

厚生科学研究費補助金(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)

幹細胞と形態形成遺伝子を用いた
眼組織の再生と修復に関する研究

(課題番号H13-再生-001)

平成13年度 総括・分担報告書

平成14年(2002年)3月

主任研究者 東 範 行
(国立成育医療センター眼科医長)

目 次

I. 総括研究報告書

- 幹細胞と形態形成遺伝子を用いた眼組織の再生と修復に関する研究
東 範行 国立成育医療センター 眼科

1

II. 分担研究報告書

1. 再生医療による臓器再構築を応用した先天代謝異常症に対する細胞治療法の開発
奥山 虎之 国立成育医療センター遺伝診療部 10
2. レンズ細胞特異的転写因子 MafA/L-Maf のヒトおよびマウス・ホモログ
片岡 浩介 東京工業大学フロンティア創造共同研究センター 12
3. 鶏雛水晶体吸引術後の後発白内障における Pax6 の発現に関する研究
根岸 一乃 慶應義塾大学眼科 13
4. 網膜特異的アミン酸化酵素に関する研究
田中 靖彦 国立病院東京医療センター 17
5. 幹細胞から眼組織への分化に関する研究
仁科 博史 東京大学大学院薬学系研究科 19
6. 成体脳由来神経幹細胞からの網膜細胞分化誘導の試み
渡邊 卓 杏林大学医学部臨床病理学教室 21
7. 眼の形態形成遺伝子 Pax6 を用いた網膜再生の研究
東 範行 国立成育医療センター 眼科 23

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

26

IV. 研究成果の刊行物、別刷

29

幹細胞と形態形成遺伝子を用いた眼組織の再生と修復に関する研究

(課題番号H13-再生-001)

主任研究者 東 範行 国立成育医療センター眼科医長

研究要旨：形態形成遺伝子を幹細胞に導入することによって、眼の組織を再生、修復させ、失われた視覚を回復することを研究目的とした。角膜の修復に関しては、ムコ多糖症の混濁に対する遺伝子治療を行った。水晶体の再生研究では、形成遺伝子 L-Maf のヒトとマウスのホモログを同定した。白内障術後の残存水晶体上皮細胞では遺伝子の発現が正常と異なっていることがわかり、適切な遺伝子を発現させれば幹細胞としての可能性があることがわかった。網膜の再生では、網膜特異遺伝子の AOC2 同定し、MAP キナーゼ系を活性化する bFGF を色素上皮に添加することにより、網膜様の構造体が分化誘導されることを見出した。また、脳由来神経幹細胞を網膜内に移植し網膜各層への組み込みと視神経内の中枢側への遊走を観察できた。レトロウイルスを用いていくつかの遺伝子を単独もしくは2種の組み合わせで細胞内に組み込んだ幹細胞株の作製をほぼ完了した。さらに、Pax6 遺伝子の導入によって網膜色素上皮細胞からほぼ完全な層構造をもつ神経網膜を作ること成功した。あわせて、FGF によって網膜色素上皮細胞を神経網膜に分化転換させる古典的実験には、Pax6 が関与していることを明らかにし。本研究によって、機能をもつ網膜再生が可能であることが示された。

分担研究者

奥山 虎之 国立小児病院小児医療研究センター
先天異常研究部奇形研究室長
片岡 浩介 東京工業大学フロンティア
創造共同研究センター研究員
根岸 一乃 慶應義塾大学眼科専任講師
田中 靖彦 国立病院東京医療センター院長
仁科 博史 東京大学大学院薬学系研究科
助教授
渡邊 卓 杏林大学医学部臨床病理学教室
教授

いる。この遺伝子はヒトでも発生を通じて眼のほぼすべての組織に発現しており、疾患の遺伝子変異検索では先天無虹彩、前眼部形成異常、先天白内障、黄斑低形成、視神経形成異常などで Pax6 の変異が見つかっていることから、ヒトでも眼の形態形成で多彩な機能を担っていると考えられる。下等動物であれば Pax6 遺伝子だけで眼全体を作ることができるが、高等動物では困難である。しかし、網膜などの部分的な組織を作成することは期待でき、失われた視覚を回復する治療に通ずると考えられる。

眼の形態形成では、Pax6 を頂点として多くの遺伝子がカスケードを形成しているが、最近 Pax6 の下流で働く遺伝子 (Eya, SO, Dac 等) が発見され機能が解析されている。これらは Pax6 に次ぐ準 master control 遺伝子であると考えられ、これらを用いても組織を再生させることが期待される。さらに、最近 Pax6 の下流で水晶体形成を担う遺伝子 L-Maf が発見された。これらの形態形成遺伝子は、網膜や水晶体を含めて眼のさまざまな組織を再生させる鍵になると考えられる。

再生において、もう1つの重要な要素は幹細胞である。両生類では網膜色素上皮細胞から神経網膜と水晶体が再生されるので、網膜と虹彩毛様体

A. 研究目的

視覚器の構造はきわめて複雑であるが、近年いくつもの形態形成遺伝子が発見されるにおよび、その形成システムの解明は急速な展開を見せている。ことに、Pax6 は眼形成の master control 遺伝子であると考えられており、ショウジョウバエやアフリカツメガエルでは target expression によって異所性に眼を形成することができ、下等動物であれば眼全体を作るほど強力な機能をもって

色素上皮細胞が注目されている。我々が色素上皮細胞に Pax6 を導入して網膜を形成したことから、網膜再生においては色素上皮細胞が幹細胞として期待される。水晶体では、L-Maf を導入して幼若な皮膚を水晶体へ分化転換することができるが、白内障手術などで残存する水晶体上皮細胞も 1 つの候補である。

本年度は、角膜の修復に関しては、ムコ多糖症の混濁に対する遺伝子治療を行った。水晶体の再生に関して形成遺伝子 L-Maf のヒトとマウスのホモログを同定し、白内障術後の残存水晶体上皮細胞に幹細胞としての可能性があるかを検討した。また、網膜の再生では、網膜特異遺伝子の同定、転写因子の発現誘導や細胞の増殖・分化に関わる細胞内シグナルの働き、脳由来神経幹細胞あるいは網膜色素上皮細胞からの神経網膜分化、誘導に関する研究を行った。

B. 研究方法

1) 臓器再構築を応用した先天代謝異常症に対する細胞治療法の開発

ヒトβ-グルクロニダーゼ (GUSB) を発現するアデノウイルスベクターを作成し、ムコ多糖モデルマウスの角膜に 3 種類の経路 (点眼、前房内、および角膜実質内) から投与し、遺伝子発現産物の組織内分布を検討した。ウイルス投与後の角膜病理の変化を検討し、治療効果を評価した。

2) レンズ細胞特異的転写因子 MafA/L-Maf のヒトおよびマウス・ホモログ

遺伝子データベース検索により、ヒトおよびマウスの MafA/L-Maf を見出し、PCR 法を用いて遺伝子断片を clone 化して塩基配列を決定した。ヒトについては MafA/L-Maf ゲノム領域も clone 化した。

3) 鶏雛水晶体吸引術後の後発白内障における Pax6 の発現

chick 眼に水晶体吸引を行い、術後の水晶体上皮増殖における Pax6、αクリスタリン、βクリスタリン、δクリスタリンの免疫染色を行った。また RT-PCR により、これらの水晶体上皮増殖における Pax6 の isoform、L-Maf、α-クリスタリン、β-クリスタリン、δ-クリスタリン遺伝子の発現レベルを検討した。

