

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13年度 総括・分担研究報告書

平成14年(2002年)3月

主任研究者 山田正夫

(国立成育医療センター 研究所 成育遺伝研究部長)

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 国立成育医療センター 研究所 成育遺伝研究部

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 国立成育医療センター 研究所 成育遺伝研究部

6

2. 器官・組織の形成不全症とアポトーシス機構

宮下俊之 国立成育医療センター 研究所 疾患遺伝子構造研究室

10

3. 眼の形成不全症の責任遺伝子と発症機能

東範行 国立成育医療センター 病院 眼科

13

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

16

IV. 研究成果の刊行物・別冊

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 国立成育医療センター 研究所 成育遺伝研究部

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。責任遺伝子の探求および変異解析は、眼・泌尿生殖器・肝・四肢の形成不全症および成長障害について解析を進めた。またこれまでに眼の形成にかかわる PAX6 および泌尿生殖器の形成にかかわる WT1 について多数の変異、特にミスセンス変異を同定してきた。これらの遺伝子は転写調節因子をコードしているので、正常型およびそれぞれの変異型について転写調節能を測定し、また動物胚に発現ベクターを導入して形態形成に及ぼす影響を解析した。また、器官や組織の形態形成過程ではアポトーシスが重要な役割を果たしているため、アポトーシス関連遺伝子について解析を進めた。これらの結果から、器官・組織の形成にかかわる転写調節因子を遺伝子工学的に使用して、組織構築を変更できる方法を得た。この結果は将来の再生医療に役立つと考える。

分担研究者

宮下俊之 国立成育医療センター 研究所
疾患遺伝子構造研究室長

東範行 国立成育医療センター 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・泌尿生殖器・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（腎形成不全症）を中心に、蛋白質の機能解析を行い、正常型および変異型の蛋白質の機能を解析する。特に、試験管内反応によって転写調節能を解析するとともに、動物胚に電気穿孔法によって発現ベクターを導入し、形成過程を解析して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誘導機構の結果を活用し、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)眼・泌尿生殖器・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) 責任遺伝子の正常型および変異型の発現ベクターをニワトリ胚に電気穿孔法によって導入し、形態形成に及ぼす影響を解析する。
- (5) 同様に、アポトーシス関連遺伝子の発現ベクターを動物胚に導入して、形態形成過程を解析する。
- (6) 我々の研究室では、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)と呼ばれる神経変性疾患が CAG リピート伸長によることを見出し、その後も DRPLA 遺伝子について解析してきた。神経細胞死の機構を明らかにすることは重要な課題であるが、本研究の課題に必ずしも一致せず、従って本研究課題では、伸長ポリグルタミンや、カスパーゼを形態形成能解析の道具として使用することを計画していた。しかし 2002 年 1 月に、少なくともショウジョウバエの DRPLA ホモログは転写調節因子であり、初期胚のパターン形成に関係し、さらには変異によって足の形態異常を呈することが示された。従って、ヒトの DRPLA が転写調節因子であるか否か、また形態形成に関与するか否かを解析することとした。

(倫理面での配慮)

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、この数年間、特に積極的に関わってきた。まず(旧)国立小児病院小児医療研究センター内の関係者の討議を経て、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わる基本的な倫理問題を国立小児病院倫理委員会に審査申請し、約 1 年間の議論の後、平成 10 年 10 月に承認を受けた。次に、疾患責任遺伝子研究に関わる一般的な倫理問題について、平成 11 年 5 月に山田から倫理委員会に審査を申請した。これに基づいて倫理委員会で討論できたことは有意義であった。山

田が提出した「先天異常研究部検体取扱規定」を基に、センター全体としてのヒト検体取扱規定が制定され、倫理委員会の承認を受けた。また倫理委員会での討議内容は、直接間接的に、いわゆるミレニアム指針、また 3 省合同倫理指針に反映される結果となった。具体的な疾患に対する遺伝子解析は、国立小児病院の共同研究者(この研究課題の分担研究者・研究協力者)で実際に患者から検体を採取する医師から、眼・腎・肝・成長障害のそれぞれの具体的な疾患と遺伝子を指定して、個別に申請してもらい、倫理委員会の承認を受けた。平成 14 年 3 月 1 日に国立成育医療センターに改組されたが、当面の経過措置として、従来の国立小児病院での倫理審査結果は有効とされている。国立成育医療センターに倫理審査委員会が設置されてから、改めて審査を受ける予定である。また、動物実験については、動物管理委員会に諸規定あり、それに従って動物愛護の観点を考慮して実験を進めている。

