

20000399

厚生科学研究費補助金(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)

器官・組織の形成不全症の責任遺伝子から 発症機能の解明と再生医療への応用

(H12-ゲノム-018)

平成12年度 総括・分担研究報告書

平成13年(2001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・再生医療等研究事業)

器官・組織の形成不全症の責任遺伝子から 発症機能の解明と再生医療への応用

(H12ーゲノムー018)

平成12年度 総括・分担研究報告書

平成13年(2001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)

目次

I. 総括研究報告書

器官・組織の形成不全症の責任遺伝子から発症機能の解明と再生医療への応用
(H12-ゲノム-018)

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

1

II. 分担研究報告書

1. 器官・組織の形成不全症の責任遺伝子から発症機能の解明と再生医療への応用
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

5

2. 器官・組織の形成不全症とアポトーシス機構

宮下俊之 国立小児病院小児医療研究センター 遺伝染色体研究室長

8

3. 眼の形成不全症の責任遺伝子と発症機能

東範行 国立小児病院 眼科

10

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

13

IV. 研究成果の刊行物・別冊

15

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総括研究報告書

器官・組織の形成不全症の責任遺伝子から発症機能の解明と再生医療への応用
(H12-ゲノム-018)

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

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よる形態形成不全の生じる分子機構を解析する。PAX6 はハプロインサフィシエンシー(haploinsufficiency)によって無虹彩症となるが、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明らかにしてきた。一群の眼形成不全症患者で同定した変異に基づいて、PAX2 と PAX6 の相互作用を推定し、これらと他の転写因子との相互ネットワークを解析し、また、アポトーシス制御関連遺伝子の機能について解析した。ある型の眼形成不全症患者で、腹側中心線を決定する因子であるソニックヘッジホッグ (Sonic Hedgehog, SHH) 遺伝子にミスセンス変異を同定した。機能解析を行い、SHH は PAX6 の発現を抑制すること、その機構によって眼球の構造を調節し、中心視野の良好な形成に関与していることを解明した。

分担研究者

宮下俊之 国立小児病院小児医療研究センター 遺伝染色体研究室長

東範行 国立小児病院 眼科医長

A. 研究目的

先天異常は軽度のものを含めると全出生の 5-6%を占め、また我が国の乳幼児死亡率は世界で最も低い水準にあるが、その中では先天異常が 35%を占め第 1 位である。先天異常の多くに遺伝要因の関与が示唆されている。眼・腎臓・肝臓・四肢などの形成不全症について、疾患と遺伝子変異との対応をつけ、責任遺伝子を明らかにする。発生時期に作動する転写因子は変異（特にミスセンス変異）によって様々な病態を呈することを明らかにしてきた。当研究部で多数のミスセンス変異を見出している PAX6 (眼形成不全症) および WT1 (腎臓形成不全症) を中心に、蛋白質の機能解析を行い、形成

過程を解析し、形成不全を生じる分子機構を解明する。また、形態形成にアポトーシスが重要な働きをする。アポトーシス関連遺伝子の機能を解析し、また、当研究部でも見出した CAG リピート伸長病における伸長ポリグルタミンによるアポトーシス機構を解析する。またこれらを応用して、形態形成能におけるアポトーシスの役割を明らかにする。

B. 研究方法

- (1) 眼・腎臓・肝臓・四肢などの形成不全症の患者ゲノム DNA について、候補遺伝子アプローチ、関連疾患アプローチによって変異を同定し、疾患と遺伝子変異との対応をつけ、責任遺伝子を明らかにする。
- (2) 疾患責任遺伝子およびアポトーシス関連遺伝子の機能を培養細胞系で解析する。
- (3) PAX6 および WT1 などの、正常型および変異型蛋白質の転写調節機能を解析し、また支配下遺伝子を同定するなど、転写因子のネットワークを明らかにする。

(4)責任遺伝子およびその変異型をニワトリ胚に導入し、形態形成に及ぼす影響を解析する。

(倫理面での配慮)

従来から疾患責任遺伝子研究に係わり、倫理に充分配慮してきた。平成9年8月に、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、平成11年5月に倫理委員会に審査を申請し、現在まで継続して審議されている。この間の倫理審査委員との討議内容は、平成12年4月28日に発表された、厚生省「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」などに間接的に反映されている。また、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ている。眼・腎・肝に関する各疾患の遺伝子解析に関して、国立小児病院内の共同研究者（本研究課題の分担研究者および研究協力者）から個別に申請してもらい、5課題について承認を受けている。

C. 研究結果および考察

(1) 眼・腎臓・肝臓・四肢などの形成不全症の患者ゲノム DNA について、候補遺伝子アプローチ、関連疾患アプローチによって変異を同定し、疾患と遺伝子変異との対応づけを進めた。以下の成果を得た。

