

厚生科学研究費補助金(ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業)

**遺伝性形成不全症の責任遺伝子における変異の
解析と情報ネットワークの構築**

(課題番号：H10-ゲノム-025)

平成11年度 研究報告書
平成9-11年度 総合研究報告書

2000年3月

主任研究者 山田正夫

(国立小児病院小児医療研究センター先天異常研究部長)

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
研究報告書

遺伝性形成不全症の責任遺伝子における変異の解析と情報ネットワークの構築
（課題番号：H10-ゲノム-025）

主任研究者：山田正夫 国立小児病院小児医療研究センター先天異常研究部長

研究要旨

主として小児に見られる各種の組織や器官の形成不全症について責任遺伝子を探求し、患者に生じた変異を同定し、遺伝子と病態との対応付けを図る。また責任遺伝子の変異に基づいて発症機構を解析する。特に関連疾患アプローチによって、広範な眼・腎・肝形成不全症について PAX6・EYA1・WT1・JAG1 の関与を解析した。PAX6 は haploinsufficiency によって無虹彩症となるが、そのミスセンス変異は様々な病態を呈する眼形成不全症を生じることを解明した。ヒトでは眼の形成に関与しないと考えられた EYA1 も、変異解析から眼の形成に関与することを明らかにした。学童期に腎不全となる Frasier 病が WT1 変異によることを明らかにした。PAX2・PAX6・p53・WT1 などの転写因子の相互ネットワークと、それによるアポトーシス制御機構について解析し、発生分化時における形成異常の発生機構にアプローチした。

A. 研究目的

主として小児に見られる各種の組織や器官の形成不全症について責任遺伝子を探求し、患者に生じた変異を同定して病態とのスペクトラムを明らかにし、遺伝子変異と病態との対応付けを図る。また責任遺伝子の変異に基づいて発症機構を解析する

B. 研究方法

患者等の検体からゲノム DNA を得て、主として PCR-SSCP 法で変異体を選択し、塩基配列決定により変異を同定した。培養細胞や胚などで疾患責任遺伝子を発現させ、機能を解析した。

特に、候補疾患アプローチ戦略を採用し、眼形成症と PAX6・EYA、腎形成不全症と WT1、肝胆管形成不全症と JAG1 について解析を進めた。

本研究課題の遂行に以下の協力を得た。東範行・国立小児病院眼科医長、香坂降夫・国立小児病院小児科（腎消化器）医

長、田中敏章国立小児病院内分泌代謝研究部長にはそれぞれ関係する患者の病態の精査および検体収集を依頼した。これら研究協力者とその関係者も先天異常研究部で解析実験に従事した。高野貴子・帝京大学医学部助教授には染色体分染解析と FISH を依頼し、沼部博直・東京医科大学室長にはインターネット情報発信に関して専門知識と技術提供を受けた。HS 財団による本研究課題の支援員（浅香敦子・大塚裕子）をはじめ、多数の先天異常研究部員が実験に参加した。

倫理面への配慮：従来から疾患責任遺伝子研究に関して倫理に配慮してきたが、本年度中に倫理委員会の承認手続きを進めるなど、倫理問題に積極的に関わってきた。平成9年8月に雨宮研究センター長名で、疾患遺伝子研究に関する基本的な倫理に関する審査を国立小児病院倫理委員会に申請し、約1年間の議論の後、平成10年10月に承認された。さらに、先天異常研究部で従来から実施してきた

内容をまとめ、山田は平成 11 年 5 月に倫理委員会に審査を申請した。いくつかの問題を提起しているため、本申請は継続して審議されている。(ただし、当病院の倫理委員会で継続審議中の多くは、平成 12 年 2 月 4 日に発表された、厚生省「遺伝子解析による疾病対策・創薬等に関する研究における生命倫理問題に関する調査研究班」による「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」中間報告書では解決されている。)しかしこの間、山田の提出した「先天異常研究部検体取扱規定」を基礎に、センター全体としての検体取扱規定が制定され、倫理委員会の承認が得られ、さらに、共同研究者(本研究課題の協力者)から眼・腎・肝に関する疾患の遺伝子解析に関して個別に申請してもらい、承認を受けている。

C. 研究結果

1. 眼形成不全症と PAX6 : PAX 遺伝子群は paired box を DNA 結合ドメインとする転写因子をコードし、種を超えて保存され、また発生分化に関与する。その内、ヒト PAX6 は無虹彩症(OMIM#106200)の責任遺伝子として 1991 年に単離され、またショウジョウバエやマウスのホモログも眼の形成に関与することが知られている。我々は無虹彩症に限定せず、広範な眼形成異常症について PAX6 変異を解析し、これまでに多数の変異を同定してきた(既発表 8 例、未発表 32 例)。世界中でこれまでに約 200 例の PAX6 変異が報告されているが、そのほとんどは欠失・スプライス異常・ナンセンス変異などによって不完全長蛋白質が形成される変異であり、無虹彩症患者で見出されている。同疾患が優性遺伝様式を示すことから haploinsufficiency によって無虹彩症になると考えられる。一方我々は、孤立性黄斑低形成症、白内障などでミスセンス変異を見出し、PAX6 のミスセンス変異は様々な病態を呈することを明らかにした。

我々の提唱したこの概念は受け入れられ、他研究室でも解析が進み、少なくとも 21 例の PAX6 ミスセンス変異がこれまでに報告されているが、数ヶ月前の時点では世界中の 11 例中 7 例が当研究室の結果であった。下流遺伝子支配に及ぼす効果の違いに基づくと推定し、変異型蛋白質の転写調節能を解析した。

2. 視神経形成異常と PAX6 : 視神経形成異常症(OMIM*120200)7 例で PAX6 のミスセンス変異を見出した。視神経形成異常に腎不全を伴う renal-coloboma 病(OMIM#120330)では PAX2 が責任遺伝子である。そこで PAX2 と PAX6 の両転写因子相互の発現調節を解析したところ、ある条件下で PAX6 は PAX2 の転写を促進し、同定された PAX6 ミスセンス変異はドミナントネガティブに作用することを見出した。