C. 研究結果および考察

- (1) 眼・泌尿生殖器・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。昨年度までの成果に加え、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 のハプロ不全(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、視神経形成不全症 7 例で PAX6 のミスセンス変異を同定した。ミスセンス

変異が存在したのは DNA 結合部位である homeo ボックスの近傍、および転写活性化機能を有する PTS 領域で、従来から PAX 遺伝子群を通じてほとんど変異が同定されていない領域であり、興味深い。また PAX6 変異の見出された視神経低形成症患者の一部にコロボーマが認められた。renal-coloboma 症候群 (OMIM120330) では PAX2 が責任遺伝子である事が知られており、このことから、PAX6 と PAX2 とのなんらかの関係が示唆された。

(3) PAX6 変異型の転写調節能: PAX6 遺伝子産物は転写調節因子であるが、paired ボックスの N 末側、C 末側および homeo ボックスの計 3 個の DNA 結合部位を持ち、また選択的スプライスによってエキソン 5a を含む、または含まない 2 種類のアイソフォームが存在するなど複雑である。上記のミスセンスを含む合計 10 種類の PAX6 ミスセンス変異について転写調節能を解析した。また正常型および変異型 PAX6 による PAX2 の発現調節を培養細胞系で解析した。コロボーマの程度と PAX2 発現制御との相関は見られなかったが、PAX6 の転写活性部位 (PTS 領域) は homeo ボックスを介する DNA 結合に大きく作用することがわかった。

(4) Russell-Silver 症候群における遺伝子変異: Russell-Silver 症候群は、出生前および出生後の発育遅滞と左右非対称成長、小指の彎曲を主徴とする。これまでに解析された約 7-10% の患者で、7 番染色体は母親由来の uni-parental ダイソミーであることが報告され、7 番染色体上のゲノム刷り込みを受ける遺伝子が責任遺伝子である可能性が示唆されていた。東京工業大学遺伝子解析施設の石野助教授らは、マウス胚を用い、父親由来に限り発現する一連の遺伝子 *peg* と母親由来に限り発現する一連の遺伝子 *meg* を単離してきた。その内、*peg1* (*Mest*) は 7 番染色体に位置していることから、Russell-Silver 症候群の責任遺伝子の可能性が考えられた。そこで、本研究課題の研究協力者である田中敏章 国立成育医療セン

ター病院内分泌・代謝医長の協力により、Russell-Silver 症候群 5 家系を収集し、多型解析したが、uni-parental ダイソミーであるといえる家系は無かった。次に、相当する領域のゲノム配列を解析したが変異を見出さなかった。この結果は他施設から収集された症例とあわせ、解析した 15 例の日本人患者では変異が無かったとして今年度報告した (Kobayashi et al. 2002)

(5) アポトーシス関連研究: アポトーシスに関連する遺伝子である *Bim* について、新規アイソフォーム 6 種類を見出し、従来から知られている 3 種のアイソフォームとともに発現ベクターを構築して解析した。アポトーシス誘導能は各アイソフォームごとに異なることを明らかにし、またそれぞれのアイソフォームは臓器特異的に発現することを見出した。カスパー 8 および 10 には Death effector domain (DED) からなるプロドメインのみをもつアイソフォームが知られている。これらアイソフォームを GFP (Green fluorescent protein) との融合蛋白質として細胞内に発現させたところ、細胞質に線維状の構造物を形成すること、それがゴルジ体の分布と一致することを見出した。またこれらアイソフォームは Death Receptor を介する細胞死を抑制すること、すなわち全長からなるカスパー 8, 10 のドミナント・ネガティブ変異体として働くことを見出した。

(6) 電気穿孔法によるニワトリ胚への発現ベクターの導入による眼形成変化: 発現ベクターをニワトリ胚に電気穿孔法で導入して発現させ、その形態形成に及ぼす効果を解析した。発生の手順に応じて最適な注入法、電気刺激の条件等を検討した。

昨年度の報告書に記載したように、ソニックヘッジホッグ (Sonic Hedgehog, SHH) のミスセンス変異を持つ緩和型の holoprosencephaly (type 3, OMIM 142945) 患者の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とに基づいて、SHH の眼形成に及ぼす効果を、電気穿孔法による発現ベクターのニワトリ胚

への導入法によって解析した。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。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。本年度、導入する位置を変えて実験を行い、SHH の濃度勾配に応じて眼形成が抑制されることを更に明確にした。