(2) 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、各種の研究から眼の形成に関与することが確立している。我々は無虹彩症に限定せず、広範な眼形成不全症について PAX6 変異を解析し、これまでに多数の変異を同定してきた。PAX6 の haploinsufficiency によって無虹彩症となり、一方、PAX6 のミスセンス変異によって、黄斑低形成症、白内障、Peter 奇形など、様々な病態を呈する不全症となるという概念を

確立してきた。この延長として、あるタイプの眼形成不全症7例で PAX6 のミスセンス変異を同定した。これらの変異の機能解析を行い、病態の発症機序の解析を進めた。

(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不全症患者を検索し、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。この成果は昨年度までに得られていたが、本年報告した。(Azuma et al., 2000)

(4) 網膜の構成異常の患者における SHH 変異: ソニックヘッジホッグ(Sonic Hedgehog, SHH)は腹側中心線を決定する分泌型因子であり、その遺伝子変異によって holoprosencephaly (type 3, OMIM 142945) となることが知られている。その病態は幅広く、重篤型では脳半球が分割せず、また単眼を生じ、致死性であるが、緩和の患者も存在する。我々は、緩和型の holoprosencephaly 患者1例で、眼球が大きく、また黄斑の位置が通常より視神経乳頭に近くに位置していることを見出した。この患者は SHH 遺伝子の E167G 変異を有していた。さらに、黄斑の位置あるいは構造の異常をもつ患者について同様に SHH 遺伝子変異を検索し、別の1例で V185M 変異を同定した。

SHH 遺伝子は別の転写因子である Gli-1 を活性化することに基づき、試験管内反応によって同定したミスセンス変異の活性を解析した。また SHH 遺伝子は PAX6 の転写を抑制すると考えられてきたが、PAX6 のプロモーター活性を直接解析して確認するとともに、同定した変異型ではその抑制能の低下を認めた。さらにニワトリ胚に発現

ベクターを導入し、SHHはPAX6を抑制し、眼の形成を抑制することを明らかにした。これらの実験結果に基づき、視野と中心視力が形成される過程の分子モデルを提唱した。

(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。1997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、既に報告した。関連疾患について JAG1 変異を解析した。Alagille 症候群の1つの特徴である肺動脈狭窄に絞りを、その患者群(約30例)を検索したが、変異を見出さなかった。

(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。その早期過程に caspase8 と 10 が活性化されることを見出した。(U et al. in press) 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。

D. 結論

発生時期に作動する転写因子は変異(特にミスセンス変異)によって様々な病態を呈することを明らかにしてきた。SHHの変異を同定し、良好な中心視野の形成にSHHが関与することを明らかにした。

E. 健康危険情報

本研究の結果、また得られた成果に関して、国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす情報として、特に報告するものは無い。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. H. Yanagisawa, M. Bundo, T. Miyashita, Y. Okamura-Oho, K. Tadokoro, K. Tokunaga & M. Yamada. Protein binding of a DRPLA family through arginine-glutamic Acid dipeptide repeats is enhanced by extended polyglutamine. *Hum. Mol. Genet.* 9, 1433-1442, 2000.
3. 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.
4. K. Shinoda, A. Hirakata, T. Hida, Y. Yamaguchi, M. Fukuda, S. Maekawa & N. Azuma. Ultrastructural and immunohistochemical findings in five patients with vitreomacular traction syndrome. *Retina* 20, 289-293, 2000.
5. K. O. Mitchell, M. S. Ricci, T. Miyashita, D. T. Dicker, Z. Jin, J. C. Reed & W. S. El-Deiry. Bax is a transcriptional target and mediator of c-myc-induced apoptosis. *Cancer Res.*, 60, 6318-6325, 2000.
6. M. Kosuga, S. Takahashi, K. Sasaki, X-K. Li, M. Fujino, H. Hamada, S. Suzuki, M. Yamada, N. Matsuo & T. Okuyama. Adenovirus-mediated gene therapy for mucopolysaccharidosis VII : Involvement of cross-correction in wide-spread distribution of the gene-products and long-term effects of CTLA-4Ig co-expression. *Mol. Therapy* 1, 406-413, 2000.
7. M. Kosuga, S. Enosawa, X-K. Li, S. Suzuki,

N. Matsuo, M. Yamada, J. R. Chowdhury, O. Koiwai & T. Okuyama. Strong, long-term transgene expression in rat liver using chicken b-actin promoter associated with cytomegalovirus immediate-early enhancer (CAG promoter). *Cell Transplant.*, 9: 675-680, 2000.