3. 眼形成不全症と EYA1 : eyes absent (eya)はショウジョウバエで眼の形成にかかわるとして単離された遺伝子であり、他生物種でも眼の形成に関与することが知られている。一方、そのヒトホモログ EYA1 は branchio-oto-renal 症候群(OMIM#113650)の責任遺伝子として、ポジショナルクローニングによって 1997 年に単離された。Branchiootic 病(OMIM#602588)もアレリックであるとされたが、これらの患者には眼の異常を伴わない。我々は広範な眼形成異常症患者を検索し、白内障 3 例で EYA1 のミスセンス変異を見出し、EYA 遺伝子群がヒトでも眼形成に関与することを初めて明らかとした。

4. 腎不全症と WT1 : WT1 遺伝子は胎児性腎腫瘍である Wilms 腫瘍の責任遺伝子として 1990 年に単離された癌抑制遺伝子である。いくつかの腫瘍遺伝子あるいは癌抑制遺伝子は奇形の責任遺伝子でもあることは良く知られており、実際 WT1 遺伝子も、腎不全・泌尿生殖器形成不全・ウイルムス腫瘍を特徴とする Denys-Drash 症候群(OMIM#194080)の責

任遺伝子として1991年に確立している。我々は日本人Wilms腫瘍等で変異を同定し、1993年以来報告してきたが、さらに広範な先天性腎不全患者についてWT1遺伝子解析を進めてきた。これまでに8人の患者ゲノムでWT1変異を検出してきた。内2例は学童期に腎不全となるFrasier症候群(OMIM#136680)に区分され、Denys-Drash症候群患者と同様にジंकフィンガードメインでのミスセンス変異であった。我々は機能解析が必要として発表を控えていたところ、米国のグループから、Frasier症候群はWT1の+KTSアイソフォームを形成しない変異を伴うと1997年に報告された。我々の解析した患者例では+KTSも形成するので、Denys-DrashとFrasier症候群とは基本的に同一分子機構によると考えている。残る例について患者の病態を精査し、病態と変異スペクトラムの確立に努めている。

5. 肝胆管形成不全症とJAG1: Alagille症候群(OMIM#118450)は肝内胆管形成不全に基づく新生児黄疸を主兆とし、また心臓・肺動脈・神経の形成異常を伴う優性遺伝病である。この家系を収集し、ポジショナル戦略によって責任遺伝子同定を進めてきたが、97年に米国の2グループが、NotchリガンドをコードするJAG1を責任遺伝子として単離同定した。我々が収集した13家系についてJAG1遺伝子に変異を同定した。Alagille症候群患者は同一家系で同一変異を持っていても、重篤度が極めて異なることが知られているので、修飾因子の存在を追及した。

6. アポトーシス関連研究: 組織や器官の形成にアポトーシスは重要な働きをなす。我々は、常染色体優性の神経変性疾患である歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(OMIM#125370)がCAGリピート伸長に起因することを1994年に報告したが、この分野では発症機構の解明が進み、伸長ポリグルタミンによるアポトーシス誘導が主要な課題となってきた。その過程にcaspase8が関与することを見出して

機構解明に貢献した。また初期胚で伸長ポリグルタミンを強発現してアポトーシスを誘導し、形成異常を解析する実験系を構築した。

3-7. 情報ネットワーク: ヒト遺伝子と遺伝病に関するWWWサイトを<http://genetics.nch.go.jp>に構築し、一般者向けならびに専門家向けの情報を提供してきた。1年間に約12000件のアクセス(セッション確立で計測)があり、述べヒット数は約10万件であった。

D. 考察

PAX6について、ミスセンス変異が多様な眼の形成不全を示すという基本概念を樹立できたことと、EYA1が眼の形成に関係あることを指摘できたことは大きな貢献であると考えられる。さらに未発表ではあるが、視神経形成異常症については疾患責任遺伝子の1つを同定できたと考えられる。これらの結果はいずれも候補疾患アプローチによる成果であり、設定した基本戦略は大変有効であった。

E. 結論

候補疾患アプローチ戦略により、眼形成症におけるPAX6およびEYA、腎形成不全症におけるWT1、肝胆管形成不全症におけるJAG1について解析を進めた。PAX6のミスセンス変異は多様な眼の形成不全を示すという基本概念を形成し、またEYA1が眼の形成に関係あることを指摘できた。

F. 研究発表

1) 論文発表

1. N. Azuma, Y. Yamaguchi, H. Handa, M. Hayakawa, A. Kanai & M. Yamada. Missense mutation in the alternative splice region of the PAX6 gene in eye anomalies. *Am. J. Hum. Genet.* 65, 656-663, 1999.
2. K. Negishi, N. Azuma & M. Yamada. Various phenotypic expression of familial aniridia with a PAX6 mutation. *Brit. J. Ophthalmol.* 83, 991-992, 1999.
3. M. Fujino, X.-K. Li, T. Okuyama, N.