一方、洞窟に生息するいくつかの種類の魚では眼が退化しており、これらの原因として Shh の高発現によるアポトーシスの亢進の機構が報告されている。高濃度の SHH による眼形成抑制という点では一致する。しかし我々の実験系では眼組織でのアポトーシスの程度は変化がないことを確認した。また SHH をもう少し早い時期に導入した場合には眼の形成が無くなり、またもう少し遅い時機に導入した場合には変化がほとんど見られず、発生の限定された時期に限って変化が誘導されることが判明した。

(6) 電気穿孔法による発現ベクター導入によるアポトーシス誘導：アポトーシス関連遺伝子や伸長ポリグルタミン鎖の発現ベクターを、電気穿孔法によってニワトリ胚の肢芽部位に導入し、形成される四肢の形状を観察解析した。後足肢芽部位に導入し、導入部位と時期に応じた、足の形態変形を形成できることを見出した。すなわち、肢芽の頂点部位にアポトーシスを誘導した場合、足の各部位が欠損するのに対し、肢芽の後部のみにアポトーシスを誘導すると、各部位は維持されるが、全体としての形成軸に変化を生じる事がわかった。

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。転写調節能を試験管内反応によって解析し、一方で、

ニワトリ胚に発現ベクターを導入して、形態形成能を直接観察した。両者の結果から形成不全症の発症機構の解明に迫った。

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. S. Kobayashi, H. Uemura, T. Kohda, T. Nagai, Y. Chinen, K. Naritomi, E-I. Kinoshita, H. Ohashi, K. Imaizumi, M. Tsukahara, Y. Sugio, H. Tonoki, T. Kishino, T. Tanaka, M. Yamada, O. Tsutsumi, N. Niikawa, T. Kaneko-Ishino & F. Ishino. No evidence of PEG1/MEST gene mutations in Silver-Russell syndrome patients. *Am. J. Med. Genet.* 104, 225-231, 2001.
2. Y. Okamura-Oho, T. Miyashita & M. Yamada. Distinctive tissue distribution and phosphorylation of IRSp53 isoforms. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 289, 957-960, 2001.
3. M. U, T. Miyashita, Y. Shikama, K. Tadokoro & M. Yamada. Molecular cloning and characterization of six novel isoforms of human Bim, a member of the proapoptotic BCL-2 family. *FEBS Lett.* 509, 135-141, 2001.
4. Y. Shikama, M. U, T. Miyashita and M. Yamada. Comprehensive studies on subcellular localizations and cell death-inducing activities of eight GFP-tagged apoptosis-related caspases. *Exp. Cell Res.*, 264, 315-325, 2001.
5. 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.*, 8, 377-386, 2001.

6. S. M. Cuddeback, H. Yamaguchi, K. Komatsu, T. Miyashita, M. Yamada, C. Wu, S. Singh & H-G. Wang. Molecular cloning and characterization of Bif-1: A novel Src homology 3 domain-containing protein that associates with Bax. *J. Biol. Chem.*, 276, 20559-20565, 2001.

7. Y. Kamata, T. Okuyama, M. Kosuga, A. O'hira, A. Kanaji, K. Sasaki, M. Yamada & N. Azuma. Adenovirus-mediated gene therapy for corneal clouding in mice with mucopolysaccharidosis type VII. *Mol. Therapy*, 4, 307-312, 2001.

8. M. Kosuga, K. Sasaki, A. Tanabe, X-K. Li, H. Okawa, 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*, 3, 139-148, 2001.

9. M. Kosuga, S. Takahashi, A. Tanaka, M. Fujino, X.-K. Li, S. Suzuki, M. Yamada, K. Kakishita, F. Ono, N. Sakuragawa & T. Okuyama. Widespread distribution of adenovirus-transduced monkey amniotic epithelial cells after local intracerebral injection: Implication for cell-mediated therapy for lysosome storage disorders. *Cell Transplant.*, 10, 435-439, 2001.

10. Y. Shikama, L. Shen, M. Yonetani, J. Miyauchi, T. Miyashita & Masao Yamada. Death effector domain-only polypeptides of caspase-8 and -10 specifically inhibit death receptor-induced cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 484-493, 2002.

