝子カセット (*Wnt1pA-loxP/neo/loxP* あるいは *CA-Alk3pA-loxP/neo/loxP*) をこの *SphI* サイトと *Emx2* の ATG より 106bp 下流にある *BamHI* サイトの間に挿入した (図 11A)。*loxP/neo/loxP* は *pgk1* プロモーター+*neo* を *loxP* で挟んで連結した。ATG より 5'側には *Emx2* 6.4kb のゲノム DNA 断片を連結した。さらに *loxP/neo/loxP* の後に、*Emx2* の第 1 エクソン内 ATG より 106bp 下流の *BamHI* サイトから第 2 エクソンを含む *SpeI* サイトまでの約 3.2kb の DNA 断片を連結させた (5', 3'側の相同組み換え領域はそれぞれ 6.4kb と 4.5 kb)。そして最後に、非同相組み換え体を選別するための *MCI* プロモーター+ジフテリア毒素-A (*DT-A*; Yagi et al., 1993b) を連結した。

##### (4.2) Primary fibroblast 細胞 (feeder 細胞) および ES 細胞の培養

初代繊維芽細胞は ICR 系統のマウスまたは *p53* 変異マウス(*neo* 耐性)の胎仔期 11~13 日目胚より単離し、PF 培地中にて 37°C/5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。この初代繊維芽細胞をマイトマイシン C で 2 時間処理することにより、細胞分裂を停止させ、ゼラチンコートした培養容器に播種し、feeder 細胞を作製した。feeder 細胞は feeder 細胞培養用培地 (以下、PF 培地) にて 37°C/5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。なお、feeder 細胞はエレクトロポレーションを行なう前日に調整した。

一方、ES 細胞 (TT2 細胞; Yagi et al., 1993a) は feeder 細胞上で ES 細胞培養用の培地 (以下、ES 培地) を用い、37°C/5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。以下に PF 培地および ES 培地の組成を示す。

PF 培地



DMEM

10% ウシ胎仔血清(FBS)

ES 培地

DMEM

20% ウシ胎仔血清 (FBS)

0.1mM 2-メルカプトエタノール

0.1mM 非必須アミノ酸

1mM ビルビン酸ナトリウム

1000U/mL Leukemia Inhibitory Factor (LIF)

#### (4.3) エレクトロポレーションによるベクターの導入

まず、エレクトロポレーション前の準備として、導入するベクターDNAの調製を行なった。100~250 $\mu$ gのノックインベクターを *NorI* により線状化し、その一部を1%アガロースゲルで電気泳動して切れ残りが無いことを確認したのち、フェノール/クロロホルム処理を2回行なった。次にエタノール沈殿を行ない、ペレットをHBS 250 $\mu$ Lにゆっくり混ぜながら溶かした。(溶けなければ、65 $^{\circ}$ Cで3~5分間温めて溶かした。)もう一度アガロースゲル電気泳動によるチェックを行ない、さらにO.D.測定により濃度を計算した。エレクトロポレーションに使用するときには、終濃度0.74 $\mu$ g/ $\mu$ L (全長19Kbの場合)になるようにHBSに希釈し、そのうちの100 $\mu$ Lを使用した。

一方、25cm<sup>2</sup>培養フラスコで培養したES細胞は0.25%トリプシン溶液を用いて回収し、30mLの冷ES培地に懸濁して氷上に保存した。そして、その一部を血球計算板にのせ、細胞数を測定した。ES細胞は冷却遠心機を用いて1200rpmで3~5分間遠心し、ペレットを冷HBS 10mLで洗った。この操作をもう一度繰り返した後、ペレットを冷HBS 0.3mLに溶かし、氷上で保存した。そこに55 $^{\circ}$ Cで3分間処理した線状化ベクターDNA 100 $\mu$ L (終濃度0.74 $\mu$ g/ $\mu$ L; 60nM)を加えた後、キュベット (BIORAD社)に移した。次にキュベットをGene Pulser (BIORAD社)にセットし、0.8V, 3.0 $\mu$ FDでエレクトロポレーションを行なった。エレクトロポレーション後のキュベットは10~15分間静置したのち、ES細胞を37 $^{\circ}$ Cで加温したES培地に懸濁し、*neo*耐性のfeeder細胞上に播種して培養した。

エレクトロポレーション翌日はES培地で培地交換し、さらにその翌日からは0.16mg/mL G418 (Nada et al., 1993; Yagi et al., 1993b)を含むES培地に交換し、約8日間培養した。以下にHBSの組成を記す。

HBS (HEPES-buffered saline)

280mM NaCl

10mM KCl  
1.5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
12mM デキストラン  
50mM HEPES

#### (4.4) G418 耐性 ES 細胞株のクローニング

G418 耐性コロニーをピックアップする前日に 24 穴プレートに G418 耐性の feeder 細胞を調整した。ピックアップはまず feeder 細胞が入った 24 穴プレートの培地を除き、そこに ES 培地 2mL を加え、37°C/5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで保温した。次に丸底の 96 穴プレートに 0.25% trypsin を 50μL ずつ分注し、分化してない G418 耐性 ES 細胞コロニーを 20μL のピペットマンを用いて吸い取り、96 穴プレートへ移した。その後、feeder 細胞を播いている 24 穴プレート中の ES 培地を 150μL 取り、コロニーが入った 96 穴プレートに加えてピペットマンを用いて懸濁し、その内 100μL を feeder 細胞が入った 24 穴プレートへ移して培養した。残り 100μL は PCR 用チューブに入れ、氷上で保存した。24 穴プレート中の ES 細胞は、翌日は ES 培地で、3 日後からは 0.16mg/mL G418 入りの ES 培地で培養した。そして、12 穴プレートに feeder 細胞を用意し、その翌日（培養 4 日目）に ES 細胞を 12 穴プレートに継代し、さらにその 3~4 日後には feeder 細胞入りの 6 穴プレートに継代した。

#### (4.5) 相同組み換え体同定のための long-PCR および Southern hybridization

PCR 用チューブに分けた ES 細胞から Proteinase K (Sigma 社)処理によりゲノム DNA を抽出し、相同組み換え体を同定するための long PCR 用テンプレートとして使用した。また、long PCR で相同組み換え体と判断された ES 細胞株については、相同組み換え体であることの最終的な確認を Southern hybridization により行なった。

long-PCR はターゲティングベクター内の *neo* カセット領域に設定したセンスプライマー p1 (5'-ATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTG)と、*Emx2* 3'側の相同領域外に設定したアンチセンスプライマー p2 (5'-CCAGTGAGTACAGGAAAGACTCAGTC)を用いて行なった。相同組み換え体の場合、4.5kb のバンドが得られた (図 11A)。long PCR は①94°C,60 秒の反応の後、②~③ (②98°C,20 秒、③68°C,8 分) を 45 サイクル行ない、最後に④72°Cで 20 分間反応させた。

Southern hybridization に関しては、まず ES 細胞株からゲノム DNA の抽出を行なった。初めに Proteinase K (プロメガ社)で 12 時間処理後、フェノール抽出、フェノール/クロロホルム抽出、クロロホルム抽出を行ない、最後にイソプロパノールおよびエタノール沈殿を行なった。そして 200μL の TE (pH 8.0)に溶かした。そして、ゲノム DNA を *Bam*HI で消化し、*Emx2* の第 3 エクソン内約 1.2kb の断片をプローブとして用いて (*Acc*III/*Eco*RI フラグメント; 図 7A) Southern hybridization を行ない、相同組み換え体では *Wnt1* knock in *Emx2*

の場合、10.5kb と 7kb のバンド、CA-*ALK3* knock in *Emx2* の場合、11.9kb と 7kb のバンドが得られるように設定した。さらに、ゲノム DNA を *EcoRI* で消化し、*neo* カセット内 0.5kb のプローブを用いて southern hybridization を行ない、6.9kb のバンドが得られることで最終的な確認とした。

Southern hybridization は、まず各 ES 細胞から得たゲノム DNA 約 10 $\mu$ g を *BamHI* あるいは *EcoRI* で消化した。線状化した DNA はフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行なった後、20 $\mu$ L の TE (pH 8.0) に溶かした。そして、0.8% アガロースゲルで 35V にて泳動した。泳動後、アガロースゲルはエチジウムブロマイド染色し、トランスイルミネーターを用いて泳動パターンを確認した。次に、アガロースゲルを 0.05N HCl により 15 分間  $\times$  2 回酸処理し、denaturation buffer により 15 分間および液交換して 30 分間アルカリ処理し、neutralization buffer により 15 分間および液交換して 30 分間中和処理を行なった。また、その間にニトロセルロースフィルター (PROTORAN; Schleicher & Schuell 社) を D.W. に 5 分間、20 $\times$ SSC に 30 分間浸した。そして、処理を終えたアガロースゲルの上にフィルターを重ね、上下を濾紙で挟んだ状態で重しを乗せて翌日まで静置することにより、アガロースゲルの DNA をフィルターに移した。翌日フィルターを剥がし、UV クロスリンカーを用いてフィルターに DNA を固定化した後、プローブを含まないハイブリダイゼーションバッファー入りのプラスチック製バックに入れて、42 $^{\circ}$ C で 1 時間以上インキュベーションした。その間にランダムラベリング法を用いたプローブの  $^{32}$ P 標識を行なった。まず、約 400ng のプローブ用 DNA 断片にランダムプライマー (宝酒造社) 2 $\mu$ L と全量で 14 $\mu$ L になるように蒸留水を加え、95 $^{\circ}$ C で 5 分間反応させた。次に、10 $\times$ buffer 2.5 $\mu$ L, dNTPs 2.5 $\mu$ L,  $^{32}$ P-dCTP 5 $\mu$ L, Klenow fragment 1 $\mu$ L (いずれも宝酒造社) を加えて混ぜた後、37 $^{\circ}$ C で 10 分間反応させて標識を行ない、その後 65 $^{\circ}$ C で 5 分間処理して酵素を失活させた。また、この反応中に TE (pH 8.0) 10mL をカラムに通し、カラム (NICK columns; アマシャム社) の平衡化を行なった。そして、処理後の標識されたプローブを含む溶液をカラムに通し、さらに TE (pH 8.0) 1mL を入れて、サービメーターで  $^{32}$ P 量が多い部分を回収した。回収したプローブはインキュベーションしたバックに加え、42 $^{\circ}$ C で一晩インキュベーションした。翌日、フィルターは solution1 中で 30 分間  $\times$  2 回、solution2 中で 60 $^{\circ}$ C, 30 分間  $\times$  2 回洗浄し、適度に風乾させた。その後、イメージングプレート (富士フィルム社) にシグナルを露出し、3 時間後にイメージアナライザー (BAS2000 II; 富士フィルム社) で解析した。

long PCR および Southern hybridization により相同組み換え体と判断された ES 細胞は、0.1% DMSO/ES 培地中に 5 $\times$ 10<sup>6</sup> 個/mL になるように懸濁し、1mL ずつバイアルに入れ、-70 $^{\circ}$ C で保存した。翌日液体窒素に移し、インジェクションに使用するまで保存した。以下に使用した各溶液の組成を記す。

denaturation buffer

1.5M NaCl

0.5N NaOH

neutralization buffer

3M NaCl

0.5M Tris·HCl (pH 7.5)

ハイブリダイゼーションバッファー

50% ホルムアミド

4×SSC

10×Denhardt's

50mM HEPES

0.5mg/mL サケ精子 DNA

solution1

2×SSC

0.1% SDS

solution2

0.1×SSC

0.1% SDS

#### (4.6) ES 細胞のインジェクションによるキメラマウスの作製

インジェクション用 ES 細胞の準備は、まず細胞を集める 2 時間以上前に一度培地交換を行なった。その後、培地を除き、EDTA-PBS 5mL で洗浄、0.25% trypsin 3~5mL で消化したのち、4.5mL の ES 培地に懸濁し、細胞数を測定した。細胞は最低  $2 \times 10^6$  個用意し、インジェクションを行なうまで氷上に保存した。余剰分はゲノム DNA 抽出用あるいは保存用に使用した。

相同組み換え ES 細胞はホルモン処理により過排卵させて得た ICR マウス 8 細胞期胚にマイクロマニピレーターを用いて微量注入した(Yagi et al., 1993b)。翌日まで *in vitro* で培養した後、胚盤胞胚に発生したものを偽妊娠させた ICR マウスの子宮に移植して発生させることによりキメラマウスを得た。そして、その毛色から ES 細胞の寄与率が高い個体を選び、CA-ALK3 knock in *Emx2* の場合はニワトリ  $\beta$ -actin プロモーターにより *Cre* を発現している雌性 *Cre* マウス(CAG-Cre; Sakai and Miyazaki, 1997)と交配し、子孫マウスを得た。一方、*Wnt1* knock in *Emx2* の場合は雌性 C57BL/6 マウスと交配しても子孫マウスが産まれな

かったので、キメラマウスにおいて解析を行なった。これら全てのマウスは熊本大学および理研で定められた指針に従い、それぞれの実験動物施設内の調節された環境下で飼育された。

#### (4.7) ノックインマウスの遺伝子型の同定

得られた子孫マウスあるいはキメラマウスの遺伝子型はマウスの尾または羊膜から抽出した鋳型 DNA を用いて PCR で解析することにより同定した。プライマー p4/p5 により正常 allele の同定、p1/p4 により *Wnt1* knock-in allele の同定、p3/p4 により *CA-Alk3* knock-in allele の同定を行なった。各プライマーの配列は以下の通りであり、位置は図中に示した(図 11A)。PCR は①94°C.3 分の反応の後、②~④ (②94°C,45 秒、③63°C.25 秒、④72°C,4 分) を 36 サイクル行ない、最後に⑤72°C で 15 分間反応させた。

#### プライマー配列

p3 : 5'- CATCTTCACAGGCTGCTAACAGTAAAC

p4 : 5'- GACTGGAATTGGCGTAGCTGAGTG

p5 : 5'- AAGAAGCGAACACTTCCATGGATTGTC

#### (5) BrdU を用いた細胞の増殖性の解析および birthdating study

細胞の増殖性を調べる時は、妊娠 11.5 日目、12.5 日目および 16.5 日目のマウスの腹腔内に BrdU (Nacalai Tesque 社) 50 mg/kg を注入し、2 時間後解剖してマウス胚を取り出した。また、birthdating study では妊娠 11.5 日目、13.5 日目あるいは 15.5 日目のマウスの腹腔内に BrdU 50 mg/Kg を注入し、18.5 日目あるいは 19.5 日目に解剖してマウス胚を取り出した。取り出したマウス胚は頸部で切斷し、カルノア固定液で固定した。その後、エタノールで段階的に脱水し、順次メチルベンゼン、ベンゼンにより透徹した。そして、60°C のパラフィン (Paraplast; Oxford 社) に入れ、4 ~5 回交換した後、包埋した。包埋したサンプルはマイクロトームを用いて 10 $\mu$ m の厚さに切り、42°C に温めた蒸留水中で伸展させ、シランコートされたスライドガラス (Dako 社) に接着させた。その後、スライドガラス上の切片はキシレンによりパラフィンを除き、エタノールにより段階的に加水し、水洗後免疫染色により BrdU のシグナルを検出した。

水洗したスライドは 2 N 塩酸で 90 分間処理した後、0.1M borate buffer(pH 8.5)で 10 分間  $\times$ 3 回洗い、中和した。その後、500 倍希釈したマウス抗 BrdU モノクローナル IgG 抗体(clone 33281A; PharMingen 社) で反応させたあと、ABC (Avidin-Biotin Complex) 法 (Vectastain Elite ABC Kit; Vector Laboratories 社) を用い、ビオチン標識抗マウス二次抗体で室温下 30 分間、ペルオキシダーゼ標識アビジン-ビオチン複合体で室温下 30 分間反応させた。最後に、DAB (diaminobenzidine tetrahydrochloride ; ジアミノベンジジン四塩酸) 基質キット (Vector

Laboratories 社) を用いて発色を行なった。発色は 0.01% DAB および 0.01% 過酸化水素水を含む 0.05M Tris buffer 中に行なった。発色後はヘマトキシリンによるカウンター染色を行ない、その後エタノールに通して脱水し、キシレンにより透徹後、非水溶性封入剤 (Eukitt; O.Kindler 社) で封入した。

細胞の増殖性を調べる時は、皮質領域の場合は幅 100 $\mu$ m あたりの総細胞数および BrdU 陽性細胞数を、天井板領域の場合は *Lhx5* 陽性領域における総細胞数および BrdU 陽性細胞数をカウントした。細胞の増殖性は labeling index (陽性細胞数/総細胞数: %) として表した。

#### (6) 細胞死の解析

細胞死の解析は、12.5 日目のマウス胚頭部を 10% ホルマリンで固定後、細胞増殖性を解析するときと同様に脱水、透徹、包埋し、パラフィン切片 (8 $\mu$ m) を作製した。その後、切片はキシレンによりパラフィンを除き、エタノールにより段階的に加水し、水洗後、染色を行なった。細胞死の解析については、TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 法を利用した。まず、20 $\mu$ g/mL Proteinase K で室温にて 20 分間処理し、In Situ Cell Death Detection Kit, AP (Boehringer Mannheim 社) を用いて、TdT (terminal deoxynucleotide transferase) 溶液 50 $\mu$ L と dNTPs mixture 450 $\mu$ L の混合液を TdT buffer で 2 倍希釈したもので 37 $^{\circ}$ C, 60 分間反応させた。そして、1% 正常馬血清 (Vector Laboratories 社) で室温, 20 分間処理後、converter - AP (アルカリホスファターゼ標識ヒツジ抗フルオレセイン抗体) と 4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。最後に、BM purple アルカリホスファターゼ基質で発色を行ない、水溶性封入剤 (Crystal Mount; コスモ・バイオ社) を用いて封入した。

#### (7) 免疫染色

MAP2, CSPGs, GAP43, TAG1, L1 それぞれに対する抗体を用いて免疫染色を行なう場合、マウス胚頭部をカルノア固定液で固定したのちパラフィン包埋を行ない、厚さ 8 $\mu$ m の切片を作製した。一方、calretinin, GABA, GFAP, glutamate に対する抗体を用いて免疫染色を行なう場合は 4% PFA で、さらに抗 RC2 抗体を用いる場合は PLP (2% PFA + 1.35% lysine) で固定した。その後、20% ショ糖/PBS に通し、OTC compound (TISSUETEK 社) で包埋したのち、クライオスタット (MICROM HM500M; Carl Zeiss 社) で厚さ 10~30 $\mu$ m の凍結切片を作製した。

作製したパラフィン切片はキシレンで脱パラフィン処理を行なった後、エタノールで段階的に加水処理し、最終的には TST (1% Triton X-100 を含む Tris-buffered saline) に戻した。そして、切片を 0.3% 過酸化水素水, 30% メタノール/TST で 30 分間ずつ処理した後、一次抗体で 4 $^{\circ}$ C 中、一晩反応させた。翌日一次抗体の洗浄後、HRP 標識されたヒツジ由来抗ウサギ IgG (COSMO BIO 社; 1:500) と反応させ、DAB 基質キットを用いて発色させた。

用いた一次抗体を以下に示す。ポリクローナル抗 calretinin 抗体(AB149: Chemicon 社; 1:500), モノクローナル抗 chondroitin sulfate 抗体(clone CS-56: Sigma 社; 1:600), モノクローナル抗 GAP43 抗体(clone GAP-7B10: Sigma 社; 1:2000), ポリクローナル抗 L1 抗体(Fukuda et al., 1997; 1:1000), モノクローナル抗 MAP2 抗体(clone HM-2: Sigma 社; 1:500), ポリクローナル抗 TAG1 抗体(Fukuda et al., 1997; 1:1000)

一方、凍結切片は一次抗体と 4°C 中で一晩反応させ、翌日洗浄した後、二次抗体と反応させ、DAB 基質キットを用いて発色させた。また、蛍光染色の場合は蛍光標識された二次抗体(Vector Laboratories 社)を用いた。用いた一次抗体については以下に示す。ポリクローナル抗 calretinin 抗体(AB149: Chemicon 社; 1:500), モノクローナル抗 GFAP 抗体(clone GF12.24: Progen 社; 1:500), モノクローナル抗 GABA 抗体(clone GB-69: Sigma 社; 1:2000), モノクローナル抗 glutamate 抗体(clone GLU-4: Sigma 社; 1:10000), モノクローナル抗 RC2 抗体(筑波大学山本雅之博士より供与いただいた; Mission et al., 1988))

さらに、抗リン酸化 SMAD1/5/8 抗体 (Persson et al., 1998)を用いて免疫染色を行なう場合、以下の方法で行なった。抗リン酸化 SMAD1/5/8 抗体は、基礎生物学研究所上野直人博士(Kurata et al., 2000)より頂いた。まず解剖して取り出したマウス胚頭部を前もって液体窒素で冷やしておいたイソペンタンに 1 分間沈め、すぐに液体窒素で冷やしておいたメタノールに移し、-80°C 中で 3 日間保存した。3 日後、メタノールを-20°C から 4°C へ、4°C から室温へと 2 時間毎に交換し、メタノール/キシレン(1:1)に 10 分間、キシレンに 10 分間浸した。その後、頭部組織はパラフィンに包埋し、厚さ 10µm の切片にした。切片はキシレンで脱パラフィン処理を行ない、エタノールで段階的に加水処理を行なった。次に、切片を 0.3% 過酸化水素水で 30 分間、4% ブロッキング用血清で 1 時間処理し、抗リン酸化 SMAD1/5/8 抗体(1:1500)と 4°C で一晩反応させた。翌日洗浄した後、切片を HRP 標識されたヒツジ由来抗ウサギ IgG (COSMO BIO 社; 1:500) と反応させ、DAB 基質キットを用いて発色させた。

#### (8) DNA 含有量の解析

DNA 量の解析は BrdU Flow Kit (Pharmingen 社)を用いた。まず妊娠 12.5 日目のマウスの腹腔内に 1mg 量の BrdU を注入し、2 日後解剖して終脳背側の皮質領域のみを各遺伝子型(正常胚,  $Emx2^{-/-}$ ,  $Emx1/2^{-/-}$ ) 3 例ずつ集めた。組織は各遺伝子型ごとにピペッティングしてばらばらにし、チューブ 1 本あたり  $1 \times 10^6$  個になるように集めた。DNA 量は FITC 標識したモノクローナル抗 BrdU 抗体および 7-ADD(7-amino-actinomycin)で染めたあとに、フローサイトメトリー(FACS Calibur; Becton Dickinson 社)を用いて測定した。

#### (9) スライス培養法を用いた細胞移動の解析

胎生 13.5 日目の終脳背側部より組織スライス(厚さ 200~300µm)を作製し、DMEM/

F12 (1:1)混合培地 (含: グルコース 2.9g, ペニシリン/ストレプトマイシン各 50U/mL, 重炭酸ナトリウム 1.2g, 牛胎仔血清 5%) にて、37°C/40% O<sub>2</sub>/5.3% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。なお、組織スライスが培地中で動かないようにコラーゲンゲルで固定した。細胞移動に関しては、内側基底核原基 (以下、MGE) に 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) あるいは Venus plasmid DNA (EYFP variant: 理研脳研の永井健治博士よりご提供いただいた: Nagai et al., 2002) をエレクトロポレーションにより導入し、そこから生まれる介在ニューロンを標識した。そして、2日間標識細胞の移動を記録した。

また、移植実験は以下の3通りの方法で行なった (図 17A)。(1) 13.5 日目の *Emx1/2*<sup>-/-</sup> あるいは正常胚 (以下、WT) から取り出した MGE 細胞をトリプシン処理でばらばらにして DiI 標識し、13.5 日目の WT あるいは *Emx1/2*<sup>-/-</sup> のスライスの MGE 部分に移植した。このとき、ドナー側の細胞はあらかじめ妊娠 11.5 日目の母親マウスの腹腔内に BrdU を注入することで BrdU 標識しておいた。そして、各スライスは細胞移動の有無を確認したあと、ビブラトームを用いて切片にし、抗 BrdU 抗体を用いた免疫染色を行なうことで宿主由来の細胞で二次的に DiI 標識されてしまった細胞とドナー由来の細胞とを区別した。(2) 13.5 日目の *Emx1/2*<sup>-/-</sup> あるいは WT から取り出した MGE 片 (直径約 150μm) を DiI 標識し、13.5 日目の WT あるいは *Emx1/2*<sup>-/-</sup> のスライスの MGE 部分に移植した。また、(3) 13.5 日目の *Emx1/2*<sup>-/-</sup> 由来背側部スライスと WT 由来腹側部スライスとを外側基底核原基 (以下、LGE) レベルで貼り合わせたもの、あるいは 13.5 日目の WT 由来背側部スライスと *Emx1/2*<sup>-/-</sup> 由来腹側部スライスとを LGE レベルで貼り合わせたものを作製し、MGE に DiI 標識あるいは Venus plasmid DNA をエレクトロポレーションした。その後数日間培養し、標識した細胞の移動について観察した。



## 7. 結果

### 第1節 *Emx1/2* 二重ホモ変異マウスの組織学的解析

*Emx1*<sup>-/-</sup> は Qiu 等あるいは吉田等の報告の通り生存でき、生殖能力も保持していた (Qiu et al., 1996; Yoshida et al., 1997) が、*Emx2*<sup>-/-</sup> は腎臓および精巣・卵巣・子宮などの泌尿生殖器系器官の欠損が認められ、生後まもなく死亡した (Pellegrini et al., 1996; Miyamoto et al., 1997; Yoshida et al., 1997)。一方、*Emx1*<sup>-/-</sup> と *Emx2*<sup>+/-</sup> の交配により得た *Emx1*<sup>+/-</sup> *Emx2*<sup>+/-</sup> あるいは *Emx1*<sup>-/-</sup> と *Emx1*<sup>+/-</sup> *Emx2*<sup>+/-</sup> の交配により得た *Emx1*<sup>-/-</sup> *Emx2*<sup>+/-</sup> はメンデルの法則に従い生まれ、生殖能力を有していた。これらに対して、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> はメンデルの法則に従い産まれるものの、*Emx2*<sup>-/-</sup> と同様に出生後死亡した。そのため表現型の解析は 18.5 日目以前の胎仔について行なった。

18.5 日目の *Emx2*<sup>-/-</sup> では大脳および嗅球が WT より小さく、左右に離れていた。これに対し、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> では大脳の大きさは著しく減少し、第三脳室に認められる天井板が露出していた (図 5A.a-c)。また、嗅球は認められなかった。

そこで次に、頭部切片を作製し、18.5 日目の表現型について組織学的に解析した。18.5 日目の *Emx2*<sup>-/-</sup> では大脳背側内側領域に異常が認められ、この領域に位置する大脳皮質の正中辺縁部および海馬領域の発達が悪かった。一方、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> では大脳背側内側のさらに広い領域が欠失し、大脳皮質の領域が狭くなっていた (図 5A.d-o)。そして、左右の大脳半球に挟まれた領域は天井板様の構造で占められていた。また、皮質領域については狭くなると同時に厚みについても明らかに WT, *Emx2*<sup>-/-</sup> より減少していた。間脳に関しては松果体の形態が明確ではなかったが、それ以外はほぼ正常に発生していた。

WT において、皮質の最も背側内側領域には原皮質を生じる。原皮質は海馬を含んだ領域であり、鉤状回, CA 領域, 齒状回, 海馬采/脳弓から成っている。これらの構造は 18.5 日目の *Emx1*<sup>-/-</sup> では WT と同様に認められた (Yoshida et al., 1997)。また、*Emx2*<sup>-/-</sup> では組織学的には齒状回は認められなかったが、CA 領域は小さくなっているものの、認められた (図 5A.k, n; Yoshida et al., 1997)。それに対して *Emx1/2*<sup>-/-</sup> では、内側領域が著しく形成不全であり、海馬領域が形成されておらず、内側は脈絡叢様構造のみ認められた (図 5A.l, o)。また、第三脳室, 第四脳室, 側脳室で認められるはずの脈絡叢は第三, 第四脳室では認められたが、側脳室では認められなかった。脈絡叢は脳室内に脳脊髄液を分泌し、それにより側脳室は発達するが、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> では脈絡叢の欠失と対応して側脳室はほとんど発達していなかった。

終脳では 12.5 日目までに左右に膨らんだ脳胞が形成され、天井板, 原皮質, 新皮質および基底核隆起 (LGE, MGE) の構造が明らかになってくる (図 5A.p)。*Emx1/2*<sup>-/-</sup> では、この時期すでに背側内側の後方領域で顕著な異常が認められ、脳胞は著しく小さく、終脳背

側内側後方の広い範囲で皮質の神経上皮を欠失していた (図 5A.u)。そして、天井板は *Emx2*<sup>-/-</sup> に比べて著しく広がっていた。また、*Emx2*<sup>-/-</sup> では天井板と内側壁の間に intermediary region (以下、IMR) が認められるが (図 5A.q; 矢印)、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> では存在しなかった (図 5A.r)。さらに、*Emx2*<sup>-/-</sup> ではアモン角は小さく、また形態学的にも異常が認められるものの形成されるのに対し、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> ではアモン角を認めることができなかった (図 5A.s-u)。このように、終脳背側内側部で見られる異常は、*Emx2*<sup>-/-</sup> に比べて *Emx1/2*<sup>-/-</sup> の方が明らかに重篤であった。一方、皮質の前方側方部 (新皮質領域) および基底核隆起には、この時期異常が認められなかった。

上記の異常に加え、13.5 日、15.5 日と発生が進んでいくにつれ、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> では WT あるいは *Emx2*<sup>-/-</sup> と比べて明らかに終脳背側の皮質領域の発達に異常が認められるようになった (図 5B.a-l)。18.5 日目の WT の皮質では、表層側より辺縁帯、皮質板、皮質下層、中間帯、脳室下帯 / 脳室帯から成る層構造が明らかになってくる。それに対して、*Emx2*<sup>-/-</sup> では皮質板、脳室下帯 / 脳室帯は認められるものの、それ以外の層の区別が明瞭ではなかった。一方、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> では脳室下帯 / 脳室帯は認められるものの、それより外側の層構造はほぼ認められなかった (図 5B.a-c、図 19A. C. D)。そしてこの皮質の異常は、11.5 日目胚の終脳皮質領域では認められなかった (図 5B.j-l)。

以上のことから、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> の終脳で認められた異常は、胎生 11.5 日目までに起こる背側正中内側部の領域形成に由来する異常と、胎生 11.5 日目以降に顕著な皮質形成に由来する異常の大きく分けて二つに区別されることが明らかとなった。*Emx1*, *Emx2* は、それぞれの形成機構において相補的に機能していると推測される。そこで、両形成機構における *Emx1*, *Emx2* の相補的機能について解析を行なった。