- Funeshima, A. Tamura, S. Enosawa, Y. Kita, T. Amano, M. Yamada, H. Amemiya & S. Suzuki. On/off switching Fas-ligand gene expression in liver by Cre/Loxp adenovirus vector system. *Transplant Proc.* 31:753-754, 1999.
4. T. Miyashita, J. Matsui, Y. Ohatsuka, M. U. S. Fujishima, Y. Okamura-Oho, T. Inoue & M. Yamada. Expression of extended polyglutamine sequentially activates initiator and effector caspases. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 257, 724-730. 1999.
5. Y. Okamura-Oho, T. Miyashita, K. Ohmi & M. Yamada. Dentatorubral-pallidoluysian atrophy protein interacts through a proline-rich region near polyglutamine with the SH3 domain of an insulin receptor tyrosine kinase substrate. *Hum. Mol. Genet.* 8, 947-957, 1999.
6. M. Takahashi, H. Saito, T. Okuyama, T. Miyashita, M. Kosuga, F. Sumisa, M. Yamada, H. Ebinuma & H. Ishii. Overexpression of Bcl-2 protects human hepatoma cells from Fas-antibody-mediated apoptosis. *J. Hepatol.* 31, 315-322, 1999.
7. D-K. Jin, S-J. Kang, S-J. Kim, E-H. Bang, H-Z. Hwang, K. Tadokoro, M. Yamada & T. Kohsaka. Transcriptional regulation of PDGF-A and TGF- β by +KTS WT1 deletion mutants and a mutant mimicking Denys-Drash Syndrome. *Renal Failure*, 21, 685-694, 1999.
8. T. Kohsaka, M. Tagawa, Y. Takekoshi, H. Yanagisawa, K. Tadokoro & M. Yamada. Exon 9 mutations in the WT1 gene, without influencing KTS splice isoforms, are also responsible for frasier syndrome. *Human Mutation* 14, 466-470, 1999.
9. K. Fujii, T. Miyashita, J.-I. Takanashi, K. Sugita, Y. Kohno, H. Nishie, S.-I. Yasumoto, M. Furue & M. Yamada. γ -Irradiation deregulates cell cycle control and apoptosis in nevoid basal cell carcinoma syndrome-derived cells. *Jpn. J. Cancer Res.* 90, 1351-1357, 1999.
10. K. Komatsu, T. Miyashita, H. Hang, K. M. Hopkins, W. Zheng, S. Cuddeback, M. Yamada, H. B. Lieberman & H.-G. Wang. Human homologue of *S. pombe* Rad9 interacts with BCL-2/BCL-XL and promotes apoptosis. *Nature Cell Biol.*, 2, 1-6, 2000.
11. N. Azuma, A. Hirakiyama, T. Inoue, A. Asaka, & M. Yamada. Mutations of a human homologue of the *Drosophila* eyes absent gene (EYA1) detected in patients with congenital cataracts and ocular anterior segment anomalies. *Hum. Mol. Genet.* 9, 363-366, 2000.
12. 長尾 芳朗, 山田 正夫
ハンチントン病遺伝子の転写制御.
日本臨床 57:912-916, 1999.
13. 於保 祐子, 山田 正夫
DRPLA 遺伝子産物と相互作用する蛋白
遺伝子のクローニング.
日本臨床 57:856-861, 1999.
14. 山田 正夫
PAX6 変異による眼形成不全症.
医学のあゆみ 190:691-696, 1999.
15. 山田 正夫
DRPLA 遺伝子産物の機能.
遺伝子医学 3:533-535, 1999.
16. 山田正夫
遺伝病と遺伝子診断. (松橋通生, 真野往
博 編) “ポイントが分かる分子生物”,
丸善, p114-115, 1999.
17. 山田正夫
遺伝子治療: ((松橋通生, 真野往博 編)
“ポイントが分かる分子生物”, 丸善,
p116-117, 1999.

2.学会等発表

1. Miyashita T, Matsui J, U M, Okamura-Oho Y, Yamada M.
Expression of polyglutamine induces activation of caspase-3-like proteases. *Keystone Symposia, “Apoptosis and Programmed Cell Death”*, Breckenridge, USA, April, 1999.
2. 奥山虎之, 高橋聡, 小須賀基通, 絵野
沢伸, 李小康, 奥山早苗, 藤野真之, 鈴
木盛一, 小祝修, 山田正夫, 桜川宣男
遺伝子導入羊膜細胞を用いたライソゾー
ム酵素欠損症に対する細胞療法の開発.
第7回細胞療法研究会, 東京, 4月23日,

1999.

3. 小須賀基通, 奥山虎之, 高橋聡, 田村明彦, 李小康, 絵野沢伸, 鈴木盛一, 松尾宣武, Jayanta Roy-Chowdhury, 小祝修, 山田正夫

遺伝子導入不死化肝細胞を用いた細胞療法の開発.

第7回細胞療法研究会, 東京, 4月23日, 1999.

4. Tokieda K, Okuyama T, Kosuga M, Takahashi S, Li XK, Suzuki S, Hashimoto M, Yaginuma H, Yamada M.

Prolonged transgene expression in mice liver by co-administration of an E1/E3-deleted adenovirus vector expressing cytokine response modifier A.

The 5th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, June 18-19, 1999.

5. Kosuga M, Okuyama T, Koiwai O, Tamura A, Suzuki S, Matsuo N, Yamada M.

Enhancement of adenovirus-mediated gene transfer by Kupffer cell depletion in the liver.

The 5th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, June 18-19, 1999.

6. 山田正夫

歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症の責任遺伝子の機能と, 培養細胞モデル実験系での細胞死の機構(シンポジウム招待講演).

第42回日本神経化学学会大会, 広島, 9月15-17日, 1999.

7. 田所恵子, 山田正夫

PAX family 遺伝子の転写調節機能.

第58回日本癌学会総会, 広島, 9月29日-10月1日, 1999.

8. 宮下俊之, 山田正夫

伸長したポリグルタミンによるカスペーシスの活性化(シンポジウム).

第72回日本生化学学会大会, 横浜, 10月6-9日, 1999.

9. Okuyama T, Kosuga M, Li XK, Tokieda K, Takahashi S, Suzuki S, Yamada M, Yaginuma H, Hashimoto M.

Prolonged transgene expression in mice liver by co-administration of an

E1/E3-deleted adenovirus vector expressing cytokine response modifier A.

50th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Dallas, USA, November 5-9, 1999.

10. 小須賀基通, 荻野郁子, 大川英徳, 屋田修, 新井一, 桜川宣男, 松尾宣武, 山田正夫, 奥山虎之

遺伝子導入羊膜細胞を用いたムコ多糖症 VII 型モデルマウスに対する脳内移植治療の検討.

第42回日本先天代謝異常学会総会, 鹿児島, 11月11-13日, 1999.

11. 奥山虎之, 高橋聡, 小須賀基通, 佐々木恭子, 李小康, 藤野真之, 鈴木盛一, 山田正夫, 濱田洋文

ムコ多糖症 VII 型の遺伝子治療-in vivo cross-correction の関与と CTLA4Ig の同時発現による長期治療効果について-

第42回日本先天代謝異常学会総会, 鹿児島, 11月11-13日, 1999.

12. 時枝啓介, 小須賀基通, 奥山虎之, 高橋聡, 山田正夫, 李小康, 鈴木盛一, 橋本光広, 八木沼洋行

アポトーシス抑制遺伝子の同時発現によるムコ多糖症 VII 型遺伝子治療法の改良(ワークショップ, 遺伝子治療).

日本人類遺伝学会第44回大会, 仙台, 11月17-19日, 1999.

13. 山田正夫, 田所恵子, 東範行
眼形成不全症と PAX6: 候補疾患アプローチ.