4) 網膜特異的アミン酸化酵素に関する研究

ヒト AOC2 cDNA をプローブにしてマウス網膜 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、5' / 3- RACE 法によってマウス AOC2 の全長を得て、全塩基配列を決定した。組織別に AOC2 の発現量を比較し、In situ hybridization 法によって網膜内での発現部位を解析した。ヒトとマウスの AOC2 プロモーター、遺伝子構造の決定、および

周辺遺伝子の解析を行った。AOC2 タンパク質を精製し、酵素活性を測定し、さらに、分子構造のシュミレーションによってヒトおよびマウスの AOC2 タンパク質の立体構造を計算した。

5) 眼形成転写因子の発現や細胞増殖・分化に関わる細胞内シグナル伝達系 MAP キナーゼ系の活性化誘導

MAP キナーゼ系活性化因子である bFGF の添加や Pax6、Eya などの眼形成に関わる転写因子の発現誘導により、マウス網膜色素上皮や ES 細胞、骨髄細胞を眼組織を構成する各種の細胞へと分化誘導する

6) 脳由来神経幹細胞からの網膜細胞分化誘導

ラット脳由来神経幹細胞を成体および発生期網膜内へ直接的に導入した。また発生期網膜の pellet 培養系に幹細胞を混合し、in vitro で発生期の細胞環境にさらした。網膜細胞への分化の指標として、ロドプシンの発現状況を検討した。

7) 眼の形態形成遺伝子 Pax6 を用いた網膜再生

鶏胚の網膜色素上皮に Pax6 遺伝子を導入し、変化を実体顕微鏡下と病理組織的に変化を検討した。また、Fibroblast Growth Factor (FGF) によって網膜色素上皮細胞を神経網膜に分化転換させる古典的実験に Pax6 が関与しているかを検討するため、FGF2 あるいは FGF8 を鶏胚網膜色素上皮近傍に注入し、Pax6 の発現様式をみた。培養細胞に FGF2 あるいは FGF8 を添加し、RT-PCR を行って Pax6 発現の変化を検討した。

C. 研究結果および考察

1) 臓器再構築を応用した先天代謝異常症に対する細胞治療法の開発

アデノウイルスの点眼は、角膜へ遺伝子導入できなかった。前房内投与で隅角および角膜内皮へ導入が示されたが、実質内へはわずかであった。Lamellar Keratotomy により実質内にアデノウイルスベクターを投与すると、遺伝子導入が可能であり、広く角膜全層におよぶことが示された。この方法でムコ多糖症 VII 型マウスの角膜実質内に GUSB を導入すると強陽性細胞が全層に認められ、特徴的な空胞変性がほぼ消失して、遺伝子治療の有用性が示された。

今回の検討により、角膜実質内への遺伝子導入における Lamellar Keratotomy の有用性が示され、局所投与にもかかわらず、角膜全層におよぶ GUSB 蛋白の分布、ほぼ全域における病理所見の改善が確認された。恒常的な遺伝子発現と治療効果の持続を期待するためには、幹細胞移植など新たな治療手段の開発が必要である。

2) レンズ細胞特異的転写因子 MafA/L-Maf のヒトおよびマウス・ホモログ

他の Maf 転写因子ファミリー比べて、MafA/L-Maf は、ヒト、マウスとニワトリとの間での相同性が比較的だったが、機能ドメイン（転写活性化領域、DNA 結合領域）はよく保存されていた。また、培養細胞系で一過的に発現させると、クリスタリン遺伝子の転写制御に重要な DNA 配列（MARE）を介して、転写を効率よく活性化できた。

ヒトおよびマウス MafA/L-Maf があきらかになり、ヒト染色体上の位置も決定したが、眼を含めて疾患との関わりはいまだあきらかではない。

3) 鶏雛水晶体吸引術後の後発白内障における Pax6 の発現

Pax6 は増殖する水晶体上皮細胞に広範に pax6 が発現していた。クリスタリン発現は、正常では、初期に δ クリスタリン、おくれに α クリスタリン、 β クリスタリンが発現するのに対し、後発白内障では水晶体吸引翌日より α -、 β -、 δ -クリスタリンとも発現していた。Pax6 遺伝子の isoform 検討では、正常では pax6(-5a) が優位であるのに対し、後発白内障では pax6(+5a) が優位であった。L-maf は、正常発生ではごく初期に発現するが、後発白内障では弱く発現した。

したがって、後発白内障においては、正常発生時にみられる Pax6、L-Maf、クリスタリンの発現がみられるものの、その発現パターンは正常発生および正常眼とは異なっていることが明らかになった。Pax6 や L-Maf の発現を適切にコントロールできれば、水晶体上皮細胞を幹細胞として透明な水晶体へ再生できる可能性があると考えられた。

4) 網膜特異的アミン酸化酵素に関する研究

マウス RAO 遺伝子はヒト AOC2 やその他のアミン酸化酵素と 75-85% の相同であった。AOC2 は網膜のみに発現し、神経節細胞層に発現が集中していた。AOC2 の酵素活性は Benzylamine を基質にした場合に特に顕著であった。AOC2 の約 1 Kb 下流には Psme3 遺伝子、約 1.3Kb 下流には AOC3 が発見された。AOC2 と AOC3 のプロモーターの相同性はきわめて少なく 15% であった。

AOC2 は網膜、特に神経節での役割が注目され、多数の組織で発現が確認されている AOC3 とタンデムに存在することを発見した。AOC2 はモノアミン酵素としての活性を持っており、神経節細胞での代謝にどのように関与しているのか継続して研究を行う予定である。さらに、この遺伝子のプロモーターを利用して神経節細胞に神経保護作用を持つ遺伝子を特異的に導入するベクターの開発を行っており、臨床応用可能な遺伝子治療法を開発している。

5) 眼形成転写因子の発現や細胞増殖・分化に関わる細胞内シグナル伝達系 MAP キナーゼ系の活

性化誘導

MAP キナーゼ系を活性化する bFGF をマウス色素上皮に添加することにより、*in vitro* で網膜様の構造体が分化誘導されることを見出した。

bFGF は、受容体を介して MAP キナーゼの活性化を誘導するが、ショウジョウバエの眼形成には、MAP キナーゼによる Eya を含む転写因子のリン酸化が、遺伝子発現の制御に関与していることが示唆されている。マウス色素上皮を用いた本実験系においても MAP キナーゼ系による眼形成関連転写因子の制御の可能性が示唆された。

6) 脳由来神経幹細胞からの網膜細胞分化誘導

網膜内細胞移植では幹細胞が網膜各層に組み込まれる状況が観察され、その一部の細胞が視神経内を中枢側に向かって遊走する所見を観察できた。レトロウイルスを用いていくつかの遺伝子を単独もしくは 2 種の組み合わせで細胞内に組み込んだ幹細胞株の作製をほぼ完了した。

この実験計画はほぼ準備段階を終え、実際の検討に入りつつある。これを駆使することにより、神経幹細胞の細胞内の環境、さらには細胞外の細胞性、液性環境を様々に manipulate し、さらにはその両者を自在に組み合わせることが可能となることから、今後このシステムは今回使用した脳由来神経幹細胞以外の細胞を対象とした検討にも広く応用が可能であるものと考えている。