8. M. Kosuga, S. Takahashi, K. Sasaki, S. Enosawa, X-K. Li, S. Okuyama, M. Fujino, S. Suzuki, M. Yamada, N. Matsuo, N. Sakuragawa & T. Okuyama. Phenotype correction in murine mucopolysaccharidosis type VII by transplantation of human amniotic epithelial cells after adenovirus-mediated gene transfer. *Cell Transplant.* 9: 687-692, 2000.

9. M. Kosuga, K. Sasaki, X-K. Li, H. Ohkawa, I. Ogino, O. Okuda, H. Arai, N. Sakuragawa, Y. Kamata, N. Azuma, S. Suzuki, M. Yamada & T. Okuyama. Engraftment of genetically-engineered amniotic epithelial cells corrects lysosomal storage in multiple areas of the brain in mucopolysaccharidosis type VII mice. *Mol. Therapy* (in press)

10. M. U, T. Miyashita, Y. Ohtsuka, Y. Okamura-Oho, Y. Shikama & M. Yamada. Extended polyglutamine selectively interacts with caspase-8 and -10 in nuclear aggregates. *Cell Death and Differ.* (in press).

11. Y. Shikama, M. U, T. Miyashita and M. Yamada. Comprehensive studies on subcellular localizations and cell death-inducing activities of GFP-tagged eight apoptosis-related caspases. *Exp. Cell Res.* (in press)

2.学会発表

18件

詳細は省略

G. 知的所有権の取得状況

無し。

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

器官・組織の形成不全症の責任遺伝子から発症機能の解明と再生医療への応用

分担研究者 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

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よる形態形成不全の生じる分子機構を解析する。PAX6 はハプロインサフィシエンシー(haploinsufficiency)によって無虹彩症となるが、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明らかにしてきた。一群の眼形成不全症患者で同定した変異に基づいて、PAX2 と PAX6 の相互作用を推定し、これらと他の転写因子との相互ネットワークを解析し、また、アポトーシス制御関連遺伝子の機能について解析した。ある型の眼形成不全症患者で、腹側中心線を決定する因子であるソニックヘッジホッグ (Sonic Hedgehog, SHH) 遺伝子にミスセンス変異を同定した。機能解析を行い、SHH は PAX6 の発現を抑制すること、その機構によって眼球の構造を調節し、中心視野の良好な形成に関与していることを解明した。

A. 研究目的

先天異常は軽度のものを含めると全出生の 5-6%を占め、また我が国の乳幼児死亡率は世界で最も低い水準にあるが、その中には先天異常が 35%を占め第 1 位である。先天異常の多くに遺伝要因の関与が示唆されている。眼・腎臓・肝臓・四肢などの形成不全症について、疾患と遺伝子変異との対応をつけ、責任遺伝子を明らかにする。発生時期に作動する転写因子は変異（特にミスセンス変異）によって様々な病態を呈することを明らかにしてきた。当研究部で多数のミスセンス変異を見出している PAX6(眼形成不全症) および WT1 (腎臓形成不全症) を中心に、蛋白質の機能解析を行い、形成過程を解析し、形成不全を生じる分子機構を解明する。また、形態形成にアポトーシスが重要な働きをする。アポトーシス関連遺伝子の機能を解析し、また、当研究部でも見出した CAG リピート伸長病における伸長ポリグルタミンによるアポトーシス機

構を解析する。またこれらを応用して、形態形成能におけるアポトーシスの役割を明らかにする。

B. 研究方法

- (1)眼・腎臓・肝臓・四肢などの形成不全症の患者ゲノム DNA について、候補遺伝子アプローチ、関連疾患アプローチによって変異を同定し、疾患と遺伝子変異との対応をつけ、責任遺伝子を明らかにする。
- (2) 疾患責任遺伝子およびアポトーシス関連遺伝子の機能を培養細胞系で解析する。
- (3) PAX6 および WT1 などの、正常型および変異型蛋白質の転写調節機能を解析し、また支配下遺伝子を同定するなど、転写因子のネットワークを明らかにする。
- (4)責任遺伝子およびその変異型をニワトリ胚に導入し、形態形成に及ぼす影響を解析する。

(倫理面での配慮)

従来から疾患責任遺伝子研究に係わり、

倫理に充分配慮してきた。平成9年8月に、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、平成11年5月に倫理委員会に審査を申請し、現在まで継続して審議されている。この間の倫理審査委員との討議内容は、平成12年4月28日に発表された、厚生省「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」などに間接的に反映されている。また、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ている。眼・腎・肝に関する各疾患の遺伝子解析に関して、国立小児病院内の共同研究者（本研究課題の分担研究者および研究協力者）から個別に申請してもらい、5課題について承認を受けている。