日本人類遺伝学会第44回大会, 仙台, 11月17-19日, 1999.

14. 柳澤比呂子, 宮下俊之, 於保祐子, 文東美紀, 徳永勝士, 山田正夫

DRPLA 蛋白と相同配列を有する RERE 蛋白の機能ドメインの解析.

日本人類遺伝学会第44回大会, 仙台, 11月17-19日, 1999.

15. 奥山虎之, 高橋聡, 小須賀基通, 佐々木恭子, 山田正夫, 桜川宣男

遺伝子導入羊膜細胞の移植によるライソゾーム酵素欠損症に対する遺伝子治療の開発.

日本人類遺伝学会第 44 回大会, 仙台, 11 月 17-19 日, 1999.

16. 小須賀基通, 山田正夫, 奥山虎之, 萩野郁子, 大川英徳, 屋田修, 新井一, 桜川宣男, 松尾宣武
遺伝子導入羊膜細胞を用いたムコ多糖 VII 型モデルマウスに対する脳内移植治療の検討.

日本人類遺伝学会第 44 回大会, 仙台, 11 月 17-19 日, 1999.

17. 高橋聡, 奥山虎之, 小須賀基通, 佐々木恭子, 山田正夫, 李小康, 藤野真之, 鈴木盛一, 濱田洋文

ムコ多糖症 VII 型の遺伝子治療: *in vivo* cross-correction の関与と CTLA-4Ig の同時発現による長期治療効果について.

日本人類遺伝学会第 44 回大会, 仙台, 11 月 17-19 日, 1999.

18. 山田正夫

小児疾患の遺伝子診断と治療(教育講演). 第 10 回小児整形外科学会学術集会, 東京, 11 月 25-26 日, 1999.

19. 於保祐子, 嶋誠悟, 宮下俊之, 山田正夫

53kDa インスリン受容体基質 (IRSp53) のインスリン刺激による細胞膜近傍への移行.

第 22 回日本分子生物学会年会, 福岡, 12 月 7-10 日, 1999.

20. 宮下俊之, 鹿間芳明, 禹麻美, 東島今日子, 於保祐子, 山田正夫

伸長したポリグルタミンによるカスパー 8 の限定分解.

第 22 回日本分子生物学会年会, 福岡, 12 月 7-10 日, 1999.

21. 禹麻美, 宮下俊之, 山田正夫

ポリグルタミンに限らず, 単一アミノ酸からなる伸長リピートを発現すると細胞死が誘導される.

第 22 回日本分子生物学会年会, 福岡, 12 月 7-10 日, 1999.

22. 大葉龍太郎, 井上正, 山田正夫

伸長ポリグルタミン鎖の凝集性の解析.

第 22 回日本分子生物学会年会, 福岡, 12

月 7-10 日, 1999.

23. 柳澤比呂子, 宮下俊之, 於保祐子, 文東美紀, 徳永勝士, 山田正夫

DRPLA と高い相同性をもつ RERE 蛋白質の, DRPLA 蛋白質との相互作用.

第 22 回日本分子生物学会年会, 福岡, 12 月 7-10 日, 1999.

24. 田所恵子, 堂口裕士, 東範行, 山田正夫

PAX 遺伝子ファミリーと WT1 の転写調節相互作用.

第 22 回日本分子生物学会年会, 福岡, 12 月 7-10 日, 1999.

25. 小林慎, 上村拓, 新川詔夫, 山田正夫, 山崎亮, 幸田尚, 石野一金児知子, 石野史敏

Silver-Russell 症候群における PEG1/MEST 遺伝子の変異解析.

第 22 回日本分子生物学会年会, 福岡, 12 月 7-10 日, 1999.

F. 知的所有権の出願・取得状況

疾患責任遺伝子の機能に関する研究に抗体が必要となり、従来の方法とは異なる新しい免疫方法を考案し、専門業者に特注してウサギを免疫して作成した。この方法が特許取得可能か検討している。

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
総合研究報告書

遺伝性形成不全症の責任遺伝子における変異の解析と情報ネットワークの構築
（課題番号：H10-ゲノム-025）

主任研究者：山田正夫 国立小児病院小児医療研究センター先天異常研究部長

研究要旨

主として小児に見られる各種の組織や器官の形成不全症について責任遺伝子を探求し、患者に生じた変異を同定し、遺伝子と病態との対応付けを図る。また責任遺伝子の変異に基づいて発症機構を解析する。特に関連疾患アプローチによって、広範な眼・腎・肝形成不全症について PAX6・EYA1・WT1・JAG1 の関与を解析した。PAX6 は haploinsufficiency によって無虹彩症となるが、そのミスセンス変異は様々な病態を呈する眼形成不全症を生じることが解明した。ヒトでは眼の形成に関与しないと考えられた EYA1 も、変異解析から眼の形成に関与することを明らかにした。学童期に腎不全となる Frasier 病が WT1 変異によることを明らかにした。PAX2・PAX6・p53・WT1 などの転写因子の相互ネットワークと、それによるアポトーシス制御機構について解析し、発生分化時における形成異常の発生機構にアプローチした。

A. 研究目的

主として小児に見られる各種の組織や器官の形成不全症について責任遺伝子を探求し、患者に生じた変異を同定して病態とのスペクトラムを明らかにし、遺伝子変異と病態との対応付けを図る。また責任遺伝子の変異に基づいて発症機構を解析する

B. 研究方法

患者等の検体からゲノム DNA を得て、主として PCR-SSCP 法で変異体を選択し、塩基配列決定により変異を同定した。培養細胞や胚などで疾患責任遺伝子を発現させ、機能を解析した。

特に、候補疾患アプローチ戦略を採用し、眼形成症と PAX6・EYA、腎形成不全症と WT1、肝胆管形成不全症と JAG1 について解析を進めた。

本研究課題の遂行に以下の協力を得た。

東範行・国立小児病院眼科医長、香坂降夫・国立小児病院小児科（腎消化器）医長、田中敏章国立小児病院内分泌代謝研究部長にはそれぞれ関係する患者の病態の精査および検体収集を依頼した。これら研究協力者とその関係者も先天異常研究部で解析実験に従事した。高野貴子・帝京大学医学部助教授には染色体分染解析と FISH を依頼し、沼部博直・東京医科大学室長にはインターネット情報発信に関して専門知識と技術提供を受けた。HS 財団による本研究課題の支援員（浅香敦子・大塚裕子）をはじめ、多数の先天異常研究部員が実験に参加した。