図 5.の説明 *Emx1/2<sup>-/-</sup>*の脳および脳原基である終脳における異常の組織学的解析。

(A)は終脳背側内側領域における異常を示す。(a-o)は18.5日目の脳の外観(a-c)、矢状断切片(d-f)、前頭断切片(g-l)、水平断切片(m-o)を示し、(d-o)はニッスル染色を行なった染色像である。(j-l)は(g-i)の背側正中領域の拡大図。(p-r)は12.5日目胚の前頭断切片、(s-u)は11.5日目胚の矢状断切片を示し、いずれもヘマトキシリン/エオシン染色を行なった染色像である。(a, d, g, j, m, p, s)はWT、(b, e, h, k, n, q, t)は*Emx2<sup>-/-</sup>*、(c, f, i, l, o, r, u)は*Emx1/2<sup>-/-</sup>*である。(d-f, m-o, s-u)は左側が吻側である。図中(f)の矢印は皮質を、矢じりは第三脳室の脈絡叢を示す。図中(q)の矢印は皮質と天井板に挟まれたintermediary region(IMR)を示しており、*Emx1/2<sup>-/-</sup>*ではそれが認められない(r)。スケールバーは(a-i)が500 $\mu$ m、(j-l)が100 $\mu$ m、(m-o)が240 $\mu$ m、(p-r)が200 $\mu$ m、(s-u)が280 $\mu$ m。略語：Ah: アモン角、CA: CA領域、DG: 歯状回、DT: 視床背側、EP: 松果体、HIP: 海馬、IC: 内包、LGE: 外側基底核隆起、MGE: 内側基底核隆起、MP: 原皮質、NC: 新皮質、r: 天井板。

(B)は終脳皮質領域における異常を示す。(a-c)は18.5日目胚、(d-f)は15.5日目胚、(g-i)は13.5日目胚、(j-l)は11.5日目胚の前頭断切片で、ニッスル染色を行なった染色像である。(a, d, g, j)はWT、(b, e, h, k)は*Emx2<sup>-/-</sup>*、(c, f, i, l)は*Emx1/2<sup>-/-</sup>*の終脳左半球を示す。スケールバーは(a-f)が300 $\mu$ m、(g-l)が450 $\mu$ m。略語：LGE: 外側基底核隆起、MGE: 内側基底核隆起、MP: 内側壁、NC: 新皮質、PA: 淡蒼球、ST: 線条体。

图5.A

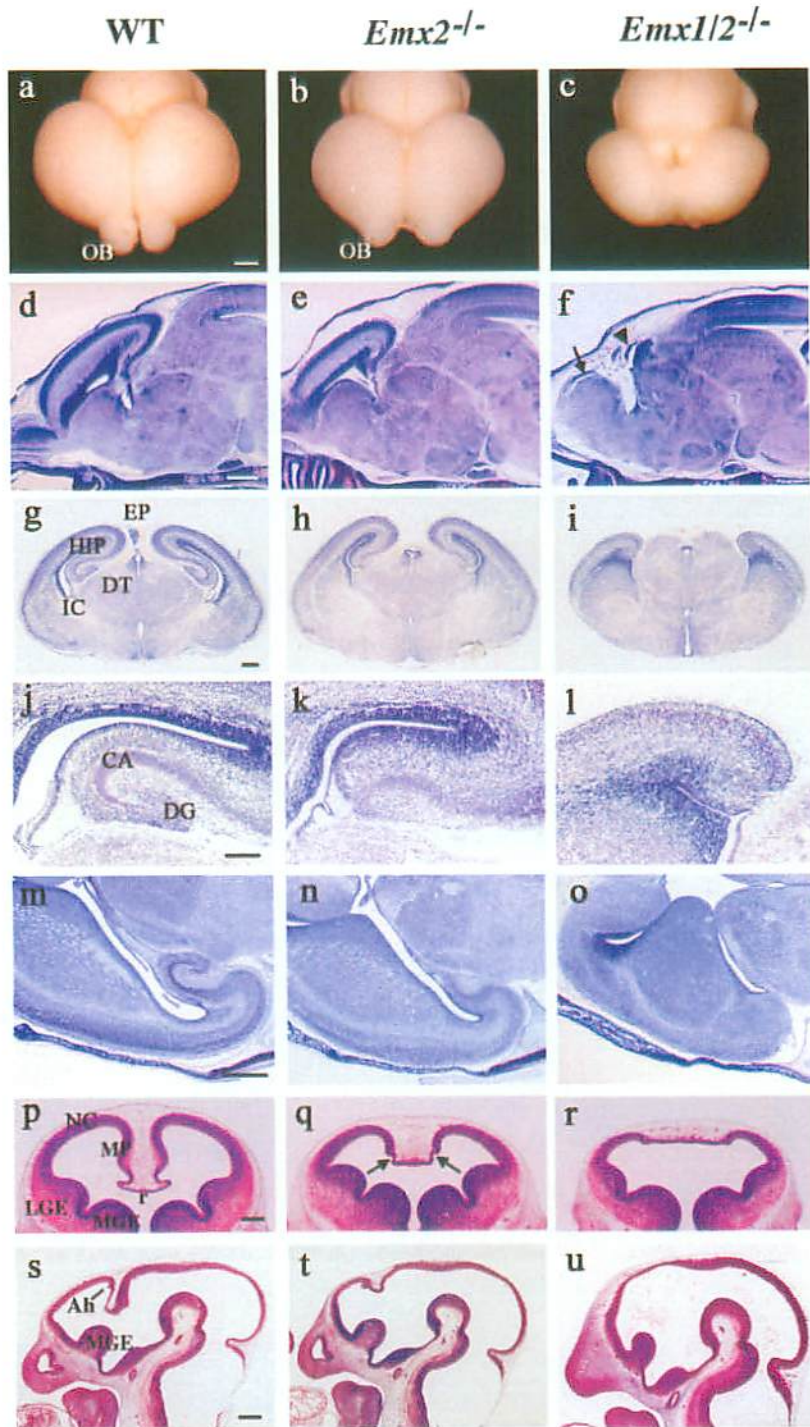
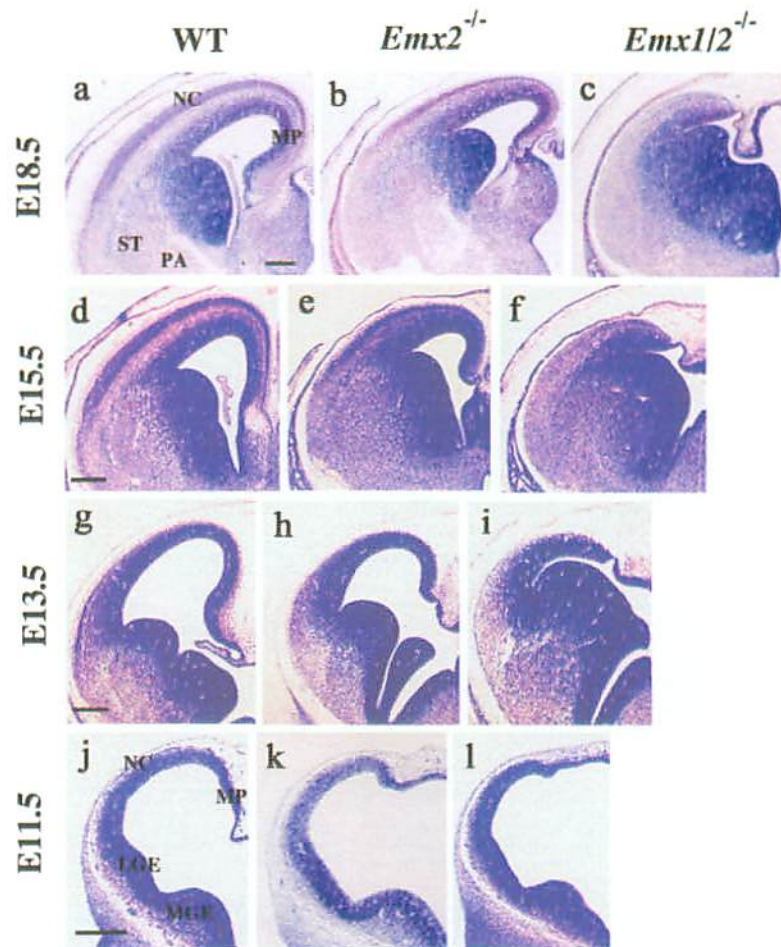


图5.B



## 第2節 マウス終脳背側内側部の領域形成における *Emx1*, *Emx2* の機能解析

### (1) 終脳の領域形成に関する解析

組織学的解析では 12.5 日目の *Emx1/2*<sup>-/-</sup> における終脳背側/腹側境界の形成は正常であるように思われたが (図 5A.r)、そのことについて分子マーカーを用いて確認した。*Lhx2* および *Gli3* は脈絡叢、天井板を除く終脳全体の神経上皮で発現する。また、*Gli3* は cortical hem で発現するが、*Lhx2* は発現しない (図 6A, D; Hui et al., 1994; Grove et al., 1998; Bulchand et al., 2001)。*Emx2*<sup>-/-</sup> および *Emx1/2*<sup>-/-</sup> におけるこれらの発現は、拡大した天井板様構造以外では WT と同様に認められた (図 6B, C, E, F)。一方、*BF1* は終脳の脳室帯内の前駆細胞および分化ニューロンで広範囲にわたって発現しているが、原皮質領域では内側に向かって発現が勾配状に減少し、cortical hem や脈絡叢あるいは天井板では発現しない (図 6G; Tao and Lai, 1992; Furuta et al., 1997; Galceran et al., 2000)。この背側内側での *BF1* の発現領域は *Emx2*<sup>-/-</sup> では減少しており、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> ではさらに減少していた (図 6H, I)。しかし、依然内側に向かっての発現勾配は確認された。

さらに、*Pax6* および *Neurogenin2* (以下、*Ngn2*) は皮質を形成する神経上皮でのみ発現し、さらに脈絡叢、天井板、終脳腹側領域では発現が認められない (図 6J, M, P; Sommer et al., 1996; Walther and Gruss, 1991)。*Emx2*<sup>-/-</sup> および *Emx1/2*<sup>-/-</sup> では、*Pax6* および *Ngn2* の発現は背側の神経上皮に限局しており、また、拡大した天井板では認められなかった (図 6K, L, N, O, Q, R)。一方、LGE, MGE で発現する *Dlx1* および MGE のみで発現する *Nkx2.1* は背側皮質領域では発現しない (図 6S, V; Kimura et al., 1996; Bulfone et al., 1993; Shimamura et al., 1995)。*Emx2*<sup>-/-</sup> および *Emx1/2*<sup>-/-</sup> でのこれらの発現は、WT と比較して変化は認められず、腹側部に限局していた (図 6T, U, W, X)。このことから、終脳背側/腹側の領域形成は正常に行なわれていると推測された。以上の結果から、組織学的解析の結果と一致して、*Emx2*<sup>-/-</sup> および *Emx1/2*<sup>-/-</sup> の終脳における初期の異常は背側内側領域に限局されることが示唆された。

図 6. の説明 終脳領域形成における異常。

各領域特的な分子マーカーの発現を *in situ* hybridization 法により解析した。(A-O, S-X) は 12.5 日目胚の前頭断切片、(P-R) は 11.5 日目胚の頭部。使用した RNA プローブ名は図中に示した通りである。(A, D, G, J, M, P, S, V) は WT、(B, E, H, K, N, Q, T, W) は *Emx2*<sup>-/-</sup>、(C, F, I, L, O, R, U, X) は *Emx1/2*<sup>-/-</sup> の終脳を示す。図中(A, B, G, H)の矢印は *Lhx2* あるいは *BF1* 陰性の cortical hem を示す。図中(Q, R)の星印は終脳および間脳の背側正中で広がった *Ngn2* 陰性領域を示す。スケールバーは(A-O, S-X)が 240 $\mu$ m、(P-R)が 300 $\mu$ m。

図6

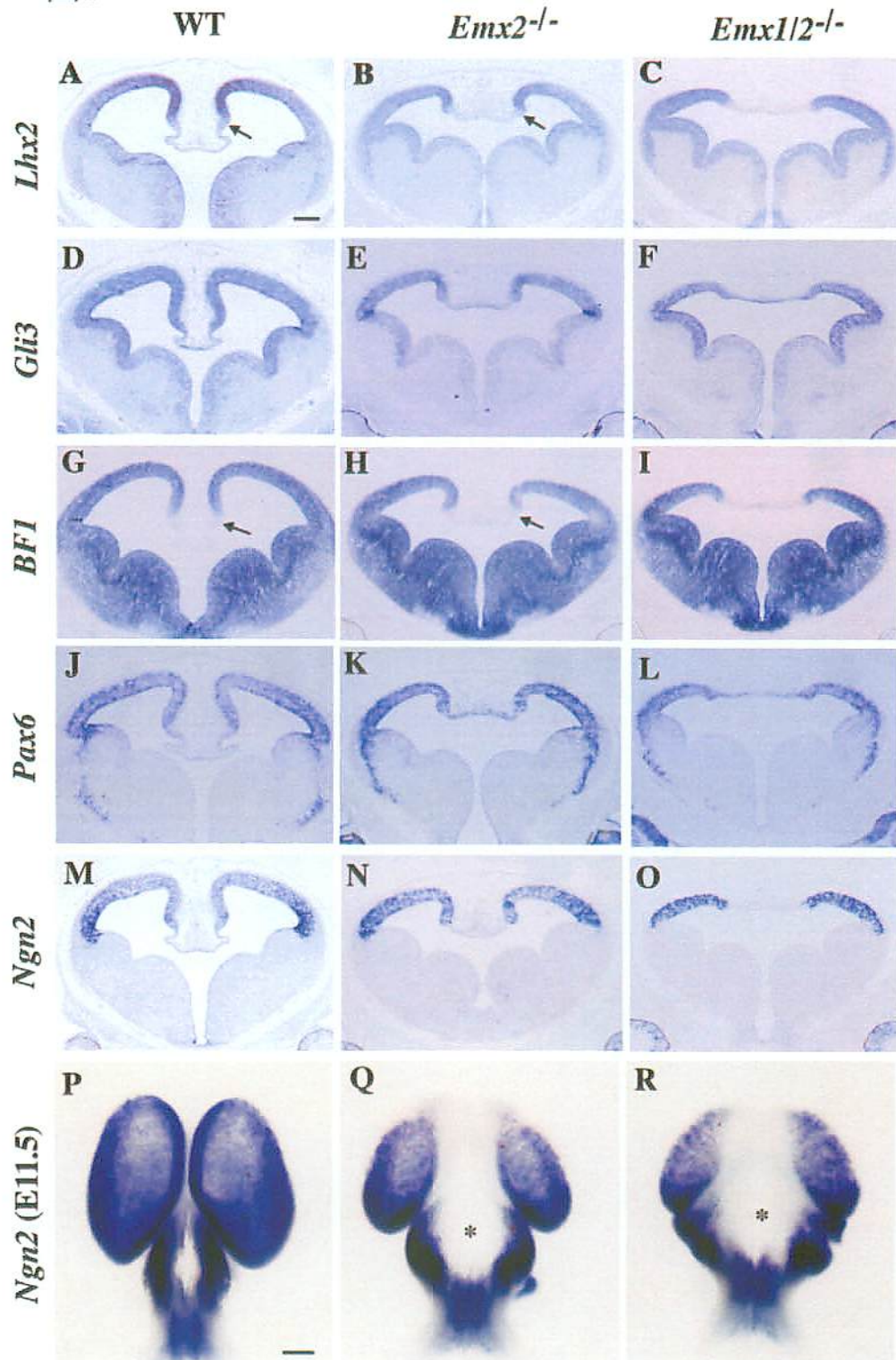
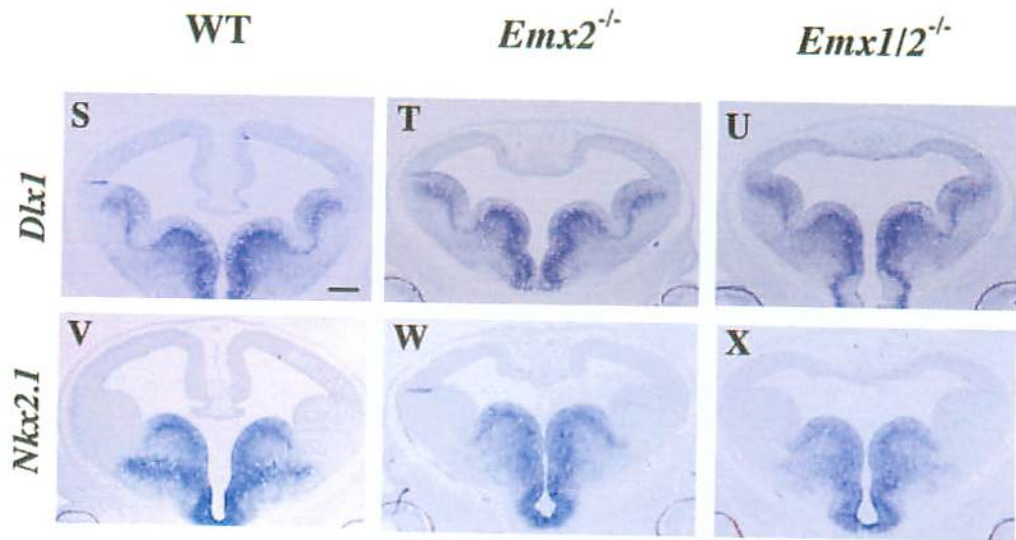


図6の続き





## (2) 天井板および脈絡叢の形成に関する解析

次に、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> の脳胞に挟まれた終脳背側内側部の構造が天井板か否かについて解析した。まず 12.5 日目において超薄切片を作製し、どのような細胞で構成されているかを観察したところ、広がった構造では天井板に特徴的な核凝縮した細胞が多数認められた (図 7A-C)。また、TUNEL 法を用いた解析を行なった結果、*Emx2*<sup>-/-</sup> および *Emx1/2*<sup>-/-</sup> の広がった構造において多くの細胞死が確認された (図 7D-F)。次に 12.5 日目において脈絡叢や cortical hem では発現しないが天井板では発現する *Lhx5* (図 7G; Zhao et al., 1999) の発現解析を行なった。その結果、*Lhx5* は *Emx2*<sup>-/-</sup> および *Emx1/2*<sup>-/-</sup> の広がった天井板様構造で発現が認められた (図 7H, I)。そして、*Emx2*<sup>-/-</sup> の IMR では *Lhx5* の発現は認められなかった。皮質と天井板を比較した場合、天井板のもう一つの特徴として細胞増殖性の減少が挙げられる。そこで、BrdU の取り込み効率を指標にして皮質領域および *Lhx5* 陽性領域の細胞増殖性について検討した。それぞれの遺伝子型について 3 個体ずつ解析した結果、皮質領域における labeling index (BrdU 陽性細胞数/総細胞数:%) は WT が 29.6%、*Emx2*<sup>-/-</sup> が 29.9%、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> が 27.2%であったのに対し、*Lhx5* 陽性領域では WT が 22.7%、*Emx2*<sup>-/-</sup> が 20.1%、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> が 12.4%であった。このようにいずれの遺伝子型においても *Lhx5* 陽性領域における細胞の増殖性は皮質領域よりも低かった。以上の結果から、我々は背側内側の広がった領域は天井板であると結論付けた。

WT では脈絡叢は天井板の両端に生じる。そこで、天井板が広がる *Emx2*<sup>-/-</sup> および *Emx1/2*<sup>-/-</sup> では脈絡叢は正常に生じるのかどうかについて調べた。脈絡叢では *Lhx5* は発現しないものの、12.5 日目から脈絡叢の分化と共に *transthyretin* (以下、*TTR*) が発現する (図 7J)。12.5 日目における *TTR* の発現解析の結果、*Emx2*<sup>-/-</sup> の *Lhx5* 陰性領域である IMR では *TTR* の発現は激減しているが、認めることができた (図 7H, K; 矢印)。しかし、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> ではその発現は認められず (図 7L)、発生が進んだ 14.5 日目あるいは 18.5 日目でも側脳室においては認められなかった (図 7J'-L')。一方、第三および第四脳室では *TTR* の発現は正常に認められた (図 7J'-L'; 矢じり)。

また、*Otx2* および *Msx1* は 12.5 日目において脈絡叢上皮、cortical hem の腹側 (最も内側) で発現する (図 7M, P; Hill et al., 1989; Boncinelli et al., 1993)。さらに、*Msx1* は天井板においても弱いながら発現する。*Emx2*<sup>-/-</sup> における *Otx2* および *Msx1* の発現は、*TTR* 陽性/*Lhx5* 陰性の IMR で認められた (図 7N, Q; 矢印)。一方 *Emx1/2*<sup>-/-</sup> では、*Lhx5* 陰性でかつ、*Otx2* が発現し、*Msx1* が強く発現する脈絡叢や腹側の cortical hem は一切認められなかった (図 7I, O, R)。また、*Emx2*<sup>-/-</sup>、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> いずれにおいても広がった天井板領域では、*Msx1* だけでなく *Otx2* の発現も認められた。さらに、*Bmp4*、*Bmp6*、*Bmp7* は脈絡叢を含む終脳背側内側領域で発現する (Furuta et al., 1997; Grove et al., 1998; Tole et al., 2000a)。*Emx1/2*<sup>-/-</sup> においてこれらの発現は著しい減少が認められ、広がった天井板でのみ発現していた (以下参照;

図 9H, I)。

以上の結果から、*Emx2*<sup>-/-</sup>で認められた IMR は脈絡叢と同じ遺伝子発現上の特徴を有することがわかった。さらに、*Emx1/2*<sup>-/-</sup>の背側内側で異常に広がった領域は天井板であり、脈絡叢が形成されないことがわかった。しかしながら、*Emx2*<sup>-/-</sup>および*Emx1/2*<sup>-/-</sup>の拡大した天井板は同時に WT とは異なる遺伝子発現特性も示した。すなわち、WT の天井板では *Otx2* は発現しないが、*Emx2*<sup>-/-</sup>および*Emx1/2*<sup>-/-</sup>の天井板ではその発現が認められた (図 7N, O)。また、本来発現しないはずの *Ephb1* の発現も天井板において認められた (図 9A-C)。一方、通常 *noggin* は天井板全体で発現するが、*Emx2*<sup>-/-</sup>、*Emx1/2*<sup>-/-</sup>の広がった天井板では *noggin* の発現は認められなかった (図 7S-U)。同様に *Wnt8b* も 12.5 日目の天井板で発現するが、*Emx1/2*<sup>-/-</sup>の広がった天井板では発現が減少していた (図 9P-R)。12.5 日目において、*Fgf8* は終脳と間脳の背側境界部と commissure plate および天井板で発現するが (Crossley and Martin, 1995)、脈絡叢では発現しない (図 7V; 挿入図)。*Emx2*<sup>-/-</sup>、*Emx1/2*<sup>-/-</sup>における *Fgf8* の発現を調べた結果、*Emx2*<sup>-/-</sup>では commissure plate での発現が広がっていた。しかしながら、*Emx1/2*<sup>-/-</sup>ではさらに広がっているわけではなかった (図 7V-X)。それに加えて、*Emx1/2*<sup>-/-</sup>の広がった天井板では背側正中に *Fgf8* 陰性の領域が広く認められた。このことから、*Emx2*<sup>-/-</sup>、*Emx1/2*<sup>-/-</sup>の終脳背側正中部の異常は単純な天井板の拡大ではないことが推測された。

図 7.の説明 天井板の拡大および脈絡叢の形成不全。

(J-L)を除き、いずれも 12.5 日目胚終脳の前頭断切片。(J-L)は 14.5 日目胚の前頭断切片。(A-C)は拡大した背側正中部の超薄切片で、そこに占める細胞の配置を示す。(D-F)は TUNEL 法を用いた細胞死の検出。(G-X)は *in situ* hybridization による発現解析。使用した RNA プローブ名は図中に示した通りである。(A, D, G, J, J', M, P, S, V)は WT、(B, E, H, K, K', N, Q, T, W)は *Emx2*<sup>-/-</sup>、(C, F, I, L, L', O, R, U, X)は *Emx1/2*<sup>-/-</sup>の終脳を示す。図中(H, K)の矢印はそれぞれ *Lhx5* 陰性、*TTR* 陽性の IMR を示す。図中(J-L)の矢印および矢じりは、それぞれ側脳室および第四脳質の脈絡叢を示す。図中(N, Q)の矢印はそれぞれ *Otx2* 陽性、*Msx1* 陽性の IMR を示す。WT では cortical hem の腹側部で発現が認められる *Otx2* および *Msx1* は、*Emx2*<sup>-/-</sup>では IMR だけでなく背側内側壁の端でも発現していることから、この領域は cortical hem の腹側部であると思われる(N, Q)。また、WT の終脳を背側から見ると、天井板が大腦半球で隠れているが、挿入図にあるように天井板では *Fgf8* の発現が認められる(V)。一方、*Emx1/2*<sup>-/-</sup>の天井板では正中に *Fgf8* 陰性領域があり、この陰性領域は間脳の天井板 (矢印)でも認められる(X)。スケールバーは(A-C)が 15 $\mu$ m、(D-U)が 300 $\mu$ m、(V-X)が 120 $\mu$ m。

图7

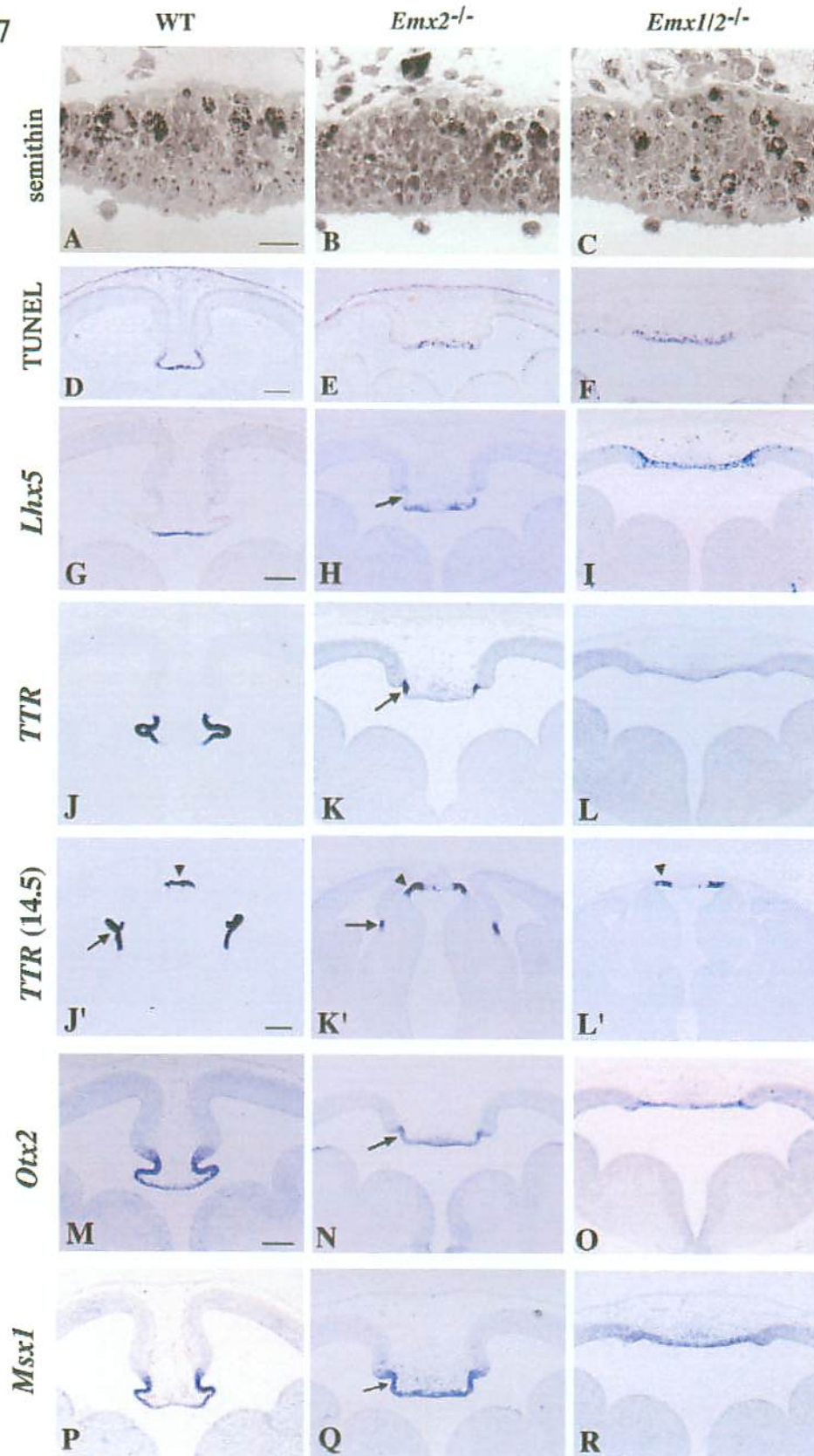
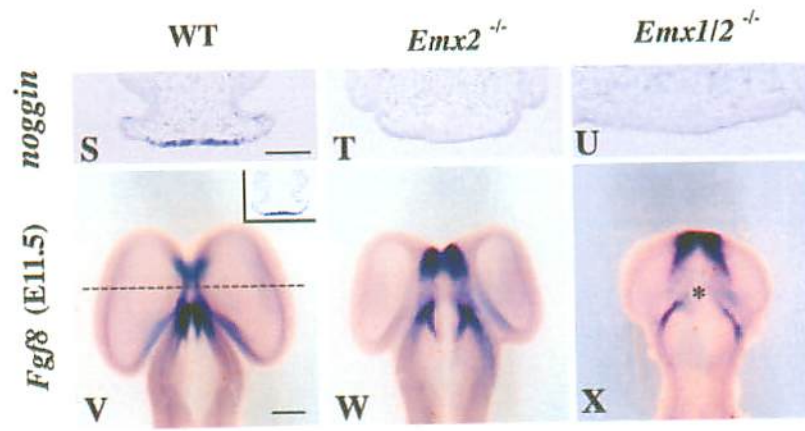