C. 研究結果および考察

(1) 眼・腎臓・肝臓・四肢などの形成不全症の患者ゲノム DNA について、候補遺伝子アプローチ、関連疾患アプローチによって変異を同定し、疾患と遺伝子変異との対応づけを図った。眼の形成不全症について大きな進展が見られた。患者の病態と PAX6、EYA1、SHH 遺伝子変異などに関しては、共同研究者である、東分担研究者の分担研究報告書に記載されているので、ここでは省略した。

(2) 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。1997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、既に報告した。関連疾患についてJAG1変異を解析した。Alagille症候群の1つの特徴である肺動脈狭窄に絞り、その患者群(約30例)を検索したが、変異を見出さなかった。

(3) 転写因子間の相互作用。眼形成にかかわる上記のPAX6やSHHは転写因子をコードする。正常型および同定した変異を持つ遺伝子産物を大腸菌や哺乳動物細胞で発現させ、コンセンサス配列やその他の配列に対する結合能や、転写調節能をレポーターアッセイなどにより解析した。患者における変異解析から、PAX6とPAX2の相互作用が予想されたこと、以前から解析しているWT1遺伝子(ウイラムス腫瘍および泌尿生殖器の形成に関与、また転写調節因子をコード)の研究から、WT1とPAX2およびp53との関係が指摘されていることに基づいて、PAX6・PAX2・WT1・p53の各転写調節因子間の相互作用を解析した。すでに、PAX2によるPAX6の活性化等を見出している。

D. 結論

発生時期に作動する転写因子は変異(特にミスセンス変異)によって様々な病態を呈することを明らかにしてきた。SHHの変異を同定し、良好な中心視野の形成にSHHが関与することを明らかにした。

E. 健康危険情報

本研究の結果、また得られた成果に関して、国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす情報として、特に報告するものは無い。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.

2. H. Yanagisawa, M. Bundo, T. Miyashita, Y. Okamura-Oho, K. Tadokoro, K. Tokunaga & M. Yamada. Protein binding of a DRPLA family through arginine-glutamic Acid dipeptide repeats is enhanced by extended polyglutamine. *Hum. Mol. Genet.* 9, 1433-1442, 2000.

3. 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.

4. K. O. Mitchell, M. S. Ricci, T. Miyashita, D. T. Dicker, Z. Jin, J. C. Reed & W. S. El-Deiry. Bax is a transcriptional target and mediator of c-myc-induced apoptosis. *Cancer Res.*, 60, 6318-6325, 2000.

5. M. Kosuga, S. Takahashi, K. Sasaki, X-K. Li, M. Fujino, H. Hamada, S. Suzuki, M. Yamada, N. Matsuo & T. Okuyama. Adenovirus-mediated gene therapy for mucopolysaccharidosis VII : Involvement of cross-correction in wide-spread distribution of the gene-products and long-term effects of CTLA-4Ig co-expression. *Mol. Therapy* 1, 406-413, 2000.

6. M. Kosuga, S. Enosawa, X-K. Li, S. Suzuki, N. Matsuo, M. Yamada, J. R. Chowdhury, O. Koiwai & T. Okuyama. Strong, long-term transgene expression in rat liver using chicken b-actin promoter associated with cytomegalovirus immediate-early enhancer (CAG promoter). *Cell Transplant.*, 9: 675-680, 2000.

7. M. Kosuga, S. Takahashi, K. Sasaki, S. Enosawa, X-K. Li, S. Okuyama, M. Fujino, S. Suzuki, M. Yamada, N. Matsuo, N. Sakuragawa & T. Okuyama. Phenotype correction in murine mucopolysaccharidosis type VII by transplantation of human amniotic epithelial cells after adenovirus-mediated gene transfer. *Cell Transplant.* 9: 687-692, 2000.

8. M. Kosuga, K. Sasaki, X-K. Li, H. Ohkawa, I. Ogino, O. Okuda, H. Arai, N. Sakuragawa, Y. Kamata, N. Azuma, S. Suzuki, M. Yamada & T. Okuyama. Engraftment of genetically-engineered amniotic epithelial cells corrects lysosomal storage in multiple areas of the brain in mucopolysaccharidosis type VII mice. *Mol. Therapy* (in press)

9. M. U, T. Miyashita, Y. Ohtsuka, Y. Okamura-Oho, Y. Shikama & M. Yamada.

Extended polyglutamine selectively interacts with caspase-8 and -10 in nuclear aggregates. *Cell Death and Differ.* (in press).