倫理面への配慮：従来から疾患責任遺伝子研究に関して倫理に配慮してきたが、本研究課題期間中に倫理委員会の承認手続きを進めるなど、倫理問題に積極的に関わってきた。平成9年8月に雨宮研究センター長名で、疾患遺伝子研究に關す

る基本的な倫理に関する審査を倫理委員会に申請し、約1年間の議論の後、平成10年10月に承認された。さらに、先天異常研究部で従来から実施してきた内容をまとめ、山田から平成11年5月に倫理委員会に審査を申請した。いくつかの問題を提起しているため、本申請は継続して審議されている。(ただし、当病院の倫理委員会で継続審議中の多くは、平成12年2月4日に発表された、厚生省「遺伝子解析による疾病対策・創薬等に関する研究における生命倫理問題に関する調査研究班」による「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」中間報告書では解決されている。)しかしこの間、山田の提出した「先天異常研究部検体取扱規定」を基礎に、センター全体としての検体取扱規定が制定され、倫理委員会の承認が得られ、さらに、共同研究者(本研究課題の協力者)から眼・腎・肝に関する疾患の遺伝子解析に関して個別に申請してもらい、承認を受けた。

D. 研究結果

1. 眼形成不全症と PAX6: PAX 遺伝子群は paired box を DNA 結合ドメインとする転写因子をコードし、種を超えて保存され、また発生分化に関与する。その内、ヒト PAX6 は無虹彩症(OMIM#106200)の責任遺伝子として1991年に単離され、またショウジョウバエやマウスのホモログも眼の形成に関与することが知られている。我々は無虹彩症に限定せず、広範な眼形成異常症について PAX6 変異を解析し、これまでに多数の変異を同定してきた(既発表8例、未発表32例)。世界中でこれまでに約200例の PAX6 変異が報告されているが、そのほとんどは欠失・スプライス異常・ナンセンス変異などによって不完全長蛋白質が形成される変異であり、無虹彩症患者で見出されている。同疾患が優性遺伝様式を示すことから haploinsufficiency によって無虹彩症になると考えられる。我々は先に、孤立性黄

斑低形成症(OMIM#136520)患者家系で paired box の C 末側半分にミスセンス変異を見出した(Nature Genet. 1995)。全生物種の PAX 群を通じて paired box の C 末側半分に見出された最初の変異であり、また従来から paired box の C 末側半分は不要とされていた定説を覆すものであった。そのとき、N 末側半分は眼の外側(虹彩など)の形成を、C 末側半分は眼の内側(網膜)の形成を支配するという仮説を提唱した。その後、試験管内で DNA 結合能と転写調節能を解析し、提唱した仮説は基本的に支持されるものの、N および C 末側半分の相互作用も存在することが明らかとなり、一層複雑な機構が存在することが明らかとなった(添付別刷1)。paired box の N と C 末側半分の DNA 結合能を切り替える要素と推定される alternative splice により挿入される14アミノ酸残基内にミスセンス変異を見出した。これは、Peter 奇形(OMIM#604229)と黄斑低形成症を伴う患者で検出された(添付別刷12)。我々のその他の報告(添付別刷5)を加え、PAX6 のミスセンス変異は白内障、Peter 奇形、黄斑低形成症など様々な病態を呈することを解明した。我々の提唱した概念は受け入れられ、他研究室でも解析が進み、少なくとも21例の PAX6 ミスセンス変異がこれまでに報告されているが、数ヶ月前の時点では世界中の11例中7例が当研究室の結果であった。下流遺伝子支配に及ぼす効果の違いに基づくと推定し、変異型蛋白質の転写調節能を解析した。

2. 視神経形成異常と PAX6: 視神経形成異常症(OMIM*120200)7例で PAX6 のミスセンス変異を見出した。視神経形成異常に腎不全を伴う renal-coloboma 病(OMIM#120330)では PAX2 が責任遺伝子である。そこで PAX2 と PAX6 の両転写因子相互の発現調節を解析したところ、ある条件下で PAX6 は PAX2 の転写を促進し、同定された PAX6 ミスセンス変異はドミナントネガティブに作用すること

を見出した (未発表)。

3. 眼形成不全症と EYA1 : eyes absent (eya) はショウジョウバエで眼の形成にかかわるとして単離された遺伝子であり、他生物種でも眼の形成に関与することが知られている。一方、そのヒトホモログ EYA1 は branchio-oto-renal 症候群 (OMIM#113650) の責任遺伝子として、ポジショナルクローニングによって 1997 年に単離された。Branchiotoxic 病 (OMIM#602588) もアレリックであるとされたが、これらの患者には眼の異常を伴わない。我々は広範な眼形成異常症患者を検索し、白内障 3 例で EYA1 のミスセンス変異を見出し、EYA 遺伝子群がヒトでも眼形成に関与することを初めて明らかとした (添付別刷 17)。

4. 腎不全症と WT1 : WT1 遺伝子は胎児性腎腫瘍である Wilms 腫瘍の責任遺伝子として 1990 年に単離された癌抑制遺伝子である。いくつかの腫瘍遺伝子あるいは癌抑制遺伝子は奇形の責任遺伝子でもあることは良く知られており、実際 WT1 遺伝子も、腎不全・泌尿生殖器形成不全・ウイルムス腫瘍を特徴とする Denys-Drash 症候群 (OMIM#194080) の責任遺伝子として 1991 年に確立している。我々は日本人 Wilms 腫瘍等で変異を同定し、1993 年以来報告してきたが、さらに広範な先天性腎不全患者について WT1 遺伝子解析を進めてきた。これまでに 8 人の患者ゲノムで WT1 変異を検出してきた。内 2 例は学童期に腎不全となる Frasier 症候群 (OMIM#136680) に区分され、Denys-Drash 症候群患者と同様にジンクフィンガードメインでのミスセンス変異であった。我々は機能解析が必要として発表を控えていたところ、米国のグループから、Frasier 症候群は WT1 の +KTS アイソフォームを形成しない変異を伴うと 1997 年に報告された。我々の解析した患者例では +KTS も形成するので、Denys-Drash と Frasier 症候群とは基本的に同一分子機構によると考えている (添

