

マウス肢芽のプログラム細胞死における遺伝子発現の解析

石川 博康

胎生期の肢芽形成時におけるプログラム細胞死の分子機構について、ゲノム解析が進んでいるマウスの胎子を用いて研究を行った。まずマウス肢芽指間の細胞死の時期を Nile blue 染色, HE 染色, TUNEL 法を用いて検討した。指間の細胞死は妊娠11.5日目から始まり, 13.5日目にそのピークがみられた。次に11.5日目および13.5日目に後肢の指間組織をメスで切り出し RNA を抽出した後, DNA Expression Arrays を用いて1176種類の既知遺伝子の発現パターンを解析した。その結果13.5日目に5種類の遺伝子発現の上昇を認めた。また, これらのうちホメオボックス遺伝子である *Msx2* や *insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2)* 及び *apolipoprotein E (apoE)* が13.5日目に上昇していることを RT-PCR 法で確認した。さらにこれらの遺伝子の空間的な発現パターンを解析するために, *whole mount in situ hybridization* を行ったところ, *Msx2* と *IGFBP2* は既報通り指間部位に一樣にその発現を認めたが, *apoE* の発現パターンはそれらとは異なり, Nile blue 染色と極めて似た顆粒状の染色パターンを示した。このことは, *apoE* が Nile blue 陽性の死細胞中に発現しているか, あるいは死細胞を貪食したマクロファージ系細胞に発現しているかを示唆している。そこで TUNEL 法で調べたところ, その発現は死細胞ではなくマクロファージ様細胞に認められた。また5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) 処理で細胞死を抑制したマウスの肢芽では Nile Blue 陽性細胞が減少するとともに *apoE* の発現も減少した。この結果から *apoE* がマクロファージ様細胞に発現され, それが死細胞の増加によって誘導されることが示唆される。すなわち *apoE* の貪食過程への関与が考えられた。

(平成13年12月25日受理)

Analysis of Gene Expression in the Programmed Cell Death of Mouse Limb Buds

Hiroyasu ISHIKAWA

Programmed cell death (PCD) is an important process for eliminating unnecessary tissues during embryonic development for proper morphogenesis at genetically determined stages. In this study, we analyzed transcriptional changes of 1176 genes in mouse limb programmed cell death (PCD) using DNA microarray technique. Many genes were up- or down-regulated during PCD. Homeobox genes *Msx2*, insulin-like growth factor binding protein 2 (*IGFBP2*) or apolipoprotein E (*apoE*) genes were up-regulated in interdigital PCD, revealed by DNA Expression Array using total RNA extracted from day 11.5 or 13.5 limb buds. Topological transcriptional patterns of selected genes were examined by *in situ* hybridization. PCD was revealed by Nile blue, HE staining

or TUNEL method. *In situ* hybridization of apoE showed similar pattern as the Nile blue staining, and its expression was detected not in dying cells, but in macrophage-like cells. This observation suggested that apoE would be involved in engulfment of apoptotic cells. We found that its expression was also significantly reduced in BrdU-treated limbs, suggesting that apoE expression had been induced by unknown signals from dying cells. (Accepted on December 25, 2001) *Kawasaki Igakkaishi* 28(1): 33-42, 2002

Key Words ① Programmed cell death ② DNA Expression Arrays
③ Apolipoprotein E (apoE) ④ Whole mount *in situ* hybridization
⑤ BrdU

はじめに

細胞死の典型とされたネクロシスとは別に、特徴的な形態学的変化を示す細胞死であるアポトーシスという概念が提唱されて久しい¹⁾。また形態形成において特定の部位の細胞が特定の時期に死滅する現象が知られており、プログラム細胞死と名づけられてきた。このプログラム細胞死は発生機構の重要な一部を構成していることが報告されるようになった^{2)~6)}。

高等動物の肢芽の形態形成においても、いわゆるプログラム細胞死が起こることが知られているが、その分子機構については不明な点が多い。最近になりこの細胞死には骨形成蛋白質 bone morphogenetic protein (BMP) のシグナル伝達系が関与していることが示された^{7)~10)}。また Apaf-1 ノックアウトマウスの指間の細胞死が遅くなること¹¹⁾から、Apaf-1 蛋白質も関与することが予想され、ミトコンドリア系の関与が考えられる。しかし、BMP から Apaf-1 の間の pathway は、まだ全く不明であり、種々の方法を用いてこの間を埋めていく必要がある。また、細胞分化を阻害することで知られる BrdU をニワトリ胚に与えると、ある時期にだけ指間の細胞死を抑えることができる¹²⁾。この BrdU の分化抑制機構は不明であるが、チミジンの代わりに DNA に取り込まれ、種々の遺伝子の発現パターンが変更された結果と考えられている。このことから指間の細胞死には遺伝子の発現の解析が重要と考え、今回、ゲノム解析が進んで