10. Y. Shikama, M. U, T. Miyashita and M. Yamada. Comprehensive studies on subcellular localizations and cell death-inducing activities of GFP-tagged eight apoptosis-related caspases. *Exp. Cell Res.* (in press)

2.学会発表

18件

詳細は省略

G. 知的所有権の取得状況

無し。

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

器官・組織の形成不全症とアポトーシス機構

分担研究者 宮下俊之 国立小児病院小児医療研究センター 遺伝染色体研究室

研究要旨

アポトーシスは多細胞生物の発生及び恒常性の維持にとって必須の現象であり、それ故に、その制御異常は様々な疾患を生ずる。アポトーシスの分子機構を解析するとともに、遺伝性疾患の発症にアポトーシスの乱れがどのように関与しているかを実験系で検証する。また、CAGリピート伸長病における伸長ポリグルタミンによるアポトーシス機構について解析を進め、その機能を応用して、形態形成過程におけるアポトーシスの役割を明らかにする。本年度、アポトーシスの実行分子である各種のカスパーズの細胞内局在を明らかにした。またBaxとc-Mycの関係を明らかにした。伸長ポリグルタミンによるアポトーシス誘導過程で、カスパーズ8と10が早期に活性化されることを見出した。伸長ポリグルタミンおよびカスパーズをニワトリ胚に導入し、形成異常を発生させる実験系を構築した。

A. 研究目的

アポトーシスは多細胞生物の発生及び恒常性の維持にとって必須の現象であり、それ故に、その制御異常は様々な疾患を生ずる。実際、ヒト疾患の約70%においてアポトーシスの異常が直接、あるいは間接的に関与しているという研究者もいる。遺伝性疾患においても、その責任遺伝子産物がアポトーシスの制御に重要な役割を果たす例が次第に明らかになってきている。そこで、アポトーシスの分子機構を解明するとともに、遺伝性疾患の発症にアポトーシスの乱れがどのように関与しているかを実験系で検証する。また、神経変性疾患に伴うCAGリピート伸長に対する発症機序として、伸長ポリグルタミンによるアポトーシス機構についても解析を進め、その作用を応用して、形態形成過程におけるアポトーシスの役割を明らかにする。

B. 研究方法

(1)既知の疾患責任遺伝子やアポトーシス関

連遺伝子を培養細胞で発現させ、蛋白質の変動や細胞機能の変化を解析する。

(倫理面での配慮)

本年度に実施した研究に関しては、既に確立されたクローンを使用した試験管内実験であり、患者検体を直接使用しないので、倫理の問題に該当しない。

C. 研究結果および考察

(1) カスパーズの細胞内分布：アポトーシス反応は、最終的にカスパーズと呼ばれるシステインプロテアーゼによって実行される。現在までにヒトで15種類のカスパーズが同定され、そのうち8種類程度が主としてアポトーシスの実行分子として機能している。これらの酵素学的特性は詳細に解析されているが、細胞内分布について包括的な研究が無く、また相互に一致しない結果も多い。我々は発光クラゲ由来の緑色蛍光蛋白質と各カスパーズを融合蛋白質として発現させ、生細胞において共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内分布を解析した。

その結果、多くのカスパーが細胞質に存在したのに対し、カスパー 2 は核蛋白質であること、カスパー 8、10 は著明な繊維状構造物を形成すること等、いくつかの新しい知見を得た (Shikama et al., in press)。

(2)bax 遺伝子の転写制御： アポトーシスを正に、あるいは負に制御する重要な分子群として Bcl-2 蛋白質ファミリーが知られている。その中で Bax はアポトーシスを誘導する方向に機能し、血液系腫瘍や大腸癌の一部で変異が報告されている。Bax 遺伝子のプロモーター領域にはヒトで最も重要な癌抑制遺伝子産物である p53 の結合配列が存在し、p53 によって転写活性化を受けることを以前に報告した。Bax 遺伝子上流にはこの他に E-box と呼ばれる c-Myc 等の転写因子が結合する配列が 4 個局在しているが、その意義は不明であった。c-Myc は細胞増殖を誘導すると共に、ある条件下でアポトーシスを誘導する癌遺伝子である。本年度、bax は c-Myc の標的遺伝子であり、c-Myc によっておこるアポトーシスに重要な役割を果たすことを明らかにした (Mitchell et al., 2000)。

(3)伸長グルタミン鎖によるアポトーシス： CAG リピート伸長病の発症機構解明のモデルとして、伸長ポリグルタミンによるアポトーシスを誘導を解析した。これまでに、伸長ポリグルタミンの強発現によってアポトーシスが誘導されること、DRPLA 蛋白質がアポトーシス実行分子であるカスパーの基質であること、伸長したポリグルタミンがカスパー活性化カスケードの引き金を引くことを報告し「カスパー活性化→ポリグルタミンを含む蛋白質の切断→凝集体の形成→カスパー活性化」という悪循環が生ずることを提唱してきた。本年度、このアポトーシス過程で、カスパー 8 とカスパー 10 が早期に活性化され、選択的に伸長ポリグルタミンと共凝集し、その結果、下流に位置するカスパー 3 の活性化が生じることを明らかとした (U et al., in press)。