付別刷 15)。残る例について患者の病態を精査し、病態と変異スペクトラムの確立に努めている。また、WT1 遺伝子産物も転写調節因子であり、がん抑制遺伝子であることから増殖関連遺伝子の転写制御を行っている と推定されている。一方、WT1 のノックアウトマウスでは泌尿生殖器に発生分化する原基組織がアポトーシスによって死滅する事が知られ、このために泌尿生殖器の奇形を呈する。これらの事実に基づいて、WT1 産物の増殖関連遺伝子、さらにはアポトーシス関連遺伝子に対する転写調節能を解析した。

5. 肝胆管形成不全症と JAG1 : Alagille 症候群 (OMIM#118450) は肝内胆管形成不全に基づく新生児黄疸を主兆とし、また心臓・肺動脈・神経の形成異常を伴う優性遺伝病である。この家系を収集し、ポジショナル戦略によって責任遺伝子同定を進めてきたが、97 年に米国の 2 グループが、Notch リガンドをコードする JAG1 を責任遺伝子として単離同定した。我々が収集した 13 家系について JAG1 遺伝子に変異を同定した (添付別刷 7)。Alagille 症候群患者は同一家系で同一変異を持っていても、重篤度が極めて異なることが知られているので、修飾因子の存在を追及した。また関連疾患における JAG1 遺伝子変異を解析した。

6. アポトーシス関連研究 : 組織や器官の形成にアポトーシスは重要な働きをなす。我々は、常染色体優性の神経変性疾患である歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (OMIM#125370) が CAG リピート伸長に起因することを 1994 年に報告したが、この分野では発症機構の解明が進み、伸長ポリグルタミンによるアポトーシス誘導が主要な課題となってきている。その過程に caspase8 が関与することを見出して機構解明に貢献した (添付別刷 6,10 等)。また初期胚で伸長ポリグルタミンを強発現してアポトーシスを誘導し、形成異常を解析する実験系を構築した。上記のように、WT1、PAX2、PAX6 は転写因子で

あり、その相互的作用と、そのネットワークによる他遺伝子の転写調節、さらにはアポトーシス関連遺伝子の転写調節について解析を進めている。

3-7. 情報ネットワーク：ヒト遺伝子と遺伝病に関する WWW サイトを <http://genetics.nch.go.jp> に構築し、一般者向けならびに専門家向けの情報を提供してきた。1 年間に約 12000 件のアクセス（セッション確立で計測）があり、述べヒット数は約 10 万件であった。

D. 考察

PAX6 について、ミスセンス変異が多様な眼の形成不全を示すという基本概念を樹立できたことと、EYA1 が眼の形成に関係あることを指摘できたことは大きな貢献であると考え。さらに未発表ではあるが、視神経形成異常症については疾患責任遺伝子の 1 つを同定できたと考え。これらの結果はいずれも候補疾患アプローチによる成果であり、設定した基本戦略は大変有効であった。一方、Allagile 症候群については競争に敗れたが、同定した米国の 2 グループはいずれも超強力グループであり、マンパワーの差と考える。

疾患責任遺伝子同定は世界的にホットな研究課題である。ゲノムの時代といわれる過去約 10 年間に、約数百の疾患責任遺伝子と病気との対応がつけられたが、我国からの報告が先陣をきったのは 40 程度である。その内、当研究部は 3 例で貢献してきたが、本研究課題の成果によってさらに 2 程度追加できることを期待している。このように学術的・国際的には大きな成果であった。

発生分化の時期に作動する転写因子、受容体とリガンド、アポトーシス関連遺伝子などは、候補疾患アプローチが適用できる好例と考え、国立小児病院の豊富な症例を対象に、さらに拡大した領域で検討を進めたい。疾患責任遺伝子が同定されると的確な診断が可能になるが、遺

伝子情報が患者の利益に結びつくには疾患責任遺伝子の機能の解析が重要である。遺伝子異常から、発症機構の解明に向けての研究を進展させたい。

G. 結論

候補疾患アプローチ戦略により、眼形成症における PAX6 および EYA、腎形成不全症における WT1、肝胆管形成不全症における JAG1 について解析を進めた。PAX6 のミスセンス変異は多様な眼の形成不全を示すという基本概念を形成し、また EYA1 が眼の形成に関係あることを指摘できた。さらに未発表ではあるが、視神経形成異常症の責任遺伝子の 1 つを同定できた。

F. 研究発表

2) 論文発表

欧文原著論文	26 件
和文総説など	18 件

1. Y. Yamaguchi, J. Sawada, M. Yamada, H. Handa & N. Azuma. Autoregulation of Pax6 transcriptional activation by two distinct DNA-binding subdomains of the paired domain. *Genes Cells* 2, 255-261, 1997.
2. T. Miyashita, M. U, T. Inoue, J. C. Reed & M. Yamada. Bcl-2 relieves the trans-repressive function of the glucocorticoid receptor and inhibits the activation of CPP32-like cysteine proteases. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 233, 781-787, 1997.
3. K. Nishiyama, K. Nakamura, S. Murayama, M. Yamada & I. Kanazawa. Regional and cellular expression of the dentatorubral-pallidoluysian atrophy gene in brains of normal and affected individuals. *Ann. Neurol.*, 41, 599-605, 1997.
4. T. Miyashita, Y. Okamura-Oho, Y. Mito, S. Nagafuchi & M. Yamada. Dentatorubral pallidoluysian atrophy (DRPLA) protein is cleaved by caspase-3 during apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 272, 29238-29242, 1997.
5. N. Azuma and M. Yamada. Missense