いるマウスを用いて肢芽細胞死の系を確立し、それを用いて DNA Expression Arrays 解析を試みた。更に発現遺伝子の空間的な発現パターンを詳細に解析するため whole mount を用いた *in situ* hybridization を行った。

材料及び方法

実験動物

使用した動物は8週齢の雌 ICR マウスで通常飼育用の餌と自由飲水で飼育した。雄 ICR マウスと一晚交配を行い、翌朝に膣栓(プラグ)を確認し、そのプラグ確認日の午後0時を妊娠0.5日(E0.5)とした。雌マウスは所定の妊娠日齢で頸椎脱臼を行い開腹し、子宮から胎子を摘出して実験に使用した。

なお、以下の実験は川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け(No. 99-069・01-049)、川崎医科大学の動物実験指針に基づき実施した。生体染色法

生体染色剤である Nile blue をリン酸緩衝塩類溶液(PBS)で0.01%に調製し、肢芽を丸ごと浸け37°C 20分間インキュベートした。これをPBSで洗浄した後、実顕微鏡で観察した。死細胞は Nile blue によって染色される。これら死細胞がマクロファージ様細胞に貪食されることにより、この貪食細胞が Nile blue 陽性の顆粒状染色物として検出できる。E10.0から12時間毎に胎子を摘出し、切り出した後肢芽を生体染色法で染色することによって、細胞死の開始時期から終了時期までを検討した。

アポトーシスの組織学的検出法として① HE 染色, ② TUNEL 法を用いた。

① HE (Hematoxyline-eosin) 染色

肢芽の細胞死を起こしている時期の組織標本を作製し常法に従い HE で染色を行い, アポトーシス時の細胞の特徴的な形態学的変化である, クロマチン凝縮やアポトーシス小体の形成を確認した。

② TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling) 法

細胞内の切断された DNA 断端を標識することでアポトーシス細胞を検出する方法である。今回, 細胞死を起こしている時期の肢芽を Streck 液で固定後パラフィン切片を作製した。脱パラフィン後, PBS で洗浄し proteinase K (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 処理を15分 (室温) 行った。これを蒸留水で洗浄後 2% 過酸化水素 (H_2O_2) 処理を5分間 (室温) 行った。これを洗浄後, 酵素, TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase, TOYOBO 社; 0.5 U/ μl) を用いて DNA 断端にビオチン標識 dUTP (10 μM) を結合させた (37°C, 30分)。PBS で洗浄し, そこに ABC 法 (Avidin-biotinylated peroxidase complex method) を用いてペルオキシダーゼ・アビジン複合体を結合させ (ABC Kit, VECTOR 社; 室温, 30分), ジアミノベンチジン (DAB) によって発色 (室温, 1~2分) させた。

DNA Expression Arrays

マウス胎子の後肢指間組織をメスで軟骨を含まないように切り出し, acid guanidinium-phenol-chloroform 法 (TRIZOL[®], GIBCO BRL 社) を用いて total RNA を抽出した。DNase 処理 (10 units/ μl , DnaseI, BOEHRINGER MANNHEIM 社) とフェノール処理, エタノール処理を行った後, 逆転写酵素 (MMLV reverse transcriptase, CLONTECH 社) および [α -³²P]dATP (Amersham Pharmacia Biotech 社) でラベルした cDNA プローブを調製した。その cDNA プローブを column chromatography (CHROMA SPIN-200 DEPC-H₂O column, CLONTECH 社) で精製した。この cDNA プローブを1176種の既知遺

伝子の載った AtlasTM cDNA Expression Arrays (CLONTECH 社) にハイブリダイゼーションをさせた。洗浄後 BAS2000 (FUJIFILM 社) を用いて細胞死の開始初期およびピーク時期の遺伝子発現を検索した。

RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction)

DNA Expression Arrays で, 細胞死の開始初期と比較して, ピーク時期に有意に発現量が増加していた遺伝子の転写レベルを RT-PCR で確認した。細胞死開始初期として E11.5 を選び, ピーク時として E13.5 の後肢指間組織を選んだ。これらをそれぞれ切り出し total RNA を抽出し, 逆転写酵素 (Ready-To-GoTM, Amersham Pharmacia Biotech 社) で cDNA に変換した。そして DNA Expression Arrays の定量解析で上位の3種であった apolipoprotein E (apoE), Msx2, Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2) のプライマー (Amersham Pharmacia Biotech 社) を以下の如く作成し, PCR を行った。

apoE (GenBank #M12414)

sense : GAGAGGATCCGCTTCTGGGATTACCTGCGCTG

antisense : GAGATCTAGACTGGGGTGATGATGGGGTTGG

PCR 産物の長さ802 bp である。

Msx2 (GenBank #X59252)

sense : GAGAGATATCGCACACCCTTACCACATCCCA

antisense : GAGACTCGAGAAAACAAAACAGGTCTTAGTGCC

PCR 産物の長さは564 bp である。

IGFBP2 (GenBank X81580)

sense : GAGAGGATCCTGAAGGCGCTTGTCACAGGC

antisense : GAGACTCGAGCTTCTGAGCTCAGTGTGTT

PCR 産物の長さは765 bp である。

変性反応 : 94°C, 1分。アニーリング反応 : apoE は65°C, 1分, Msx2 は63°C, 1分, IGFBP2 は55°C, 1分。ポリメリゼーション反