図7の続き



### (3) 原皮質領域の形成に関する解析

組織学的解析から、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> は原皮質領域を欠失し、その代わりに天井板が広がっていると考えられた。そのことを調べるために、まず初めに 18.5 日目において背側内側領域のマーカー分子を用いて解析を行なった。以下に用いたマーカー分子とその発現箇所を記す。*Prox1*: 歯状回 (図 8A; Oliver, 1993)、*Steel*: 歯状回, CA 領域, 新皮質 (図 8D; Tole et al., 2000a)、*SCIP*: CA1 領域, 新皮質 (図 8G; Frantz et al., 1994)、*Big1*: 鉤状回, 新皮質 (図 8J; Yoshihara et al., 1994; Lee et al., 2000)、*NT3*: cingulate cortex (図 8M; Freidman et al., 1993; Lee et al., 2000)、*NP2*: 海馬全体, 新皮質 (図 8P; Chen et al., 1997; Galceran et al., 2000)。各分子の発現解析の結果、*Emx2*<sup>-/-</sup> では大脳背側内側の *Prox1*, *Steel*, *Big1*, *NT3*, *NP2* 発現領域は減少し (図 8 B, E, K, N, Q)、*SCIP* を発現している細胞は拡散していた (図 8H)。また、*Emx2*<sup>-/-</sup> では組織学的には歯状回を同定できなかったが、*Prox1* 陽性細胞が検出された (図 5B; Yoshida et al., 1997; Tole et al., 2000a)。それに対して、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> ではこれらの分子の背側内側部での発現は認められなかった (図 8C, F, I, L, O, R)。一方、これらの分子の間脳, 中脳での発現は保持されていた。この 18.5 日目におけるマーカー分子の発現解析結果から、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> では原皮質領域全体を欠失していることが示唆された。さらに、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> の新皮質領域では *Steel* および *NP2* の発現は残っていたが、*SCIP* および *Big1* の発現が失われており、このことは *Emx1/2*<sup>-/-</sup> では大脳新皮質の層特異的な細胞分化が起こっていないことを示唆していると推測された (後述)。

海馬の初期マーカー分子である *Ephb1* および *Prox1* は (図 9A; Galceran et al., 2000; Tole et al., 2000b)、12.5 日目の *Emx1/2*<sup>-/-</sup> において両方とも発現が認められなかった (図 9C; データ示さず)。一方、*Emx2*<sup>-/-</sup> における *Ephb1* の発現はわずかに認められ、むしろ広がった天井板で発現していた (図 9B)。 *Lef1* は 12.5 日目の終脳では将来の海馬領域と新皮質の内側部で発現し、cortical hem では発現しない (図 9D; Galceran et al., 2000)。 *Emx2*<sup>-/-</sup> における *Lef1* の発現解析では、*Lef1* 陽性領域と *Lef1* 陰性領域 (cortical hem) が明らかに認められたが (図 9E)、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> では *Lef1* 陽性領域がかなり減少しており、さらに *Lef1* 陰性の cortical hem も認められなかった (図 9F)。

通常、*Bmp* 遺伝子群は 12.5 日目において脈絡叢や天井板を含む終脳背側内側部で発現する。それらの中でも *Bmp6* は最も広く発現しており、その発現は cortical hem にまで達している (図 9G)。この *Bmp6* の発現は、*Emx2*<sup>-/-</sup> では cortical hem で認められるが (図 9H; 矢印)、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> では *Lhx5* の発現と一致して広がった天井板でのみ認められた。そして、*Bmp6* 陽性/*Lhx5* 陰性の領域、つまり cortical hem は認められなかった (図 7I, 9I)。さらに、*Otx2* および *Msx1* は WT において腹側の cortical hem で発現するが、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> では *Lhx5* 陰性/*Msx1* 陽性/*Otx2* 陽性の領域は前述の通り存在しなかった (図 7I, O, R)。一方、12.5 日目の終脳では種々の *Wnt* 遺伝子が cortical hem や背側内側壁を含む領域で発現している (Theil et al., 1999)。 *Wnt3a*, *Wnt5a*, *Wnt2b* の発現は cortical hem あるいは海馬采に局限し、

それに対して *Wnt8b* は cortical hem で強く、背側内側壁で勾配状に減少しながら発現している (図 9J, M, P; Grove et al., 1998; Lee et al., 2000)。 *Emx2*<sup>-/-</sup> において、 *Wnt3a* の発現領域は減少しているものの認められたのに対し、 *Emx1/2*<sup>-/-</sup> では *Wnt3a* の発現が完全になくなっていた (図 9K, L)。さらに、 *Emx2*<sup>-/-</sup> では *Wnt2b* および *Wnt5a* の発現も認められたが、 *Emx1/2*<sup>-/-</sup> ではいずれの発現も消失していた (図 9N, O; データ示さず)。また、 *Wnt8b* 陽性領域は *Emx2*<sup>-/-</sup> では減少し、 *Emx1/2*<sup>-/-</sup> ではさらに減少していた (図 9Q, R)。特に *Emx1/2*<sup>-/-</sup> では *Wnt8b* の発現が最も強い領域を欠失していた (図 9R)。以上の結果から、 *Emx1/2*<sup>-/-</sup> は 12.5 日目ですでに cortical hem を含む原皮質領域を欠失していることが示唆された。

図 8. の説明 18.5 日目における大脳原皮質の異常。

全て背側内側領域の前頭断切片であり、各領域特異的に発現する分子マーカーの発現を *in situ* hybridization 法により解析した。使用した RNA プローブ名は図中に示した通りである。(A, D, G, J, M, P) は WT、(B, E, H, K, N, Q) は *Emx2*<sup>-/-</sup>、(C, F, I, L, O, R) は *Emx1/2*<sup>-/-</sup> を示す。図中(A, B)の矢印は *Emx2*<sup>-/-</sup> において形態学的には認めがたい *Prox1* 陽性の歯状回を示す(図 5A.k, n; Tole et al., 2000a)。図中(D, E)の矢印は *Steel* 陰性の鉤状回、(J, K)の矢印は *Big1* 陽性の鉤状回、(M, N)の矢印は *NT3* 陽性の cingulate cortex、(R)の矢印は *NP2* 陽性の新皮質を示す。スケールバーは(A-C, J-R)が 180 $\mu$ m、(D-F)が 200 $\mu$ m、(G-I)が 90 $\mu$ m。

図 9. の説明 12.5 日目における終脳背側内側壁の異常。

いずれも前頭断切片を作製したのち、各領域特異的な分子マーカーの発現を *in situ* hybridization 法により解析した。使用した RNA プローブ名は図中に示した通りである。(A, D, G, J, M, P) は WT、(B, E, H, K, N, Q) は *Emx2*<sup>-/-</sup>、(C, F, I, L, O, R) は *Emx1/2*<sup>-/-</sup> を示す。図中(A, B)の矢印は *Ephb1* 陰性領域、(D, E)の矢印は *Lef1* 陰性領域、(G, H)の矢印は *Bmp6* 陽性領域、(J, K)および(M, N)の矢印はそれぞれ *Wnt3a* および *Wnt5a* 陽性の cortical hem を示す。図中(B, F)の矢じりは著しく減弱した *Ephb1* および *Lef1* の発現を示し、(B, C)の白抜き矢印は拡大した天井板での *Ephb1* の異所的発現を示す。 *Emx2*<sup>-/-</sup> および *Emx1/2*<sup>-/-</sup> の終脳腹側における *Ephb1* の発現は正常に認められる。スケールバーは 300 $\mu$ m。

图8

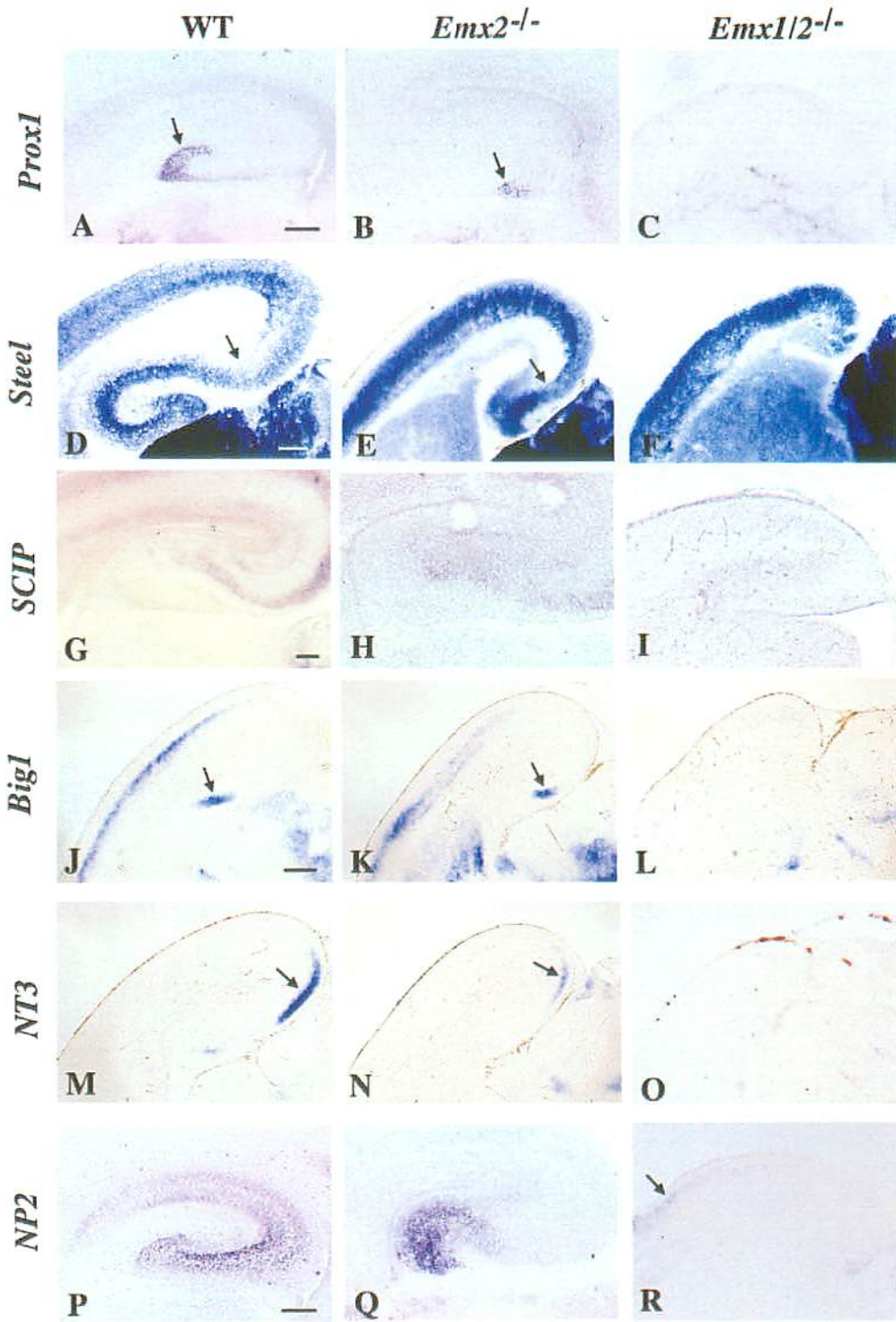
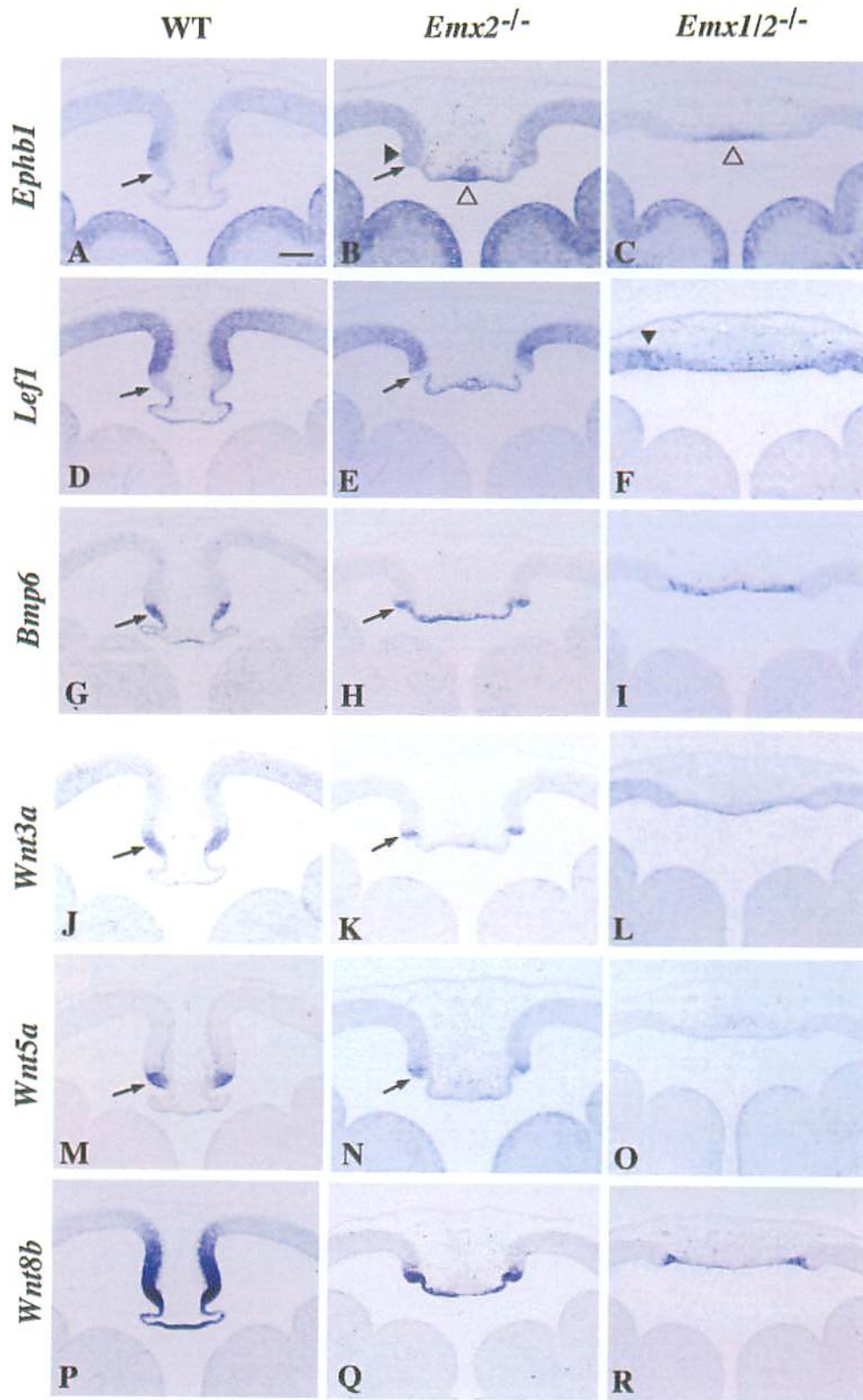


图9





#### (4) 終脳形成初期における背側内側壁の形成に関する解析

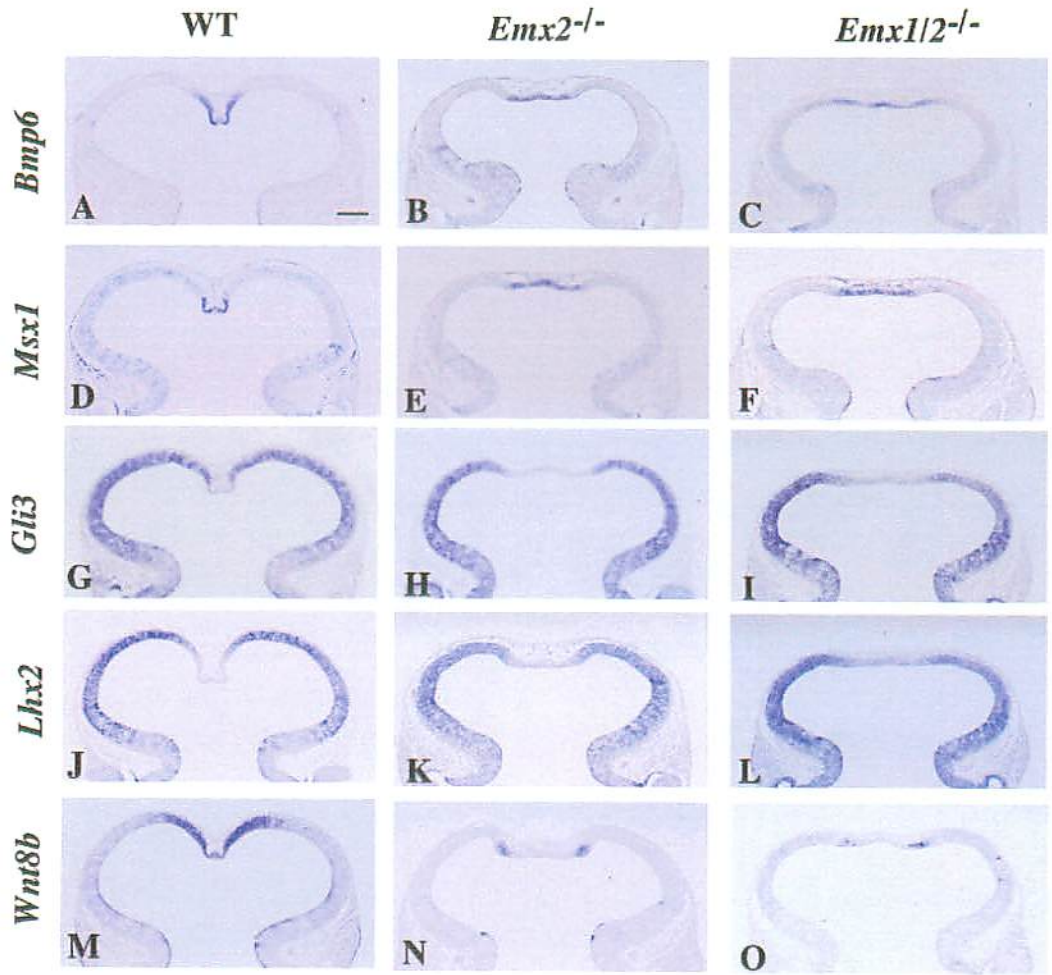
*Emx2* の発現は3体節期から、*Emx1* の発現は神経管の閉塞は完了したが、まだ一つの脳胞である9.5日目辺りから始まる。この時期、*Wnt*、*Tcf/Lef*あるいは*Lhx*はまだ発現していないが、*Bmp4*、*Bmp6*、*Msx1*は脳胞の背側正中部で発現している(図10A, D; Furuta et al., 1997)。また、*Gli3*の発現は*Msx1*が発現している正中を除く終脳全体で認められる(図10G)。*Wnt*遺伝子群の中では*Wnt3a*が最も早く発現を開始し、10.0日目辺りからcortical hemで発現する。そして、*Wnt8b*および*Lef1*が10.5日目から背側内側壁で発現し始める(図10M; Lee et al., 2000)。*Lhx2*も10.5日目辺りから*Wnt8b*陽性の背側内側部で弱いながら発現が始まる(図10J)。

10.5日目の*Emx2*<sup>-/-</sup>および*Emx1/2*<sup>-/-</sup>では、*Bmp6*、*Msx1*は広がった天井板で発現していた(図10B, C, E, F)。また、*Emx1/2*<sup>-/-</sup>では*Gli3*、*Lhx2*の発現は天井板の隣で認められた(図10H, I, K, L)。一方、背側内側壁における*Wnt3a*の発現は*Emx2*<sup>-/-</sup>ではわずかに認められたが、*Emx1/2*<sup>-/-</sup>では認められなかった(データ示さず)。さらに、*Wnt8b*あるいは*Lef1*は*Emx2*<sup>-/-</sup>では発現領域が減少しており、*Emx1/2*<sup>-/-</sup>ではさらに減少していたが、発現領域は存在していた(図10N, O; データ示さず)。このように前述の12.5日目における*Emx1/2*<sup>-/-</sup>の異常は、すでに10.5日目で認められた。このことから、異常が生じ始めるのは神経管が閉じる時期である9.5日目の*Emx1*発現開始時期と一致しているように推測された。

図10の説明 10.5日目における終脳背側内側壁の異常。

いずれも前頭断切片に対して*in situ* hybridizationを行なった。使用したRNAプローブ名は図中に示した通りである。(A, D, G, J, M)はWT、(B, E, H, K, N)は*Emx2*<sup>-/-</sup>、(C, F, I, L, O)は*Emx1/2*<sup>-/-</sup>を示す。12.5日目の*Emx1/2*<sup>-/-</sup>で認められた異常が10.5日目においてすでに認められた。スケールバーは150μm。

图10



#### (5) *Wnt1* knock in *Emx2* マウスおよび *CA-ALK3* knock in *Emx2* マウスの解析

これまでの遺伝子発現の解析から、*Emx2*<sup>-/-</sup>, *Emx1/2*<sup>-/-</sup> では *Wnt* および *Bmp* 遺伝子群の発現に変化が認められた。これら遺伝子群は、神経管背側部の形成に関与することが知られている。さらに、終脳においても背側内側領域の形成および脈絡叢の形成に必須であることが報告されている。このことから、*Emx1*, *Emx2* が WNT, BMP シグナルを介して働いていることが推測された。そこで、*Emx1*, *Emx2* と WNT, BMP シグナルとの関係を明らかにし、各シグナルの終脳背側内側領域の形成における機能を解析するため、*Emx2* 遺伝子座に *Wnt1* および活性化型 *Bmp* 受容体(*CA-ALK3*)を導入したマウスを作製した (図 11A)。ノックインベクターを ES 細胞へ導入し、G418 による選別を行なった後、形成されたコロニーをそれぞれ 50 個ずつピックアップし、long-PCR による遺伝子型の同定を行なった。その結果、それぞれ 26 個, 23 個の相同組み換え体を得た。さらに、相同組み換え体と判定した細胞からゲノム DNA を抽出し、Southern hybridization での確認を行なうことで、最終的に相同組み換え体であることを同定した。

*Emx2*<sup>+/-</sup> は明らかな異常が認められないのに対して(Yoshida et al., 1997)、作製した *Emx2*<sup>+/*Wnt1*</sup> (F1) は胎生致死だったので、*Emx2*<sup>+/*Wnt1*</sup> の解析は 50~80%キメラ胚を用いて行なった。一方、*Emx2*<sup>+/*CA-Alk3*</sup> は出生したので任意の時期に解析した。まず、それぞれのノックインマウス胚において *Wnt1* あるいは *CA-ALK3* の発現を確認した。*Emx2*<sup>+/*Wnt1*</sup> キメラ胚における *Wnt1* の発現は、*Wnt1* RNA プロブを用いた *in situ* hybridization により調べた。その結果、*Wnt1* mRNA は終脳背側部全体で発現しており、*Emx2* とよく似た発現パターンを示していることがわかった (図 11B.b)。さらに 15.5 日目胚を組織学的に解析したところ、終脳背側部に皮質の細胞の一部が異所的に軟膜の外に飛び出しているような構造が認められた (図 11B.c)。一方、*Emx2*<sup>+/*CA-Alk3*</sup> における *CA-Alk3* の発現は、BMP シグナルの増加に伴いリン酸化されるリン酸化 SMAD1/5/8 の発現を免疫染色することにより調べた。その結果、WT ではリン酸化 SMAD1/5/8 は脈絡叢でのみ発現が認められるのに対して、*Emx2*<sup>+/*CA-Alk3*</sup> では終脳背側部全体で発現が認められた (図 11B.d, e)。

次に、それぞれのノックインマウス胚における領域特異的マーカー分子の発現変動結果について示す。10.5 日目の *Emx2*<sup>+/*Wnt1*</sup> キメラ胚では *Emx1*, *Emx2* の発現に変化は認められなかった (データ示さず)。また、領域特異的マーカー分子を用いた解析から、終脳背側内側領域の形成には顕著な異常が認められなかった (図 12)。12.5 日目の *Emx2*<sup>+/*Wnt1*</sup> キメラ胚では、*BF1*, *Ngn2* の発現結果から皮質領域の拡大が見られたが (図 12A-D)、その皮質神経上皮の厚みは WT よりも薄くなっていた。一方、終脳腹側部に関しては、*Dlx1*, *Nkx2.1* の発現解析から基底核隆起の大きさが減少していることがわかった (図 12E-H)。さらに終脳背側内側部に関しては、*Lef1* 発現領域の拡大は認められるものの、*Wnt8b* および *Ephb1* の発現領域についてはほとんど変化が認められなかった (図 12I-N)。また、*BF1* あるいは *Ngn2* 陰性の領域は広がっておらず (図 12A-D)、*Wnt3a* 陽性の cortical hem、*TTR* 陽性の脈

絡叢、あるいは *Msx1* 陽性の天井板および脈絡叢も拡大していなかった (図 12O-T)。すなわち *Emx2*<sup>+/Wnt1</sup> においては、終脳のうち原皮質は拡大しておらず、異常は新皮質領域にのみに認められているように思われた。

一方、*Emx2*<sup>+/CA-Alk3</sup> では終脳背側内側壁の拡大が認められた。まず、10.5 日目の *Emx2*<sup>+/CA-Alk3</sup> における *Emx1*、*Emx2* の発現パターンを調べたが、ほとんど変わっていなかった (データ示さず)。また、マーカー遺伝子を用いた解析では、10.5 日目において終脳背側内側領域の形成には異常が認められなかった (データ示さず)。しかし、12.5 日目になると *BF1* の背側内側壁における発現は背側 (側方) に後退し (図 13A, B)、同時に *Wnt8b* の発現は広がっていた (図 13C, D)。そして、*Ephb1* の発現および *Wnt3a* の cortical hem での発現も広がっていた (図 13E-H)。一方、*TTR* 陽性の脈絡叢や *TTR* 陰性の天井板は 12.5 日目だけではなく 14.5 日目においても異常は認められなかった (図 13I-L)。以上の結果から、*Emx2*<sup>+/CA-Alk3</sup> では終脳背側内側壁が拡大したと推察した。

図 11.の説明  $Emx2^{+/Wnt1}$  および  $Emx2^{+/CA-Alk3}$  の作製。

(A)はノックインベクターの構築および Southern hybridization による解析結果を示す。なお、相同組み換えを起こした ES 細胞から抽出した DNA を *BamHI* 切断し、Southern hybridization に用いた。太い線はゲノム DNA を示し、細い線は pBluescript 由来の塩基配列を示す。黒の四角と黒の三角はそれぞれ exon と *loxP* 配列を示す。p1 - p6 は相同組み換えを起こした knock-in allele および WT allele を同定するためのプライマーの位置を示す。略語：DT-A; *MCI* プロモーターを持ったジフテリア毒素 A フラグメント、neo: *pgk1* プロモーターを持ったネオマイシン耐性遺伝子、PA: *polyA* シグナル、B; *BamHI*、N; *NcoI*、Sal; *Sall*、Sp; *SpeI*。

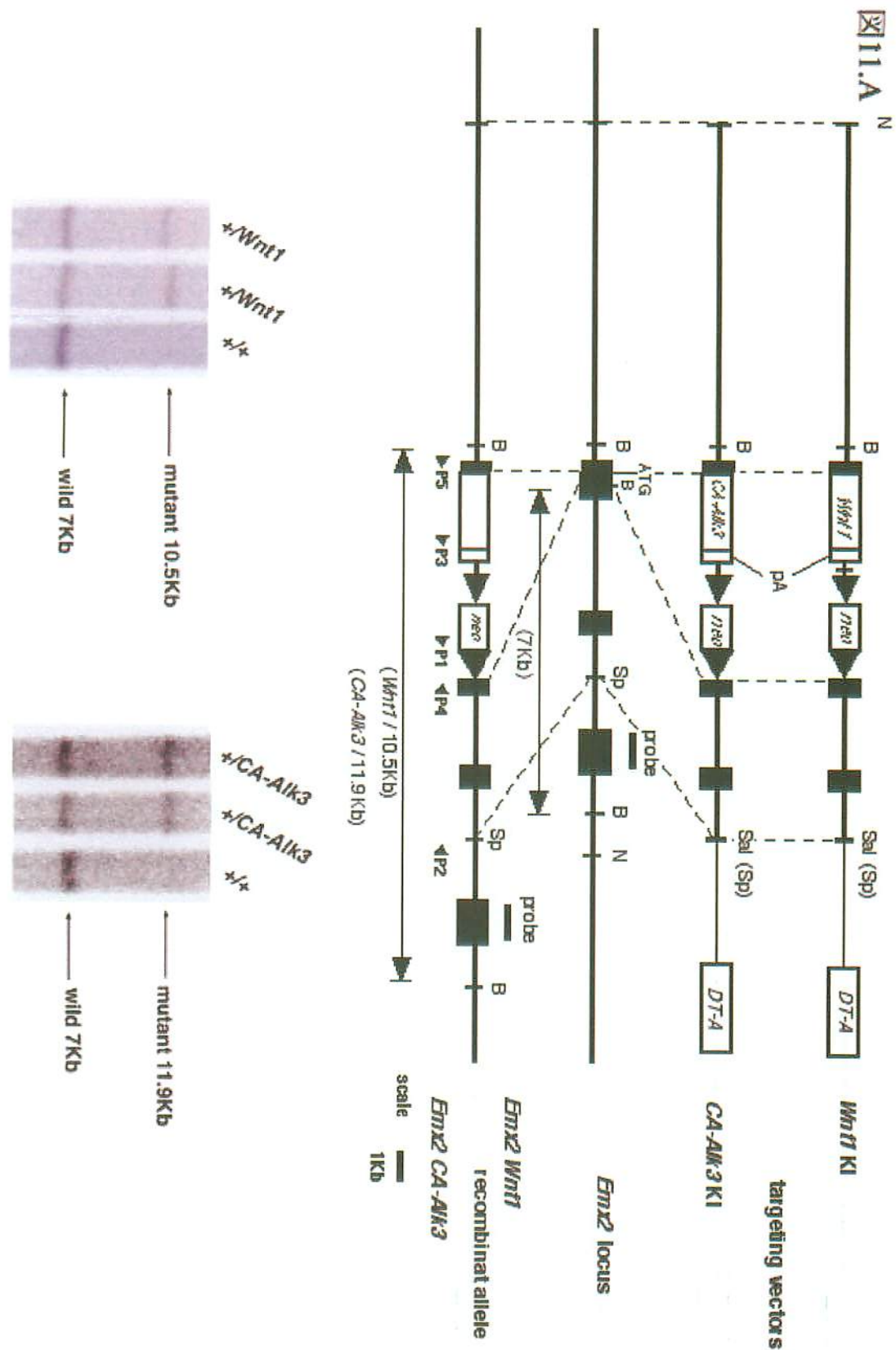
(B)は  $Emx2^{+/Wnt1}$  および  $Emx2^{+/CA-Alk3}$  における *Wnt1*, *CA-ALK3* の発現を示す。(a, b)は 10.5 日目胚頭部に対して *Wnt1* RNA プローブを用いた *in situ* hybridization、(c)は 15.5 日目胚前頭断切片に対してニッスル染色、(d, e)は 11.5 日目胚矢状断切片に対して抗リン酸化 SMAD1/5/8 抗体を用いた免疫染色を行なった。(a, d)は WT、(b, c)は  $Emx2^{+/Wnt1}$ 、(e)は  $Emx2^{+/CA-Alk3}$  を示す。スケールバーは(a, b)が 400 $\mu$ m、(c)が 200 $\mu$ m、(d, e)が 150 $\mu$ m。