(4)伸長ポリグルタミンおよび各種のカスパーをニワトリ胚に導入し、形態形成の異

常を解析する実験系を構築し、順次解析を進めた。

D. 結論

アポトーシスの実行分子であるカスパーの細胞内局在を明らかにした。

E. 健康危険情報

本研究の結果、また得られた成果に関して、国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす情報として、特に報告するものは無い。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. H. Yanagisawa, M. Bundo, T. Miyashita, Y. Okamura-Oho, K. Tadokoro, K. Tokunaga & M. Yamada. Protein binding of a DRPLA family through arginine-glutamic Acid dipeptide repeats is enhanced by extended polyglutamine. *Hum. Mol. Genet.* 9, 1433-1442, 2000.

2. 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.

3. K. O. Mitchell, M. S. Ricci, T. Miyashita, D. T. Dicker, Z. Jin, J. C. Reed & W. S. El-Deiry. Bax is a transcriptional target and mediator of c-myc-induced apoptosis. *Cancer Res.*, 60, 6318-6325, 2000.

4. M. U, T. Miyashita, Y. Ohtsuka, Y. Okamura-Oho, Y. Shikama & M. Yamada. Extended polyglutamine selectively interacts with caspase-8 and -10 in nuclear aggregates. *Cell Death and Differ.* (in press).

5. Y. Shikama, M. U, T. Miyashita and M. Yamada. Comprehensive studies on subcellular localizations and cell death-inducing activities of GFP-tagged eight apoptosis-related caspases. *Exp. Cell Res.* (in press)

2. 学会発表

12 件 詳細は省略

G. 知的所有権の取得状況

無し。

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

眼の形成不全症の責任遺伝子と発症機能

分担研究者 東範行 国立小児病院 眼科

研究要旨

各種の眼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よる形態形成不全の生じる分子機構を解析する。PAX6 はハプロインサフィシエンシー(haploinsufficiency)によって無虹彩症となるが、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明らかにしてきた。別のタイプの眼形成不全症患者でも PAX6 変異の検索を進めた。候補遺伝子アプローチにより、あるタイプの病態を呈する眼形成不全症患者で、腹側中心線を決定する因子であるソニックヘッジホッグ (Sonic Hedgehog, SHH) 遺伝子にミスセンス変異を同定した。機能解析を行い、SHH は PAX6 の発現を抑制すること、その機構によって眼球の構造を調節し、中心視野の良好な形成に関与していることを解明した。

A. 研究目的

各種の眼形成不全症について、疾患と遺伝子変異との対応をつけ、責任遺伝子を明らかにする。これまでに多数のミスセンス変異を見出している PAX6 (眼形成不全症) について、蛋白質の機能解析を行い、形成過程を解析し、形成不全を生じる分子機構を解明する。特に、ニワトリ胚に電気穿孔法によって発現ベクターを導入し、眼の形態変化を解析し、責任遺伝子およびその変異型の形態形成への影響を明らかとする。

B. 研究方法

- (1) 各種の眼形成不全症の患者ゲノム DNA について、候補遺伝子アプローチ、関連疾患アプローチによって変異を同定し、疾患と遺伝子変異との対応をつけ、責任遺伝子を明らかにする。
- (2) 責任遺伝子およびその変異型をニワトリ胚に導入し、形態形成に及ぼす影響を解析する。

(倫理面での配慮)

従来から疾患遺伝子の変異の解析には倫

理的問題を充分考慮して行ってきた。国立小児病院で所定の手続きなどが整備されてきたので、研究の目的や倫理的配慮などの項目を含む所定の書式に記入し、また別に説明書や同意書などを準備し、「眼先天異常における形態形成遺伝子異常の検索」課題で国立小児病院倫理委員会に平成 11 年 10 月に審査を申請した。平成 12 年 3 月に承認を受けた。

C. 研究結果および考察

- (1) 眼形成不全症の患者ゲノム DNA について、候補遺伝子アプローチ、関連疾患アプローチによって変異を同定し、疾患と遺伝子変異との対応付けを進めた。以下の成果を得た。
- (2) 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、各種の研究から眼の形成に関与することが確立している。我々は無虹彩症に限定せず、広範な眼形成不全症について PAX6 変異を解析し、これまで