応：72℃，1分。以上を1サイクルとして，40サイクル行った。PCR産物は1%アガロースゲルにて電気泳動を行い，ethidium bromideで染色し撮影した。更にこのPCR産物の塩基配列をdirect sequencingによって確認した。

Whole mount *in situ* hybridization

野地らの方法¹³⁾に従った。

・枝芽の固定

E11.5およびE13.5の胎子の後肢をメスで切り出し，PBSで洗浄後，4%パラホルムアルデヒド/PBT (PBT:0.1% Tween20/PBS)で一晩固定後，脱水を行い100%エタノールで保存(-20℃)した。

・RNAプローブの作成

apoE, Msx2 および IGFBP2 の遺伝子を上記条件でPCR増幅した後，そのPCR産物をプラスミドベクター (pBluescript II KS⁻) にライゲーションを行い，エレクトロポレーション法で大腸菌に導入し増幅した。このプラスミドDNAを精製し(プラスミドキット, QIAGEN社)，制限酵素処理後ジゴキシゲニン(digoxigenin: DIG)で標識したRNAプローブをDIG-RNA Labeling Kit (BOEHRINGER MANNHEIM社)を用いて作成した。なお，プローブの合成は1.5%アガロースゲルの電気泳動で確認した。

・ハイブリダイゼーション

この過程には以下の試薬を使用した。

プレハイブリダイゼーション溶液：50%ホルムアミド，5×SSC，pH4.5，50μg/ml yeast tRNA，1% SDS，50μg/ml ヘパリン

Solution 1：50%ホルムアミド，5×SSC，pH4.5，1% SDS

Solution 2：5×SSC，pH4.5，0.1% Tween 20

Solution 3：50%ホルムアミド，2×SSC，pH4.5，1% SDS

TBST：150 mM NaCl，100 mM Tris-HCl，0.1% Tween20

NTMT：0.1 M NaCl，0.1 M Tris-HCl，pH9.5，50 mM MgCl₂，1% Tween20

APバッファー：0.1M NaCl，0.1M Tris-HCl，

pH 9.5，50 mM MgCl₂，70~100 kDa の5%ポリビニルアルコール，1% Tween20

スクリーチューブ (1.5 ml) を用いて作製したメッシュホルダーに，固定・保存していた枝芽を入れ，再水和後，proteinase K (10 μg/ml・37℃，15分) およびグリシン/PBT (2 mg/ml・室温，5分) で処理した。PBTで洗浄後0.2%グルタルアルデヒド・4%パラホルムアルデヒド/PBTで処理(室温，20分)した。更に洗浄後，6% H₂O₂/PBT処理(室温，1時間)を行い，再度洗浄しプレハイブリダイゼーション溶液でインキュベート(70℃，1時間)した。この試料にプローブ溶液(1 μg/ml)を加え70℃，16時間ハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーション後，液を除去し，Solution 1を加え70℃で30分間×3回インキュベートし，続いてSolution 2で5分間インキュベートした(室温，4回)。更にSolution 3でインキュベートした(70℃，5分間×2回，次いで30分間×3回)後，TBSTで5分間インキュベートした(室温，5回)。ブロッキング溶液(1.5% Blocking-reagent/TBST)を加え室温で1時間インキュベートした後，アルカリフォスファターゼを標識した抗ジゴキシゲニン抗体溶液で更に16時間インキュベートした。なお抗体の非特異的吸着を防ぐため，上記ブロッキング溶液に同時期の胚のembryo-powderを加えた。その後，TBSTで抗体を洗浄し，NTMTおよびAPバッファーでインキュベート後，NBT solution & BCIP solution/AP bufferで発色(青色)させた。

5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) 処理

妊娠マウス E12.5 に BrdU (BOEHRINGER MANNHEIM 社；150 mg/kg) を 2 時間毎，計 4 回，腹腔内に投与した。コントロールは同時期に PBS を同様に投与した。E13.5 に腹腔内から胎子を摘出し，後肢芽を切り出して固定を行い，これらに whole mount による *in situ* hybridization を上記の如く行い，更に切片化して TUNEL 法を行った。