図 12.の説明  $Emx2^{+/Wnt1}$  の 12.5 日目における異常の解析。

いずれも前頭断切片に対して *in situ* hybridization を行なった。使用した RNA プローブ名は図中に示した通りである。(A, C, E, G, I, K, M, O, Q, S)は  $Emx2^{+/+}$ 、(B, D, F, H, J, L, N, P, R, T)は  $Emx2^{+/Wnt1}$  キメラ胚を示す。スケールバーは(A-I, K, M, O, Q, S)が 230 $\mu$ m、(J, L, N, P, R, T)が 300 $\mu$ m。

図 13.の説明  $Emx2^{+/CA-Alk3}$  の 12.5 日目における異常の解析。

いずれも前頭断切片に対して *in situ* hybridization を行なった。使用した RNA プローブ名は図中に示した通りである。(A, C, E, G, I, K)は  $Emx2^{+/+}$ 、(B, D, F, H, J, L)は  $Emx2^{+/CA-Alk3}$  を示す。スケールバーは(A-J)が 200 $\mu$ m、(K, L)が 240 $\mu$ m。



11.B

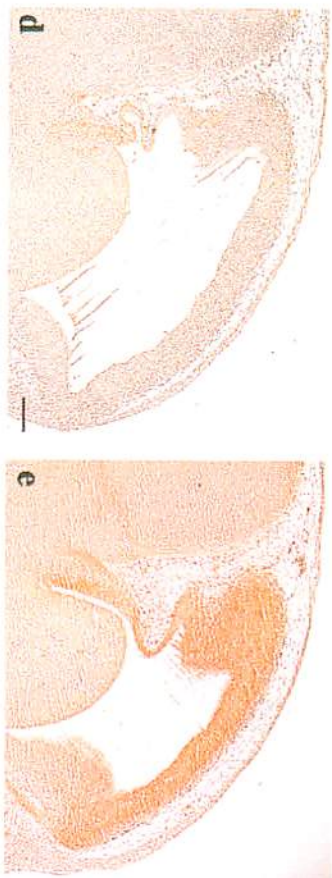
WILD

*Emx2*<sup>+/*W<sup>nl</sup>*</sup>



WILD

*Emx2*<sup>+/*CA-AIK3*</sup>



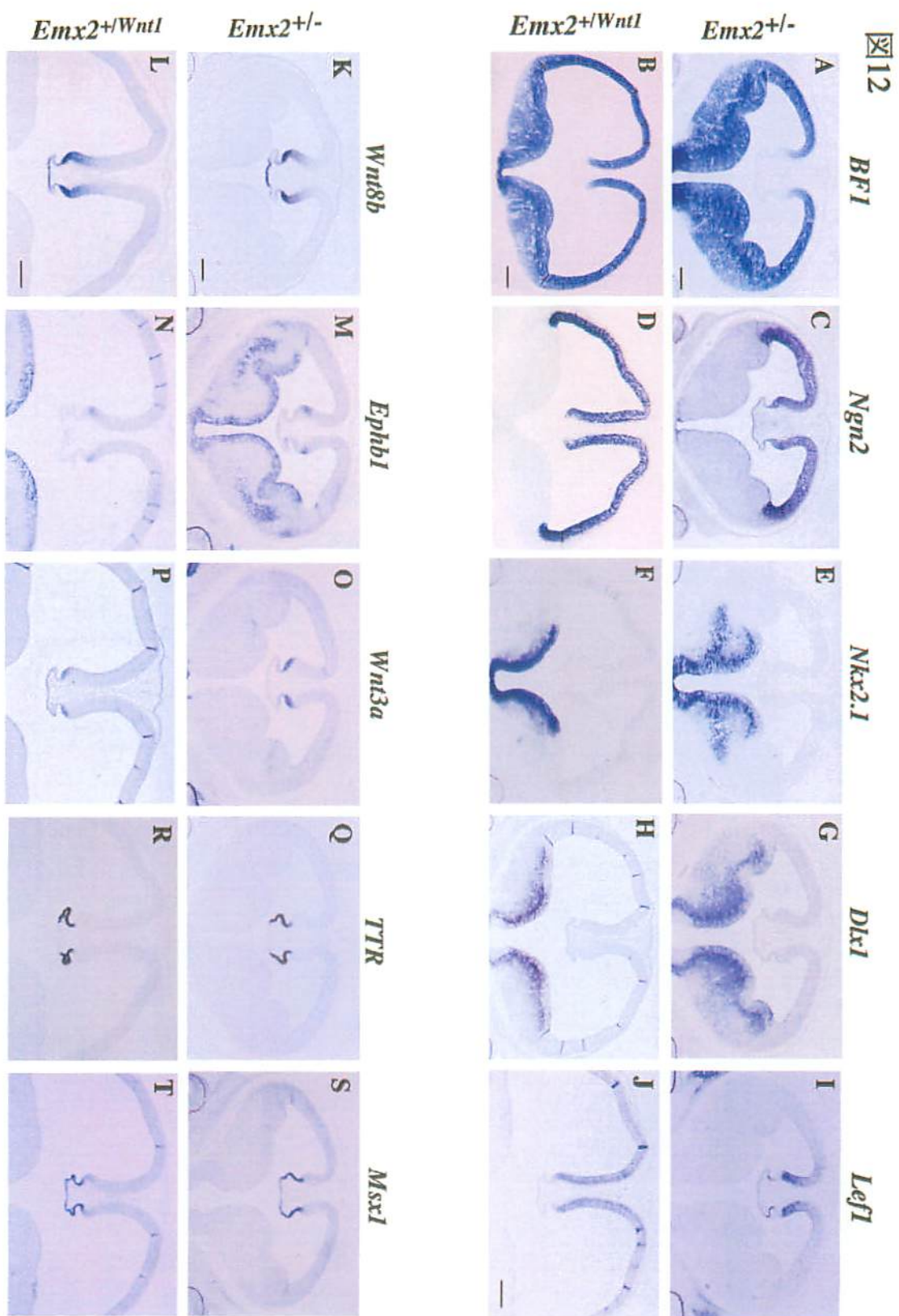
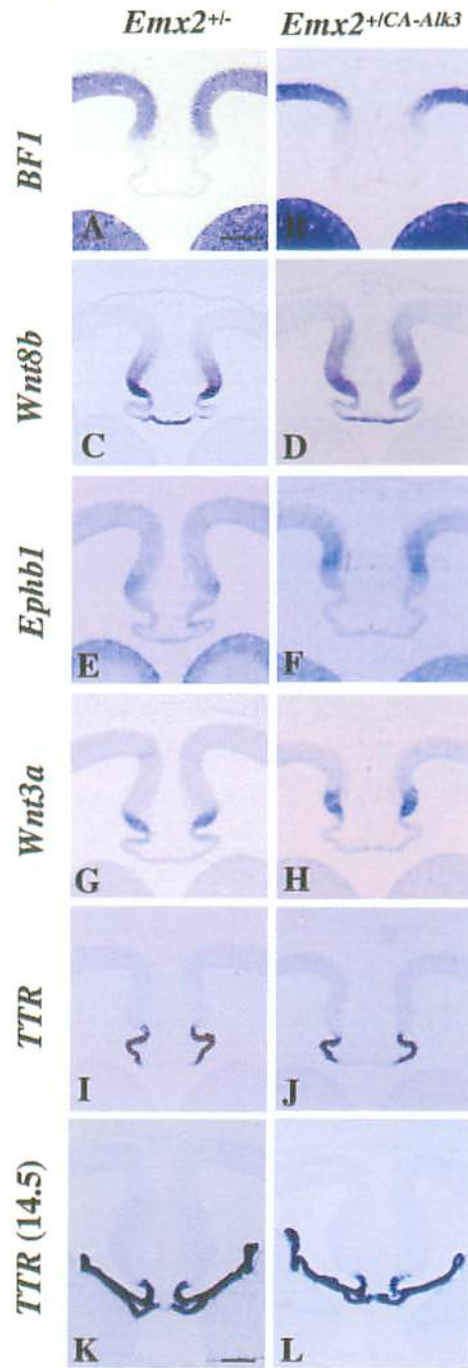




图 13



### 第3節 マウス終脳皮質領域形成における *Emx1*, *Emx2* の機能解析

#### (1) 細胞の増殖性の解析

この項目からは、発生が進むにつれて *Emx1/2*<sup>-/-</sup> の終脳の皮質領域の肥厚に異常が認められる原因について解析した結果を記す。まず始めに、その原因として皮質領域の細胞数に異常が認められるのではないかと考え、BrdU の取り込みによる細胞の増殖性について解析を行なった。細胞数の測定は、終脳背側/腹側境界から等距離に位置する皮質領域の幅 100 $\mu$ m あたりの BrdU 陽性細胞数及び総細胞数をカウントした (図 14A)。その結果、11.5 日目においては WT, *Emx2*<sup>-/-</sup>, *Emx1/2*<sup>-/-</sup> の間で BrdU 陽性細胞数、総細胞数ともに差は認められなかった (WT, *Emx2*<sup>-/-</sup>, *Emx1/2*<sup>-/-</sup> の順に BrdU 陽性細胞数は、平均 54.7, 53.7, 53.7 個、総細胞数は平均 184.7, 179.6, 197.1 個であった)。また、16.5 日目胚でも、BrdU 陽性細胞数はそれぞれの遺伝子型で平均 60.4, 61.7, 57.7 個であり、3 者間でほとんど差はなかった (図 14B)。しかしながら、総細胞数に関しては *Emx1/2*<sup>-/-</sup> では WT の約 60%しか認められず (WT, *Emx2*<sup>-/-</sup>, *Emx1/2*<sup>-/-</sup> の順に平均 858.5, 765.9, 508.4 個) (図 14C)、その結果 *Emx1/2*<sup>-/-</sup> における labeling index (陽性細胞数/総細胞数; %) は 11.3%で、WT (7.0%) よりも高かった (図 14D)。このことから、皮質脳室帯にある前駆細胞の細胞増殖能には異常がないと考えられた。

このように *Emx1/2*<sup>-/-</sup> において前駆細胞の増殖性がほとんど変化することなく、皮質の総細胞数が減少する理由として、前駆細胞の最後の DNA 複製に続く細胞分裂に異常があり、四倍体を生じているのではないかと考え、12.5 日目に BrdU を取り込ませて 2 日後に新皮質領域の細胞を取り出し、DNA 量の測定を行なった。その結果、BrdU 陽性細胞あるいは陰性細胞どちらにおいても遺伝子型 (WT, *Emx2*<sup>-/-</sup>, *Emx1/2*<sup>-/-</sup>) による四倍体細胞の割合に差は認められなかった (図 15)。さらに、総細胞数が少ない原因として *Emx1/2*<sup>-/-</sup> の新皮質領域で細胞死 (アポトーシス) が起こっている可能性も考えられたので、TUNEL 法を用いた細胞死の検出を行なった。11.5 日目から 16.5 日目の WT では天井板で細胞死が認められることが分かっているが (Gavrieli et al., 1992)、*Emx2*<sup>-/-</sup> あるいは *Emx1/2*<sup>-/-</sup> においても細胞死は主に天井板でのみ認められ、天井板以外ではほとんど検出できず、皮質領域での顕著な細胞死の増加は認められなかった (データ示さず)。

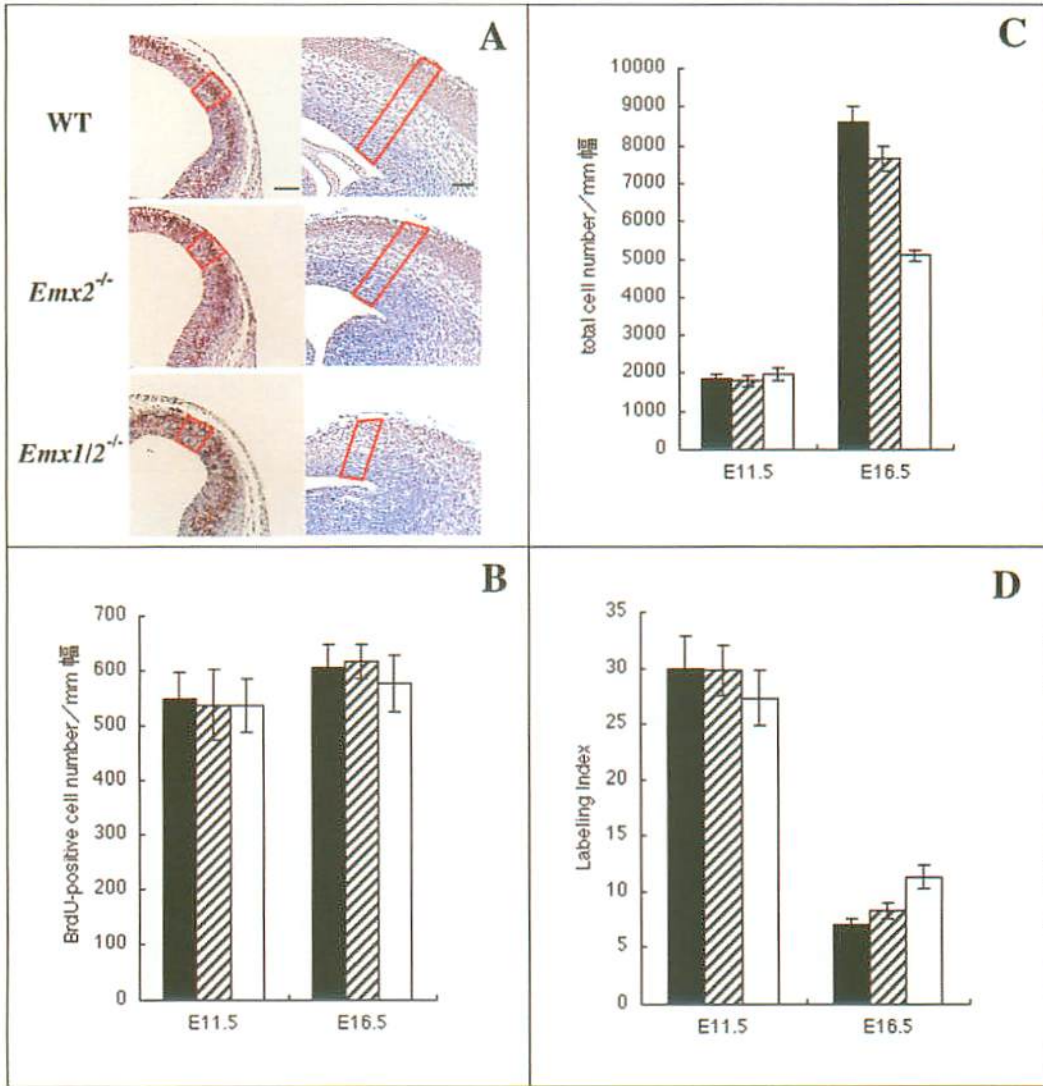
図 14.の説明 BrdU の取り込みによる細胞増殖性の解析。

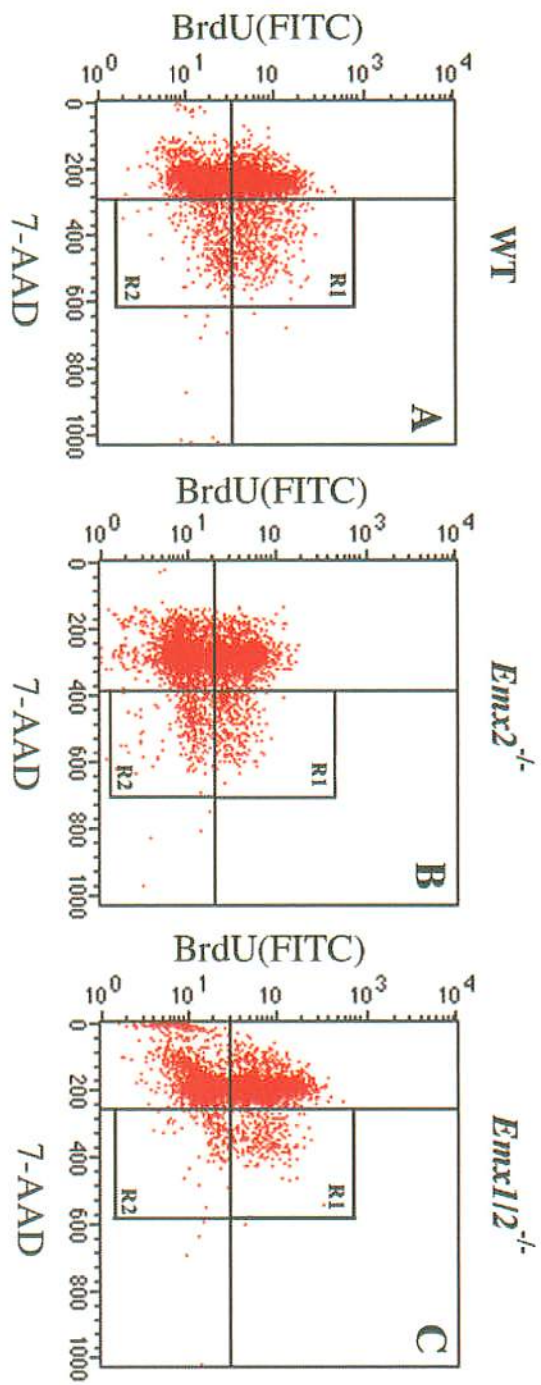
(A)左が 11.5 日目胚、右が 16.5 日目胚の終脳背側皮質領域。遺伝子型は左に示す。いずれも前頭断切片で、抗 BrdU 抗体で染色後、それぞれ幅 100 $\mu$ m の領域内（赤枠内）の細胞数をカウントした。BrdU 陽性細胞数(B)および総細胞数(C)は、それぞれの遺伝子型に対して 3 個体ずつサンプルを集め、1 個体あたり 3 枚のスライド上の細胞数をカウントしてその平均値を示した。細胞の増殖性は、labeling index (BrdU 陽性細胞数/総細胞数：%) として表す(D)。スケールバーは 100 $\mu$ m。

図 15.の説明 新皮質領域における四倍体細胞数の測定。

BrdU で染まった頻度を縦軸、7-ADD で染まった頻度を横軸で表し、7-ADD でよく染まった細胞集団を BrdU の取り込みが高い細胞集団(R1)と低い集団(R2)に分けた。それぞれの遺伝子型における R1：R2 の割合は WT が 7.3%：6.6%(A)、*Emx2*<sup>+</sup> が 8.2%：7.3%(B)、*Emx1/2*<sup>+</sup> が 7.9%：5.8%(C)であった。

图14





## (2) スライス培養法を用いた細胞移動の解析

投射ニューロンは皮質の脳室帯で産生され放射状に移動するのに対して、介在ニューロンは基底核隆起で産生され、接線方向に移動して皮質領域まで侵入する。このことから、*Emx1/2*<sup>-/-</sup>において総細胞数が少ないのは、この移動に異常があることが原因であるかもしれないと考えられた。基底核隆起から皮質領域に向けての細胞移動は、MGEをDiIで標識したスライス培養法により観察することができることから(Powell et al., 2001)、13.5日目の各表現型の終脳からスライスを作製し、MGEにDiI標識を行なった。培養から2日後、WTではDiI陽性細胞の終脳背側部への流入が認められた(図16A-J)。ここで、最初にDiI陽性細胞が終脳背側/腹側境界を越えてから8時間後に皮質領域を取り出し、DiI陽性細胞数をカウントしたところ、DiI陽性細胞は背側皮質領域の総細胞数の4~4.5%を占めていた。また、*Emx2*<sup>-/-</sup>では細胞の移動に遅れが見られるものの、培養2日後には背側部への移動が確認できた(図16B-K)。一方、*Emx1/2*<sup>-/-</sup>の皮質領域ではDiI陽性細胞が認められず、培養2日後も皮質の背側/腹側境界を越えることはなかった(図16C-L)。さらに注目すべき点として、*Emx1/2*<sup>-/-</sup>のスライスでは、培養中明らかに終脳腹側領域の増大が認められた。これは背側部へ移動できなかつた腹側細胞の蓄積によるものと思われ、これと関連して11.5日目の*Emx1/2*<sup>-/-</sup>の切片では基底核隆起は正常であるが、その後発生が進むにつれて基底核隆起が増大しているのが認められた(図5B)。

*Emx1*は腹側部では発現していないことから(Tole et al., 2000b)、*Emx1/2*<sup>-/-</sup>での細胞移動の異常はおそらく基底核隆起から移動する細胞自身の異常ではなく、移動環境となる皮質の異常が原因と思われた。このことを明らかにするために、図17Aに示す移植実験を行なった。*Emx1/2*<sup>-/-</sup>のMGE細胞またはMGE片をWTのMGEに移植した場合、あるいはWT由来の終脳背側部スライス断片と*Emx1/2*<sup>-/-</sup>由来の終脳腹側部スライス断片とを貼り合わせた場合に、基底核隆起から生じた細胞は背側の皮質領域まで移動した(図17B,C)。一方、WTのMGE細胞またはMGE片を*Emx1/2*<sup>-/-</sup>のMGEに移植した場合、あるいは*Emx1/2*<sup>-/-</sup>由来の終脳背側部スライス断片とWT由来の終脳腹側部スライス断片とを貼り合わせた場合は背側への細胞流入が起こらなかつた。そしてその場合、*Emx1/2*<sup>-/-</sup>の切片で観察されたのと同様に基底核隆起の肥厚が認められた(図17B)。このことから、*Emx1/2*<sup>-/-</sup>で見られた基底核隆起から皮質への細胞移動の異常は、移動する細胞自身の異常によるものではなく、皮質中に存在する細胞移動のための環境要因に異常があることが原因であると考えられた。

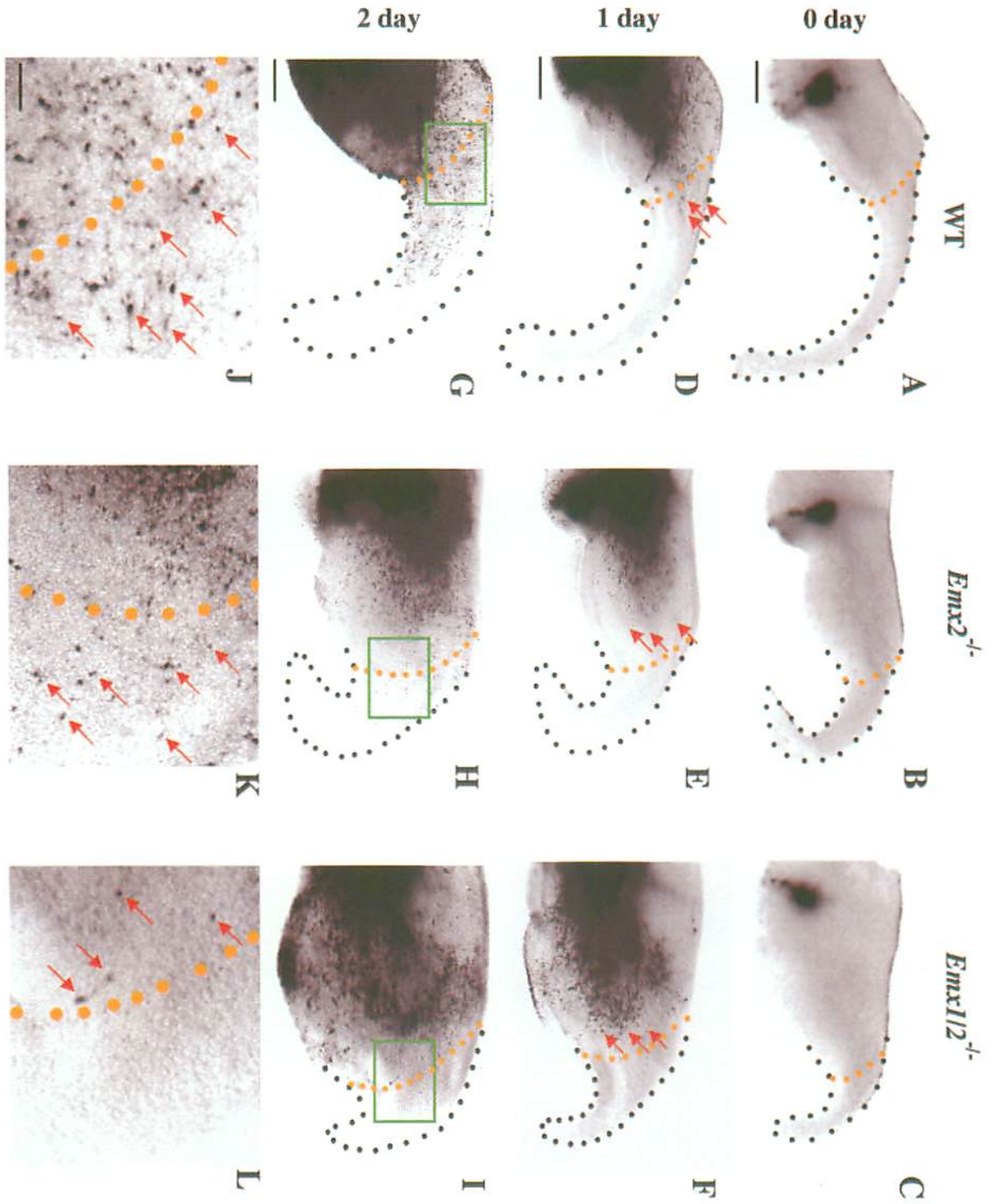
図 16.の説明 基底核隆起からの細胞移動の異常。

いずれも 13.5 日目胚の終脳組織スライスを作製し、MGE に Dil を置き(A-C)、1 日後(D-F)、2 日後(G-L)の細胞の移動の様子を観察した。(J-L)は(G-I)の緑枠内の拡大図。(A, D, G, J)は WT、(B, E, H, K)は *Emx2*<sup>+</sup>、(C, F, I, L)は *Emx1/2*<sup>+</sup> を示す。(D-F)の矢印は最も背側に移動した細胞集団、橙色の点線は終脳背側/腹側境界を示す。スケールバーは(A-I)が 100 $\mu$ m、(J-L)が 400 $\mu$ m。

図 17.の説明 移植実験系を用いた細胞移動の異常の解析。

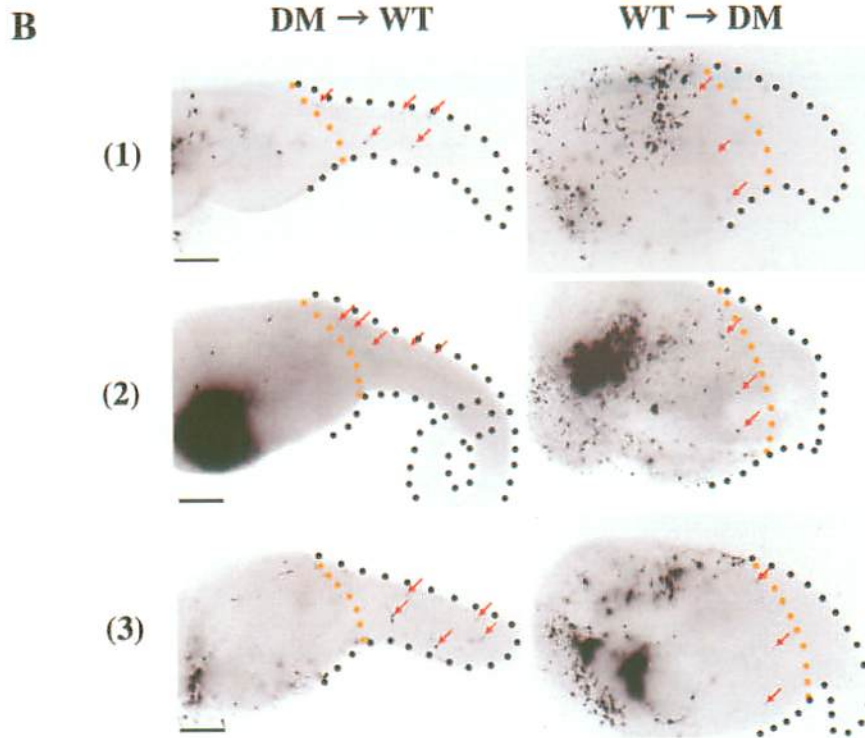
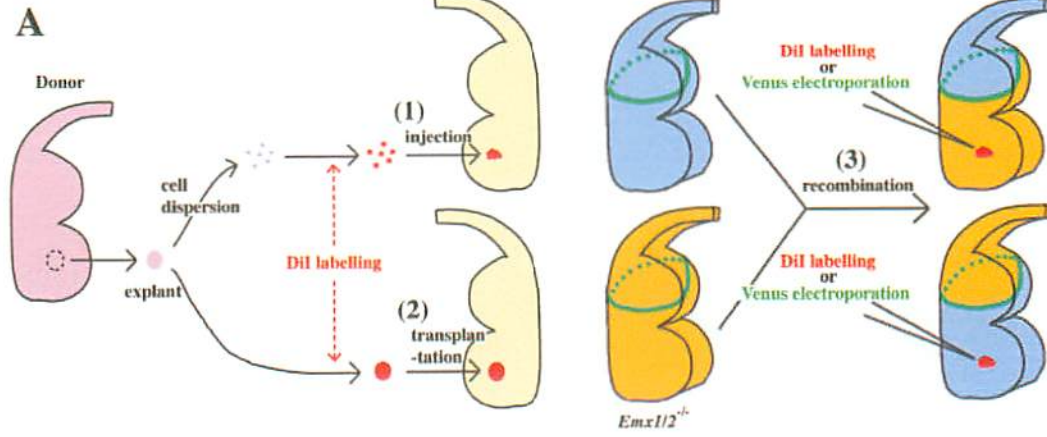
*Emx1/2*<sup>+</sup> における細胞移動の異常の原因が、皮質中に存在する細胞移動のための環境要因にあることを示すために、以下に示す 3 通りの移植実験を行なった(A)。(1) 13.5 日目の *Emx1/2*<sup>+</sup> あるいは WT から取り出した MGE 細胞をトリプシン処理でばらばらにして Dil で標識し、13.5 日目の WT あるいは *Emx1/2*<sup>+</sup> のスライスのスライス部分に移植。(2) 13.5 日目の *Emx1/2*<sup>+</sup> あるいは WT から取り出した MGE 片を Dil 標識し、13.5 日目の WT あるいは *Emx1/2*<sup>+</sup> のスライスのスライス部分に移植。(3) 13.5 日目の *Emx1/2*<sup>+</sup> 由来終脳背側部スライス断片と WT 由来終脳腹側部スライス断片とを LGE レベル (緑線) で貼り合わせたもの、あるいは 13.5 日目の WT 由来終脳背側部スライス断片と *Emx1/2*<sup>+</sup> 由来終脳腹側部スライス断片とを LGE レベル (緑線) で貼り合わせたものを作製し、MGE に Dil 標識あるいは Venus plasmid DNA をエレクトロポレーションした。いずれの場合もその後 2 日間培養し、標識された細胞の移動について観察した。(B, C)は (1)~(3)のアッセイをおこなった結果を示す。(→)はドナーとホストの関係を示し、図中の矢印は最も背側に移動した細胞集団を表す。スケールバーは 150 $\mu$ m。(C)の分母は調べたスライスの数で、分子は其中でドナーである基底核隆起の細胞がホストである皮質に流入したスライス数を示す。略語: DM: *Emx1/2*<sup>+</sup>。