に多数の変異を同定してきた。PAX6 の haploinsufficiency によって無虹彩症となり、一方、PAX6 のミスセンス変異によって、黄斑低形成症、白内障、Peter 奇形など、様々な病態を呈する不全症となるという概念を確立してきた。この延長として、あるタイプの眼形成不全症 7 例で PAX6 のミスセンス変異を同定した。これらの変異の機能解析を、山田主任研究者とともに進めている。

(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不全症患者を検索し、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。この成果は昨年度までに得られていたが、本年報告した。(Azuma et al., 2000)

(4) 網膜の構成異常の患者における SHH 変異 : ソニックヘッジホッグ(Sonic Hedgehog, SHH)は腹側中心線を決定する分泌型因子である。その遺伝子変異によって holoprosencephaly (type 3, OMIM 142945)となることが知られている。その病態は重篤型から緩和型まで幅広く、重篤型では脳半球が分割せず、また単眼を生じ、致死性である。一方、緩和型では、脳は半球に分割し、生存することができるが、顔の形成異常、特に左右に対象に位置する器官の異常を伴うことが知られている。我々は、緩和型の holoprosencephaly 患者 1 例で、眼球が大きく、また黄斑の位置が通常より視神経乳頭に近くに位置していることを見出した。そこで、この患者について SHH 遺伝子変異を解析したところ、E167G 変異を見出した。また、黄斑の位置あるいは構造の異常をもつ患者について同様に SHH 遺伝子変異を検索し、別の 1 例で V185M 変異を同定した。

(5) SHH の機能解析 : SHH は Gli-1 の転写を促進することが知られている。そこで正常型 SHH および同定した変異を持つ SHH の発現ベクターを構築し、培養細胞に導入し、転写活性を測定した。変異型 SHH では転写促進能が著しく低下していた。SHH は PAX6 の転写を抑制することが推定されていたが、PAX6 のプロモーター活性を直接測定した例は無い。そこで PAX6 プロモーター部位をレポーター遺伝子に連結し、SHH の効果を測定したところ、野生型 SHH は PAX6 のプロモーター活性を抑制するのに対し、変異型 SHH はその程度が低下していた。

(6) SHH の発現部位の解析 : 発生初期に SHH は神経管腹側中心線で発現し、腹-背の濃度勾配を形成し、腹背軸の形成に関与していることが知られている。ニワトリおよびマウス胚を使用し、発生の各段階での発現部位を解析した。眼球の構造が前方を見るのに適する時期(以下に記載)に、SHH は顔の中心(鼻の部位)で発現していることを確認した。

(7) ニワトリ胚を使用した、SHH の眼形成の抑制 : SHH 発現ベクターをニワトリ胚に電気穿孔法で導入し、その効果を解析した。発現部位は混合して導入する緑蛍光蛋白質で同定した。まず、10-20 期のニワトリ胚の眼の広範な部位に SHH 発現ベクターを導入すると、小眼球が形成され、SHH は眼の形成を抑制することがわかった。次に、局所的に SHH を発現させた。たとえば、眼の下側で局所的に発現させると、眼の下側の形成が遅滞し、本来中央に位置するレンズが下側に偏り、あたかも下向きに見るのに都合が良い構造となった。逆に眼の上側で局所的に発現させると、あたかも上向きに見るのに都合が良い構造となった。これらの場合、SHH の発現する部位の近傍では PAX6 の発現が抑制されていた。

(7) 良好な視野を獲得するための眼球構造に SHH と PAX6 が関与 : 視野と中心視力は、(レンズにより点对称となるが)対応する網膜上の部位における光受容体の密度と相関することが知られている。最も視力の高

い中心視力は黄斑の位置に対応する。ヒトを含む類人猿やフクロウなどは明確な顔を持ち、眼は顔に、すなわち前面に位置するが、その場合でも視野は左右に均等ではなく、鼻側に狭く、外側に広い（網膜上では逆に鼻側に狭く、側頭側に広い）。一方、多くの脊椎動物では眼は頭の側部に位置するが、その場合でも、単に左右方向（前方に直交する）を見るのに適しているのではなく、前方を見るのに適するように黄斑（またはそれに代わる部位）は側頭側に位置している。

患者での SHH 変異、試験管内反応およびにわとり胚での SHH による PAX6 の抑制結果と併せると、以下のことが考えられる。脊椎動物では眼の原基は、頭の側部に形成される。その場合、眼の前後軸に沿って網膜の分化が進み、後端に位置する部位で光受容体の数的増加が生じるであろう。その後、鼻部位で発現して浸透してくる SHH のシグナルによって、眼の形成の主要な制御因子である PAX6 が抑制を受けるが、その程度は前後軸後端より鼻側で大きく、前後軸後端より側頭側で小さい。その結果、光受容体の形成は、前後軸後端（この部位はやがて視神経乳頭になる）から少し側頭側にずれた位置で最も活性化され、その部位に黄斑が形成される。これらのことは、明確な顔を持つ生物種にとっても、そうでない生物種にとっても、より高い視力で前方見ることに貢献する結果となる。