結 果

マウス肢芽の細胞死の時期

E10.0から12時間毎に胎子を摘出し、後肢を切り出し、Nile blue 染色で確認したところ、細胞死はE11.5に anterior necrotic zone (ANZ) と posterior necrotic zone (PNZ) から始まり、その後、apical ectodermal ridge (AER) と interdigital necrotic zone (INZ) にも細胞死を起こし E13.5にそのピークをむかえ、E15.0に肢芽の細胞死は終了した (Fig. 1)。また、前肢の細胞死は後肢に対して約12時間ほど先行し、E13.0にピークをむかえた。

この細胞死の時期に合わせて E10.0から E15.0までの後肢芽のパラフィン切片を作成し、HE 染色で観察したところ、Nile blue 染色と一致する時期にクロマチン凝縮やアポトーシス小体を認め (Fig. 2a)、その所見のピーク時期は E13.5であった。更に TUNEL 法を行ったところ、Nile blue 染色や HE 染色と同時期および同部位に TUNEL 陽性細胞を認め (Fig.

2b)、その時期のピークはやはり E13.5であった。肢芽の細胞死の遺伝子発現

細胞死開始時期である E11.5とピーク時期の E13.5の遺伝子発現を DNA Expression Arrays (Fig. 3)で1176種類の遺伝子について確認したところ、E13.5に上昇していた遺伝子は7つで、apoE、Msx2 や IGFBP2 は定量解析で E11.5と比較して6倍以上と有意に上昇していた

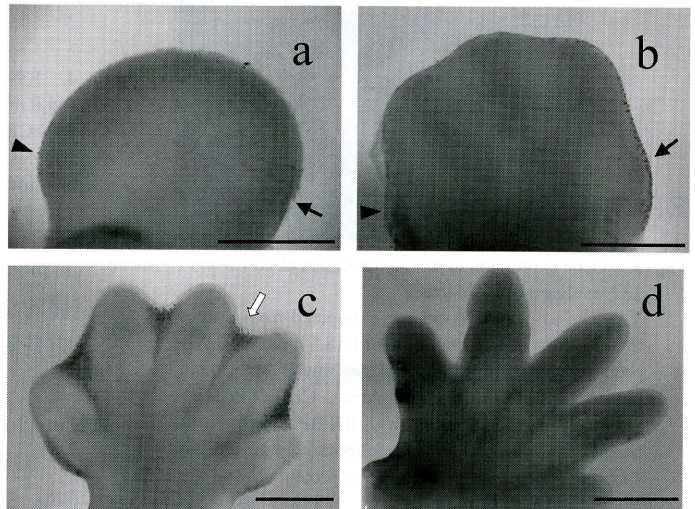


Fig. 1. Nile blue staining of dead cells in macrophage-like cells in mouse hindlimbs (E11.5–E15.0) **a** (E11.5), **b** (E12.5); Many dead cells were found in ANZ (arrow) and PNZ (arrowhead). **c**; In E13.5 hindlimbs, cell death occurred in INZ (open arrowhead). **d**; The cell death was not detected in E15.0 hindlimbs. ANZ; anterior necrotic zone, PNZ; posterior necrotic zone, INZ; interdigital necrotic zone. Bars represent 0.5 mm.

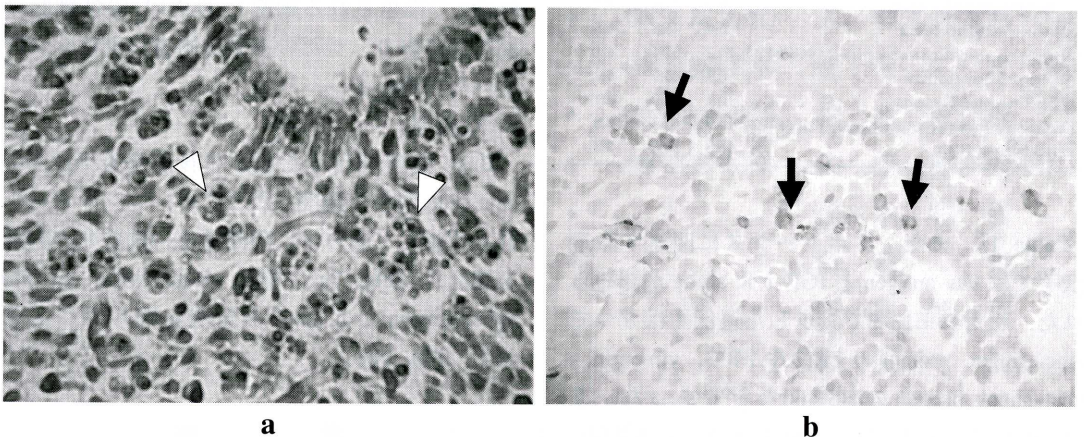


Fig. 2. Hematoxyline-eosin staining of the interdigital region in E13.5 hindlimb **a**; Many apoptotic bodies (open arrowhead) were observed ($\times 400$). **b**; TUNEL staining for apoptotic cells (arrows) at the interdigital region in E13.5 hindlimbs ($\times 400$).