图 16





17



**C**

	WT → WT	WT → DM	DM → WT	DM → DM
(1)	3/3	0/3	2/2	ND
(2)	2/2	0/10	15/15	0/2
(3)	3/3	0/15	13/13	ND

### (3) 神経細胞の分化に関する解析

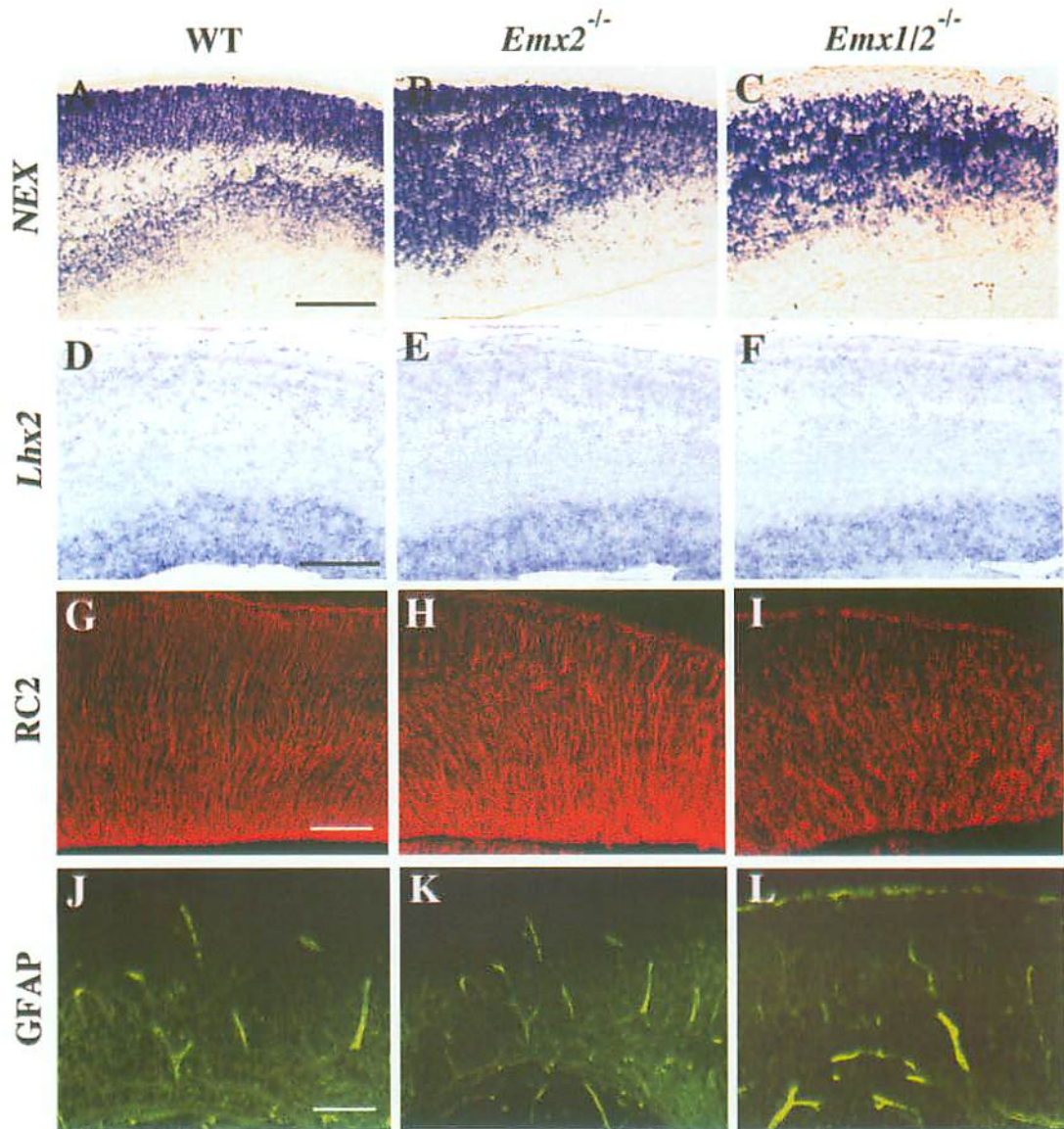
次に、前駆細胞からの神経分化に異常が認められるか否かについてマーカー遺伝子を用いて調べた。神経細胞のマーカー分子である MAP2 は 12.5 日では軟膜直下の細胞で発現しているが、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> においても正常に発現していた (図 19I, L)。また 15.5 日の *Emx1/2*<sup>-/-</sup> では、分化したニューロンに特異的に発現する bHLH 遺伝子 *NEX*(Bartholomae and Nave, 1994; Shimizu et al., 1995) と脳室帯の未分化細胞で発現する *Lhx2*(Porter et al., 1997) の発現パターンによって、分化/未分化細胞が WT 同様に区別できた (図 18A-F)。

一方、放射状グリア細胞は皮質の発達を通して最も早く産生され、発生中の頭部において多くを占めるグリア細胞である(Super et al., 1998; Chans-Sacre et al., 2000)。グリア細胞は出生後、早期にアストロサイトに分化する。放射状グリア細胞のマーカー遺伝子である *RC2*(Misson et al., 1988) の発現は *Emx1/2*<sup>-/-</sup> においても認められるが、その繊維の並びはかなり乱れており、その異常は *Emx2*<sup>-/-</sup> よりも重篤であった (図 18G-I)。また、18.5 日目におけるアストロサイトのマーカー遺伝子である *GFAP*(Sancho-Tello et al., 1995) の発現は WT と同様に認められなかったので、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> においてアストロサイトへの分化が促進されているわけではないことがわかった (図 18J-L)。

#### 図 18.の説明 神経分化マーカー遺伝子の発現。

(A-F)は 15.5 日目胚、(G-I)は 16.5 日目胚、(J-L)は 18.5 日目胚の終脳背側皮質領域を示す。いずれも前頭断切片に対して(A-F)は *in situ* hybridization、(G-L)は免疫染色を行なった。使用した RNA プローブ名あるいは抗体名は図中に示した通りである。(A, D, G, J)は WT、(B, E, H, K)は *Emx2*<sup>-/-</sup>、(C, F, I, L)は *Emx1/2*<sup>-/-</sup> を示す。*Emx1/2*<sup>-/-</sup> でも神経分化は正常に認められた。スケールバーは 100 $\mu$ m。

図18



#### (4) 皮質層構造の解析

18.5 日における皮質の層構造は、表層側から辺縁帯、皮質板、皮質下層、中間帯、脳室下帯/脳室帯により構成されている (図 19A)。 *Emx1*<sup>-/-</sup> において、それぞれの層構造は WT と同様に認められたが (図 19B; Yoshida et al., 1997)、 *Emx2*<sup>-/-</sup> では層構造は形成されているものの、幾分乱れていた (図 19C; Yoshida et al., 1997; Mallamaci et al., 2000)。また、 *Emx2*<sup>-/-</sup> では白質は薄くなっており、皮質下層は不明瞭で、本来細胞が疎である辺縁帯で細胞数が増えていた (図 19G)。さらに、 *Emx2*<sup>-/-</sup> の皮質の側方では辺縁帯と皮質板の境界が波打っていた。一方、 *Emx1/2*<sup>-/-</sup> の皮質では層構造が著しく乱れており、軟膜直下の本来辺縁帯が形成される最も表層部分では細胞が集積していた (図 19D, H)。また、皮質板は不明瞭で皮質下層も認めることができなかった。そして、皮質内は比較的細胞が多い領域と少ない領域が存在し、細胞が多い領域ではニューロンが分散し、無秩序な形態をしていた。さらに白質は認められず、細胞の多い領域へ伸びた異常な軸索の束が散見された。

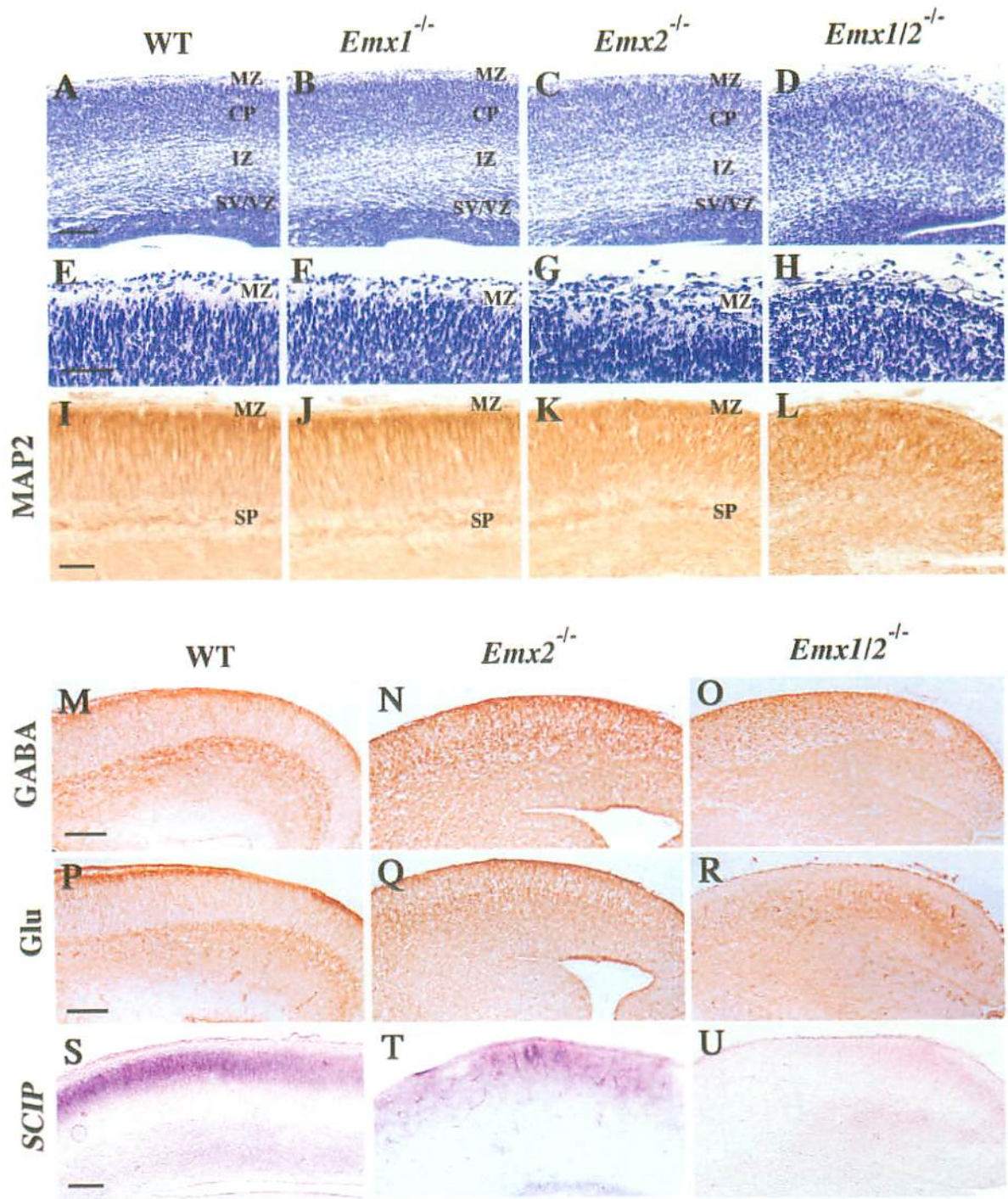
次に、MAP2 抗体を用いて皮質ニューロンの樹状突起を染色し、皮質の細胞構築の異常を調べた。WT の皮質板では MAP2 陽性の神経突起は放射状に並び、規則的な柵状のパターンを形成しているが (図 19I)、同時に MAP2 は皮質下層にある水平状の突起も染めた (Luskin and Shatz, 1985; Wood et al., 1992)。しかし、辺縁帯や中間帯など軸索が豊富な場所では強い染色像は見られない (Ringstedt et al., 1998)。この MAP2 の発現様式は、 *Emx1*<sup>-/-</sup> では正常であったが (図 19J)、 *Emx2*<sup>-/-</sup> では MAP2 陰性の最表層領域が薄かった (図 19K)。しかし、MAP2 陽性の柵状の突起や皮質下層の突起は認めることができた。それらに対して、 *Emx1/2*<sup>-/-</sup> ではこのパターンが著しく乱れており、MAP2 陽性の樹状突起は脳室帯を除いて分散しており、柵状のパターンや皮質下層は認められなかった (図 19L)。また、MAP2 陰性の最表層領域も認められず、軟膜直下では線状に強い発現が認められた。

16.5 日目の WT において、辺縁帯、皮質下層および中間帯と脳室下帯の境界では GABA, glutamate の発現が認められた (図 19M, P; Del Rio et al., 1992; Del Rio et al., 1995)。 *Emx2*<sup>-/-</sup> ではこれらの GABA, glutamate 陽性の層は分散していたが、層として認められた (図 19N, Q)。一方、 *Emx1/2*<sup>-/-</sup> では GABA 陽性ニューロンは層状には認められず、広く分散しており、glutamate 陽性ニューロンはほとんどなくなっていた (図 19O, R)。また、18.5 日目に皮質板ニューロンで発現している SCIP (図 19S; Frantz et al., 1994) は、 *Emx2*<sup>-/-</sup> では発現しているものの、発現が分散していた (図 19T; Tole et al., 2000a)。それに対して *Emx1/2*<sup>-/-</sup> では、SCIP の発現は全く認められなかった (図 19U)。以上のように、 *Emx1/2*<sup>-/-</sup> の皮質構造は形態学的、分子的に著しく異常が認められることがわかった。

図 19.の説明 皮質の層構造異常。

(A-L, S-U)は 18.5 日目胚、(M-R)は 16.5 日目胚の前頭断切片で、いずれも終脳背側皮質領域を示す。(A-H)はニッスル染色、(I-R)は免疫染色、(S-U)は *in situ* hybridization を行なった。(E-H)は(A-D)の辺縁帯部分の拡大図で、(I-U)で使用した抗体名および RNA プローブ名は図中に示した通りである。(A, E, I, M, P, S)は WT、(B, F, J)は *Emx1*<sup>-/-</sup>、(C, G, K, N, Q, T)は *Emx2*<sup>-/-</sup>、(D, H, L, O, R, U)は *Emx1/2*<sup>-/-</sup> を示す。スケールバーは(E-L)が 50 $\mu$ m、(A-D, M-U)が 100 $\mu$ m。略語：CP; 皮質板、IZ; 中間帯、MZ; 辺縁帯、SP; 皮質下層、SV/VZ; 脳室下帯/脳室帯。

図19



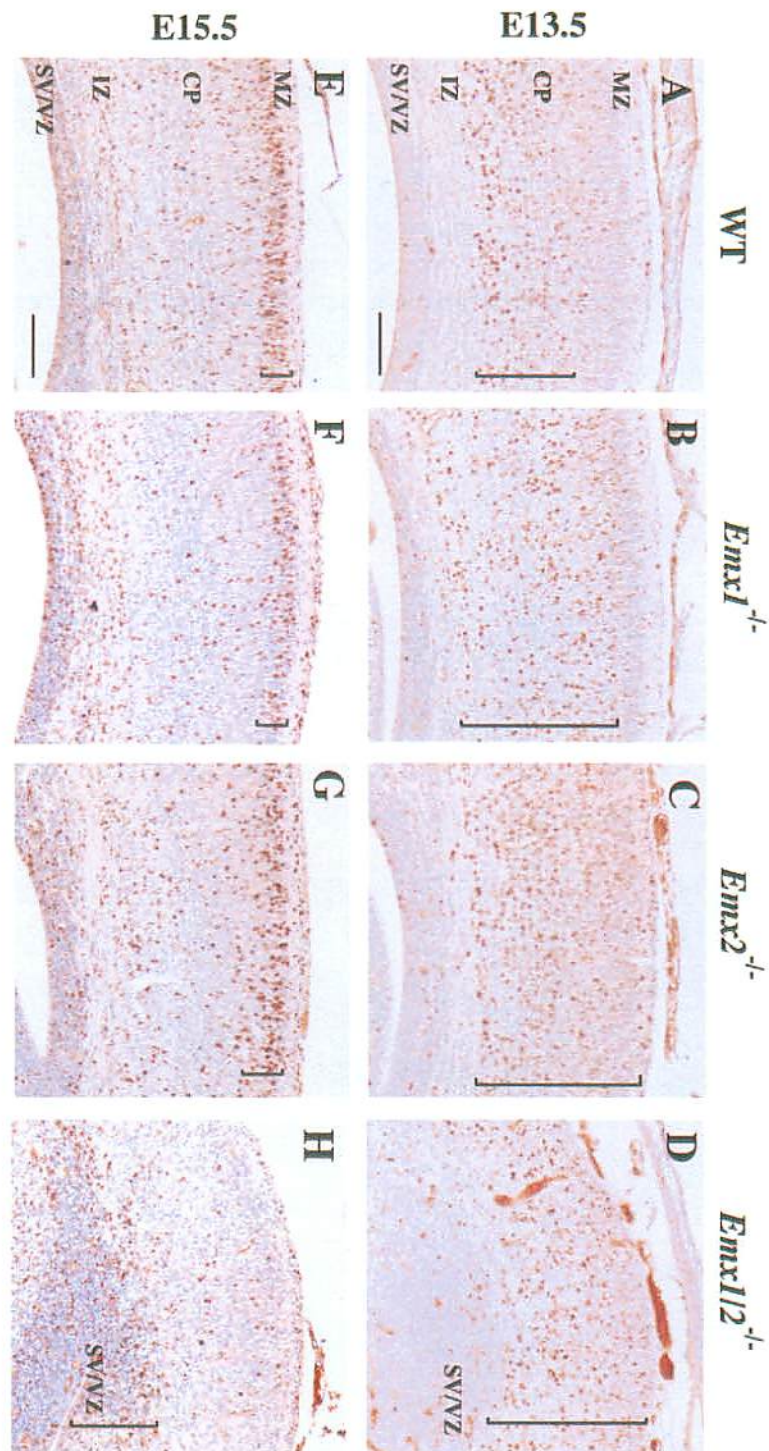
#### (5) "inside-outside" パターン形成に関する解析

上述のように、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> では皮質層構造に異常が認められたことから、皮質板ニューロンの"inside-outside" なパターン形成にも異常が認められる可能性が考えられた。そこで、時期特異的に生まれた細胞の皮質内での局在を birthdating study により解析した。妊娠 13.5 日目あるいは 15.5 日目の母親マウスの腹腔内に BrdU を注入し、19.5 日目に胚を取り出して抗 BrdU 抗体による免疫染色を行ない、各時期に細胞分裂を停止して BrdU によって標識された細胞の局在を同定した。まず WT および *Emx1*<sup>-/-</sup> では、13.5 日目あるいは 15.5 日目に生まれたニューロンは 19.5 日目にはそれぞれ皮質板の深層あるいは皮質板の最も表層に局在していた (図 20A, B, E, F)。 *Emx2*<sup>-/-</sup> では Mallamci 等(Mallamaci et al., 2000)が示しているように移動パターンに異常が認められ、13.5 日目あるいは 15.5 日目に生まれたニューロンは 19.5 日目には幾分分散して存在していた (図 20C, G)。しかし、15.5 日目に生まれたニューロンのほとんどは皮質板の最表層に移動していた。一方、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> では移動パターンに著しい異常が認められ、13.5 日目に生まれたニューロンは皮質全体に分布していた (図 20D)。また、15.5 日目に生まれたニューロンは皮質板の表層に移動できずに脳室帯周辺に留まっていた (図 20H)。このように、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> では"inside-outside" なパターン形成に伴った皮質の層構造形成に顕著な異常が認められた。

図 20.の説明 birthdating study による時期特異的に生まれた細胞の皮質内での局在の異常。

いずれも前頭断切片で、終脳背側皮質領域の拡大図。(A-D)は 13.5 日目に、(E-H)は 15.5 日目にそれぞれ BrdU 標識を行ない、19.5 日目に BrdU 陽性細胞の局在を調べた。括弧は BrdU 細胞が分布する領域を示す。(A, E)は WT、(B, F)は *Emx1*<sup>-/-</sup>、(C, G)は *Emx2*<sup>-/-</sup>、(D, H)は *Emx1/2*<sup>-/-</sup> を示す。スケールバーは 100 $\mu$ m。  
略語：CP; 皮質板、IZ; 中間帯、MZ; 辺縁帯、SP; 皮質下層、SV/VZ; 脳室下帯/脳室帯。

20





## (6) Cajal-Retzius 細胞および皮質下層ニューロンの形成に関する解析

皮質板神経細胞の垂直方向への移動には *reelin* シグナルが重要な役割を果たしていることが知られていることから、*reelin* の発現を調べた。13.5 日目および 15.5 日目において、*reelin* は辺縁帯の CR 細胞で発現している (図 21A, D, G; Alcántara et al., 1998)。13.5 日目の *Emx2*<sup>-/-</sup> では陽性細胞数は減少しているものの、*reelin* の発現は認められた (図 21B; Mallamaci et al., 2000)。しかし、15.5 日目になると、将来 cingulate cortex や海馬原基になる内側領域では発現が認められるが、新皮質および古皮質領域での発現は消失していた (図 21E, H)。これに対して、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> では 13.5 日目においても 15.5 日目においても *reelin* の発現は全く認められなかった (図 21C, F, I)。

マウスの皮質領域において *reelin* はもっぱら CR 細胞で発現している (Alcántara et al., 1998)、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> において *reelin* の発現が認められなかったことは CR 細胞を欠失していることを示唆していると考えられた。そこで、他の CR 細胞特異的なマーカー分子を用いて確認を行なった。GAP43 はニューロン特異的な燐タンパク質で (Benowitz et al., 1988)、抗 GAP43 抗体は 16.5 日目の辺縁帯では CR 細胞の垂直方向への軸索とシナプスを形成している樹状突起の神経終末および皮質下層ニューロンで発現している (図 22A)。*Emx2*<sup>-/-</sup> において、GAP43 は皮質下層での発現は認められるが、辺縁帯での発現は消失していた (図 22B)。一方、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> では GAP43 の発現は全く認められなかった (図 22C)。さらに、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (chondroitin sulfate proteoglycans; CSPGs) も 16.5 日目において辺縁帯および皮質下層で発現している (図 22D; Sheppard and Pearlman, 1997)。この CSPGs の発現は、*Emx2*<sup>-/-</sup> では皮質下層や終脳内側壁の辺縁帯で認められ、新皮質領域の辺縁帯では減少していた (図 22E)。一方、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> ではわずかに発現が認められるのみであった (図 22F)。

もう一つの CR 細胞および皮質下層ニューロンのマーカー遺伝子である calretinin の発現は (Del Rio et al., 1995; Alcántara et al., 1998)、*Emx2*<sup>-/-</sup> では辺縁帯での発現は減少していたが、皮質下層では比較的 WT と同様に発現していた (図 22H; Mallamaci et al., 2000)。それに対して、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> では calretinin の発現は全く認められなかった (図 22I)。

また、calretinin と GAP43 は視床および皮質の繊維束でも発現しており、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> ではそれらの発現もなくなっていた。皮質下層ニューロンは皮質求心性神経線維のガイドに重要な役割を担っていることが示されており (Molnar and Blakemore, 1995; Super et al., 1998; Zhou et al., 1999)、また、皮質下層での CSPGs の発現は視床からの神経支配と関係していることも示されている (Bicknese et al., 1994)。*Emx1/2*<sup>-/-</sup> では皮質下層での CSPGs, GAP43, calretinin の発現がなくなっていることから (図 22C, F, I)、視床からの投射に異常が認められることが推測された。そこで、抗 L1 抗体を用いてその異常の有無について調べた。17.5 日目の WT において、L1 陽性神経線維は間脳から内包へ向かって走行し、皮質下層に沿って腹側 - 側方部から皮質に投射する (図 22J; Fukuda et al., 1997)。L1 の発現を調べた結果、

*Emx2*<sup>-/-</sup> では L1 陽性神経線維は内包へ投射し、皮質に入ったが、皮質各部への投射は未発達でいくらかの繊維は皮質板の下に蓄積していた (図 22K)。一方、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> では視床 - 皮質投射繊維はほとんど皮質に投射できず、向きを変えて外包や扁桃体へ投射していた (図 22L)。

皮質遠心性神経線維のマーカ分子である TAG1 (Fukuda et al., 1997) は、皮質板および中間帯の太い神経線維束で発現し、皮質下層では発現しない (図 22M)。また、それらの繊維は視床軸索に沿って伸び、内包へ入ることがわかっている。17.5 日目において、*Emx2*<sup>-/-</sup> では TAG1 の発現は減弱しており (図 22N)、終脳背側/腹側境界での発現は認められなかった。それに対して、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> ではその発現はほとんど認められなかった (図 22O)。

#### 図 21. の説明 *reelin* の発現消失。

いずれも前頭断切片で、終脳背側領域を示す。(A-C) は 13.5 日目胚、(D-I) は 15.5 日目胚で、*reelin* プローブを用いた *in situ* hybridization を行なった。(G-I) は (D-F) の辺縁帯部分の拡大図である。(A, D, G) は WT、(B, E, H) は *Emx2*<sup>-/-</sup>、(C, F, I) は *Emx1/2*<sup>-/-</sup> を示す。*Emx1/2*<sup>-/-</sup> では *reelin* の発現が全く認められない。スケールバーは 100 $\mu$ m。

#### 図 22. の説明 CR 細胞および皮質下層の欠失。

いずれも前頭断切片で、(J-L) を除き、終脳背側領域を示す。(A-I) は 16.5 日目胚、(J-O) は 17.5 日目胚で、免疫染色を行なった。使用した抗体名は図中に示した通りである。(G-I) の枠内図は辺縁帯部分の拡大図を示す。(A, D, G, J, M) は WT、(B, E, H, K, N) は *Emx2*<sup>-/-</sup>、(C, F, I, L, O) は *Emx1/2*<sup>-/-</sup> を示す。スケールバーは (A-I, M-O) が 100 $\mu$ m、(J-L) が 400 $\mu$ m。略語：MZ: 辺縁帯、SP: 皮質下層。