- mutation at the C terminus of the PAX6 gene in ocular anterior segment anomalies. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 39, 828-830, 1998.
6. T. Miyashita, K. Nagao, K. Ohmi, H. Yanagisawa, Y. Okamura-Oho & M. Yamada. Intracellular aggregate formation of dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA) protein with the extended polyglutamine. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 249, 96-102, 1998.
 7. S. Takayama, S. Krajewski, M. Krajewska, S. Kitada, J. M. Zapata, K. Kochel, D. Knee, D. Scudiero, U. Tudor, G. J. Miller, T. Miyashita, M. Yamada & J. C. Reed. Expression and location of Hsp70/Hsc-binding anti-apoptotic protein BAG-1 and its variants in normal tissues and tumor cell lines. *Cancer Res.* 58, 3116-3131, 1998.
 8. Z.-R. Yuan, T. Kohsaka, T. Ikegaya, T. Suzuki, S. Okano, J. Abe, N. Kobayashi & M. Yamada. Mutational analysis of the Jagged 1 gene in Alagille syndrome families. *Hum. Mol. Genet.* 7, 1363-1369, 1998.
 9. T. Okuyama, M. Fujino, X.-K. Li, N. Funeshima, M. Kosuga, I. Saito, S. Suzuki & M. Yamada. Efficient Fas-ligand gene expression in rodent liver after intravenous injection of a recombinant adenovirus by the use of a Cre-mediated switching system. *Gene Therapy* 5, 1047-1053, 1998.
 10. K. Sakai, M. Yamada, N. Horiba, M. Wakui, H. Demura & T. Suda. The genomic organization of the human corticotropin-releasing factor type-1 receptor. *Gene*, 219, 125-130, 1998.
 11. T. Okuyama, X.-K. Li, N. Funeshima, M. Fujino, K. Sasaki, Y. Kita, M. Kosuga, M. Takahashi, H. Saito, S. Suzuki and M. Yamada. Fas-mediated apoptosis is involved in the elimination of gene-transduced hepatocytes with E1/E3-deleted adenoviral vectors. *J. Gastroenterol.* 13, S113-118, 1998.
 12. T. Miyashita, K. Nagao, S. Krajewski, G. S. Salvesen, J. C. Reed, T. Inoue & M. Yamada. Investigation of glucocorticoid-induced apoptotic pathway: Processing of caspase-6 but not caspase-3. *Cell Death Differ.* 5, 1034-1041, 1998.
 13. T. Okuyama, M. Kosuga, S. Takahashi, K. Sasaki & M. Yamada. Hepatocyte specific gene expression by a recombinant adeno-associated virus vector carrying apolipoprotein E enhancer and α 1-antitrypsin promoter. *Gene Therapy Mol. Genet.* 3, 67-74, 1998.
 14. N. Azuma, Y. Hotta, H. Takahashi & M. Yamada. Missense Mutations in the PAX6 Gene in Aniridia. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 39, 2524-2528, 1998.
 15. X.-K. Li, T. Okuyama, A. Tamura, S. Enosawa, Y. Kaneda, S. Takahara, N. Funeshima, M. Yamada, H. Amemiya, S. Suzuki. Prolonged survival of rat liver allografts transfected with Fas-ligand expressing plasmid. *Transplantation*, 66, 1416-1423, 1998.
 16. M. Fujino, X.-K. Li, T. Okuyama, N. Funeshima, A. Tamura, S. Enosawa, Y. Kita, T. Amano, M. Yamada, H. Amemiya & S. Suzuki. On/off switching Fas-ligand gene expression in liver by Cre/Loxp adenovirus vector system. *Transplant Proc.* 31:753-754, 1999.
 17. T. Miyashita, J. Matsui, Y. Ohatsuka, M. U. S. Fujishima, Y. Okamura-Oho, T. Inoue & M. Yamada. Expression of extended polyglutamine sequentially activates initiator and effector caspases. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 257, 724-730, 1999.
 18. Y. Okamura-Oho, T. Miyashita, K. Ohmi & M. Yamada. Dentatorubral-pallidoluysian atrophy protein interacts through a proline-rich region near polyglutamine with the SH3 domain of an insulin receptor tyrosine kinase substrate. *Hum. Mol. Genet.* 8, 947-957, 1999.
 19. M. Takahashi, H. Saito, T. Okuyama, T. Miyashita, M. Kosuga, F. Sumisa, M. Yamada, H. Ebinuma & H. Ishii. Overexpression of Bcl-2 protects human hepatoma cells from Fas-antibody-mediated apoptosis. *J. Hepatol.* 31, 315-322, 1999.

20. N. Azuma, Y. Yamaguchi, H. Handa, M. Hayakawa, A. Kanai & M. Yamada. Missense mutation in the alternative splice region of the PAX6 gene in eye anomalies. *Am. J. Hum. Genet.* 65, 656-663, 1999.
21. K. Negishi, N. Azuma & M. Yamada. Various phenotypic expression of familial aniridia with a PAX6 mutation. *Brit. J. Ophthalmol.* 83, 991-992, 1999.
22. D-K. Jin, S-J. Kang, S-J. Kim, E-H. Bang, H-Z. Hwang, K. Tadokoro, M. Yamada & T. Kohsaka. Transcriptional regulation of PDGF-A and TGF- β by +KTS WT1 deletion mutants and a mutant mimicking Denys-Drash Syndrome. *Renal Failure*, 21, 685-694, 1999.
23. T. Kohsaka, M. Tagawa, Y. Takekoshi, H. Yanagisawa, K. Tadokoro & M. Yamada. Exon 9 mutations in the WT1 gene, without influencing KTS splice isoforms, are also responsible for Frasier syndrome. *Human Mutation* 14, 466-470, 1999.
24. K. Fujii, T. Miyashita, J.-I. Takanashi, K. Sugita, Y. Kohno, H. Nishie, S.-I. Yasumoto, M. Furue & M. Yamada. g-Irradiation deregulates cell cycle control and apoptosis in nevoid basal cell carcinoma syndrome-derived cells. *Jpn. J. Cancer Res.* 90, 1351-1357, 1999.
25. K. Komatsu, T. Miyashita, H. Hang, K. M. Hopkins, W. Zheng, S. Cuddeback, M. Yamada, H. B. Lieberman & H.-G. Wang. Human homologue of *S. pombe* Rad9 interacts with BCL-2/BCL-XL and promotes apoptosis. *Nature Cell Biol.*, 2, 1-6, 2000.
26. N. Azuma, A. Hirakiyama, T. Inoue, A. Asaka, & M. Yamada. Mutations of a human homologue of the *Drosophila* eyes absent gene (EYA1) detected in patients with congenital cataracts and ocular anterior segment anomalies. *Hum. Mol. Genet.* 9, 363-366, 2000.