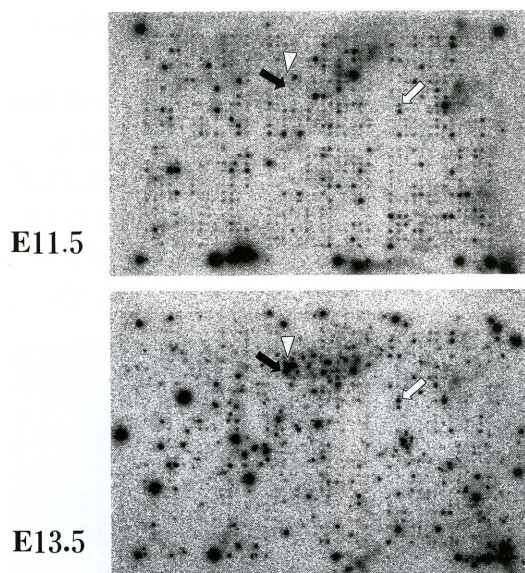


Fig. 3. Gene expression in mouse hindlimbs of E11.5 and E13.5 analysed by 1176 genes

³²P-labeled cDNA probes were prepared from 5 µg of total RNA isolated from E11.5 or E13.5 hindlimbs. The probes were hybridized with Atlas Mouse Array membranes (Atlas™ Mouse 1.2 Array, CLONTECH®), separately. apoE (open arrows) IGFBP2 (open arrowheads) Msx2 (arrows) apoE; apolipoprotein E, IGFBP2; insulin-like growth factor binding protein 2.

Table 1. Increased genes expression in E13.5 hindlimbs than E11.5

Gene expression analysis was described in the Fig. 3. The radioactive intensity was measured by BAS2000 as described in the text.

Gene Name	Intensity		Ratio fold
	E11.5	E13.5	
① apolipoprotein E (apoE)	9.6	73.6	7.7
② homeobox genes Msx2	6.9	44.8	6.5
③ insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2)	14.2	87.4	6.1
④ homeobox genes Msx1	8.9	48.9	5.4
⑤ Fas I receptor: Fas antigen	10.1	42.0	4.1
⑥ insulin-like growth factor I receptor alpha subunit (IGF-I-R alpha)	14.9	42.9	2.8
⑦ Huntingtin (HD)	16.8	38.8	2.3

(Table 1). また、アポトーシスに関連する遺伝子では Fas antigen と IGF-I-R alpha が認められた。反対に E13.5 で減少した遺伝子は 6 つで zinc finger protein の ZIC2 や ZIC3, vimentin, heat-shock protein の HSP 60 などであった。また、有意に上昇していた apoE, Msx2 や IGFBP2 に対して RT-PCR を行い、転写レベルでみたところ差を確認した (Fig. 4).

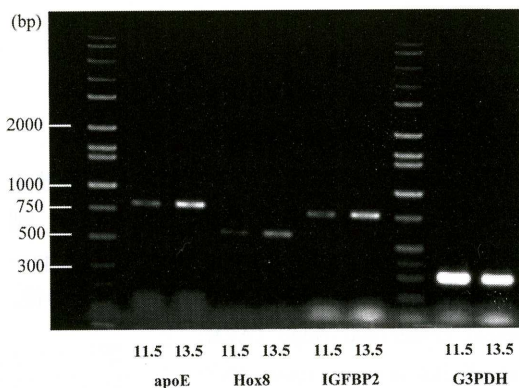


Fig. 4. RT-PCR analysis of mRNA from apoE and Msx2 and IGFBP2 of E11.5 and E13.5 hindlimbs

RT-PCR amplification was carried out to the mRNA samples from interdigital tissues at E11.5 and E13.5 hindlimbs. Methods were described in the text.

Whole mount *in situ* hybridization

空間的な遺伝子発現パターンを確認するために、定量解析で有意に上昇していた遺伝子について RNA プローブを作製し、whole mount による *in situ* hybridization を行ったところ、apoE, Msx2, IGFBP2 は肢芽の指間部位に発現を認めた (Fig. 5a,b). また apoE の発現パターンは通常の *in situ* hybridization とは異なり顆粒状の染色パターンを呈した。これは生体染色法である Nile blue 染色に非常によく似た染色パターンであった (Fig. 5c).

これを切片化して TUNEL 法を行ったところ、*in situ* で染色される細胞と TUNEL 陽性細胞は異なっており、一部の細胞は両方の染色を受けていた (Fig. 6).

BrdU 処理

BrdU 処理を行った胎子の後肢芽を E13.5 に Nile blue 染色で観察したところ、コントロール群と比較して明らかに指間部位の細胞死の抑制を認めた (Fig. 7a). 更に whole mount *in situ* hybridization では apoE の発現も明らかに減少した (Fig. 7b).