图21

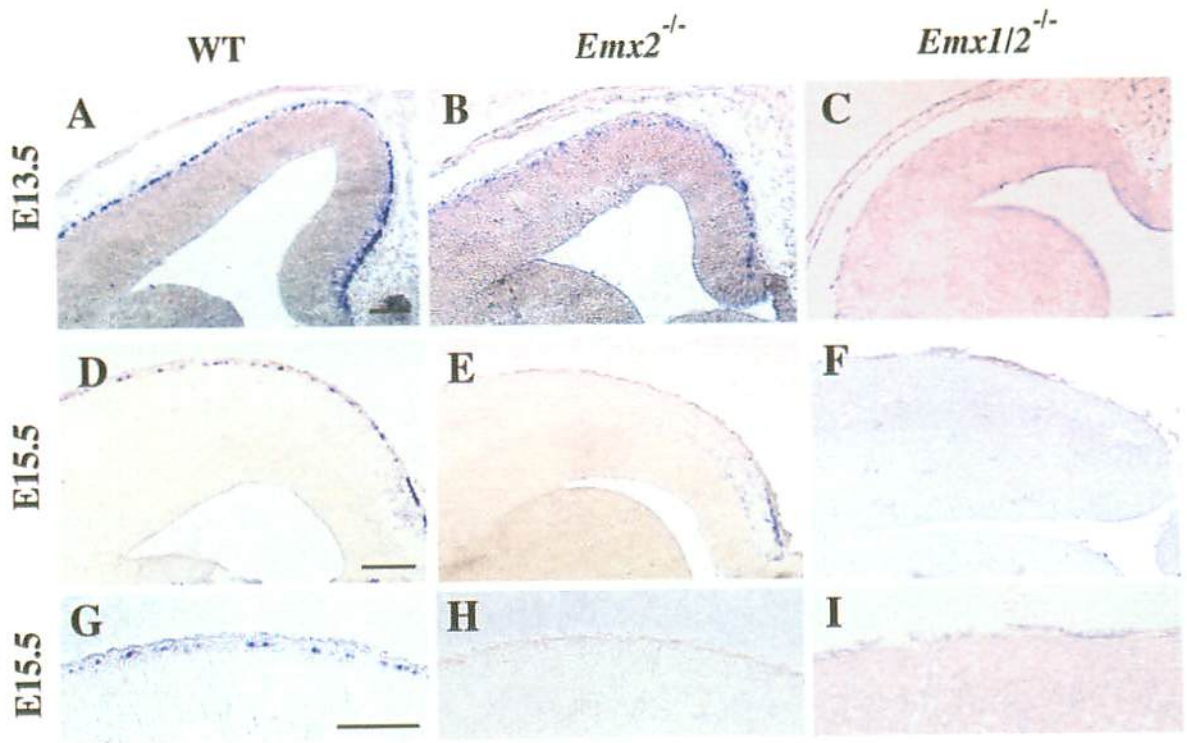
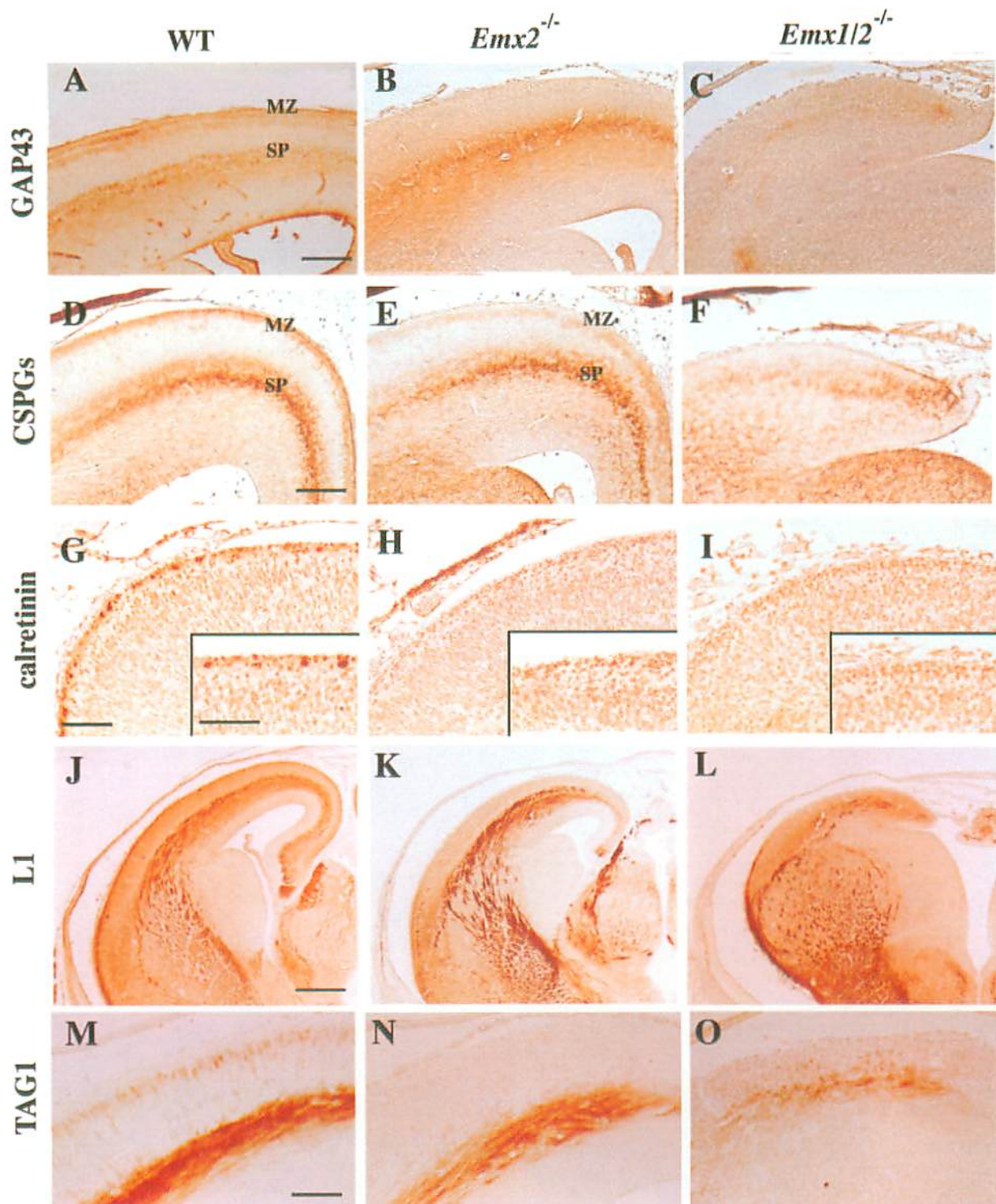


图22



### (7) 皮質形成開始時における Cajal-Retzius 細胞および皮質下層の形成に関する解析

前脳における *Emx1*, *Emx2* の発現は *Emx1* が 9.5 日目から始まるのに対して、*Emx2* は 8.5 日目から始まる (Gulisano et al., 1996; Briata et al., 1996; Mallamaci et al., 1998)。そして、*Emx2* は終脳腹側部で発現するのに対して、*Emx1* は発現しない (Tole et al., 2000b)。また、我々が発現解析を行なった結果、*Emx1*, *Emx2* は皮質の未分化な神経上皮で発現するが、*Emx1* は分化した細胞でも発現した。11.5 日目胚における *Emx1*, *Emx2* の発現は、脳室帯で重なっており (図 23A, D)、皮質形成が進むと、*Emx1* は脳室帯から皮質板にわたって発現しているのに対して、*Emx2* は脳室帯にのみ発現が限局していた (図 23B, E)。さらに注目すべき点として、*Emx2* は CR 細胞で発現するのに対して、*Emx1* は CR 細胞では発現しなかった (図 23C, F; Briata et al., 1996; Mallamaci et al., 1998)。しかし、その辺縁帯での *Emx2* の発現は 13.5 日目にはほとんどなくなっていた。

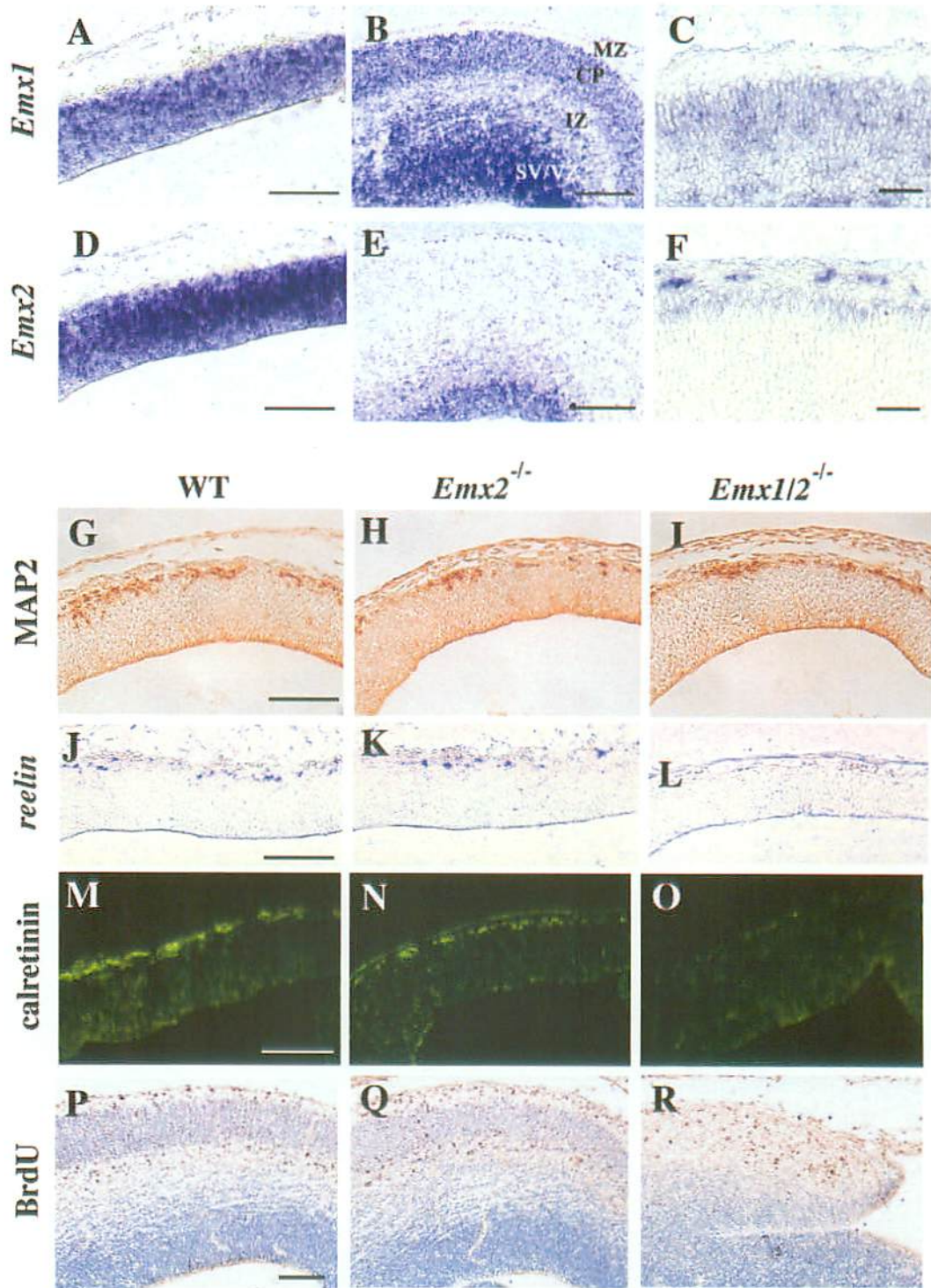
このような *Emx1*, *Emx2* の発現様式から、*Emx2*<sup>-/-</sup> よりも重篤な異常を示す *Emx1/2*<sup>-/-</sup> の皮質形成異常は、脳室帯で相補的に発現していることに起因していると思われた。皮質領域での細胞分化は、CR 細胞や皮質下層ニューロンが分化してくる場所であるプレプレート形成と共に 11.5 日目辺りから始まる。このプレプレートニューロンでは MAP2, *reelin*, *calretinin* が発現している (図 23G, J, M)、11.5 日目におけるそれらの分子の発現解析を行なった。その結果、*Emx2*<sup>-/-</sup> ではいずれの分子も WT と同様にプレプレートで発現が認められた (図 23H, K, N)。一方、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> では MAP2 陽性細胞は WT 同様に神経上皮の外側表面に発現していたが、*reelin* あるいは *calretinin* は発現が認められなかった (図 23I, L, O)。このことから、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> では CR 細胞と皮質下層が皮質形成初期から欠失していることが示唆された。

このことを確認するため、これらの細胞が生まれる 11.5 日目に BrdU を投与することにより、標識された細胞の有無およびその分布を調べた。妊娠 11.5 日目の母親マウスの腹腔内に BrdU を注入し、18.5 日目に胚を取り出して抗 BrdU 抗体による染色を行なった結果、*Emx2*<sup>-/-</sup> では BrdU 陽性細胞が WT とほぼ同様に辺縁帯および皮質下層に分布しており、幾つかの細胞だけが皮質板に広がっていた (図 23P, Q)。一方、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> では CR 細胞および皮質下層の欠失に伴い、BrdU 陽性細胞も認められないと予想された。しかしながら、BrdU 陽性細胞は皮質全体にわたって広がっていた (図 23R)。

図 23.の説明 皮質形成開始時における異常。

いずれも前頭断切片で、(A, D, J-O)は 11.5 日目胚、(B, C, E, F)は 15.5 日目胚、(G-I)は 12.5 日目胚、(P-R)は 18.5 日目胚を示す。(A-F, J-L)は *in situ* hybridization、(G-I, M-R)は免疫染色を行なった。それぞれ使用した RNA プロブ名および抗体名は図中に示した通りである。また、(C, F)は(B, E)の辺縁帯部分の拡大図で、(P-R)は 11.5 日目に BrdU 標識を行なったときの 18.5 日目における BrdU 陽性細胞の局在を示す。(A-F, G, J, M, P)は WT、(H, K, N, Q)は *Emx2*<sup>-/-</sup>、(I, L, O, R)は *Emx1/2*<sup>-/-</sup> を示す。*Emx1/2*<sup>-/-</sup> では皮質形成開始時から CR 細胞および皮質下層への分化に異常が認められるが、BrdU 陽性細胞は皮質内に分散して存在した。スケールバーは(C, F)が 25 $\mu$ m、それ以外は 100 $\mu$ m。略語：CP: 皮質板、IZ: 中間帯、MZ: 辺縁帯、SV/VZ: 脳室下帯/脳室帯。

图23



## 8. 考察

*Emx1/2*<sup>-/-</sup> ではシグナルセンターである cortical hem と脈絡叢が形成されず、原皮質が天井板に形質転換していた。そのことから、*Emx1/2* は cortical hem あるいは原皮質と天井板の境界の形成に協働しており、*Emx* は天井板の代わりに原皮質を形成する機能を有していると考えられる。そして、この過程は *Emx1* の発現が開始される神経管が閉じた直後に始まると思われる。一方、11.5 日目以降、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> では基底核隆起から皮質への接線方向の細胞の移動が著しく阻害されると共に、皮質の層構造にも顕著な異常が認められた。また、CR 細胞および皮質下層ニューロンが認められず、皮質を出入りする神経線維もかなり失われていた。以上のことから、皮質層構造の形成、特に CR 細胞や皮質下層ニューロンの形成は *Emx1*, *Emx2* による制御を受けていると思われる。また、これらの形成が基底核隆起から皮質への接線方向の細胞移動と関係している可能性が示唆された。さらに、最近 cortical hem が CR 細胞の主な供給源となることがわかってきている (Takiguchi-Hayashi et al., 2004; Yamazaki et al., 2004)。このことから、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> において発生後期に認められてくる皮質層構造の形成異常は、発生早期に cortical hem を欠失したことによる二次的な現象である可能性も考えられる。

### 第 1 節 マウス終脳背側内側部の領域形成における *Emx1*, *Emx2* の機能

#### (1) 天井板の拡大および脈絡叢の欠失

*Emx2*<sup>-/-</sup> と *Emx1/2*<sup>-/-</sup> の表現型の違いは組織学的には 11.5 日目から明らかになってくる。この違いは背側内側壁の伸長と天井板の拡大の程度で示され、特に *Emx2*<sup>-/-</sup> では内側壁と天井板の間に intermediary structure (IMR) が認められるが、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> ではこの構造が欠失している (図 5A.q, r)。そこで、拡大した背側正中の構造が本当に天井板か否かという疑問が持ち上がる。形態学的には、その領域を占める細胞の特徴は WT における天井板を占める細胞の特徴と一致していた。また、その領域では顕著な細胞死も認められ、細胞増殖性は皮質よりも低かった。そして、拡大した正中構造は *Lhx5*, *Msx1*, *Bmps* 陽性で *TTR*, *Wnts*, *Ngn2*, *Pax6*, *Lhx2*, *Gli3*, *BF1* 陰性であった。以上のことから、この拡大した背側正中構造は天井板であると判断した。しかし、この天井板では *noggin* の発現が消失し、逆に *Otx2* および *Ephb1* の発現が異所的に認められた。さらに、*Fgf8* 陰性領域が天井板の正中で広がっていた。これらの異常の原因に関しては、さらに詳細な解析が必要である。

また、commissure plate における *Fgf8* の発現が *Emx2*<sup>-/-</sup> では広がっていることは注目すべき点である (Fukuchi-Shimogori and Grove, 2001)。*Fgf8* シグナルは終脳のパターンニング (Shimamura and Rubenstein, 1997; Ye et al., 1998; Crossley et al., 2001) および新皮質の領域化 (Fukuchi-Shimogori and Grove, 2001; Garel et al., 2003) に関係していることが示唆されている。



*Fgf8* と *Emx2* の相互関係については、*Emx2*<sup>-/-</sup> において *Fgf8* の発現が拡大していることが示されているのと同様に(Fukuchi-Shimogori and Grove, 2003)、gain-of-function および loss-of-function の実験結果(Crossley et al., 2001; Garel et al., 2003; Fukuchi-Shimogori and Grove, 2003)が報告されている。しかし、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> では前方領域がさらに広がってはならず(Bishop et al., 2003)、これと一致して、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> では *Fgf8* 発現の拡大が認められなかった。このように *Fgf8* を介した背側内側壁の前方化は、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> における原皮質の欠失では説明できないと思われる。

*Emx2*<sup>-/-</sup> の IMR は、*TTR*, *Otx2*, *Msx1*, *Bmp6* 陽性で *Lhx2*, *Gli3*, *BF1*, *Pax6*, *Ngn2*, *Lef1*, *Ephb1*, *Wnt8b*, *Wnt3a*, *Lhx5* 陰性であることから、この領域は脈絡叢であると推察された。このように、*Emx2*<sup>-/-</sup> では脈絡叢は貧弱であるが形成されていたのに対して、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> では脈絡叢は形成されなかった。脈絡叢では *Emx1*, *Emx2* は共に発現していないので、脈絡叢形成における *Emx1*, *Emx2* の作用は細胞自律的ではないと思われる。*Lhx5* や *Gli3* の変異マウスでは、cortical hem の欠失と共に脈絡層も欠失することから、cortical hem と脈絡叢の形成はお互いに関係していると考えられる。しかし、それらの遺伝子も脈絡叢では発現していない(Grove et al., 1998; Zhao et al., 1999)。また、*Wnt3a* ホモ変異マウス (以下、*Wnt3a*<sup>-/-</sup>) では、*Emx2*<sup>-/-</sup> と同様に cortical hem に異常が認められ、脈絡叢の大きさが減少していた(図 7; Lee et al., 2000)。一方、*Lhx2* も同様に脈絡叢では発現しないが、*Lhx2* ホモ変異マウス (以下、*Lhx2*<sup>-/-</sup>) では cortical hem が肥大しており、さらに脈絡叢も肥大していた(Bulchand et al., 2001; Monuki et al., 2001)。脈絡叢は *Bmp* 遺伝子群の発現が最も高いところで形成されるが、*Lhx5* および *Gli3* 変異マウスにおける *Bmp* 遺伝子群の発現は消失または著しく減少しており(Theil et al., 1999, 2002; Zhao et al., 1999; Tole et al., 2000b)、特に *Bmp* 遺伝子群が強く発現している領域が *Emx1/2*<sup>-/-</sup> と同様に認められなかった。一方、*Emx2*<sup>-/-</sup> および *Wnt3a*<sup>-/-</sup> では *Bmp* 遺伝子群の強い発現領域が認められたが、その領域は減少していた。さらに、条件的に *Bmpr1a* の発現をなくした *Bmpr1a* 変異体や *nestin* プロモーター下に活性化型 *Bmpr1a* を挿入して強制的に発現させたマウスを用いた解析から、BMP シグナルは背側内側壁の形成には必要ではないが、脈絡叢の形成には必要不可欠であることが示されている(Hebert et al., 2002; Panchision et al., 2001)。以上のことから、cortical hem からのシグナルがその隣の将来の脈絡叢領域に対して、*Bmp* 遺伝子群あるいは *Msx1*, *Otx2* の発現を誘導または維持していると思われる。

## (2) 原皮質の形成

背側内側壁の形成に異常をきたす幾つかの変異体が知られているが、天井板の拡大は *Emx* 変異マウスに特徴的なことである。*Wnt3a*<sup>-/-</sup> は 18.5 日目では海馬領域が欠失しているが、10.5 日目では *Wnt8b* 陽性の背側内側壁は正常に認められる (Lee et al., 2000)。*Lef1* ドミナントネガティブマウス (*Lef1*<sup>LacZ/LacZ</sup>) の 18.5 日目胚でも CA 領域および歯状回を欠失

していた(Galceran et al., 2000)。しかし、12.5 日目では *Lef1* 陽性領域が存在し、むしろ発現領域が拡大する場合もあった。また、*Lhx5* ホモ変異マウス (以下、*Lhx5*<sup>-/-</sup>) では最初領域の特異化が認められるが、海馬領域は正常な形態をしていない(Zhao et al., 1999)。一方、*Lhx2*<sup>-/-</sup> では原皮質を含むほとんどの皮質領域が cortical hem および脈絡叢に形質転換していた(Bulchand et al., 2001; Monuki et al., 2001)。*Lhx2* の背側内側壁での発現は 10.5 日目に始まるので、おそらく 10.5 日目までは将来の皮質領域は正常に形成されるのであろう。つまり、初期の皮質前駆細胞は cortical hem や脈絡叢になる反応能を持っていると思われるのに対し、*Lhx2* は cortical hem の領域化および一旦 non-hem/non-脈絡叢に誘導された皮質前駆細胞の特異化に機能していると考えられる。このように *Wnt3a*, *Lef1*, *Lhx5*, *Lhx2* 変異体では当初背側内側壁が形成されることから、内側壁がそれぞれの領域に細分化され始めるのは 10.5 日目より多少遅れた時期であると考えられている(Tole and Grove, 2001)。そして、10.5 日目までに勾配を持ちながら重なり合って発現している *Wnt*, *Tcf*, *Lhx* 遺伝子群は原皮質領域を誘導あるいは決定するのに機能しているのではなく、内側壁をそれぞれの領域にパターン化するのに機能しているのかもしれない(Tole and Grove, 2001)。

終脳背側内側壁における *Emx* の発現は、*Wnt*, *Tcf/Lef*, *Lhx* ファミリー遺伝子の発現より先に始まる。*Emx1* の発現は神経管が閉じるのに続いて 9.5 日目辺りから始まる。*Emx1/2*<sup>-/-</sup> では、10.5 日目においてすでに終脳背側内側領域に異常が認められることから、異常は *Emx1* の発現が始まる 9.5 日目辺りから生じると考えられる。すなわち天井板と皮質の境界および原皮質領域は、神経管が閉じてから決定されと考えられる。この時期、背側正中では *Msx*, *Bmp* が発現しており、*Emx2* の発現は *BMP* シグナルにより抑制される(Ohkubo et al., 2002; Theil et al., 2002)。以上のことから、cortical hem は *Emx1*, *Emx2* が *Msx* あるいは *Bmp* と発現が重なり合った領域で形成される可能性が考えられる。また、低形成な cortical hem を持つ 12.5 日目の *Emx2*<sup>-/-</sup> では背側内側壁が減少するが、内側壁ではそれぞれの分子が依然発現しており、のちに各々の背側内側構造が形成された。よって、通常 *Emx2* は皮質と天井板の間の境界を決定しているが、*Emx2* を欠失すると *Emx1* は cortical hem あるいは皮質と天井板の境界の形成に機能する方向に働くと思われる。一方、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> では *Wnt3a*, *Wnt2b*, *Wnt5a* の発現消失や *Wnt8b*, *Bmp6*, *Msx1*, *Otx2* の強い発現領域の消失で示されるように、cortical hem が形成されなかった。それに付随して、拡大した天井板に隣接する内側壁では *Lef1*, *Lhx2*, *BF1*, *Pax6* 陰性領域がなくなっていた (図 24)。

また、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> では *Ephb1* および *Prox1* 陽性領域が形成されず、海馬構造が認められなかった。そして、*Wnt8b* および *Lef1* 発現領域の最も背側 - 側方部がどこの領域なのか、すなわち cingulate cortex なのかあるいは鉤状回なのかについては確認できなかった。マーカー遺伝子の発現が消失したとき、特にそのマーカーが分化細胞を認識する場合は各々の構造の欠失とは必ずしも関係しないと考えられる。つまり 18.5 日目の *Emx1/2*<sup>-/-</sup> において、*Big1* の発現が認められないことは鉤状回を欠失していることを必ずしも意味しないと思わ

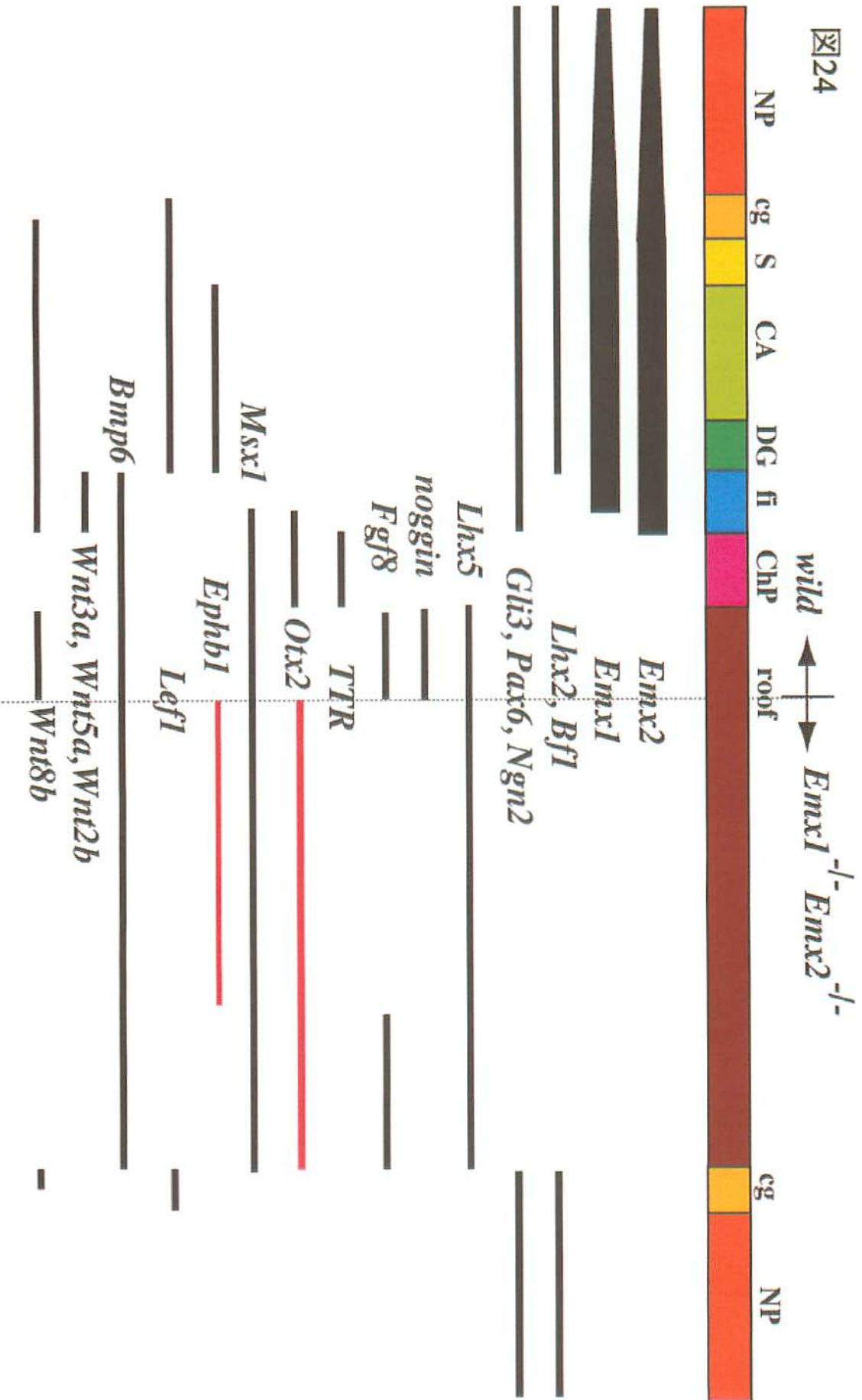
れる。(また、新皮質における *Big1* の発現も認められなかった。) さらに、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> において、*NT3* は新皮質で発現していないが、これは cingulate cortex の欠失を意味してはいないのかもしれない。一方、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> では *NP2* および *Steel* の背側内側壁における発現はほとんど失われているのに対して、新皮質における発現は残っていた。*NP2* は海馬全体で (鉤状回や cingulate neocortex への移行部に近い境界まで) 発現していると考えられている (Galceran et al., 2000)。*Steel* の発現が認められない領域は鉤状回であり (Lee et al., 2000)、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> ではこの領域を欠失していた。はっきりと結論付けるためには更に詳細な解析が必要であるが、組織学的解析の結果と考え合わせると、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> では鉤状回を含む原皮質全体が天井板に形質転換したと推測される。

*Emx1/2*<sup>-/-</sup> において、どのようにして天井板へ形質転換する背側内側壁の側方境界が決められているのか、あるいはなぜ背側-側方の新皮質は天井板に形質転換してないのかについては依然疑問が残るので、今後明らかにしなければならない。*Pax6* は前方-側方で強く発現し、*Emx* と対称的な勾配を持って発現している。*Emx* と *Pax6* に関しては、相互の拮抗作用によって皮質の領域化を決定していることが示唆されている (Bishop et al., 2000, 2002; Mallamaci et al., 2000; Muzio et al., 2002)。よって、*Pax6* は *Emx1/2*<sup>-/-</sup> の側方に認められる皮質領域の形成に機能していると推測される。しかしながら、*Emx2* と *Pax6* は 9.0 日目以前に前脳の領域化に相互作用していることから (未公表データ)、*Emx2/Pax6* 二重ホモ変異マウスあるいは *Emx1/Emx2/Pax6* 三重ホモ変異マウスを用いた解析を行なってもその可能性については明らかにできないかもしれない。

図 24. の説明 WT および *Emx1/2*<sup>-/-</sup> 12.5 日目胚の終脳背側内側部における領域特異的マーカー遺伝子の発現を示す概略図。

図は終脳背側内側構造 (概略) を線状に並べたもので、天井板を真中にして左半分は WT、右半分は *Emx1/2*<sup>-/-</sup> の各背側内側構造を四角で示す。*Emx1/2*<sup>-/-</sup> の広がった天井板では、本来発現が認められるはずの *noggin* および *Wnt8b* の発現が認められず、さらに正中には *Fgf8* 陰性領域が存在し、逆に本来発現が認められない *Otx2*, *Ephb1* の発現が認められた。略語: CA: CA 領域、cg: cingulate cortex、ChP: 脈絡叢、DG: 歯状回、fi: 海馬采/cortical hem、NP: 新皮質、S: 鉤状回。

图24



### (3) *Gli3* および *Emx* の関係

*Gli3* 変異体 (以下、*Xt*) も海馬, cortical hem, 脈絡叢が形成されない(Grove et al., 1998)。また、*Emx1* の発現が認められず(Theil et al., 1999; Tole et al., 2000b)、*Emx2* はかなり発現が減少していることが明らかになっている (Tole et al., 2000b)。これらのデータと今回の結果とを考え合わせると、*Xt* における終脳背側内側壁の異常は *Emx1*, *Emx2* の発現異常と関係していることを示唆している。しかしながら、*Xt* と *Emx1/2*<sup>-/-</sup> の表現型の間には幾つかの違いが認められた。まず、*Xt* では不完全ではあるが終脳背側内側壁の伸長が認められた (Grove et al., 1998)。また、*Xt* の背側内側壁における *Wnt8b* 陽性領域は、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> のそれよりも明らかに広範囲だった。しかし、*Xt* の内側壁は WT より小さく、異常な形態をしていた。そして、*Ephb1* あるいは *KAl* 陽性構造も認められなかった (Tole et al., 2000b)。*Xt* で認められたこれらの異常の程度は、*Emx2* の発現が多少残っていることから説明できるのかもしれない。

それらに加えて、*Xt* では皮質の腹側化が認められる (Tole et al., 2000b; Rallu et al., 2002; Kuschel et al., 2003)。それに対して、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> の皮質背側/腹側境界には異常が認められなかった。また、プレプレート形成に続く皮質形成についてもこれらの変異体間で違いが認められた (Theil et al., 1999)。このように、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> よりも *Xt* に広範囲な異常が認められたことから、*Gli3* は *Emx1*, *Emx2* 以外の幾つかの分子も制御していると思われる。

さらに、*Xt* および *Emx1/2*<sup>-/-</sup> 間の最も大きな違いは *Xt* では天井板の拡大が認められないことである。*Xt* において *Fgf8* は天井板全体で発現が認められるのに対して、天井板における *noggin* の発現は WT と同様である (Theil et al., 1999)。*Xt* において *Msx1* の発現は表皮外胚葉では維持されていたが、天井板における発現は消失していた (Theil et al., 1999)。また、*Bmp* ファミリー分子の発現も *Xt* の天井板では消失あるいは著しく減少していた (Tole et al., 2000b)。*Xt* で天井板の拡大が起らないことは、*Msx1*, *Bmps* の発現が消失していることから説明できるであろう。

*Emx2* エンハンサーの解析から、*Emx2* の発現は *BMP* および *WNT* シグナルにより相乗的に制御される一方で、*Gli3* には直接的な制御は受けていないことが明らかになっている (Theil et al., 2002)。このことから、*Gli3* は *Emx2* の発現を制御している *Bmp*, *Wnt* 遺伝子群の発現を制御していると予想される。つまり、10.5 日目以降の *Emx2* の発現は背側内側壁において重なり合ったり勾配を持って発現している *Bmp*, *Wnt* 遺伝子群によって制御されている可能性がある。しかし、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> および *Xt* における終脳背側内側領域の異常は、*Wnt* ファミリー分子の発現が背側内側でまだ始まっていない、もっと早い時期に生じると思われる。その上、この同定されたエンハンサーは 8.5 日目から 10.5 日目といった早い時期の *Emx2* の発現を反映していない後期エンハンサーであると考えられる。よって、*Emx2* 初期エンハンサーが別に存在し、*Gli3* により直接制御されている可能性がある。

最後に、*Rfx4* 変異マウスについての報告に注目すべき点がある (Blackshear et al., 2003)。この変異マウスでは、cortical hem および脈絡叢を含む背側内側領域が形成されないが、*Emx* や *Msx* の発現は認められ、天井板は広がっていない。このことから、終脳背側内側領域の形成において *Rfx4* が *Gli3* や *Emx* とどのように関わっているのか明らかにしていくことは、今後非常に興味を持たれる。

#### (4) 終脳背側内側壁における WNT および BMP シグナルの役割

*Wnt3a*<sup>-/-</sup> の表現型で示されるように、終脳背側内側壁の増殖および分化は WNT シグナルにより制御されている。そこで、*Emx2*<sup>+/Wnt1</sup> は終脳背側領域の初期領域化には影響せず、その後の原皮質領域の形成を促進すると予測した。しかしながら、*Emx2*<sup>+/Wnt1</sup> では皮質神経上皮のみ拡大が認められた。*Wnt1* は細胞増殖の活性化因子として働くことが知られており、*nestin* プロモーター下に活性化型  $\beta$ -catenin を連結したトランスジェニックマウスでは劇的に増殖細胞が増加し、入り組んだひだをもった皮質領域がかなり増大した表現型を示した (Chenn and Walsh, 2002)。このことから、*Emx2*<sup>+/Wnt1</sup> では皮質神経上皮の細胞増殖が異常に活性化された可能性が考えられる。

Ligon らは変異型 *Wnt1* エンハンサーを用いて *Wnt1* を終脳で強制発現させたトランスジェニックマウスについて報告している (Ligon et al., 2003)。そのトランスジェニックマウスにおける外因性の *Wnt1* の発現は、今回作製した *Emx2*<sup>+/Wnt1</sup> と同様に終脳背側部で認められた。さらに、そのトランスジェニックマウスでは、終脳背側部での異常な細胞増殖の結果生じたと思われる異所性軟膜神経膠腫 (leptomeningeal glioneuronal heterotopias; 以下、LGH) が形成されたが、今回作製した *Emx2*<sup>+/Wnt1</sup> でも同様に LGH 様の構造が認められた。一方、彼らが解析した *Emx2*<sup>-/-</sup> においても LGH が認められているが、今回の解析に使用した *Emx2*<sup>-/-</sup> では認められなかった。このような表現型の違いを生じた原因については、両者の間では使用したマウスのバックグラウンドが異なるため (CD1 vs. C57Bl6)、終脳背側部における *Wnt1* の発現レベルや感受性に差異があるのかもしれない。

また一方で、なぜ *Emx2*<sup>+/Wnt1</sup> の異常が内側部領域では認められないのかという疑問が生じる。一つの可能性として、皮質領域の神経上皮と内側部の神経上皮とでは *Wnt1* シグナルに対する感受性が異なるのかもしれない。*Sfrp* ファミリーは、*Wnt1* リガンドのアンタゴニストとして機能することが知られている。興味深いことに、*Sfrp* ファミリーは終脳背側内側部で高レベルに発現している。*Wnt1* 受容体である *Frizzle* ファミリーの多様性と併せて、*Wnt1* シグナルの細胞外の修飾因子が皮質領域と内側領域の感受性の違いに関与しているのかもしれない。

*Emx2*<sup>+/CA-Alk3</sup> では BMP シグナルの活性化により背側内側壁が天井板に形質転換し、*Emx2*<sup>-/-</sup> あるいは *Emx1/2*<sup>-/-</sup> とよく似た表現型を示すだろうと予測した。条件的に *Bmpr1a* の発現をなくした *Bmpr1a* 変異マウスおよび *nestin* プロモーター下に活性化型 *Bmpr1a* を連

結したトランスジェニックマウスの解析から、*BMP* シグナルが脈絡叢の形成には必要不可欠であるが背側内側壁の形成にはそうではないことが示唆されている(Hebert et al., 2002; Panchision et al., 2001)。*Bmpr1a* 変異体において、*BMP* シグナルは内側壁で産生されていないと思われるが、本当にそうであるかどうかは不明である。また、*Bmp5/7* 二重ホモ変異マウスでは背側内側壁が著しく低形成になっている (Solloway and Robertson, 1999)。さらに、*BF1*<sup>-/-</sup> では *Bmp4* の発現が皮質全体で認められるが、皮質は脈絡叢に形質転換していない (Dou et al., 1999)。*Emx2*<sup>+/-</sup>*CA-ALK3* における現在までの解析では、原皮質の天井板への形質転換あるいは脈絡叢の拡大は認められておらず、むしろ背側内側壁が拡大していた。この結果から、どの領域になるかは *BMP* シグナルの量依存的に決定されるのかもしれない。つまり、cortical hem および脈絡叢は *Bmp* 遺伝子群が発現している領域内で最も *BMP* シグナルが高レベルなところに分化するのかもしれない。*nestin* プロモーター下における *BMP* シグナルの発現量と比較すると、*Emx2* 下における *CA-ALK3* の発現量は原皮質の形成には十分であるが、天井板や脈絡叢への形質転換を引き起こすには不十分なのかもしれない。

## 第2節 マウス終脳皮質領域形成における *Emx1*, *Emx2* の機能

### (1) 終脳腹側部から背側部への細胞移動の異常

*Emx1/2*<sup>-/-</sup> で認められる皮質領域は最初正常に発生するが、18.5日目になるとWTに比べて非常に薄くなっていた。一方、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> と同様に介在ニューロンの移動に異常が認められる *Dlx1/2*, *Mash1*, *Nkx2.1* 各変異マウスではそのような皮質の発達に異常は認められていない(Anderson et al., 1997; Casarosa et al., 1999; Sussel et al., 1999)。さらに、皮質層構造に異常が認められる *reelin* シグナル経路に参与する分子の変異マウスにおいても皮質の厚みには異常が見られない(Ohshima et al., 1996; Chae et al., 1997; Howell et al., 1997; Sheldon et al., 1997; Gilmore et al., 1998; Rice et al., 1998; Trommsdorff et al., 1999; Rice and Curran, 1999)。16.5日目の *Emx1/2*<sup>-/-</sup> において、皮質領域の細胞数はWTの60%にまで減少していたが、これは基底核隆起からの細胞移動ができないことを主因としていると思われる、それに付随して組織学的解析では *Emx1/2*<sup>-/-</sup> の基底核隆起が肥大していた。これと相関して、スライス培養法による細胞の移動を調べた結果、終脳腹側部を Dil 標識した *Emx1/2*<sup>-/-</sup> では背側部への細胞の流入が全く認められず、腹側部の肥大が認められた(図16I, L)。しかし、このような解析結果を得たにもかかわらず、免疫染色による解析では *Emx1/2*<sup>-/-</sup> の皮質領域において GABA 陽性細胞が認められた(図19O)。このことから、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> では発育遅延により細胞移動が遅れてこのような表現型が現れているという可能性も考えられる。しかし、WTにおいてまだ細胞移動が終わっていないと思われる出生直後に *Emx1/2*<sup>-/-</sup> は死亡するので、移動の遅延が起きているのか否かについてはわからない。また、腹側部から背側部への細胞の移動経路には最初に通る辺縁帯と、その後に通る中間帯があるが、今回解析を行なった時期よりも前に一部の GABA 陽性細胞が辺縁帯を通過して皮質へ入った可能性もある。

次に、「本当に細胞移動の異常で細胞数の減少を完全に説明できるか?」ということについて考察する。GABA 陽性の介在ニューロンは全ての皮質ニューロンの25%以上を占めるという報告(Gonchar and Burkhalter, 1997)や、実質的には全ての皮質の GABA 陽性介在ニューロンは基底核隆起由来であるという報告(Stühmer et al., 2002)もある。一方、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> では原皮質が欠失していることから、おそらく背側正中からの細胞の移動はないものと思われる(Monuki et al., 2001)。よって、終脳腹側部から背側部へ移動する性質を持った細胞自体は *Emx1/2*<sup>-/-</sup> においても存在するが、それらの細胞の背側部への流入が阻害されていると考えられる。また、*Emx1*, *Emx2* が皮質形成期に脳室帯で重なって発現することから、*Emx1*, *Emx2* は皮質内での前駆細胞の増殖あるいは多能的な分化を促進するのかもしれない。しかし、11.5日目の *Emx1/2*<sup>-/-</sup> において皮質領域に異常は認められず、また11.5日目あるいは16.5日目における BrdU の取り込みにも顕著な減少傾向は見られなかった。さらに、前駆細胞の未成熟な分化や細胞死あるいは四倍体細胞数の増加も認められなかった。現在の解



析ではそれぞれは独立した要素で主因とはなり得ないが、*Emx1/2*<sup>-/-</sup>の皮質領域における細胞数はWTに比べて40%も減少していることから、背側部への細胞流入の異常に加えてこれらの要素が合わさって細胞数の減少が引き起こされた可能性は否定できない。

## (2) 細胞分化の異常

MAP2, *NEX*, *Lhx2*, *RC2*, GFAPの発現解析から、*Emx1/2*<sup>-/-</sup>では神経分化に異常は認められず、また、放射状グリア細胞は形成されており、アストロサイトへ分化が促進されているということもないことがわかった。しかし、*Emx1/2*<sup>-/-</sup>では皮質構造や層構造に沿った細胞の分化に異常が認められた。11.5日目から12.5日目の*Emx1/2*<sup>-/-</sup>の皮質では、プレプレート様の構造は形成されているが、この時期に分化した細胞はのちに皮質全体に広がっていた。また、*reelin*, *calretinin*, CSPGs, GAP43の発現は消失していたことから、*Emx1/2*<sup>-/-</sup>において分裂を終えた細胞はCR細胞や皮質下層ニューロンへ分化できないと思われる。一部CSPGsの発現は認められるが、これはCR細胞や皮質下層以外での発現である可能性が高い。さらに、皮質下層でのMAP2, glutamate, GABAの発現消失や視床からの投射ができないことも皮質下層ニューロンが欠失しているということを補足している。*Emx1/2*<sup>-/-</sup>において、11.5日~12.5日目に産生された細胞がどのような性質を有しているのかについては更なる解析が必要であるが、それらの細胞は本来*calretinin*あるいは*reelin*を発現すべき前駆細胞が未成熟な状態にあるのかもしれない。しかし、これらの細胞は生きてはいるものの正常な場所に存在しないため、異常な分化を起こしていると考えられる。そのため、これらの細胞は慢性的に産生されているのかもしれないし、あるいはそれらは二重変異の結果として神経分化を逸脱した未知の前駆細胞という可能性もある。

## (3) Cajal-Retzius細胞および皮質下層ニューロンの欠失

近年、皮質の層構造に異常をきたす変異マウスが報告されている。これらのほとんどは*reelin*シグナル経路に属する遺伝子の変異体で、それらの表現型は*reeler*に似ている(Ohshima et al., 1996; Howell et al., 1997; Sheldon et al., 1997; Chae et al., 1997; Gilmore et al., 1998; Rice et al., 1998; Rice and Curran, 1999; Trommsdorff et al., 1999)。BDNF欠損マウスにおける皮質層構造の異常もCR細胞での*reelin*発現制御により説明できる(Ringstedt et al., 1998)。また、*Tbr*欠損マウスでの異常も*reelin*発現の減少が関与しているのであろう(Hevner et al., 2001)。今回解析した*Emx1/2*<sup>-/-</sup>における皮質層構造の異常は、*reeler*の異常よりも明らかに重篤であった。そして、この皮質層構造の異常は、CR細胞や皮質下層ニューロン自体が形成されないことによるものと思われる。このようなパイオニアニューロンが形成されないというのは、これまでで初めての報告である。

*Emx2*<sup>-/-</sup>は*Emx1/2*<sup>-/-</sup>と比較すると辺縁帯や皮質下層は形成され、皮質層構造の異常は*Emx1/2*<sup>-/-</sup>ほど認められなかった。また、*reelin*陽性のCR細胞も形成され、最初は正常に

辺縁帯に存在した。しかし、CR 細胞は次第に皮質側方で失われていった。発生中の皮質では、*Emx1* は辺縁帯では発現していないが、脳室帯から皮質板にわたって発現している (Briata et al., 1996; Mallamaci et al., 1998)。それに対して *Emx2* は、脳室帯と CR 細胞でのみ発現し (Simeone et al., 1992; Gulisano et al., 1996; Mallamaci et al., 1998)、11.5 日目や 12.5 日目には辺縁帯における発現は認められない。これらの発現様式および *Emx1/2*<sup>-/-</sup> の表現型から、*Emx2* は辺縁帯の CR 細胞の維持に働き、*Emx1*, *Emx2* は脳室帯に存在する前駆細胞から CR 細胞や皮質下層ニューロンが形成されるのに協働していると考えられる。また、*Emx2*<sup>-/-</sup> の背側内側領域で *reelin* 陽性細胞が残っていることに関しては、これらの細胞は CR 細胞の中でも特異的な細胞であると思われ、これらの細胞は *Emx1/2*<sup>-/-</sup> では存在しないが *Emx2*<sup>-/-</sup> では存在する cortical hem 由来の CR 細胞である可能性がある (Monuki et al., 2001)。

一般的に CR 細胞は 11.5 日目あたりに脳室帯で産生され、垂直方向に移動して皮質形成期中は辺縁帯に留まっていると考えられており、CR 細胞の多くは glutamate 陽性である (Del Rio et al., 1995)。マウスでは辺縁帯の GABA 陽性ニューロンは *reelin* を発現せず、CR 細胞のみが特異的に *reelin* 陽性である (Alcántara et al., 1998)。現在までに CR 細胞に関する多数の報告があるにも関わらず、CR 細胞については完全には解明されていない。すなわち、それらの細胞数は明らかに皮質形成と共に増加するが (Alcántara et al., 1998)、形成中に辺縁帯を構成する細胞の種類の中でどれが CR 細胞になるのか、あるいはその起源はどこなのか、ということは現在議論の的である。少なくともラットでは嗅球後領域の軟膜下にある少数のニューロンが CR 細胞の起源の一つであり、胎仔期の様々な時期に辺縁帯に移動すると報告されている (Meyer et al., 1998)。マウスにおいてはマイクロアレイ解析により、CR 細胞特異的に発現する遺伝子として明らかになった *p21*, *Gdn* (*Gria derived nexin precursor*), *Ebf2* (*Early B-cell factor 2*) のうち、*p21*, *Gdn* が cortical hem を含む終脳背側後方内側領域 (以下、CMWT) の辺縁帯で、*Ebf2* が腹側外套の辺縁帯で発現することから、これらの領域が CR 細胞の起源になっている可能性が示されている (Yamazaki et al., 2004)。さらに、Takiguchi-Hayashi らも cortical hem を含む CMWT で *reelin* 陽性細胞が産生され、辺縁帯を通過して皮質領域全体に移動すること、そして皮質内では内側 - 後方から前方 - 側方へ勾配を持って分布する可能性を示している (Takiguchi-Hayashi et al., 2004)。以上のことから、現在 cortical hem が CR 細胞の主な供給源である可能性が示唆されている。このことから、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> において発生後期に認められてくる皮質層構造の形成異常は、発生早期に cortical hem を欠失したことによる二次的な現象である可能性も考えられる。そして、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> において 11.5 日目に BrdU 標識され、皮質全体に広がっていた BrdU 陽性細胞 (図 23R) は、皮質下層ニューロンに分化すべきであった未分化な細胞のみを示していると思われる。

皮質下層ニューロンは視床-皮質投射繊維の走行に重要な役割を果たしていることが報

告されている(Allendoer and Shatz, 1994; Molnar and Blakemore, 1995; Nothias et al., 1998; Mackarehtschian et al., 1999; Zhou et al., 1999)。 *Emx1/2*<sup>-/-</sup> では CSPGs の発現がほとんどなくなっているが、皮質下層での CSPGs 発現は視床での神経投射に関係していることが示されている(Bicknese et al., 1994)。 *reeler* マウスでは視床からの神経軸索は直接表層に位置する皮質下層に入り、下向して第IV層に投射する(Molnar and Blakemore, 1995)。 *Tbr* 変異マウスでは皮質下層の細胞は存在するが、違った分化の方向へと変化させられ、視床からの投射繊維に異常をきたす(Hevner et al., 2001)。一方、 *Emx1/2*<sup>-/-</sup> では calretinin や GAP43 の発現に加え、L1 の発現にも異常が認められることは、視床 - 皮質投射経路に異常が認められることを示唆している。しかし、その詳細な解析については今後の課題である。一方、放射状グリア細胞もまた初期に認められる細胞の一つで、 *Emx1/2*<sup>-/-</sup> ではこれらの細胞は形成されているが、放射状配列は非常に乱れていた。CR 細胞は放射状グリア細胞を維持していることが示唆されており(Hunter-Schaedle, 1997; Soriano et al., 1997; Super et al., 2000)、 *reeler* マウスでは放射状の足場は配列を崩しており、未成熟のまま消失する。以上のことから、 *Emx1/2*<sup>-/-</sup> における放射状グリア細胞の配列異常は CR 細胞の欠失による二次的な影響であると思われる。

#### (4) 細胞流入と皮質層構造形成

終脳腹側部から背側部への細胞移動の異常と皮質の層構造形成が関係しているのかどうか、あるいは関係しているとするならばどのように関係しているのかに興味を持たれる。 *Emx1* は終脳腹側部あるいは GABA 陽性ニューロンでは発現していないことから(Iwasato et al., 2000)、皮質において *Emx1*, *Emx2* の機能が欠失したことにより細胞移動の異常が引き起こされたと考えられる。実際、移植実験の結果から細胞移動の異常は腹側部の細胞によるものではないことを示した。さらに、介在ニューロンだけでなく、全ての皮質の *reelin* 陽性 CR 細胞が皮質領域外で産生され、皮質のプレプレートや辺縁帯に移動する可能性もある(Lavdas et al., 1999)。つまり、 *Emx1*, *Emx2* は皮質内での細胞移動に重要で、 *Emx1/2*<sup>-/-</sup> における皮質層構造の異常は、CR 細胞や皮質下層の欠失あるいは細胞移動の異常により皮質領域外から入ってくるができなかった細胞の欠如によって引き起こされた二次的なものかもしれない。また、 *Dlx1/2*, *Mash1*, *Nkx2.1* 各変異マウスでの皮質層構造の形成はほぼ正常であったが (Anderson et al., 1997; Casarosa et al., 1999; Sussel et al., 1999)、各変異マウスの皮質では介在ニューロンはなくなっておらず、CR 細胞や皮質下層ニューロンも存在する。一方、 *Emx1/2*<sup>-/-</sup> で認められた異常から考えると、 *Emx1*, *Emx2* による皮質での層構造形成あるいは CR 細胞や皮質下層ニューロンの形成は、介在ニューロンの腹側から背側への移動が不可欠である可能性もある。また、 *reeler* マウスにおいても介在ニューロンは皮質へ移動するので、これは *reelin* に対する反応ではないと思われる。皮質中の腹側由来細胞と皮質遠心性神経線維および視床-皮質投射神経繊維の密接な関係については、移動中の介在ニ

ニューロンがこの繊維束を皮質への移動の足場として使っているかもしれないことが示されている(Metin and Godement, 1996)。また、皮質遠心性繊維に発現している TAG-1 が、その移動を仲介していることが示されている(Denaxa et al., 2001)。それらのことと相関して、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> では TAG-1, L1 陽性の神経繊維はほとんど認められなかった。基底核隆起から皮質への移動に必要なガイダンス的な因子は幾つか報告されているので(Marin and Rubenstein, 2001)、これらの因子の発現変化については更なる解析が必要である。

一方、*Emx1*, *Emx2* に対して *Pax6* は腹側由来細胞の皮質への侵入を制限していると考えられている(Chapouton et al., 1999)。*Pax6* 変異マウス (以下、*Sey/Sey*) では LGE がより腹側に特異化されて MGE 領域が拡大し、背側/腹側境界がなくなると共に腹側および背側-側方皮質が腹側様の構造に再配置される(Stoykova et al., 2000; Toresson et al., 2000; Yun et al., 2001)。この *Sey/Sey* の皮質では、辺縁帯に CR 細胞が認められ、基本的な皮質層構造は維持されている。しかしながら、細胞の増殖性は脳室帯の肥大に伴い促進するが、中間帯および皮質下層を欠失していた(Stoykova et al., 2000)。また、皮質板は薄く、放射状に配置しておらず、そのかわり辺縁帯が厚く細胞過多になっていた。さらに、皮質の放射状グリア細胞には形態異常が認められ、分化が阻害されており(Götz et al., 1998)、後期に産生された皮質ニューロンの皮質板への放射状の移動が妨げられていた(Caric et al., 1997)。一方、EGFファミリーに属する *Tgf α* や *Wnt* 拮抗分子である *Sfrp2* が終脳背側/腹側境界で発現し、*Tgf α* の発現は *Emx2*<sup>-/-</sup> では認められるが、*Sey/Sey* では消失していることが明らかとなっている。よって、これらの分子が終脳腹側から背側へ細胞が流入する際にその選別や制御を行なっている可能性があり、*Emx1/2*<sup>-/-</sup> におけるこれらの発現の有無にも興味を持たれる。さらに、皮質の領域化において、*Emx2* は後方-内側の形成に、一方、*Pax6* は前方-側方の形成に機能している(Bishop et al., 2000; Muzio et al., 2001)。このように *Emx1*, *Emx2* および *Pax6* は皮質形成のそれぞれのステップにおいて異なる機能を持っているが、*Emx1*, *Emx2* および *Pax6* により制御されるシグナルは皮質の正常発生のために相互作用していると思われる。

## 9. 結語

本研究によって、*Emx1*, *Emx2* は cortical hem, 原皮質と天井板の境界形成に協働していると考えられる。*Emx1/2*<sup>-/-</sup>で失われる終脳背側内側領域は脈絡層, cortical hem と原皮質に対応し、これらが天井板に転換したと考えられた。しかし、本来 *Emx1*, *Emx2* が発現する新皮質領域の一部は形成されることから、新皮質の形成および新皮質と原皮質の境界形成の分子機構と *Emx1*, *Emx2* の働きがどのように関連しているかは今後の大きな課題である。また、*Emx1/2*<sup>-/-</sup>の新皮質では RC2 陽性の放射状グリア細胞はほぼ正常に形成され、プレプレートも形成されるが、CR 細胞や皮質下層ニューロンが形成されないことが明らかとなった。この結果、皮質板の形成, "inside-outside" な層構造の形成は起こらず、皮質 - 視床間の神経線維連絡も失われていた。すなわち、*Emx1*, *Emx2* は皮質層構造の形成に重要な役割を果たすパイオニアニューロンの形成にも協働していると考えられる。最近、cortical hem は皮質 CR 細胞の主な供給源であることが明らかにされており、*Emx1/2*<sup>-/-</sup>での皮質層構造形成の異常は cortical hem 欠損の二次的結果として説明されるのかもしれない。さらに、*Emx1/2*<sup>-/-</sup>では、基底核隆起から皮質への接線方向の細胞移動が阻害されることも明らかとなったが、そのメカニズムと併せ、今後のより詳細な検討は複雑な大脳皮質の形づくりのメカニズム解明に重要な貢献をなすと考える。

## 10. 参考文献

- Alcántara, S., Ruiz, M., D’Arcangelo, G., Ezan, F., Lecea, L., Curran, T., Sorelo, C. and Soriano, E. (1998). Regional and Cellular patterns of *reelin* mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse. *J. Neurosci.* **18**, 7779-7799.
- Allendoerfer, K. L. and Shatz, C. J. (1994). The subplate, a transient neocortical structure: Its role in the development of connections between thalamus and cortex. *Annu. Rev. Neurosci.* **17**, 185-218.
- Anderson, S. A., Eisenstat, D. D., Shi, L. and Rubenstein, J. L. R. (1997). Interneurons migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science* **278**, 474-476.
- Anderson, S., Mione, M., Yun, K. and Rubenstein, J. L. (1999). Differential origins of neocortical projection and local circuit neurons: role of *Dlx* genes in neocortical interneurons ogenesis. *Cereb. Cortex* **9**, 646-654.
- Angevine, J. B. and Sidman, R. L. (1961). Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* **192**, 766-768.
- Assimacopoulos, S., Grove, E. A. and Ragsdal, C. W. (2003). Identification of *Pax6*-dependent epidermal growth factor family signaling source at the lateral edge of the embryonic cerebral cortex. *J. Neurosci.* **23**, 6399-6403.
- Bartholomae, A. and Nave, K. A. (1994). *NEX-1*: a novel brain-specific helix-loop-helix protein with autoregulation and sustained expression in mature cortical neurons. *Mech. Dev.* **48**, 217-228.
- Benowitz, L. I., Apostolides, P. J., Perrone-Bizzozero, N., Finklestein, S. P. and Zwiers, H. (1988). Anatomical distribution of the Growth-Associated Protein GAP-43/B-50 in the adult rat brain. *J. Neurosci.* **8**, 339-352.
- Bicknese, A. R., Sheppard, A. M., O’Leary, D. D. M. and Pearlman, A. L. (1994). Thalamocortical axons extend along a chondroitin sulfate proteoglycan-enriched pathway coincident with the neocortical subplate and distinct from the efferent path. *J. Neurosci.* **14**, 3500-3510.
- Bishop, K. M., Goudreau, G. and O’Leary, D. D. M. (2000). Regulation of area identity in the mammalian neocortex by *Emx2* and *Pax6*. *Science* **288**, 344-349.
- Bishop, K.M., Rubenstein, J.L.R. and O’Leary, D.D.M. (2002). Distinct actions of *Emx1/2*, and *Pax6* in regulating the specification of areas in the developing neocortex. *J. Neurosci.* **22**, 7627-7638.
- Bishop, K.M., Garel, S., Nakagawa, Y., Rubenstein, J.L.R. and O’Leary, D.D.M. (2003). *Emx1* and *Emx2* cooperate to regulate cortical size, lamination, neuronal differentiation, development of cortical efferents and thalamocortical pathfinding. *J. Comp. Neurol.* **457**, 345-360.
- Blackshear, P.J., Graves, J.P., Stumpo, D.J., Cobos, I., Rubenstein, J.L.R. and Zeldin, D.C. (2003). Graded phenotypic response to partial and complete deficiency of a brain-specific transcript variant of the winged helix transcription factor *RFX4*. *Development* **130**, 4539-4552.
- Boncinelli, E., Gulisano, M. and Broccoli, V. (1993). *Emx* and *Otx* homeobox gene in the developing mouse

brain. *J. Neurobiol.* **24**, 1356-1366.

Briata, P., di Blas, E., Gulisano, M., Mallamaci, A., Iannone, R., Boncinelli, E. and Corte, G. (1996). EMX1 homeoprotein is expressed in cell nuclei of the developing cerebral cortex and in the axons of the olfactory sensory neurons. *Mech. Dev.* **57**, 169-180.

Bulchand, S., Grove, E.A., Porter, F.D. and Tole, S. (2001). LIM-homeodomain gene *Lhx2* regulates the formation of the cortical hem. *Mech. Dev.* **100**, 165-175.

Bulfone, A., Puelles, L., Porteus, M. H., Frohman, M. A., Martin, G. R. and Rubenstein, J. L. (1993). Spatially restricted expression of *Dlx-1*, *Dlx-2 (Tes-1)*, *Gbx-2*, and *Wnt-3* in the embryonic day 12.5 mouse forebrain defines potential transverse and longitudinal segmental boundaries. *J. Neurosci.* **13**, 3155-3172.

Caric, D., Gooday, D., Hill, R. E., McConnell, S. K. and Price, D. J. (1997). Determination of the migratory capacity of embryonic cortical cells lacking the transcription factor *Pax-6*. *Development* **124**, 5087-5096.

Casarosa, S., Fode, C. and Guillemot, F. (1999). Mash1 regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. *Development* **126**, 525-534.

Catron, K.M., Wang, H., Hu, G., Shen, M.M. and Abate-Shen, C. (1996). Comparison of *MSX-1* and *MSX-2* suggests a molecular basis for functional redundancy. *Mech. Dev.* **55**, 185-199.

Caviness, V. S., Jr and Rakic, P. (1978). Mechanisms of cortical development: A view from mutations in mice. *Annu. Rev. Neurosci.* **1**, 297-326.

Caviness, V. S., Jr (1982). Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: a developmental study based upon [3H]thymidine autoradiography. *Dev. Brain Res.* **4**, 293-302.

Chae, T., Kwo, Y. T., Bronson, R., Dikkes, P., Li, E. and Tsai, L. H. (1997). Mice lacking p35, a neuronal specific activator of cdk5, display cortical lamination defects, seizures, and adult lethality. *Neuron* **18**, 29-42.

Chans-Sacre, G., Rogister, B., Moonen, G. and Lepronce, P. (2000). Radial glial phenotype: origin, regulation, and transdifferentiation. *J. Neurosci. Res.* **61**, 357-363.

Chapouton, P., Gartner, A. and Götz, M. (1999). The role of *Pax6* in restricting cell migration between developing cortex and basal ganglia. *Development* **126**, 5569-5579.

Cheng, H.Z., Bertuzzi, S., Chiang, C., Shawlot, W., Taira, M., Dawid, I. and Westphal, H. (1997). Expression of murine *Lhx5* suggests a role in specifying the forebrain. *Dev. Dyn.* **208**, 266-277.

Chenn, A. and Walsh, A.W. (2002). Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science* **297**, 365-369.

Corbin, J. G., Nery, S. and Fishell, G. (2001). Telencephalic cells take a tangent: non-radial migration in the mammalian forebrain. *Nature Neurosci.* **4**, 1177-1182.

Crossley, P.H. and Martin, G.R. (1995). The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development* **121**, 439-451.

Crossley, P.H., Martinez, S., Ohkubo, Y. and Rubenstein, J.L.R. (2001). Coordinate expression of *Fgf8*, *Otx2*,

- Bmp4*, and *Shh* in the rostral prosencephalon during development of the telencephalic and optic vesicles. *Neurosci.* **108**, 183-206.
- Curran, T. and D'Arcangelo, G. (1998). Role of reelin in the control of brain development. *Brain Res. Rev.* **26**, 285-294.
- D'Arcangelo, G., Miao, G. G., Chen, S.-C., Soares, H. D., Morgan, J. I. and Curran, T. (1995). A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature* **374**, 719-723.
- de Carlos, J. A., Lopez-Mascaraque, L. and Valverde, F. (1996). Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat. *J. Neurosci.* **16**, 6146-6156.
- Del Rio, J. A., Soriano, E. and Ferrer, I. (1992). Development of GABA immunoreactivity in the neocortex of the mouse. *J. Comp. Neurol.* **326**, 501-526.
- Del Rio, J. A., Martinez, A., Fonesca, M., Auladell, C. and Soriano, E. (1995). Glutamate-like immunoreactivity and fate of Cajal-Retzius cells in the murine cortex as identified with Calretinin antibody. *Cereb. Cortex* **5**, 13-21.
- Denaxa, M., Chan, C.-H., Schachner, M., Parnavelas, J. G. and Karagogeos, D. (2001). The adhesion molecule TAG-1 mediates the migration of cortical interneurons from the ganglionic eminence along the corticofugal fiber system. *Development* **128**, 4635-4644.
- Frantz, G. D., Bohner, A. P., Akers, R. M. and McConnell, S. K. (1994). Regulation of the POU domain gene SCIP during cerebral cortical development. *J. Neurosci.* **14**, 472-485.
- Friedman, W.J., Ernfors, P. and Patterson, H. (1991). Transient and persistent expression of *NT-3/HDNF* mRNA in the rat brain during postnatal development. *J. Neurosci.* **11**, 1577-1584.
- Fukuchi-Shimogori, T. and Grove, E.A. (2001). Neocortex patterning by the secreted signaling molecule *FGF8*. *Science* **2**, 1071-1074.
- Fukuchi-Shimogori, T. and Grove, E.A. (2003). *Emx2* patterns the neocortex by regulating *FGF* positional signaling. *Nat Neurosci.* **6**, 825-831.
- Fukuda, T., Kawano, H., Ohyama, K., Li, H., Takeda, Y., Oohira, A. and Kawamura, K. (1997). Immunohistochemical localization of neurocan and L1 in the formation of thalamocortical pathway of developing rats. *J. Comp. Neurol.* **382**, 141-152.
- Fung, Y.-K.T., Shackleford, G.M., Brown, A.M.C., Sanders, G.S. and Varmus, H.E. (1985). Nucleotide sequence and expression in vitro of cDNA derived from mRNA of *int-1*, a provirally activated mouse mammary oncogene. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 3337-3344.
- Furuta, Y., Piston, D.W. and Hogan, B.L.M. (1997). Bone morphogenetic proteins (BMPs) as regulators of dorsal forebrain development. *Development* **124**, 2203-2212.
- Galceran, J., Miyashita-Lin, E.M., Devaney, E., Rubenstein, J.L.R. and Grosschedl, R. (2000). Hippocampus development and generation of dentate gyrus granule cells is regulated by *LEF1*. *Development* **127**, 469-482.
- Garel, S., Huffman, K.J. and Rubenstein, J.L.R. (2003). Molecular regionalization of the neocortex is



disrupted in *Fgf8* hypomorphic mutants. *Development* **130**, 1903-1914.

Gavrieli, Y., Sherman, Y. and Ben-Sasson, S. A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* **119**, 493-501.

Gilmore, E. C., Ohshima, T., Goffinet, A. M., Kulkarni, A. B. and Herrup, K. (1998). Cyclin-dependent kinase 5-deficient mice demonstrate novel developmental arrest in cerebral cortex. *J. Neurosci.* **18**, 6370-6377.

Gonchar, Y. and Burkhalter, A. (1997). Three distinct families of GABAergic neurons in rat visual cortex. *Cereb. Cortex* **7**, 347-358.

Götz, M., Stoykova, A. and Gruss, P. (1998). *Pax6* controls radial glia differentiation in the cerebral cortex. *Neuron* **21**, 1031-1044.

Grove, E.A., Tole, S., Limon, J., Yip, L.-W. and Ragsdale, C.W. (1998). The hem of the embryonic cerebral cortex is defined by the expression of multiple *Wnt* genes and is compromised in *Gli3*-deficient mice. *Development* **125**, 2315-2325.

Gulisano, M., Broccoli, V., Pardini, C. and Boncinelli, E. (1996). *Emx1* and *Emx2* show different patterns of expression during proliferation and differentiation of the developing cerebral cortex in the mouse. *Eur. J. Neurosci.* **8**, 1037-1050.

Hartfuss, E., Glial, R., Heins, N. and Götz, M. (2001). Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev. Biol.* **229**, 15-30.

Hébert, J.M., Mishina, Y. and McConnell, S.K. (2002). *BMP* signaling is required locally to pattern the dorsal telencephalic midline. *Neuron* **35**, 1029-1041.

Hevner, R. F., Shi, L., Justice, N., Hsueh, Y.-P., Sheng, M., Smiga, S., Bulfone, A., Goffinet, A. M., Campagnoni, A. T. and Rubenstein, J. L. R. (2001). *Tbr1* regulates differentiation of the preplate and layer 6. *Neuron* **29**, 353-366.

Hill, R. E., Jones, P. F., Rees, A. R., Sime, C. M., Justice, M. J., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Graham, E. and Davidson, D. R. (1989). A new family of mouse homeo box containing genes: molecular structure, chromosome location and developmental expression of *Hox-7.1*. *Genes Dev.* **3**, 26-37.

Howell, B. W., Hawkes, R., Soriano, P. and Cooper, J. A. (1997). Neuronal position in the developing brain is regulated by mouse *disabled-1*. *Nature* **389**, 733-737.

Hui, C.-C., Slusarski, D., Platt, K.A., Holmgren, R. and Joyner, A.L. (1994). Expression of three mouse homologs of the *Drosophila* segment polarity gene *cubitus interruptus*, *Gli*, *Gli-2*, and *Gli-3*, in ectoderm- and mesoderm-derived tissues suggests multiple roles during postimplantation development. *Dev. Biol.* **162**, 402-413.

Hunter-Schaedle, K. E. (1997). Radial glial cell development and transformation are disturbed in *reeler* forebrain. *J. Neurobiol.* **33**, 459-472.

Iwasato, T., Datwani, A., Wolf, A. M., Nishiyama, H., Taguchi, Y., Tonegawa, S., Knopfel, T., Erzurumly, R. S. and Itoharu, S. (2000). Cortex-restricted disruption of NMDAR1 impairs neuronal patterns in the barrel cortex. *Nature* **406**, 726-731.

- Kennedy, H. and Dehay, C. (1993). Cortical specification of mice and men. *Cereb. Cortex* **3**, 171-186.
- Kim, A.S., Lowenstein, D.H. and Pleasure, S.J. (2000). Wnt receptors and Wnt inhibitors are expressed in gradients in the developing telencephalon. *Mech. Dev.* **103**, 167-172.
- Kimura, S., Hara, Y., Pineau, T., Fernandez-Salguero, P., Fox, C.H., Ward, J.M. and Gonzalez, F.J. (1996). The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes Dev.* **10**, 60-69.
- Kuschel, S., Ruther, U. and Theil, T. (2003). A disrupted balance between *Bmp/Wnt* and *Fgf* signaling underlies the ventralization of the *Gli3* mutant telencephalon. *Dev. Biol.* **15**, 484-95.
- Lavdas, A. A., Grigoriou, M., Pachnis, V. and Parnavelas, J. G. (1999). The medial ganglionic eminence give rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* **99**, 7881-7888.
- Lee, S.M.K., Tole, S., Grove, E. and McMahon, A.P. (2000). A local *Wnt-3a* signal is required for development of the mammalian hippocampus. *Development* **127**, 457-467.
- Luskin, M. B. and Shatz, C. J. (1985). Studies of the earliest generated cells of the cat's visual cortex: cogeneration of subplate and marginal zones. *J. Neurosci.* **5**, 1062-1075.
- Mackarehtschian, K., Lau, C. K., Caras, I. and McConnell, S. K. (1999). Regional differences in the developing cerebral cortex revealed by *Ephrin-A5* expression. *Cereb. Cortex* **9**, 601-610.
- Malatesta, P., Hartfuss, E. and Götz, M. (2000). Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* **127**, 5253-5263.
- Mallamaci, A., Iannone, R., Briata, P., Pintonello, L., Mercurio, S., Boncinelli, E. and Corte, G. (1998). EMX2 protein in the developing mouse brain and olfactory area. *Mech. Dev.* **77**, 165-172.
- Mallamaci, A., Mercurio, S., Muzio, L., Cecchi, C., Pardini, C. L., Gruss, P. and Boncinelli, E. (2000). The lack of *Emx2* causes impairment of *Reelin* signaling and defects of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* **20**, 1109-1118.
- Mallamaci, A., Muzio, L., Chan, C.-H., Parnavelas, J. and Boncinelli, E. (2000). Area identity shifts in the early cerebral cortex of *Emx2<sup>-/-</sup>* mutant mice. *Nature Neurosci.* **3**, 679-686.
- Marin, O., Anderson, S. A. and Rubenstein, J. L. R. (2000). Origin and molecular specification of striatal interneurons. *J. Neurosci.* **20**, 6063-6076.
- Marin, O. and Rubenstein, J. L. R. (2001). A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nature Reviews Neurosci.* **2**, 780-790.
- Marin-Padilla, M. (1998). Cajal-Retzius cells and the development of the neocortex. *Trends Neurosci.* **21**, 64-71.
- Matsuo, I., Kuratani, S., Kimura, C., Takeda, N. and Aizawa, S. (1995). Mouse *Otx2* function in the formation and patterning of rostral head. *Genes Dev.* **9**, 2646-2658.
- McMahon, A.P. and Bradley, A. (1990). The *Wnt-1* (*int-1*) protooncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* **62**, 1073-1085.
- Metin, C. and Godement, P. (1996). The ganglionic eminence may be an intermediate target for corticofugal and

thalamocortical axons. *J. Neurosci.* **16**, 3219-3235.

Meyer, G., Soria, J. M., Martinez-Galan, J. R., Martin-Clemente, B. and Fairen, A. (1998). Different origins and developmental histories of transient neurons in the marginal zone of the fetal and neonatal rat cortex. *J. Comp. Neurol.* **397**, 493-518.

Misson, J.-P., Edwards, M. A., Yamamoto, M. and Caviness, V. S., Jr. (1988). Identification of radial glial cells within the developing murine central nervous system: studies based upon a new immunohistochemical marker. *Dev. Brain Res.* **44**, 95-108.

Miyamoto, N., Yoshida, M., Kuratani, S., Matsuo, I. and Aizawa, S. (1997). Defects of urogenital development in mice lacking *Emx2*. *Development* **124**, 1653-1664.

Miyata, T., Kawaguchi, A., Okano, H. and Ogawa, M. (2001). Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron* **31**, 727-741.

Molnar, Z. and Blakemore, C. (1995). How do thalamic axons find their way to the cortex? *Trends Neurosci.* **18**, 389-397.

Monuki, E. S., Weinmaster, G., Kuhn, R. and Lemke, G. (1989). SCIP: a glial POU domain gene regulated by cyclic AMP. *Neuron* **3**, 783-793.

Monuki, E. S., Porter, F. D. and Walsh, C. A. (2001). Patterning of the dorsal telencephalon and cerebral cortex by a roof plate-*Lhx2* pathway. *Neuron* **32**, 591-604.

Muzio, L., DiBenedetto, B., Stoykova, A., Boncinelli, E., Gruss, P. and Mallamaci, A. (2001). *Emx2* and *Pax6* control regionalization of the preneurogenic cortical primordium. *Cerebral Cortex* **12**, 129-139.

Muzio, L., DiBenedetto, B., Stoykova, A., Boncinelli, E., Gruss, P. and Mallamaci, A. (2002). Conversion of cerebral cortex into basal ganglia in *Emx2*<sup>-/-</sup> *Pax6*<sup>Sey/Sey</sup> double-mutant mice. *Nature Neurosci.* **5**, 737-745.

Nada, S., Yagi, T., Takeda, N., Tokunaga, H., Nakagawa, Y., Ikawa, Y., Okada, M. and Aizawa, S. (1993). Constitutive activation of *Src* family kinases in mouse embryos that lack *Csk*. *Cell* **73**, 1125-1135.

Nagai, T., Ibata, K., Park, E. S., Kubota, M., Mikoshiba, K. and Miyawaki, A. (2002). A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nature Biotechnol.* **20**, 87-90.

Noctor, S. C., Flint, A. C., Weissman, T. A., Dammerman, R. S. and Kriegstein, A. R. (2001). Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* **409**, 714-720.

Nothias, F., Fishell, G. and Altaba, A. R. (1998). Cooperation of intrinsic and extrinsic signals in the elaboration of regional identity in the posterior cerebral cortex. *Curr. Biol.* **8**, 459-462.

Ogawa, M., Miyata, T., Nakajima, K., Yagyu, K., Seike, M., Ikenaka, K., Yamamoto, H. and Mikoshiba, K. (1995). The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzius Neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. *Neuron* **14**, 899-912.

Ohkubo, Y., Chiang, C. and Rubenstein, J.L.R. (2002). Coordinate regulation and synergistic actions of *BMP4*, *SHH* and *FGF8* in the rostral prosencephalon regulate morphogenesis of the telencephalic and optic vesicles.

*Neurosci.* **111**, 1-17.

Ohshima, T., Ward, J. M., Huh, C.-G., Longenecker, G., Veernna, A., Pant, H. C., Brady, R. O., Martin, L. J. and Kulkarni, A. B. (1996). Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 11173-11178.

*Sci. USA* **93**, 11173-11178.

O'Leary, D. D. M. (1989). Do cortical areas emerge from a protocortex? *Trends Neurosci.* **12**, 4000-4006.

Oliver, G. (1993). *Prox1*, a prospero-related homeobox gene expressed during mouse development. *Mech. Dev.* **44**, 3-16.

Olivier, C., Cobos, I., Villegas, E. M. P., Spassky, N., Zalc, B., Martinez, S. and Thomas, J.-L. (2001). Monofocal origin of telencephalic oligodendrocytes in the anterior entopeduncular area of the chick embryo. *Development* **128**, 1757-1769.

Panchision, D.M., Pickel, J.M., Studer, L., Lee, S.-H., Turner, P.A., Hazel, T.G. and McKay, R.D.G. (2001). Sequential actions of *BMP* receptors control neural precursor cell production and fate. *Genes Dev.* **15**, 2094-2110.

Parr, B.A., Shea, M.J., Vassileva, G. and McMahon, A.P. (1993). Mouse *Wnt* genes exhibit discrete domains of expression in the early embryonic CNS and Limb buds. *Development* **119**, 247-261.

Pellegrini, M., Mansouri, A., Simeone, A., Boncinelli, E. and Gruss, P. (1996). Dentate gyrus formation requires *Emx2*. *Development* **122**, 3893-3898.

Porter, F., Drago, J., Xu, Y., Cheema, S. S., Wassif, C., Huang, S., Lee, E., Grinberg, A., Massalas, J. S., Bodine, D., Alt, F. and Westphal, H. (1997). *Lhx2*, a LIM homeobox gene, is required for eye, forebrain, and definitive erythrocyte development. *Development* **124**, 2935-2944.

Powell, E. M., Mars, W. M. and Levitt, P. (2001). Hepatocyte growth factor/scatter factor is a motogen for interneurons migrating from the ventral to dorsal telencephalon. *Neuron* **30**, 79-89.

Puelles, L., Kuwana, E., Puelles, E., Bulfone, A., Shimamura, K., Keleher, J., Smiga, S. and Rubenstein, J.L.R. (2000). Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1*. *J. Comp. Neuro.* **424**, 409-438.

Qiu, M., Anderson, S., Chen, S., Meneses, J. J., Hevner, R., Kuwana, E., Pedersen, R. A. and Rubenstein, J. L. (1996). Mutation of the *Emx-1* homeobox gene disrupts the corpus callosum. *Dev. Biol.* **178**, 174-178.

Rakic, P., Suner, I. and Williams, R. W. (1991). A novel cytoarchitectonic area induced experimentally within the primate visual cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2083-2087.

Rallu, M., Machold, R., Gaiano, N., Corbin, J.G., McMahon, A.P. and Fishell G. (2002). Dorsoventral patterning is established in the telencephalon of mutants lacking both *Gli3* and *Hedgehog* signaling. *Development* **129**, 4963-4974. .

Rice, D. S., Sheldon, M., D'Arcangelo, G., Makajima, K., Goldowitz, D. and Curran, T. (1998). *Disabled-1* acts downstream of *Reelin* in a signaling pathway that controls laminar organization in the mammalian brain.

*Development* **125**, 3719-3729.

Rice, D. S. and Curran, T. (1999). Mutant mice with scrambled brains: understanding the signaling pathways that control cell positioning in the CNS. *Genes Dev.* **13**, 2758-2770.

Ringstedt, T., Linnarsson, S., Wagnöer, J., Lendahl, U., Kokaia, Z., Arenas, E., Ernfors, P. and Ibáñez, C. F. (1998). *BDNF* regulates *reelin* expression and Cajal-Retzius cell development in the cerebral cortex. *Neuron* **21**, 305-315.

Roelink, H. and Nusse, R. (1991). Expression of two members of the *Wnt* family during mouse development-restricted temporal and spatial patterns in the developing neural tube. *Genes Dev.* **5**, 381-388.

Sakai, K. and Miyazaki, J. (1997). A transgenic mouse line that retains Cre recombinase activity in mature oocytes irrespective of the cre transgene transmission. *Biochem Biophys Res Commun.* **18**, 318-24.

Sancho-Tello, M., Valles, S., Montoliu, C., Renau-Piqueras, J. and Guerri, C. (1995). Developmental pattern of *GFAP* and *vimentin* gene expression in rat brain and in radial glial cultures. *Glia* **15**, 157-166.

Schwab, M. H., Druffel-Augustin, S., Gass, P., Jung, M., Klugmann, M., Bartholomae, A., Rossner, M. J. and Nave, K. A. (1998). Neuronal basic helix-loop-helix proteins (NEX, neuroD, NDRF): spatiotemporal expression and targeted disruption of the *NEX* gene in transgenic mice. *J. Neurosci.* **18**, 1408-1418.

Sheldon, M., Rice, D. S., D'Arcangelo, G., Yoneshima, H., Nakajima, K., Mikoshiba, K., Howell, B. W., Cooper, J. A., Goldowitz, D. and Curran, T. (1997). *Scrambler* and *yotari* disrupt the *disabled* gene and produce a *reeler*-like phenotype in mice. *Nature* **389**, 730-733.

Sheng, Z.H., Bertuzzi, S., Chiang, C., Shawlot, W., Taira, M., Dawid, I. and Westphal, H. (1997). Expression of murine *Lhx5* suggested a role in specifying the forebrain. *Dev. Dyn.* **208**, 266-277.

Sheppard, A. M. and Pearlman, A. L. (1997). Abnormal reorganization of preplate neurons and their associated extracellular matrix: an early manifestation of altered neocortical development in the *reeler* mutant mouse. *J. Comp. Neurol.* **378**, 173-179.

Shimamura, K., Martinez, S., Puelles, L. and Rubenstein, J.L.R. (1995). Longitudinal organization of the anterior neural plate and neural tube. *Development* **121**, 3923-3933.

Shimamura, K. and Rubenstein, J.L.R. (1997). Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Development* **124**, 2709-2718.

Shimizu, C., Akazawa, C., Nakanishi, S. and Kageyama, R. (1995). *MATH-2*, a mammalian helix-loop-helix factor structurally related to the product of *Drosophila* proneural gene *atonal*, is specifically expressed in the nervous system. *Eur. J. Biochem.* **229**, 239-248.

Simeone, A., Acampora, D., Gulisano, M., Stornaiuolo, A. and Boncinelli, E. (1992). Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain. *Nature* **358**, 687-690.

Simeone, A., Gulisano, M., Acampora, D., Stornaiuolo, A., Rambaldi, M. and Boncinelli, E. (1992). Two vertebrate homeobox genes related to the *Drosophila* empty spiracles gene are expressed in the embryonic cerebral cortex. *EMBO J.* **11**, 2541-2550.

- Sommer, L., Ma, Q. and Anderson, D. J. (1996).** *Neurogenins*, a novel family of atonal-related bHLH transcription factor, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing CNS and PNS. *Mol. Cell. Neurosci.* **8**, 221-241.
- Soriano, S., Alvarado-Mallart, R. M., Dumesnil, N., del Rio, J. A. and Sotelo, C. (1997).** Cajal-Retzius cells regulate the radial glia phenotype in the adult and developing cerebellum and alter granule cell migration. *Neuron* **18**, 563-577.
- Spassky, N., Goujet-Zalc, C., Parmantier, E., Olivier, C., Martinez, S., Ivanova, A., Ikenaka, K., Macklin, W., Cerruti, I., Zalc, B. and Thomas, J.-L. (1998).** Multiple restricted origin of oligodendrocytes. *J. Neurosci.* **18**, 8331-8343.
- Stoykova, A., Treichel, D., Hallonet, M. and Gruss, P. (2000).** *Pax6* modulates the dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon. *J. Neurosci.* **20**, 8042-8050.
- Stühmer, T., Puelles, L., Ekker, M. and Rubenstein, J. J. R. (2002).** Expression from a *Dlx* gene enhancer marks adult mouse cortical GABAergic neurons. *Cereb. Cortex* **12**, 75-85.
- Super, H., Soriano, E. and Uylings, H. B. M. (1998).** The functions of the preplate in development and evolution of the neocortex and hippocampus. *Brain Res. Rev.* **27**, 40-64.
- Super, H., del Rio, J. A., Martinez, A., Perez-Sust, P. and Soriano, E. (2000).** Disruption of neuronal migration and radial glia in the developing cerebral cortex following ablation of Cajal-Retzius cells. *Cereb. Cortex* **10**, 602-613.
- Sussel, L., Marin, O., Kimura, S. and Rubenstein, J. L. (1999).** Loss of *Nkx2.1* homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. *Development* **126**, 3359-3370.
- Suzuki, A., Thies, R.S., Yamaji, N., Song, J.J., Wozney, J.M., Murakami, K. and Ueno, N. (1994)** A truncated bone morphogenetic protein receptor affects dorsal-ventral patterning in the early *Xenopus* embryo. *PNAS* **91**, 10255-10259.
- Takiguchi-Hayashi, K., Sekiguchi, M., Ashigaki, S., Takamatsu, M., Hasegawa, H., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Nakanishi, S. and Tanabe, Y. (2004).** Generation of *Reelin*-positive 辺縁帯 cells from the caudomedial wall of telencephalic vesicles. *J. Neurosci.* **24**, 2286-2295
- Tamamaki, N., Fujimori, K. E. and Takauji, R. (1997).** Origin and route of tangentially migrating neurons in the developing neocortical intermediate zone. *J. Neurosci.* **17**, 8313-8323.
- Tao, W. and Lai, E. (1992).** Telencephalon-restricted expression of *BF-1*, a new member of the *HNF-3/fork head* gene family, in the developing rat brain. *Neuron* **8**, 957-966.
- Theil, T., Alvarez-Bolado, G., Walter, A. and Rütther, U. (1999).** *Gli3* is required for *Emx* gene expression during dorsal telencephalon development. *Development* **126**, 3561-3571.
- Theil, T., Aydin, S., Koch, S., Grotewold, L. and Rütther, U. (2002).** Wnt and Bmp signaling cooperatively regulate graded *Emx2* expression in the dorsal telencephalon. *Development* **129**, 3045-3054.

- Tole, S., Christian, C. and Grove, E.A.** (1997). Early specification and autonomous development of cortical fields in the mouse hippocampus. *Development* **124**, 4959-4970.
- Tole, S., Goudreau, G., Assi macopoulos, S. and Grove, E. A.** (2000a). *Emx2* is required for growth of the hippocampus but not for hippocampal field specification. *J. Neurosci.* **20**, 2618-2625.
- Tole, S. and Grove, E.A.** (2001). Detailed field pattern is intrinsic to the embryonic mouse hippocampus early in neurogenesis. *J. Neurosci.* **21**, 1580-1589.
- Tole, S., Ragsdale, C. W. and Grove, E. A.** (2000b). Dorsoventral patterning of the telencephalon is disrupted in the mouse mutant *extra-toes*. *Dev. Biol.* **217**, 254-265.
- Toresson, H., Potter, S. S. and Campbell, K.** (2000). Genetic control of dorsoventral identity in the telencephalon: opposing roles for *Pax6* and *Gsh2*. *Development* **127**, 4361-4371.
- Trommsdorff, M., Gotthardt, M., Hiesberger, T., Shelton, J., Stockinger, W., Nimpf, J., Hammer, R. E., Richardson, J. A. and Herz, J.** (1999). *Reeler/Disabled*-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the *VLDL* receptor and *ApoE* receptor 2. *Cell* **97**, 689-701.
- Wakasugi, S., Maeda, S., Shimada, K., Nakashima, H. and Migita, S.** (1985). Structural comparison between mouse and human prealbumin. *J. Biochem.* **98**, 1707-1714.
- Walther, C. and Gruss, P.** (1991). *Pax-6*, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* **113**, 1435-1449.
- Wilkinson, D.G.** (1993). In situ hybridization.: Stern, C.D., Holland, P.W.H. (Ed). In *Essential Developmental Biology: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 257-274.
- Wood, J. G., Martin, S. and Price, D. J.** (1992). Evidence that the earliest generated cells of the murine cerebral cortex form a transient population in the subplate and marginal zone. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **66**, 137-140.
- Yagi, T., Nada, S., Watanabe, N., Tamemoto, H., Kohmura, N., Ikawa, Y. and Aizawa, S.** (1993a). A novel negative selection for homologous recombinants using diphtheria toxin A fragment gene. *Analyt. Biochem.* **214**, 77-86.
- Yagi, T., Tokunaga, T., Furuta, Y., Nada, S., Yoshida, M., Tukada, T., Saga, N., Takeda, N., Ikawa, Y. and Aizawa, S.** (1993b). A novel ES cell line, TT2, with high germline-differentiating potency. *Analyt. Biochem.* **214**, 70-76.
- Yamazaki, H., Sekiguchi, M., Takamatsu, M., Tanabe, Y. and Nakanishi, S.** (2004). Distinct ontogenic and regional expressions of newly identified Cajal-Retzius cell-specific genes during neocorticalogenesis. *PNAS* **101**, 14509-14514.
- Ye, W., Shimamura, K., Rubenstein, J.L.R., Hynes, M.A. and Rosenthal, A.** (1998). FGF and Shh Signals Control Dopaminergic and Serotonergic Cell Fate in the Anterior Neural Plate. *Cell* **93**, 755-766.
- Yoshida, H., Hayashi, S.-I., Shultz, L.D., Yamamura, K.-I., Nishikawa, S., Nishikawa, S.-I. and Kunisada, T.** (1996). Neural and skin cell specific expression pattern conferred by Steel factor regulatory sequence in transgenic mice. *Dev. Dyn.* **207**, 222-232.

- Yoshida, M., Suda, Y., Matsuo, I., Miyamoto, N., Takeda, N., Kuratani, S. and Aizawa, S. (1997). *Emx1* and *Emx2* functions in development of dorsal telencephalon. *Development* **124**, 101-111.
- Yoshihara, Y., Kawasaki, M., Tani, A., Tamada, A., Nagata, S., Kagamiyama, H. and Mori, K. (1994). *BIG-1*: a new TAG-1/F3-related member of the immunoglobulin superfamily with neurite outgrowth-promoting activity. *Neuron* **13**, 415-426.
- Yun, K., Potter, S. and Rubenstein, J. L. R. (2001). *Gsh2* and *Pax6* play complementary roles in dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon. *Development* **128**, 193-205.
- Zhao, Y., Sheng, H.Z., Amini, R., Grinberg, A., Lee, E., Huang, S., Taira, M. and Westphal, H. (1999). Control of hippocampal morphogenesis and neuronal differentiation by the LIM homeobox gene *Lhx5*. *Science* **284**, 1155-1158.
- Zhou, C., Qiu, Y., Oeireira, F. A., Crair, M. C., Tsai, S. Y. and Tsai, M.-J. (1999). The nuclear orphan receptor COUP-TFI is required for differentiation of subplate neurons and guidance of thalamocortical axons. *Neuron* **24**, 847-859.