2.学会発表

22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 国立成育医療センター 研究所 成育遺伝研究部

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 はハプロ不全(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。PAX6 遺伝子産物は転写調節因子であるが、paired ボックスの N 末側、C 末側および homeo ボックスの計 3 個の DNA 結合部位を持ち、また選択的スプライスによってエクソン 5a の有無の 2 種アイソフォームが存在するなど複雑である。一群の眼形成不全症患者で同定した変異を持つ発現ベクターを作成し、それぞれ転写調節能を解析した。転写調節因子相互のネットワークを明らかにした。また Russell-Silver 症候群について解析した。

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・泌尿生殖器・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。また分担研究者によるアポトーシスや形態形成の解析とあわせ、器官・組織の形成にかかわる転写調節因子を遺伝子工学的に使用して、組織構築を変更できる方法を得て、将来の再生医療

に役立つ手段を開発する。

B. 研究方法

- (1)眼・泌尿生殖器・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関して倫理に配慮してきたが、この数年間、特に積極的に関わってきた。まず（旧）国立小児

病院小児医療研究センター内の関係者の討議を経て、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わる基本的な倫理問題を国立小児病院倫理委員会に審査申請し、約1年間の議論の後、平成10年10月に承認を受けた。次に、疾患責任遺伝子研究に関わる一般的な倫理問題について、平成11年5月に山田から倫理委員会に審査を申請した。これに基づいて倫理委員会で討論できたことは有意義であった。山田が提出した「先天異常研究部検体取扱規定」を基に、センター全体としてのヒト検体取扱規定が制定され、倫理委員会の承認を受けた。また倫理委員会での討議内容は、直接間接的に、いわゆるミレニアム指針、また3省合同倫理指針に反映される結果となった。具体的な疾患に対する遺伝子解析は、国立小児病院の共同研究者（この研究課題の分担研究者・研究協力者）で実際に患者から検体を採取する医師から、眼・腎・肝・成長障害のそれぞれの具体的な疾患と遺伝子を指定して、個別に申請してもらい、倫理委員会の承認を受けた。また、動物実験については、動物管理委員会に諸規定あり、それに従って動物愛護の観点を考慮して実験を進めている。

C. 研究結果および考察

(1) 眼・泌尿生殖器・肝臓・四肢などの形成不全症の遺伝子追求と変異解析：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、PAX6、EYA1、SHH 遺伝子変異などを検出してきた。新しいPAX6変異については東分担研究者の報告書に記載してあるので、ここでは省略した。

(2) Russell-Silver 症候群における遺伝子変異：Russell-Silver 症候群は、出生前および出生後の発育遅滞と左右非対称成長、小指の彎曲を主徴とする。これまでに解析された約7-10%の患者で、7番染色体は母親由来のuni-parental ダイソミーであることが報告され、7番染色体上のゲノム刷り込みを受

ける遺伝子が責任遺伝子である可能性が示唆されていた。東京工業大学遺伝子解析施設の石野助教授らは、マウス胚を用い、父親由来に限り発現する一連の遺伝子 peg と母親由来に限り発現する一連の遺伝子 meg を単離してきた。その内、peg1(Mest)は7番染色体に位置していることから、Russell-Silver 症候群の責任遺伝子の可能性が考えられた。そこで、本研究課題の研究協力者である田中敏章 国立成育医療センター病院内分泌・代謝医長の協力により、Russell-Silver 症候群5家系を収集し、多型解析したが、uni-parental ダイソミーであるといえる家系は無かった。次に、相当する領域のゲノム配列を解析したが変異を見出さなかった。この結果は他施設から収集された症例とあわせ、解析した15例の日本人患者では変異が無かったとして今年度報告した (Kobayashi et al. 2002)

(3) 転写因子としてのPAX6の機能解析：共同研究者である東分担研究者とともに、これまで多数の眼形成不全症患者のゲノムを解析してきた。これまでに、欠失・挿入によるフレームシフトやナンセンス変異によって、一方の対立遺伝子から完全長のPAX6遺伝子産物が形成されない場合、すなわちハプロ不全(haploinsufficiency)によって無虹彩症となるが、ミスセンス変異はPeter奇形、黄斑低形成、白内障など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。PAX6 遺伝子産物は転写調節因子であるが、paired ボックスのN末側、C末側およびhomeo ボックスの計3個のDNA結合部位を持ち、また選択的スプライスによってエキソン5aを含む、または含まない2種類のアイソフォームが存在するなど複雑である。一群の眼形成不全症患者で同定したミスセンス変異を持つ発現ベクター (10種類)を作成し、それぞれについて、各DNA結合部位を介した転写調節能を解析した。東分担研究者の報告書に記載されているように、PAX6変異の見出された視神経低形成症患者の一部にコロボマが認められた。Renal-coloboma 症候群(OMIM120330)ではPAX2が責任遺伝子である。初期胚における

神経系の発生分化の段階では PAX6 と PAX2 の発現部位は住み分けていることが知られているが、PAX6 と PAX2 の直接的な相互作用は知られていない。そこで PAX6 による PAX2 の発現調節を培養細胞系で解析し、また PAX6 変異体についても解析した。コロボーマの程度と PAX2 発現制御との相関は見られなかったが、一方で、PAX6 の転写活性部位 (PTS 領域) は homeo ボックスを介する DNA 結合に大きく作用することがわかった。

このような、試験管内反応による転写調節に関する結果を、東分担研究者によるニワトリ胚への発現ベクター導入による形態形成の結果と結び合わせ、PAX6 変異による形態不全症の発生機序を明らかにしつつある。

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。試験管内反応によって転写調節能を解析し、また、東分担研究者によって形態形成能を直接評価し、両者の結果を合わせ、形態不全症の発生機序を明らかにしつつある。

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. S. Kobayashi, H. Uemura, T. Kohda, T. Nagai, Y. Chinen, K. Naritomi, E-I. Kinoshita, H. Ohashi, K. Imaizumi, M. Tsukahara, Y. Sugio, H. Tonoki, T. Kishino, T. Tanaka, M. Yamada, O. Tsutsumi, N. Niikawa, T. Kaneko-Ishino & F. Ishino. No evidence of PEG1/MEST gene mutations in Silver-Russell syndrome patients. *Am. J. Med. Genet.* 104, 225-231, 2001.

2. Y. Okamura-Oho, T. Miyashita & M.

Yamada. Distinctive tissue distribution and phosphorylation of IRSp53 isoforms. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 289, 957-960, 2001.

3. M. U, T. Miyashita, Y. Shikama, K. Tadokoro & M. Yamada. Molecular cloning and characterization of six novel isoforms of human Bim, a member of the proapoptotic BCL-2 family. *FEBS Lett.* 509, 135-141, 2001.

4. Y. Shikama, M. U, T. Miyashita and M. Yamada. Comprehensive studies on subcellular localizations and cell death-inducing activities of eight GFP-tagged apoptosis-related caspases. *Exp. Cell Res.*, 264, 315-325, 2001.

5. 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.*, 8, 377-386, 2001.

6. S. M. Cuddeback, H. Yamaguchi, K. Komatsu, T. Miyashita, M. Yamada, C. Wu, S. Singh & H-G Wang. Molecular cloning and characterization of Bif-1: A novel Src homology 3 domain-containing protein that associates with Bax. *J. Biol. Chem.*, 276, 20559-20565, 2001.

7. Y. Kamata, T. Okuyama, M. Kosuga, A. O'hira, A. Kanaji, K. Sasaki, M. Yamada & N. Azuma. Adenovirus-mediated gene therapy for corneal clouding in mice with mucopolysaccharidosis type VII. *Mol. Therapy*, 4, 307-312, 2001.

8. M. Kosuga, K. Sasaki, A. Tanabe, X-K. Li, H. Okawa, 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*, 3, 139-148, 2001.

9. M. Kosuga, S. Takahashi, A. Tanaka, M. Fujino, X.-K. Li, S. Suzuki, M. Yamada, K.

Kakishita, F. Ono, N. Sakuragawa & T. Okuyama. Widespread distribution of adenovirus-transduced monkey amniotic epithelial cells after local intracerebral injection: Implication for cell-mediated therapy for lysosome storage disorders. *Cell Transplant.*, 10, 435-439, 2001.

10. Y. Shikama, L. Shen, M. Yonetani, J. Miyauchi, T. Miyashita & Masao Yamada. Death effector domain-only polypeptides of caspase-8 and -10 specifically inhibit death receptor-induced cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 484-493, 2002.

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 国立成育医療センター 研究所 疾患遺伝子構造研究室

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、アポトーシス関連遺伝子の Bim について、アイソフォームごとに機能を明らかにし、またカスパーゼ 8 および 10 のドメインの機能を明らかにした。ニワトリ胚の肢芽部位に電気穿孔法によって発現ベクターを導入し、伸長ポリグルタミンあるいはカスパーゼを発現させてアポトーシスを人為的に誘導し、四肢形成に異常を生じ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) アポトーシス関連遺伝子の構造を解析し、また培養細胞で発現させて蛋白質発現の変動や細胞機能の変化を解析し、アポトーシスの素過程を明らかにする。
- (2) 電気穿孔法によって動物胚に、アポトーシス関連遺伝子や伸長ポリグルタミン鎖の発現ベクターを導入し、アポトーシスを誘導し、形態形成に及ぼす影響を解析する。当面、ニワトリ胚の肢芽を標的とする。

(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) Bim の新規アイソフォーム：Bim は Bcl-2 ファミリーに属し、アポトーシス誘導能を持つ。Bim を始めとするいくつかのメンバーは、他の Bcl-2 ファミリーと BH3

(Bcl-2 homology 3) と呼ばれる領域でのみ相同性を示すため、BH3-only 蛋白質と呼ばれる。Bim には選択的スプライシングにより、EL, L, S の3種類のアイソフォームが存在することが知られていたが、今回我々はヒト Bim には更に6種類のアイソフォームが存在することを見出した (U et al. 2001)。ヒトゲノムデータベースとの比較から、これらも全て選択的スプライシングによる産物である。既知のアイソフォームを含め、計9種のアイソフォームそれぞれの発現ベクターを作成し、アポトーシス誘導能を比較したところ、アポトーシス誘導には BH3 ドメインが必要であるが、充分ではないことが判明した。また様々なヒト臓器由来 RNA を用いて各アイソフォームの発現プロフィールを解析した結果、臓器特異的な Bim アイソフォームの発現制御機構が存在することが示唆された。

(2) カスパー8および10のアイソフォームによるアポトーシスの制御：アポトーシス実行プロテアーゼであるカスパー8は、アポトーシスの刺激に応じて、先ず上流のカスパー (カスパー2, 9, 10) が活性化され、次に、下流のカスパー (カスパー3, 6, 7) を活性化する。Fas を始めとする Death Receptor を介する細胞死のシグナル伝達においては、カスパー8, 10 が関与することが知られているが、そのいずれにも Death effector domain (DED) からなるプロドメインのみをもつアイソフォームが知られている。我々はこれらアイソフォームを GFP (Green fluorescent protein) との融合蛋白質として細胞内に発現させたところ、細胞質に線維状の構造物を形成すること、それがゴルジ体の分布と一致することを見出した。またこれらアイソフォームは Death Receptor を介する細胞死を抑制すること、すなわち全長からなるカスパー8, 10 のドミナント・ネガティブ変異体として働くことを見出した (Shikama et al. 2002)。

(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

ポトーシス誘導を解析してきた。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8の基質であること、伸長したポリグルタミンがカスパー8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8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8活性化」という悪循環が生ずることを提唱してきたが、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報告した (U et al., 2000)。

(4) 電気穿孔法によってニワトリ胚の肢芽に、アポトーシス関連遺伝子や伸長ポリグルタミン鎖の発現ベクターを導入し、アポトーシスを誘導し、形態形成に及ぼす影響を解析した。電気穿孔法は最近の技術であり、初期胚に導入して神経系の発生の影響などに有効な手段となってきた。器官や組織の形成時期は、それより少し遅れるため、まず、電気穿孔法によって発現ベクターを導入する基本的な条件を検討した。安定して導入できる条件を得て、後足肢芽部位に導入し、導入部位と時期に応じた、足の形態変形を形成できることを見出した。すなわち、肢芽の頂点部位にアポトーシスを誘導した場合、足の各部位が欠損するのに対し、肢芽の後部のみにアポトーシスを誘導すると、各部位は維持されるが、全体としての形成軸に変化を生じる事がわかった。

D. 結論

アポトーシス関連遺伝子の機能を明らかにした。人為的アポトーシス誘導によって形態形成の変化を誘導できる実験系を構築できた。

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。

G. 知的所有権の取得状況

無し。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. M. U, T. Miyashita, Y. Shikama, K. Tadokoro & M. Yamada. Molecular cloning and characterization of six novel isoforms of human Bim, a member of the proapoptotic BCL-2 family. FEBS Lett. 509, 135-141, 2001.

2. Y. Shikama, M. U, T. Miyashita and M. Yamada. Comprehensive studies on subcellular localizations and cell death-inducing activities of eight GFP-tagged apoptosis-related caspases. Exp. Cell Res., 264, 315-325, 2001.

3. 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., 8, 377-386, 2001.

4. S. M. Cuddeback, H. Yamaguchi, K. Komatsu, T. Miyashita, M. Yamada, C. Wu, S. Singh & H-G Wang. Molecular cloning and characterization of Bif-1: A novel Src homology 3 domain-containing protein that associates with Bax. J. Biol. Chem., 276, 20559-20565, 2001.

5. Y. Okamura-Oho, T. Miyashita & M. Yamada. Distinctive tissue distribution and phosphorylation of IRSp53 isoforms. Biochem. Biophys. Res. Comm., 289, 957-960, 2001.

6. Y. Shikama, L. Shen, M. Yonetani, J. Miyauchi, T. Miyashita & Masao Yamada. Death effector domain-only polypeptides of caspase-8 and -10 specifically inhibit death receptor-induced cell death. Biochem. Biophys. Res. Commun. 291, 484-493, 2002.

1

2.学会発表

14件 詳細は省略

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 国立成育医療センター 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 はハプロ不全 (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。本年度、神経低形成症患者 7 例に PAX6 変異を同定した。これらのほとんどはミスセンス変異であり、従来報告の無かった領域に位置していた。電気穿孔法によってニワトリ胚に発現ベクターを導入する実験系の開発を進め、網膜の形成を促進させること、脈絡膜を水晶体に転換させること、中心視野の方向を転換させることに成功した。これらの結果は、将来の再生医療に応用可能であると考えられる。

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。平成 14 年 3 月 1 日に国立成育医療センターに改組されたが、当面の経過措置として、従来の国立小児病院での倫理審査結果は有効とされている。国立成育医療センターに倫理審査委員会が設置されてから、改めて審査を受ける予定である。

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。昨年度までに、PAX6、EYA1、SHH 変異などを見出している。本年度、また新たに PAX6 のミスセンス変異を見出した。
- (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 のハプロ不全(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、視神経低形成症 7 例で PAX6 のミスセンス変異を同定した。PAX6 変異の見出された視神経低形成症患者の一部にコロボーマが認められた。renal-coloboma 症候群(OMIM120330)では PAX2 が責任遺伝子である事が知られており、このことから、PAX6 と PAX2 とのなんらかの関係が示唆された。

PAX6 は転写調節因子をコードしているが、DNA 結合部位として、paired ボックスの N 末側半分、C 末側半分、および homeo ボックスがあることが知られている。Pax 遺伝子群にはヒトあるいはマウスでは 8~9 種類が知られているが、全てのメンバーに paired ボックスが存在するのに対して、homeo ボックスはいくつかのメンバーにしか存在しない。Pax 遺伝子群の homeo ボックスの役割については不明な点が多い。今回見出したミスセンス変異のいくつかは homeo ボックス内あるいは近接部位に有り、また残りは C 末端の PTS 領域といわれる転写活性化ドメインに位置する。従来から、全ての Pax メンバーを通じて、homeo ボックスあるいは転写活性化ドメインでのミスセンス変異はほとんど報告されていないので、一連の変異は大変興味深い。これらの変異の機能解析について、山田主任研究者とともに進めている。(転写調節能の結果は山田主任研究者の報告書に記載してある。)

(3) 電気穿孔法によるニワトリ胚への発現ベクターの導入による眼形成変化：発現ベクターをニワトリ胚に電気穿孔法で導入して発現させ、その形態形成に及ぼす効果を

解析した。注入する DNA 溶液に色素を混合して、遺伝子注入部位を色素により確認し、さらに緑蛍光蛋白質の発現ベクターを混合して遺伝子発現部位を特定した。ニワトリ胚に電気穿孔法で発現ベクターを導入する方法は、最近開発された手法であるが、初期胚における神経系の発生分化などで有効な手段として確立してきている。各器官や組織の発生分化の時期は、それらに比べ、少し遅い時期であり、発生のステージに応じて最適な注入法、電気刺激の条件等を検討した。

昨年度の報告書に記載したように、ソニックヘッジホッグ(Sonic Hedgehog, SHH)のミスセンス変異を持つ緩和型の holoprosencephaly (type 3, OMIM 142945)患者の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とに基づいて、SHH の眼形成に及ぼす効果を、電気穿孔法による発現ベクターのニワトリ胚への導入法によって解析した。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。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。本年度、導入する位置を替えて実験を行い、SHH の濃度勾配に応じて眼形成が抑制されることを更に明確にした。

一方、洞窟に生息するいくつかの種類の魚では眼が退化しており、これらの原因として Shh の高発現によるアポトーシスの亢進の機構が報告されている。高濃度の SHH による眼形成抑制という点では一致する。しかし我々の実験系では眼組織でのアポトーシスの程度は変化がないことを確認した。また SHH をもう少し早い時期に導入した場合には眼の形成が無くなり、またもう少し遅い時機に導入下場合には変化がほとんど見られず、発生の限定された時期に限っ

て変化が誘導されることが判明した。

その他、同様の手法によって、網膜の形成を促進させること、脈絡膜を水晶体に転換させることなどに、基本的に成功しているが、さらに多数例を作出し、また導入時期などの問題について検討を重ねている。

D. 結論

発生時期に作動する転写因子である PAX6 のミスセンス変異によって、様々な病態を呈する眼形成不全症となることを明らかにしてきた。ニワトリ胚に電気穿孔法で発現ベクターを導入して発現させ、その形態形成に及ぼす効果を解析し、基本的に、網膜の形成を促進させること、脈絡膜を水晶体に転換させること、中心視野の方向を転換させることに成功した。これらの結果は、将来の再生医療に応用可能であると考える。

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. Y. Kamata, T. Okuyama, M. Kosuga, A. O'hira, A. Kanaji, K. Sasaki, M. Yamada & N. Azuma. Adenovirus-mediated gene therapy for corneal clouding in mice with mucopolysaccharidosis type VII. *Mol. Therapy*, 4, 307-312, 2001.

2. M. Kosuga, K. Sasaki, A. Tanabe, X-K. Li, H. Okawa, 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*, 3, 139-148, 2001.

2. 学会発表

5 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

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名 巻頁数 論文名)	刊行年月	刊行者氏名	執筆者氏名
Biochem Biophys Res Commun 289: 957-960 Distinctive tissue distribution and phosphorylation of IRSp53 isoforms.	2001		Okamura-Oho Y, Miyashita T, <u>Yamada M</u>
FEBS Lett 509:135-141 Molecular cloning and characterization of six novel isoforms of human Bim, a member of the proapoptotic Bcl-2 family.	2001		U M, Miyashita T, Shikama Y, Tadokoro K, <u>Yamada M</u>
Exp Cell Res 264:315-325 Comprehensive studies on subcellular localizations and cell death-inducing activities of eight GFP-tagged apoptosis-related caspases.	2001		Shikama Y, U M, Miyashita T, <u>Yamada M</u>
Cell Death Differ 8:377-386 Extended polyglutamine selectively interacts with caspase-8 and -10 in nuclear aggregates.	2001		U M, Miyashita T, Ohtsuka Y, Okamura-Oho Y, Shikama Y, <u>Yamada M</u>
J Biol Chem 276:20559-20565 Molecular cloning and characterization of Bif-1. A novel Src homology 3 domain-containing protein that associates with Bax.	2001		Cuddeback SM, Yamaguchi H, Komatsu K, Miyashita T, <u>Yamada M</u> , Wu C, Singh S, Wang HG
Am J Med Genet 104:225-231 No evidence of PEG1/MEST gene mutations in Silver-Russell syndrome patients.	2001		Kobayashi S, Uemura H, Kohda T, Nagai T, Chinen Y, Naritomi K, Kinoshita EI, Ohashi H, Imaizumi K, Tsukahara M, Sugio Y, Tonoki H, Kishino T, Tanaka T, <u>Yamada M</u> , Tsutsumi O, Niikawa N, Kaneko-Ishino T, Ishino F.
Mol Ther 4:307-312 Adenovirus-mediated gene therapy for corneal clouding in mice with mucopolysaccharidosis type VII.	2001		Kamata Y, Okuyama T, Kosuga M, O'hira A, Kanaji A, Sasaki K, <u>Yamada M</u> , Azuma N
Cell Transplant 10:435-439 Widespread distribution of adenovirus-transduced monkey amniotic epithelial cells after local intracerebral injection: implication for cell-mediated therapy for lysosome storage disorders.	2001		Kosuga M, Takahashi S, Tanabe A, Fujino M, Li XK, Suzuki S, <u>Yamada M</u> , Kakishita K, Ono F, Sakuragawa N, Okuyama T
Mol Ther 3(2):139-148 Engraftment of genetically engineered amniotic epithelial cells corrects lysosomal storage in multiple areas of the brain in mucopolysaccharidosis type VII mice.	2001		Kosuga M, Sasaki K, Tanabe A, Li XK, Okawa H, Ogino I, Okuda O, Arai H, Sakuragawa N, Kamata Y, Azuma N, Suzuki S, <u>Yamada M</u> , Okuyama T
Biochem Biophys Res Commun 291:484-493 Death effector domain-only polypeptides of caspase-8 and -10 specifically inhibit death receptor-induced cell death.	2002		Shikama Y, Shen L, Yonetani M, Miyauchi J, Miyashita T, <u>Yamada M</u>

20010458

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