考 察

マウス肢芽の指間細胞死は11日目頃から始ま

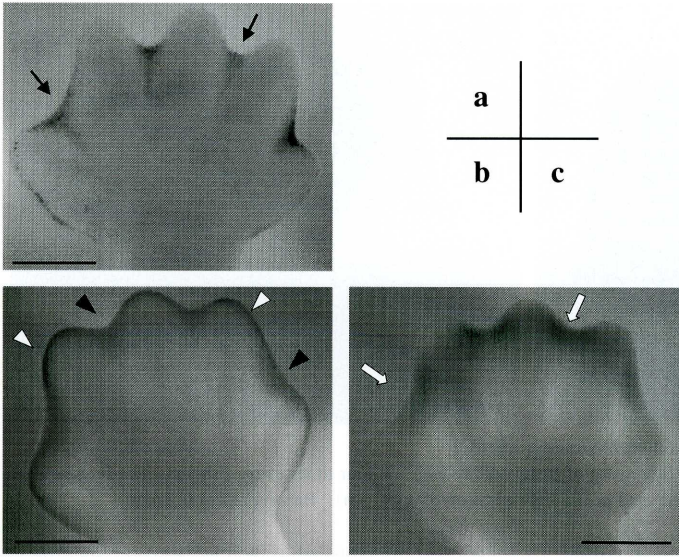


Fig. 5. mRNA expression patterns of apoE, IGFBP2 and Msx2 in E13.5 hindlimbs by the whole mount *in situ* hybridization **a**, ; ApoE expression in the interdigital regions (arrows) of E13.5 hindlimbs. **b**; IGFBP2 expression in the AER (arrowheads) and the interdigital regions (open arrowheads) of E13.5 hindlimbs. **c**; Msx2 expression in the interdigital regions (open arrows) of E13.5 hindlimbs. AER; apical ectodermal ridge. Bars represent 0.5 mm.

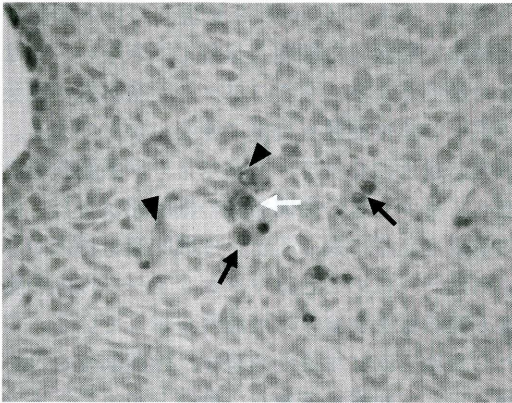


Fig. 6. TUNEL & *in situ* hybridization double staining of the interdigital regions of E13.5 hindlimb
TUNEL positive cells were stained with brown (arrows). Apolipoprotein E expression were stained by blue dye (arrowheads). A part of these cells were double stained (open arrowhead) ($\times 400$).

り15日目頃には終了した。しかし、一回の妊娠で十数匹の胎子が生まれるため、各胎子間で発生の時期に若干ずれが生じ細胞死の時期にも差が認められた。マウス肢芽の発生におけるステージングについての検討はいくつか報告はある

が^{14),15)}、ニワトリの肢芽に用いられているような正確なステージ表(第3指の先端から蹠骨・趾骨関節までの距離)は得られていない¹²⁾。これはマウスの場合、10日目前後の早期のステージでは軟骨や指の関節等の確認が難しいためである。今回の研究においては、一般的に使用されるプラグ確認日からの妊娠日数をステージとして用いたが、個体差が少なからずあるため今後は正確なステージングの確立が必要と考えられる。

肢芽の発生におけるプログラム細胞死は、HE染色やTUNEL法の結果からアポトーシスによるものと考えられるが、最近、この細胞死はアポトーシスだけではなく、ネクローシスも関与するとの報告がなされた¹⁶⁾。この報告は必ずしも

プログラム細胞死=アポトーシスではなく、また、その細胞死の分子機構が複雑であることを示している。

細胞死のピーク時期に上昇を認めた遺伝子のうち、Msx2やIGFBP2は既報通りであったが^{17),18)}、アポトーシスの実行過程において必須である、caspaseやApaf-1などの上昇は認められなかった。しかし、今回、新たにapoEの発現の増加を確認した。このapoEはアポリポタンパク質の一つで、通常は脂質代謝に重要な働きをしているが、肢芽の発生過程で発現が認められた。また*in situ* hybridizationにおいては、Msx2にみられるような様に染色される通常の染色パターンではなく、生体染色法であるNile blue染色に非常によく似た顆粒状の染色パターンを示した。この顆粒はNile blueにより染色された死細胞を貪食した、マクロファージ様細胞である。これを考慮すると、*in situ* hybridizationで染色されているのは死細胞かマクロファージ様細胞のどちらかということになる。このことを確認するために、切片化しTUNEL