H. 知的所有権の出願・取得状況

疾患責任遺伝子の機能に関する研究に抗体が必要となり、従来の方法とは異なる新しい免疫方法を考案し、専門業者に特注してウサギを免疫して作成した。この方法が特許取得可能か検討している。

2.学会等発表

- | | |
|-----------|------|
| 1) 国内口頭発表 | 54 件 |
| 2) 海外口頭発表 | 14 件 |

(省略)

以下、主要な発表論文の別刷を添付した。

1. Y. Yamaguchi, J. Sawada, **M. Yamada**, H. Handa & N. Azuma. Autoregulation of Pax6 transcriptional activation by two distinct DNA-binding subdomains of the paired domain. **Genes Cells** 2, 255-261, 1997.
2. T. Miyashita, Y. Okamura-Oho, Y. Mito, S. Nagafuchi & **M. Yamada**. Dentatorubral pallidolusian atrophy (DRPLA) protein is cleaved by caspase-3 during apoptosis. **J Biol Chem** 272, 29238-29242, 1997.
3. T. Miyashita, M. U, T. Inoue, J. C. Reed & **M. Yamada**. Bcl-2 relieves the trans-repressive function of the glucocorticoid receptor and inhibits the activation of CPP32-like cysteine proteases. **Biochem Biophys Res Comm** 233, 781-787, 1997.
4. K. Nishiyama, K. Nakamura, S. Murayama, **M. Yamada** & I. Kanazawa. Regional and cellular expression of the dentatorubral-pallidolusian atrophy gene in brains of normal and affected individuals. **Ann. Neurol** 41, 599-605, 1997.
5. N. Azuma and **M. Yamada**. Missense mutation at the C terminus of the PAX6 gene in ocular anterior segment anomalies. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 39, 828-830, 1998.
6. T. Miyashita, K. Nagao, K. Ohmi, H. Yanagisawa, Y. Okamura-Oho & **M. Yamada**. Intracellular aggregate formation of dentatorubral-pallidolusian atrophy (DRPLA) protein with the extended polyglutamine. **Biochem Biophys Res Comm** 249, 96-102, 1998.
7. Z.-R. Yuan, T. Kohsaka, T. Ikegaya, T. Suzuki, S. Okano, J. Abe, N. Kobayashi & **M. Yamada**. Mutational analysis of the Jagged 1 gene in Alagille syndrome families. **Hum Mol Genet** 7, 1363-1369, 1998.
8. K. Sakai, **M. Yamada**, N. Horiba, M. Wakui, H. Demura & T. Suda. The genomic organization of the human corticotropin-releasing factor type-1 receptor. **Gene** 219, 125-130, 1998.
9. N. Azuma, Y. Hotta, H. Takahashi & **M. Yamada**. Missense Mutations in the PAX6 Gene in Aniridia. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 39, 2524-2528, 1998.
10. T. Miyashita, J. Matsui, Y. Ohatsuka, M. U. S. Fujishima, Y. Okamura-Oho, T. Inoue & **M. Yamada**. Expression of extended polyglutamine sequentially activates initiator and effector caspases. **Biochem Biophys Res Comm** 257, 724-730, 1999.
11. Y. Okamura-Oho, T. Miyashita, K. Ohmi & **M. Yamada**. Dentatorubral-pallidolusian atrophy protein interacts through a proline-rich region near polyglutamine with the SH3 domain of an insulin receptor tyrosine kinase substrate. **Hum Mol Genet** 8, 947-957, 1999.
12. N. Azuma, Y. Yamaguchi, H. Handa, M. Hayakawa, A. Kanai & **M. Yamada**. Missense mutation in the alternative splice region of the PAX6 gene in eye anomalies. **Am J Hum Genet** 65, 656-663, 1999.
13. K. Negishi, N. Azuma & **M. Yamada**. Various phenotypic expression of familial aniridia with a PAX6 mutation. **Brit J Ophthalmol** 83, 991-992, 1999.
14. D-K. Jin, S-J. Kang, S-J. Kim, E-H. Bang, H-Z. Hwang, K. Tadokoro, **M. Yamada** & T. Kohsaka. Transcriptional regulation of PDGF-A and TGF-b by +KTS WT1 deletion mutants and a mutant mimicking Denys-Drash Syndrome. **Renal Failure** 21, 685-694, 1999.
15. T. Kohsaka, M. Tagawa, Y. Takekoshi, H. Yanagisawa, K. Tadokoro & **M. Yamada**. Exon 9 mutations in the WT1 gene, without influencing KTS splice isoforms, are also responsible for Frasier syndrome. **Hum Mutat** 14, 466-470, 1999.
16. K. Komatsu, T. Miyashita, H. Hang, K. M. Hopkins, W. Zheng, S. Cuddeback, **M. Yamada**, H. B. Lieberman & H.-G. Wang. Human homologue of *S. pombe* Rad9 interacts

with BCL-2/BCL-XL and promotes apoptosis. **Nature Cell Biol** 2, 1-6, 2000.

17. N. Azuma, A. Hirakiyama, T. Inoue, A. Asaka, & M. Yamada. Mutations of a human homologue of the *Drosophila* eyes absent gene (EYA1) detected in patients with congenital cataracts and ocular anterior segment anomalies. **Hum Mol Genet.** 9, 363-366, 2000.

以下に参考資料（和文総説）を添付した。

1. 山田正夫
ヒト遺伝病の責任遺伝子の解析
蛋白質核酸酵素 41, 643-651, 1996.
2. 山田正夫
神経変性疾患における PCR による伸長したトリプレットリピートの検出
実験医学 15, 808-813, 1997.
3. 長尾芳朗 山田正夫
歯状核赤核淡蒼球レイ体萎縮症 神経細胞のアポトーシスへの関与
細胞工学 16, 1431-1437, 1997.
4. 於保祐子 山田正夫
DRPLA 遺伝子産物と相互作用する蛋白遺伝子のクローニング
日本臨床 57, 856-861, 1999.
5. 長尾芳朗 山田正夫
ハンチントン病遺伝子の転写調節
日本臨床 57, 912-916, 1999.
6. 山田正夫
DRPLA 遺伝子産物の機能
遺伝子医学 3, 533-535, 1999.

19990352

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、P.13-14
の発表論文をご参照ください。