D. 結論

発生時期に作動する転写因子は変異（特にミスセンス変異）によって様々な病態を呈することを明らかにしてきた。SHH の変異を同定し、良好な中心視野の形成に SHH が関与することを明らかにした。

E. 健康危険情報

本研究の結果、また得られた成果に関して、国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす情報として、特に報告するものは無い。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.

2. K. Shinoda, A. Hirakata, T. Hida, Y. Yamaguchi, M. Fukuda, S. Maekawa & N. Azuma. Ultrastructural and immunohistochemical findings in five patients with vitreomacular traction syndrome. *Retina* 20, 289-293, 2000.

仁科幸子、東範行、他。未熟児網膜症による視覚障害児の養育に関する問題点。眼臨 94, 529-534, 2000.

東範行。眼の形成遺伝子とその異常。現代医療 32, 1973-1982, 2000.

東範行。視交叉の謎。日本の眼科 71, 1085, 2000.

2. 学会発表

11 件 詳細は省略

G. 知的所有権の取得状況

無し

研究成果の刊行に関する一覧表

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|--|-------------------|----|-----------|------|
| 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. Yanagisawa, M. Bundo, T. Miyashita, Y. Okamura-Oho, K. Tadokoro, K. Tokunaga & M. Yamada. | Protein binding of a DRPLA family through arginine-glutamic acid dipeptide repeats is enhanced by extended polyglutamine. | Hum. Mol. Genet. | 9 | 1433-1442 | 2000 |
| 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-x _L and promotes apoptosis. | Nature Cell Biol. | 2 | 1-6 | 2000 |
| K. O. Mitchell, M. S. Ricci, T. Miyashita, D. T. Dicker, Z. Jin, J. C. Reed & W. S. El-Deiry. | Bax is a transcriptional target and mediator of c-myc-induced apoptosis. | Cancer Res. | 60 | 6318-6325 | 2000 |
| M. Kosuga, S. Takahashi, K. Sasaki, X.-K. Li, M. Fujino, H. Hamada, S. Suzuki, M. Yamada, N. Matsuo & T. Okuyama. | Adenovirus-mediated gene therapy for mucopolysaccharidosis VII: involvement of cross-correction in wide-spread distribution of the gene products and long-term effects of CTLA-4Ig coexpression. | Mol. Therapy | 1 | 406-413 | 2000 |
| M. Kosuga, S. Enosawa, X.-K. Li, S. Suzuki, N. Matsuo, M. Yamada, J. Roy-Chowdhury, O. Koiwai & T. Okuyama. | Strong, long-term transgene expression in rat liver using chicken β -actin promoter associated with cytomegalovirus immediate-early enhancer (CAG promoter). | Cell Transplant. | 9 | 675-680 | 2000 |

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|---|------------------------|----|---------|----------|
| M. Kosuga, S. Takahashi, K. Sasaki, S. Enosawa, X.-K. Li, S. Okuyama, M. Fujino, S. Suzuki, M. Yamada, N. Matsuo, N. Sakuragawa & T. Okuyama. | Phenotype correction in murine mucopolysaccharidosis type VII by transplantation of human amniotic epithelial cells after adenovirus-mediated gene transfer. | Cell Transplant. | 9 | 687-682 | 2000 |
| M. Kosuga, K. Sasaki, X.-K. Li, H. Ohkawa, I. Ogino, O. Okuda, H. Arai, N. Sakuragawa, Y. Kamata, N. Azuma, S. Suzuki, M. Yamada & T. Okuyama. | Engraftment of genetically-engineered amniotic epithelial cells corrects lysosomal storage in multiple areas of the brain in mucopolysaccharidosis type VII mice. | Mol. Therapy | | | in press |
| M. U, T. Miyashita, Y. Ohtsuka, Y. Okamura-Oho, Y. Shikama & M. Yamada. | Extended polyglutamine selectively interacts with caspase-8 and -10 in nuclear aggregates. | Cell Death and Differ. | | | in press |
| Y. Shikama, M. U, T. Miyashita & M. Yamada. | Comprehensive studies on subcellular localizations and cell death-inducing activities of GFP-tagged eight apoptosis-related caspases. | Exp. Cell Res. | | | in press |

20000399

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
P13～P14「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください