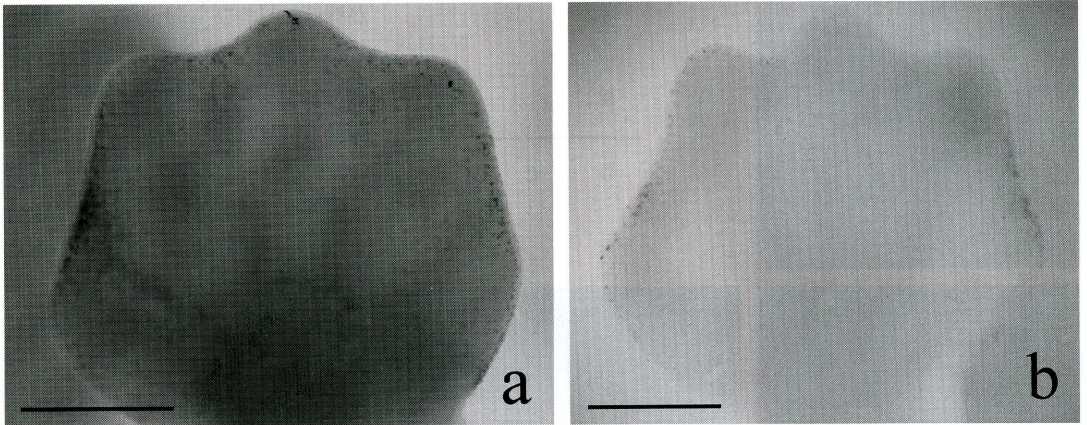


Fig. 7. Interdigital apoptosis inhibition by 5-bromodeoxyuridine (BrdU)

Pregnant female mouse were injected with 150 mg/kg of BrdU on day E12.5 at four times every 2 hours. The fetuses were examined on E13.5 for Nile blue staining (a) and *in situ* hybridization of apoE (b). Bars represent 0.5mm.

を行って検討したところ、*in situ* hybridizationで陽性を示すのはマクロファージ様細胞であると考えられた。そして、一部の細胞はTUNELと*in situ* hybridizationの両方が陽性であり、これは死細胞をマクロファージ様細胞が貪食している所見と考えられる。つまりapoEはマクロファージ様細胞の中に誘導発現されていた。マクロファージはapoEを分泌しているが¹⁹⁾、その働きは血中のリポタンパク代謝や組織の局所的脂質代謝²⁰⁾であると言われており、貪食機構への関与は不明である。

細胞がアポトーシスを起こすと、細胞自体は縮小し、核内ではクロマチンが凝縮し、核が断片化する。そして細胞自体が断片化してアポトーシス小体が形成され、マクロファージなどの食細胞や隣接する細胞によって貪食され、除去される²¹⁾。細胞死がおこると、細胞膜の細胞質側リン脂質層に主として局在するフォスファチジルセリンが細胞膜外側に露出し、それをマクロファージ表面のフォスファチジルセリンレセプターが認識することで貪食作用がおこると考えられている^{22)~24)}。更に内毒素の構成成分であるリポ多糖を認識するマクロファージ表面のCD14の関与も指摘されている²⁵⁾。またアポトーシスにおけるマクロファージ動員機構としてはS19リボソーム蛋白架橋化二量体などが報告されている^{26)~27)}。今回新たに発現を認めたapoE

は*in situ* hybridizationとTUNELの二重染色から死細胞ではなく、その周辺のマクロファージ様細胞内に発現していた。更にこの発現はBrdU処理によって明らかに抑制された。このことは死んだ細胞による刺激で、その隣接する細胞内にapoEの発現が誘導されていると推測される。もちろんapoEを発現している細胞が死細胞に隣接した細胞とは断定できない。なぜなら網内系から、マクロファージ系細胞が動員されている可能性も否定できないからである。さらに最近になってマクロファージ系細胞を除去してもマウスの指間組織の細胞死は生じ、指の形成も正常に起こるという興味深い報告がなされた²⁸⁾。このことはマクロファージ以外の細胞が死細胞を貪食する可能性を示している。これらを明らかにするため現在、指間部位だけを切り出して組織培養を行い検討している。またapoEの貪食における役割は不明だが、フォスファチジルセリンのような“eat me signal”ではなく、貪食能を獲得した時に発現する、“eat you signal”かもしれない。今後はapoEの発現を抑制することで、貪食作用に起こる変化などを検討し、apoEの貪食機構における役割を調べる必要がある。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導と御鞭撻を賜りました川崎医科大学生化学教室 刀祢重信助教授、湊川洋介教授、産婦人科学教室 河野一郎教授に深甚なる謝意

を捧げます。また、本研究の一部は、大学院重点特別経費（平成11年度）の援助によって行われたことを付記し深謝します。なお本論文の一部は14th International Congress of Developmental Biology（2001年7月8日～12日 Kyoto）において発表した。

文 献

- 1) Kerr JF, Wyllie AH, Raff MC : Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26 : 239-257, 1972
- 2) Glucksmann A : Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev* 26 : 59-86, 1951
- 3) Saunders JW Jr : Death in embryonic systems. *Science* 154 : 604-612, 1966
- 4) Hurler JM : Cell death in developing systems. *Meth Achi Exp Pathol* 13 : 55-86, 1988
- 5) Coucouvanis E, Martin G R, Nadeau J H : Genetic approaches for studying programmed cell death during development of the laboratory mouse. *Meth Cell Biol* 46 : 387-440, 1995
- 6) Michael DJ, Miguel W, Martin CR : Programmed Cell Death in Animal Development. *Cell* 88 : 347-354, 1997
- 7) Hongyan Z, Lee Niswander : Requirement for BMP Signaling in Interdigital Apoptosis and Scale Formation. *Science* 272 : 738-741, 1996
- 8) Yokouchi Y, Sakiyama J, Kameda T, Iba H, Suzuki A, Ueno N, Kuroiwa A : BMP-2/4 mediate programmed cell death in chicken limb buds. *Development* 122 : 3725-3734, 1996
- 9) Rodriguez-Leon J, Merino R, Macias D, Ganan Y, Santesteban E, M.Hurle J : Retinoic acid regulates programmed cell death through BMP signalling. *Nature Cell Biology* 1 : 125-126, 1999
- 10) Omi M, Sato-Maeda M, Ide H : Role of chondrogenic tissue in programmed cell death and BMP expression in chick limb buds. *Int J Dev Biol* 44 : 381-388, 2000
- 11) Ceccconi F, Alvarez-Bolado G, Meyer BI, Roth KA, Gruss P : Apaf1 (CED-4 Homolog) Regulates Programmed Cell Death in Mammalian Development. *Cell* 94 : 727-737, 1998
- 12) Toné S, Tanaka S, Kato Y : The inhibitory effect of 5-bromodeoxyuridine on the programmed cell death in the chick limb. *Dev Growth Differ* 25 : 381-391, 1983
- 13) 野地澄晴 : 免疫染色・*in situ* ハイブリダイゼーション 別冊実験医学 ザ・プロトコールシリーズ : 1997
- 14) Wanek N, Muneoka K, Holler-Dinsmore G, Burton R, V.Bryant S : A Staging System for Mouse Limb Development. *THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL ZOOLOGY* 249 : 41-49, 1989
- 15) Martin P : Tissue patterning in the developing mouse limb. *Int J Dev Biol* 34 : 323-336, 1990
- 16) Chautan M, Chazal G, Ceccconi F, Gruss P, Golstein P : Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. *Current Biology* 9 : 967-970, 1999
- 17) Chan-Thomas PS, Thompson RP, Robert B, Yacoub MH, Barton PJR : Expression of Homeobox Genes Msx-1 (Hox-7) and Msx-2 (Hox-8) During Cardiac Development in the Chick. *Dev Dyn* 197 : 203-216, 1993
- 18) Kleffens M, Groffen C, Rosato RR, Eijnde SM, Neck JW, Lindenberg-Kortleve DJ, Zwarthoff EC, Drop SLS : mRNA expression patterns of the IGF system during mouse limb bud development, determined by whole mount *in situ* hybridization. *Mol Cell End* 138 : 151-161, 1998
- 19) Basu SK, Brown MS, Ho YK, Havel RJ, Goldstein JL : Mouse macrophages synthesize and secrete a protein resembling apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci* 78 : 7545-7549, 1981
- 20) Mahley RW : Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240 : 622-630, 1988

- 21) Schulze-Osthoff K : Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 254 : 439-459 1998
- 22) Savill J : Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Br Med Bull* 53 : 491-508, 1997
- 23) Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RAB, Henson PM : A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptosis cells. *Nature* 405 : 85-90, 2000
- 24) Green DR, Beere HM : Gone but not forgotten. *Nature* 405 : 28-29, 2000
- 25) Devitt A, Moffatt OD, Raykundalia C : Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* 392 : 505-509, 1998
- 26) Horino K, Nishiura H, Ohsako T, Shibuya Y, Hiraoka T, Kitamura N, Yamamoto T : A Monocyte Chemotactic Factor, S19 Ribosomal Protein Dimer, in Phagocytic Clearance of Apoptotic Cells. *Lab Invest* 78 : 603-617, 1998
- 27) Shrestha A, Horino K, Nishiura H, Yamamoto T : Aquired Immune Response as a Consequence of the Macrophage-Dependent Apoptotic Cell Clearance and Role of the Monocyte Chemotactic S19 Ribosomal Protein Dimer in This Connection. *Lab Invest* 79 : 1692-1641, 1999
- 28) Wood W, Turmaine M, Weber R, Camp V, Maki RA, Mckercher SR, Martin P : Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos. *Development* 127 : 5245-5252, 2000