7) 眼の形態形成遺伝子 Pax6 を用いた網膜再生

Pax6 を導入した網膜色素上皮は神経網膜に変化し、多くはほぼ完全な層構造をもっていた。視神経近傍では神経線維が視神経を通り中枢へ投射していた。FGF 注入でも網膜色素上皮を神経網膜に転換させるが、層構造は不完全であった。FGF による神経網膜への転換は 4.5 日胚までで、Pax6 導入では 7 日まで可能であった。網膜色素上皮付近に FGF を注入すると、まもなく強い Pax6 の発現がみられ、*in vitro* 実験では、FGF 添加で量依存的に Pax6 の発現が亢進した。

今回の研究によって、Pax6 遺伝子を用いれば、幼若網膜色素上皮細胞を幹細胞として神経網膜を作成できることが明らかになった。また、従来から知られていた Factor (FGF) によって網膜色素上皮細胞を神経網膜に分化転換させる古典的実験には、Pax6 が関与していることが明らかになった。Pax6 を導入の方が FGF よりも後期までほぼ完全な網膜を作れた。したがって、このように形態形成遺伝子を適切に用いれば、少なくとも組織レベルでは十分な再生ができることが示された。また、網膜色素上皮細胞が発生のほぼ中期まで神経網膜に変化できる幹細胞としての潜在性をもつことも明らかになった。

E. 結論

本年度は、角膜の修復に関しては、ムコ多糖症の混濁に対する遺伝子治療を行った。

水晶体の再生研究では、形成遺伝子L-Mafのヒトとマウスのホモログを同定した。白内障術後の残存水晶体上皮細胞では遺伝子の発現が正常と異なっていることがわかり、適切な遺伝子を発現させれば幹細胞としての可能性があることがわかった。

網膜の再生では、網膜特異遺伝子のAOC2同定し、MAPキナーゼ系を活性化するbFGFを色素上皮に添加することにより、網膜様の構造体が分化誘導されることを見出した。また、脳由来神経幹細胞を網膜内に移植し網膜各層への組み込みと視神経内の中核側への遊走を観察できた。レトロウイルスを用いていくつかの遺伝子を単独もしくは2種の組み合わせで細胞内に組み込んだ幹細胞株の作製をほぼ完了した。さらに、Pax6遺伝子の導入によって網膜色素上皮細胞からほぼ完全な層構造をもつ神経網膜を作ることに成功した。あわせて、FGFによって網膜色素上皮細胞を神経網膜に分化転換させる古典的実験には、Pax6が関与していることを明らかにし、本研究によって、機能をもつ網膜再生が可能であることが示された。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kamata Y, Okuyama T, et al. Adenovirus-mediated gene therapy for corneal clouding in mice with mucopolysaccharidosis type VII. *Mol Ther* 4:307-312, 2001.

Fujino M, Okuyama T, et al. Selective repopulation of mice liver after Fas-resistant hepatocyte transplantation. *Cell Transplant* 10:353-361, 2001.

Kosuga M, Okuyama T, et al. Engraftment of genetically engineered amniotic epithelial cells corrects lysosomal storage in multiple areas of the brain in mucopolysaccharidosis type VII mice. *Mol Ther* 3:139-148, 2001.

Fujino M, Okuyama T, et al. In vitro prevention of cell-mediated xeno-graft rejection via the Fas/FasL-pathway in CrmA-transduced porcine kidney cells. *Xenotransplantation* 8:115-124, 2001.

Li XK, Okuyama T, et al. Fulminant hepatitis by Fas-ligand expression in MRL-lpr/lpr mice grafted with Fas-positive livers and wild-type mice with

Fas-mutant livers. *Transplantation* 71:503-508, 2001.

Ohba M, Okuyama T, et al. Long-term graft acceptance in rat heart transplantation by CTLA4Ig gene transfection combined with FTY720 treatment. *World J Surg* 25:391-397, 2001.

Kosuga M, Okuyama T, et al. 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.

Kataoka, K., K. Yoshitomo-Nakagawa, S. Shioda, and M. Nishizawa. 2001. A set of Hox proteins interact with the Maf oncoprotein to inhibit its DNA binding, transactivation, and transforming activities. *J. Biol. Chem.* 276: 819-826.

Kataoka, K., H. Handa, and M. Nishizawa. 2001. Induction of cellular anti-oxidative stress genes through heterodimeric transcription factor Nrf2/Small Maf by anti-rheumatic gold(I) compounds. *J. Biol. Chem.* 276: 34074-34081.

Kataoka, K., S. Shioda, K. Yoshitomo-Nakagawa, H. Handa, and M. Nishizawa. 2001. Maf and Jun nuclear oncoproteins share downstream target genes for inducing cell transformation. *J. Biol. Chem.* 276: 36849-36856.

Negishi K, Ohnuma K, Hirayama N, Noda T: Effect of chromatic aberration on contrast sensitivity in pseudophakic eyes. *Arch Ophthalmol* 119:1154-1158,2001

根岸一乃：前眼部解析装置。臨床検査 45 :1579-1582,2001

根岸一乃：色収差.IOL&RS 15:9-12,2001

小林克彦、根岸一乃：PSF : IOL&RS 15:205-210,2001

Minoru Obazawa, Yukihiro Mashima, Setsuko Noda, Jun Kudoh, Nobuyoshi Shimizu, Yasuhiko Tanaka, and Takeshi Iwata. Expression of Porcine Myocilin in Trabecular Meshwork Cells and Astrocytes from Optic Nerve Head. (Submitted to *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2001)

Qiang Zhang, Yukihiro Mashima, Setsuko Noda, Yutaka Imamura, Jun Kudoh, Nobuyoshi Shimizu, Shinsuke Umeda, Yasuhiko Tanaka, and Takeshi Iwata. Cloning and Characterization of Copper-Binding Amine Oxidase (AOC2) Specifically

Expressed in Mouse Retina. (submitted to *Genomics* 2001)

Takeshi Iwata, Naoko Sanuki, Keiko Fujiki, Ha Nguyen Thanh, Atsushi Kanai, Michihiro T. Suzuki, Yasuhiro Yoshikawa, Shinsuke Umeda, Takatsune Nishiyama, Yukihiko Mashima, Yasuhiko Tanaka. Identification of Erythrocyte Antigen PBDX Expressed in Human Cornea Epithelial Cells and Keratocytes. (Submitted to *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2001)

Shinsuke Umeda, Michihiro T. Suzuki, Yasuhiro Yoshikawa, Fumino Iwata, Keiko Fujiki, Atsushi Kanai, Naoko Sanuki, Yasuhiko Tanaka, and Takeshi Iwata. Cloning and Characterization of ELVLO4 Gene in Cynomolgus (*Macaca fascicularis*) Monkey. (Submitted to *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2001)

Wada, T. et al. *J. Biol. Chem.* (2001) **276**, 30892-30897

Sasaki, T. et al. *J. Exp. Med.* (2001) **194**, 757-768

Yoshida, H. et al. *Immunity* (2001) **15**, 569-578

Kitagawa, D. et al. *J. Biol. Chem.* (2002) **277**, 366-371

Abe N, Watanabe T, Nakashima M, Masaki T, Mori T, Sugiyama M, Atomi Y: Quantitative analysis of telomerase activity: a potential diagnostic tool for colorectal carcinoma. *Hepato-Gastroenterol.* 48: 692-695 (2001)

Hatano N, Sugiyama M, Watanabe T, Atomi Y: Opsonin receptor expression on peritoneal exudative and circulatory neutrophils in murine acute pancreatitis. *Pancreas* 23: 55-61 (2001)

Chiappetta G, Manfioletti G, Pentimalli F, Abe N, Di Bonito M, Vento MT, Giuliano A, Fedele M, Viglietto G, Santoro M, Watanabe T, Giancotti V, Fusco A: High mobility group HMGI(Y) protein expression in human colorectal hyperplastic and neoplastic diseases. *Int. J Cancer* 91: 147-151 (2001)

Abe N, Watanabe T, Toda H, Machida H, Suzuki K, Masaki T, Sugiyama M, Atomi Y, Nakaya Y: Prognostic significance of carcinoembryonic antigen levels in peritoneal washes in patients with gastric cancer. *Am. J Surg.* 181: 356-361 (2001)

Nagamatsu S, Nakamichi Y, Ohara-Imaizumi M, Ozawa S, Katahira H, Watanabe T, Ishida H: Adenovirus-mediated preproinsulin gene transfer into adipose tissues ameliorates hyperglycemia in obese

diabetic KK^{AY} mice. *FEBS Lett.* 509: 106-110 (2001)

Kondo K, Sagara H, Hirotsawa K, Kaga K, Matsushima S, Mabuchi K, Uchimura H, Watanabe T: Hair cell development in vivo and in vitro: analysis by using a monoclonal antibody specific to hair cells in the chick inner ear. *J Comp. Neurol.* (in press)

Abe N, Watanabe T, Ozawa S, Masaki T, Mori T, Sugiyama M, Ishida H, Nagamatsu S, Atomi Y: Pancreatic endocrine function and GLUT2 expression in rat acute pancreatitis. *Pancreas* (in press)

Abe N, Watanabe T, Izumisato Y, Masaki T, Mori T, Sugiyama M, Chiappetta G, Fusco A, Fujioka Y, Atomi Y: Diagnostic significance of high mobility group I(Y) protein expression in intraductal papillary mucinous tumors of the pancreas. *Pancreas* (in press)

Okazaki M, Suzuki K, Asano N, Araki K, Shukuya N, Egami T, Higurashi Y, Morita K, Uchimura H, Watanabe T: Effectiveness of fosfomycin combined with other antimicrobial agents against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates using the efficacy time index assay. *J Infect. Chemother.* (in press)

Abe N, Watanabe T et al.: Risk factor predictive of lymph node metastasis in depressed early gastric cancer. *Am. J Surg.* (in press)

Abe N, Watanabe T et al.: Carcinoembryonic antigen levels in peritoneal washes: a potential prognostic marker for patients with colorectal cancer. *Hepato-gastroenterol.* (in press)

東 範行. 日本眼科学会宿題報告 黄斑疾患 黄斑形成と中心視成立の分子細胞生物学 2001;104:960-985.

Kawase E, Azuma N. A case of atypical WAGR syndrome with anterior segment anomaly and microphthalmos. *Arch Ophthalmol* 2001; in press.

Nishina S, Azuma N. Severe macular pucker after infantile retinal detachment surgery. *Br J Ophthalmol* 2001; in press.

東 範行. 視線を合せる脳の領域. 日本の眼科 2001;72:335.

東 範行. 未熟児網膜症. あたらしい眼科 2001;12: 1460-1488.

東 範行. 未熟児網膜症の眼底検査法.
日本の眼科 2001;73:11-14.

2. 学会発表

Kawashita T, Caton M, Ghosh SS, Takahashi M, Roy-Chowdhury N, Okuyama T, Guha C, Whitley CB, Strayer DS, Roy-Chowdhury J. Recombinant SV40 vector-mediated transfer of β -glucuronidase gene into mucopolysaccharidosis type VII mice. The fourth annual meeting of the American society of gene therapy, May 30-June 3, 2001, Seattle WA, USA.

Kosuga M, Tanabe A, Sasaki K, Li XK, Azuma N, Suzuki S, Koiwai O, Yamada M, Okuyama T. Long-term morphological normalization in the brain of mucopolysaccharidosis type VII mice by neonatal systemic administration of an adenoviral vector expressing beta-glucuronidase. The fourth annual meeting of the American society of gene therapy, May 30-June 3, 2001, Seattle WA, USA

Kamata Y, Azuma N, Kosuga M, O'hira A, Tanabe A, Sasaki K, Yamada M, and Okuyama T. Rapid and long-term pathological correction of corneal clouding in mice with mucopolysaccharidosis type VII using novel vector administration procedure "lamellar keratotomy." The 7th annual meeting for Japan Society of Gene Therapy, July 5-7, 2001, Tokyo.

高橋正彦, 川下雄丈, Roy-Chowdhury J, 奥山虎之. Fas リガンドの一過性発現と放射線照射の併用による移植肝細胞の選択的増殖. 第9回細胞療法研究会, 2001年4月20-21日(松本).

小須賀基通, 田辺亜希子, 山田正夫, 奥山虎之, 垣下浩二, 小野史子, 高橋悟, 桜川宣男. リソゾーム蓄積症の治療を目的とした遺伝子導入サル羊膜細胞の脳内移植療法の検討. 第46回日本人類遺伝学会, 2001年10月3-5日, (さいたま)

Negishi K, Kobayashi K, Ohnuma K, Ohno K, Noda T: Visual simulation system according to the point spread function analysis in various patients. American Society of Cataract and Refractive Surgery, Annual meeting, 2001, San Diego, USA

Kosaka K, Negishi K, Yamazaki S, Yoshino M, Nakamura K, Kurosaka D, Mashima Y: The effect of pupil size on night vision contrast sensitivity in LASIK patients. American Society of Cataract and Refractive Surgery, Annual meeting, 2001, San Diego, USA

Yamazaki S, Negishi K, Kosaka K, Yoshino M, Nakamura K, Kurosaka D, Mashima Y: The effect of central glare on night vision contrast sensitivity in

LASIK patients. American Society of Cataract and Refractive Surgery, Annual meeting, 2001, San Diego, USA

Negishi K, Kobayashi K, Shibutani M, Takeuchi G, Ohnuma K, Hirayama N, Ohno K, Noda T: Evaluation of visual function using a new point spread function analysis system in normal, cataractous, and pseudophakic eyes. The association for research in vision and ophthalmology, Annual meeting, 2001, Florida, USA

Kobayashi K, Shibutani M, Takeuchi G, Ohnuma K, Noda T, Negishi K, Ohno K: A comparison of scattering reflection and specular reflection for double-pass MTF of the human eye. The association for research in vision and ophthalmology, Annual meeting, 2001, Florida, USA

根岸一乃: エキシマレーザー手術の合併症第1回感覚器疾患講習会講演, 2001, 東京

根岸一乃: エキシマレーザー手術の適応と禁忌. 第1回感覚器疾患講習会講演, 2001, 東京

根岸一乃: 屈折矯正手術の課題. 城南眼科集談会, 特別講演, 2001, 東京

根岸一乃: 眼科学の臨床からみたレーザーの安全. 第2回日本レーザー医学会安全教育セミナー, 教育講演, 2002, 東京

根岸一乃: 屈折矯正手術(LASIK)--診療の実際と今後の課題--. 杏林アイセンター招待講演, 2002, 東京

根岸一乃: ポイントスプレッドファンクション解析装置によるLASIK術後眼の視機能評価, 第1回東北屈折矯正研究会, 招待講演, 2002, 仙台

根岸一乃, 大沼一彦, 平山典夫, 大野建治, 野田徹: 眼内レンズ挿入眼における色収差の偽調節への影響. 第24回日本手術学会総会, 2001大阪

小坂晃一, 吉野真未, 中村邦彦, 根岸一乃, 黒坂大次郎, 真島行彦: LASIK術前後の夜間コントラスト感度と瞳孔径. 第24回日本手術学会総会, 2001大阪

根岸一乃, 大野建治, 平井香織, 高橋慶子, 野田徹, 林達敏: オゾン水によるLASIK術前消毒とフラップ下洗浄. 第25回角膜カンファレンス, 2001,

大阪

大野建治、野田徹、平井香織、黒川直行、根岸一乃、佐野雄太:蛍光濾過フィルターを用いた細隙灯顕微鏡による角結膜フルオレセイン染色所見の観察・撮影法. 第25回角膜カンファレンス.2001,大阪

根岸一乃、小林克彦、渋谷雅博、竹内 楽、大沼一彦、平山典夫、大野建治、野田徹:新しいPoint Spread Function解析装置による正常眼、白内障眼および偽水晶体眼の視機能評価. 第105回日本眼科学会総会2001,横浜

大野建治、小林克彦、渋谷雅博、竹内 楽、大沼一彦、平山典夫、根岸一乃、野田徹:新しいPoint Spread Function解析システムによる正常眼のdouble-pass MTFの解析.第105回日本眼科学会総会2001,横浜

吉野真未、中村邦彦、加藤克彦、根岸一乃、黒坂大次郎:眼内レンズ後面突出度の水晶体上皮細胞に対する影響.第16回日本眼内レンズ屈折手術学会,2001,福岡

平井香織、細田ひろみ、大野建治、野田徹、根岸一乃:前囊切開窓の完全閉鎖に対しNd:YAGレーザー前囊切開術を行った1例. 第16回日本眼内レンズ屈折手術学会,2001,福岡

井上達也、奥田恵美、吉野真未、中村邦彦、加藤克彦、根岸一乃、黒坂大次郎:層間白内障の視力予後. 第16回日本眼内レンズ屈折手術学会,2001,福岡

山崎重典、根岸一乃、吉野真未、中村邦彦、黒坂大次郎、小坂晃一:LASIK術前後のコントラスト感度へのグレアの影響. 第16回日本眼内レンズ屈折手術学会,2001,福岡

黒川直行、細田ひろみ、林康司、野田徹、根岸一乃、森實秀子、秋山健一:自然治癒をみた朝顔症候群に伴う網膜剥離の一例.第26回小児眼科学会総会,2001,東京

根岸一乃、仁科幸子、山田正夫、東範行:PAX6変異を伴う先天無虹彩の一家系. 第26回小児眼科学会総会,2001,東京

根岸一乃、清水里美、山崎重典、小坂晃一、吉野真未、中村邦彦、黒坂大次郎、真島行彦:慶應義塾大学病院におけるLASIK診療の実際. 第719回東京都眼科集談会,2001,東京

根岸一乃、小林克彦、渋谷雅博、竹内 楽、大沼一彦、平山典夫、大野建治、野田徹:Point Spread Function解析装置によるLASIK術後眼の視機能評価.第55回日本臨床眼科学会総会,2001,京都

平井香織、大野建治、野田徹、小林克彦、渋谷雅博、竹内 楽、大沼一彦、平山典夫、根岸一乃:Point Spread Function解析装置による他覚的視機能評価. 第55回日本臨床眼科学会総会,2001,京都

大野建治、平井香織、野田徹、佐野雄太、山崎重典、清水里美、根岸一乃:LASIK術後の近見視機能の変化. 第55回日本臨床眼科学会総会,2001,京都

根岸一乃、小林克彦、渋谷雅博、竹内 楽、大沼一彦、平山典夫、大野建治、野田徹:Point Spread Function解析装置による後発白内障眼の視機能評価. 第25回日本手術学会総会,2002,広島

山崎重典、根岸一乃、清水里美、小坂晃一、吉野真未、中村邦彦、黒坂大次郎、真島行彦: Laser in situ keratomileusis(LASIK)による惹起乱視.第25回日本手術学会総会,2002,広島

野田徹、大野建治、秋山邦彦、黒川直行、春畑裕二、林康司、細田ひろみ、根岸一乃、小林克彦、平山典夫、大沼一彦:Point Spread Function解析による人眼光学機能評価:第56回国立病院療養所総合医学会、仙台、2001

秋山邦彦、野田徹、大野建治、黒川直行、春畑裕二、林康司、細田ひろみ、:Point Spread Function解析システムによる人眼眼球光学系 double-pass MTFの解析.—正常眼における年齢別の散乱反射成分および鏡面反射成分の比較—:第56回国立病院療養所総合医学会、仙台、2001

細田ひろみ、尾藤誠司、野田徹、根岸一乃、水野谷智、柳田隆、砂川光子、石本一郎、大島浩一、小木曾正博、高木郁江、久保田敏昭、手島倫子、田中靖彦:白内障手術患者のクリティカルパス:患者立脚型医療アウトカムによる臨床評価. 第56回国立病院療養所総合医学会、仙台、2001

F. IWATA, S. UMEDA, M.T. SUZUKI, Y. YOSHIKAWA, K. FUJIKI, A. KANAI, Y. TANAKA, T. IWATA. ISOLATION OF NOVEL GENES ENRICHED IN MACULAR REGION OF

CYNOMOLGUS MONKEY MACACA
FASCICULARIS RETINA. The Association for
Research in Vision and Ophthalmology, USA, 2001.

T. IWATA, T. NISHIYAMA, M. WAKAKURA, S.
UMEDA, Y. MASHIMA, Y. TANAKA.
ISOLATION OF NOVEL GENE SPECIFICALLY
EXPRESSED IN RAT RETINAL MULLER CELLS
AND LUNG. The Association for Research in Vision
and Ophthalmology, USA, 2001.

Y. IMAMURA, Q. ZHANG, Y. MASHIMA, S.
NODA, S. UMEDA, J. KUDOH, N. SHIMIZU, Y.
TANAKA, T. IWATA. CLONING OF NOVEL
AMINE OXIDASE GENE SPECIFICALLY
EXPRESSED IN MOUSE RETINAL GANGLION
CELLS. The Association for Research in Vision and
Ophthalmology, USA, 2001.

Y. TANAKA, M. OBAZAWA, Y. MASHIMA, S.
NODA, J. KUDOH, N. SHIMIZU, T. IWATA.
CLONING AND CHARACTERIZATION OF
PORCINE MYOC IN CULTURED PORCINE
TRABECULAR MESHWORK CELLS AND
ASTROCYTES FROM OPTIC NERVE HEAD. The
Association for Research in Vision and
Ophthalmology, USA, 2001.

田中靖彦、讃岐奈緒子、藤木慶子、金井淳、西山
隆恒、真島行彦、岩田岳: ヒト角膜内皮細胞に特
異的に発現する未知遺伝子の検索. 第105回日本
眼科学会総会 横浜、2001.

尾羽澤実、真島行彦、野田節子、工藤純、清水信
義、田中靖彦、岩田岳 プタMYOC遺伝子のク
ローニングおよび発現機構の解析. 第105回日本
眼科学会総会 横浜、2001.

西山隆恒、張強、今村裕、真島行彦、野田節子、
工藤純、清水信義、田中靖彦、岩田岳 マウス神
経節細胞に特異的に発現するアミン酸化酵素の
クローニングおよびその機能解析. 第105回日本
眼科学会総会 横浜、2001.

岩田岳、梅田慎介、鈴木通弘、吉川泰弘、藤木慶
子、岩田文乃、金井淳、野田徹、田中靖彦 カニ
クイザル網膜黄斑部で発現する未知遺伝子のク
ローニングおよび機能. 第105回日本眼科学会総
会 横浜、2001.

11th international conference Second Messengers &
phosphoproteins, 2001年4月/メルボルン

第74回 日本生化学会、2001年10月、京都

第24回日本分子生物学会、2001年12月、横浜

東 範行・田所恵子・山田正夫・川瀬英理子・高
橋泉・赤沢智宏・高坂新一・中福雅人. Shhによ
る Pax6 の制御と神経網膜の発生. 日本分子生物
学会 2001年12月(神戸)

川瀬英理子・山田正夫・小椋利彦・東 範行.
Pax6, Pax2, Tbx5 の相互作用. 日本分子生物学会
2001年12月(神戸)

東 範行・山田正夫・半田宏・中福雅人. Pax6
による色素上皮細胞から神経網膜への分化転換.
日本眼科学会 2001年4月(横浜)

川瀬英理子・山田正夫・小椋利彦・東 範行.
Pax6, Pax2, Tbx5 の相互作用. 日本眼科学会
2001年4月(横浜)

高本紀子・奥山虎之・山田正夫・東 範行. オ
プシンプロモーターと Cre/loxP システムを用い
た網膜視細胞への選択的遺伝子導入. 日本眼
科学会 2001年4月(横浜)

鎌田裕子・奥山虎之・山田正夫・東 範行. 全
身投与による先天ムコ多糖症 IV 型マウスの遺伝
子治療. 日本眼科学会 2001年4月(横浜)

仁科幸子・富田 香・東 範行. 乳幼児のロー
ビジョンケアの現状と問題点. 日本小児眼科学
会 2001年5月(東京).

仁科幸子・富田 香・東 範行. ロービジョン
ケアにおけるグレアテスター. 日本弱視斜視学
会 2001年6月(静岡).

新井千賀子・仁科幸子・富田 香・東 範行. 視
覚障害児の相談における医療機関の連携事例報
告2例. 2001年5月(東京).

東 範行. シンポジウム 白内障と遺伝子. 日
本白内障学会 2001年6月(福岡)

東 範行. シンポジウム 小児の硝子体手術.
北日本眼科学会 2001年7月(札幌)

東 範行. 特別講演 小児の眼の診方 長崎眼
科研究会 2001年7月(長崎)

東 範行. Pax6 遺伝子の選択的スプライスの機
能. Japan Macula Club 2001年8月(軽井沢)

東 範行. シンポジウム 小児眼科学会 形態形成遺伝子の変異と機能. 日本臨床眼科学会 2001年10月(京都)

東 範行. シンポジウム 日本眼科医会 電子カルテ(病院). 日本臨床眼科学会 2001年10月(京都)

仁科幸子・富田 香・東 範行. ロービジョンケアにおける眼鏡装用の問題点. 日本臨床眼科学会 2001年10月(京都).

高本紀子・東 範行. 早期発症の先天無虹彩に伴う緑内障の手術. 日本臨床眼科学会 2001年10月(京都).

川瀬英理子・東 範行. 乳幼治にみられた骨髄移植後網膜症の1例. 日本臨床眼科学会 2001年10月(京都).

東 範行. 特別講演 小児・若年者の緑内障管理. みちのく緑内障懇話会 2001年10月(東京)

東 範行. 教育講演 先天白内障の管理. 東京眼科医会 2001年10月(東京)

東 範行. 教育講演 小児の視覚管理. 東京眼科医会 2001年12月(東京)

東 範行. ワークショップ 眼の発生と進化 日本分子生物学会 2001年12月(横浜)

川瀬英理子. PAX6とEYA1の変異と相互関係. 日本分子生物学会 2001年12月(横浜)

東 範行. 教育講演 小児の視覚管理. 神奈川県眼科医会 2002年1月(横浜)

東 範行. 眼の形成異常における遺伝子変異. 感覚器障害研究事業発表 2002年2月(東京)

東 範行. 特別講演 眼の形成と進化 宮崎眼科研究会 2002年2月(宮崎)

東 範行. 未熟児網膜症の管理 日大臨床講演会 2002年2月(東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

再生医療による臓器再構築を応用した 先天代謝異常症に対する細胞治療法の開発

分担研究者 奥山 虎之 国立成育医療センター 遺伝診療科

研究要旨：ムコ多糖症は網膜変性や角膜混濁などの眼合併症を高頻度に合併するが、角膜移植以外に効果的な治療法は確立されていない。今回、幹細胞移植による眼合併症の治療法の開発をめざし、遺伝子導入による角膜混濁の治療の可能性についてムコ多糖症 VII 型マウスを用いて検討した。ムコ多糖症 VII 型の欠損酵素であるβ-グルクロニダーゼ（GUSB）を発現するアデノウイルス AxCAhGUS を、Lamellar keratotomy を施行後の角膜実質に直接投与した。活性染色で、投与部位を越えて広範囲に GUSB 陽性細胞が分布していることが確認され、角膜全層での病理所見の正常化が確認された。しかし、治療効果は一過性であり、恒常的な治療効果を期待するためには、遺伝子導入幹細胞の移植の必要が示された。

A. 研究目的

本研究の目的は、小児先天代謝異常症の眼合併症の根治的治療法を開発することである。ムコ多糖症 VII 型は、リソゾーム酵素であるβ-グルクロニダーゼ（GUSB）の先天的欠損により角膜混濁や網膜変性を呈する。今回は、アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療の可能性について検討し、その有効性と限界を明らかにするとともに、再生医療の有用性について検討を加えることを目的とする。

B. 研究方法

1) アデノウイルスベクターの作成

ヒト GUSB を発現するアデノウイルスベクター AxCAhGUS を斎藤らの開発した COS-TPC 法で作成した。

2) アデノウイルスベクターの角膜への投与

アデノウイルスベクターをマウスの角膜に 3 種類の異なった経路（点眼、前房内、および角膜実質内）から投与し、遺伝子発現産物の角膜組織内での分布を GUSB の活性染色を利用して検討した。

3) 角膜病理所見の変化

アデノウイルス投与前後での角膜病理所見の変化を検討し、治療効果について評価した。

（倫理面への配慮）

本研究では、ヒト材料を用いた研究は計画されていない。実験動物を用いる研究は、国立小児病院小児医療研究センター動物実験指針に準拠して研究を実施する。特に、以下の点について留意する。

（1）実験計画の立案において、動物愛護ならび

に動物福祉の観点から、動物実験の範囲を研究目的に必要な最小限度にとどめる。

（2）実験者は管理者と相互に協力し、適切な環境のもとで、飼育管理を行う。

（3）実験者は目的に合致した適切な実験操作を行い、麻酔等の手段によって動物の苦痛を最小限にとどめるように配慮する。

C. 研究結果

アデノウイルスの点眼は、角膜への遺伝子導入には有効でなかった。前房内投与では、隅角および角膜内皮への効率のよい遺伝子導入は示されたが、角膜実質内への遺伝子導入はわずかであった。一方、Lamellar Keratotomy により角膜実質内にアデノウイルスベクターを投与した場合、角膜内部に遺伝子導入することが可能であり、さらに発現産物である GUSB 蛋白がウイルス投与部位をこえて広く角膜全層におよぶことが示された。

上記の結果をうけて、Lamellar Keratotomy 施行後のムコ多糖症 VII 型マウスの角膜実質内に AxCAhGUS を投与したところ、GUSB 活性染色では、GUSB 強陽性細胞が角膜全層に認められた。リソゾームの腫大による特徴的な空胞変性が、ムコ多糖症の角膜実質細胞に認められ、これが角膜混濁の病因と考えられている。AxCAhGUS を投与したマウスの角膜では、この空胞変性はほぼ消失しているのが確認され、遺伝子治療の有用性が示された。

しかし、アデノウイルス、投与後 30 日では GUSB 活性は、投与 7 日目の 1-2%まで急激に低下することが示された。

D. 考察

今回の検討により、角膜実質内への遺伝子導入における Lamellar Keratotomy の有用性が示された。しかも、角膜実質への局所投与にもかかわらず、角膜全層におよぶ GUSB 蛋白の分布がしめされ、さらに角膜のほぼ全域における病理所見の改善が確認された。しかしながら、この治療効果は一過性であり、恒常的な遺伝子発現と治療効果の持続を期待するためには、幹細胞移植など新たな治療手段の開発が必要であることが同時に示された。

E. 結論

Lamellar Keratotomy を行い、角膜実質内にアデノウイルスベクターを局所投与することにより、一時的ではあるが角膜全層におよび遺伝子発現が可能となることが示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kamata Y, Okuyama T, et al. Adenovirus-mediated gene therapy for corneal clouding in mice with mucopolysaccharidosis type VII. *Mol Ther* 4:307-312, 2001.

Fujino M, Okuyama T, et al. Selective repopulation of mice liver after Fas-resistant hepatocyte transplantation. *Cell Transplant* 10:353-361, 2001.

Kosuga M, Okuyama T, et al. Engraftment of genetically engineered amniotic epithelial cells corrects lysosomal storage in multiple areas of the brain in mucopolysaccharidosis type VII mice. *Mol Ther* 3:139-148, 2001.

Fujino M, Okuyama T, et al. In vitro prevention of cell-mediated xeno-graft rejection via the Fas/FasL-pathway in CrmA-transduced porcine kidney cells. *Xenotransplantation* 8:115-124, 2001.

Li XK, Okuyama T, et al. Fulminant hepatitis by Fas-ligand expression in MRL-lpr/lpr mice grafted with Fas-positive livers and wild-type mice with Fas-mutant livers. *Transplantation* 71:503-508, 2001.

Ohba M, Okuyama T, et al. Long-term graft acceptance in rat heart transplantation by CTLA4lg gene transfection combined with FTY720 treatment. *World J Surg* 25:391-397, 2001.

Kosuga M, Okuyama T, et al. 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.

2. 学会発表

Kawashita T, Caton M, Ghosh SS, Takahashi M, Roy-Chowdhury N, Okuyama T, Guha C, Whitley CB, Strayer DS, Roy-Chowdhury J. Recombinant SV40 vector-mediated transfer of β -glucuronidase gene into mucopolysaccharidosis type VII mice. The fourth annual meeting of the American society of gene therapy, May 30-June 3, 2001, Seattle WA, USA.

Kosuga M, Tanabe A, Sasaki K, Li XK, Azuma N, Suzuki S, Koiwai O, Yamada M, Okuyama T. Long-term morphological normalization in the brain of mucopolysaccharidosis type VII mice by neonatal systemic administration of an adenoviral vector expressing beta-glucuronidase. The fourth annual meeting of the American society of gene therapy, May 30-June 3, 2001, Seattle WA, USA

Kamata Y, Azuma N, Kosuga M, O'hira A, Tanabe A, Sasaki K, Yamada M, and Okuyama T. Rapid and long-term pathological correction of corneal clouding in mice with mucopolysaccharidosis type VII using novel vector administration procedure "lamellar keratotomy." The 7th annual meeting for Japan Society of Gene Therapy, July 5-7, 2001, Tokyo.

高橋正彦, 川下雄丈, Roy-Chowdhury J, 奥山虎之. Fas リガンドの一過性発現と放射線照射の併用による移植肝細胞の選択的増殖. 第9回細胞療法研究会, 2001年4月20-21日(松本).

小須賀基通, 田辺亜希子, 山田正夫, 奥山虎之, 垣下浩二, 小野史子, 高橋悟, 桜川宜男. リソゾーム蓄積症の治療を目的とした遺伝子導入サル羊膜細胞の脳内移植療法の検討. 第46回日本人類遺伝学会, 2001年10月3-5日, (さいたま)

レンズ細胞特異的転写因子 MafA/L-Maf のヒトおよびマウス・ホモログ

分担研究者 片岡 浩介 東京工業大学フロンティア創造共同研究センター

研究要旨：レンズ細胞特異的遺伝子発現を司る転写因子 MafA/L-Maf のヒトおよびマウス・ホモログをクローン化し、その構造および機能を解析した

A. 研究目的

転写因子 MafA/L-Maf は、レンズ細胞に特異的に発現しており、各クラスのクリスタリン遺伝子の発現を活性化し、またレンズ細胞の分化にたいへん重要な役割を果たしていることがニワトリを用いた解析からあきらかにされてきている。クリスタリン遺伝子群が進化の過程において著しく変化していることを考慮すると、ニワトリにおける知見が哺乳類にもあてはまる保証はない。しかしながら、MafA/L-Maf 遺伝子はヒト、マウスなど哺乳類においてははまだ同定されておらず、ヒトの疾患との関わりも不明である。そこで、MafA/L-Maf の哺乳類の眼（特にレンズ）の発生における役割をあきらかにする目的で、まず MafA/L-Maf のヒトおよびマウス・ホモログをクローン化し、構造解析を行った。

B. 研究方法

遺伝子データベース検索により、ヒトおよびマウスの MafA/L-Maf と思われる cDNA の部分配列を見出すことができたので、PCR 法を用いてそれぞれの open reading frame を含む遺伝子断片を clone 化し、塩基配列を決定した。また、ヒトについては MafA/L-Maf ゲノム領域も clone 化した。

C. 研究結果

他の Maf 転写因子ファミリー（c-Maf, MafB）はニワトリ、ヒト、マウス間でたいへんよく進化的に保存されているのに対して、MafA/L-Maf は、ヒト、マウスとニワトリとの間での相同性が比較的低いことがわかったが、機能ドメイン（転写活性化領域、DNA 結合領域）はよく保存されていた。また、ニワトリと同様にヒトおよびマウス MafA/L-Maf は、培養細胞系で一過的に発現させると、クリスタリン遺伝子の転写制御に重要な DNA 配列（MARE）を介して、転写を効率よく活性化できることがわかった。

D. 考察

得られた cDNA clone が活性を持つヒトおよび

マウス MafA/L-Maf があきらかになった。また、ヒトの MafA/L-Maf ゲノム領域を利用してヒト染色体上の位置も決定したが、眼を含めてヒトの疾患との関わりはいまだあきらかではない。

E. 結論

得られた cDNA clone を利用することにより、マウスをモデル動物として用いて MafA/L-Maf の眼（特にレンズ）の発生における発現パターンや、クリスタリン遺伝子群の発現に対する影響を分子レベルで調べることのできる準備が整った。また、ヒトの疾患における MafA/L-Maf の遺伝子変異を解析することも可能となった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kataoka, K., K. Yoshitomo-Nakagawa, S. Shioda, and M. Nishizawa. 2001. A set of Hox proteins interact with the Maf oncoprotein to inhibit its DNA binding, transactivation, and transforming activities. *J. Biol. Chem.* 276: 819-826.
- 2) Kataoka, K., H. Handa, and M. Nishizawa. 2001. Induction of cellular anti-oxidative stress genes through heterodimeric transcription factor Nrf2/Small Maf by anti-rheumatic gold(I) compounds. *J. Biol. Chem.* 276: 34074-34081.
- 3) Kataoka, K., S. Shioda, K. Yoshitomo-Nakagawa, H. Handa, and M. Nishizawa. 2001. Maf and Jun nuclear oncoproteins share downstream target genes for inducing cell transformation. *J. Biol. Chem.* 276: 36849-36856.

H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし

鶏雛水晶体吸引術後の後発白内障における Pax6 の発現に関する研究

分担研究者 根岸一乃 慶應義塾大学眼科専任講師

研究要旨：白内障手術後の主要合併症であり、水晶体の不完全再生である後発白内障発生のメカニズムを解明するため、鶏雛水晶体吸引術後の後発白内障における Pax6 の発現について検討した。材料は chick 眼で、chick 眼については 2 way 針による水晶体吸引術後、1,3,5,7 日後に眼球を摘出し、抗 chick Pax6 モノクローナル抗体、抗 α クリスタリン、抗 β クリスタリン、抗 δ クリスタリンのモノクローナル抗体で免疫染色した。また、胎生期 stage24、コントロールとして生後 3 日の正常水晶体、そして同時期の鶏雛眼に水晶体吸引術を行って術後 1, 3, 5, 7 日眼に眼球を摘出した際の水晶体に対し、RT-PCR により、Pax6(-5a)、pax6(+5a)、L-maf、 α A-クリスタリン、 β B1-、 β A3/A1-クリスタリン、 δ 1/ δ 2-、 δ 1-クリスタリン遺伝子の転写レベルを比較検討した。研究結果より、後発白内障においては、正常発生時にみられる Pax6、L-maf、クリスタリンの発現がみられるものの、その発現パターンは正常発現および正常眼とは異なっていることが明らかになった。結論として Pax6 や L-maf の発現を正常発生のように適切にコントロールできれば、後発白内障の原因である水晶体上皮細胞を stem cell として、後発白内障から透明な水晶体を再生できる可能性があるのではないかと考えられた。

A. 研究目的

脊椎動物の水晶体には水晶体嚢の中に一層のシート状にならんだ水晶体上皮細胞と水晶体上皮細胞の分化の最終地点である水晶体繊維細胞の 2 種類の細胞がある。水晶体は単純で整然とした構造によりその透明性を保っているが、加齢や外傷などにより水晶体蛋白の変化がおこると、水晶体は混濁し白内障となり視力が低下する。これに対し、現在は水晶体嚢内の内容をすべて除去し、代わりに、人工のレンズ、すなわち眼内レンズを挿入するという治療がおこなわれています。しかし、現在の技術では、手術操作で水晶体上皮細胞をすべて取り去ることは不可能であるため、術後も水晶体上皮細胞が一部残る。この残存した水晶体上皮細胞は、術後の環境下で増殖、分化することにより不完全な水晶体を再生する。これを後発白内障とよぶ。後発白内障は白内障術後眼に高率におきる主要合併症で、再度の視力障害の原因となり、視力回復のためにはレーザー治療が必要となる。年間 100 万件以上の手術件数を考えると医学的ばかりでなく、医療経済上も大きな問題である。しかし、後発白内障の発生機序の詳細、とくに転写因子については未だ不明な点が多く、根本的な治療はみつかっていない。後発白内障発生のメカニズムを解明し、水晶体再生の完全抑制、あるいは逆に正常発生と同様の透明水晶体の再生が可能になれば、白内障手術の主要な問題点の解決になる可能性がある。一方、pax6 は表面外胚

葉からの水晶体の誘導に関与する転写因子で、水晶体主要蛋白である各種クリスタリン遺伝子の発現にも関与していることが知られている。先天白内障患者で pax6 の変異が発見されていることから、pax6 は正常水晶体の発生に関与している可能性がある。また、pax6 はエクソン 5a で encode される 14 個のアミノ酸の有無により pax6(+5a) と pax6(-5a) の 2 つの isoform があるが、その発現のバランスも正常水晶体の発生に重要であることが報告されている。これらのことから、水晶体の異常再生である後発白内障の発生にも pax6 が関与している可能性が考えられる。そこで本研究では、chick 眼を用いて水晶体摘出術後に発生した後発白内障における Pax6 および水晶体の構造蛋白である各種クリスタリンの発現について免疫組織化学的に検討し、また同時に、pax6 の 2 つの isoform、水晶体分化のマスター遺伝子 L-Maf、および各種クリスタリン遺伝子の転写レベルについて胎生期およびコントロールと比較検討した。

B. 研究方法

材料は chick 眼で、chick 眼については 25G 針による水晶体吸引術後、1,3,5,7 日後に眼球を摘出し、抗 chick Pax6 モノクローナル抗体、抗 α クリスタリン、抗 β クリスタリン、抗 δ クリスタリンのモノクローナル抗体で免疫染色した。また、胎生期 stage24、コントロールとして生後 3 日の正常水晶体、そして同時期の鶏雛眼に水晶体吸引術をして

術後1, 3, 5, 7日目に眼球を摘出した際の水晶体に対し、RT-PCRにより、Pax6(-5a), pax6(+5a)、L-maf、 α A-クリスタリン、 β B1-, β A3/A1-クリスタリン、 δ 1/ δ 2-, δ 1-クリスタリン遺伝子の転写レベルを比較検討した。

C. 研究結果

pax6は正常発生過程にあるchick眼においては水晶体上皮細胞および水晶体赤道部付近の増殖帯にのみ発現し、生後は増殖帯付近にまばらに発現するのみになるが、免疫染色の結果、水晶体吸引後1日目に形成された後発白内障では水晶体嚢内に増殖する水晶体上皮細胞に広範にpax6が発現していた。各種クリスタリンの発現については、chickの正常発生過程では、初期に δ クリスタリンが発現し、おくれ α クリスタリン、 β クリスタリンが発現するのに対し、後発白内障では水晶体吸引翌日より α -、 β -、 δ -クリスタリンとも明らかに発現していた。RT-PCRにより遺伝子の転写レベルを検討した結果、pax6については、胎生期 stage24および正常水晶体、そして後発白内障のいずれでも発現しているものの、isoformは発生過程および正常ではpax6(-5a)が優位であるのに対し、後発白内障ではpax6(+5a)が優位であった。L-mafについては、正常発生ではごく初期に発現するのに対し、後発白内障でも発現が認められるものの弱かった。後発白内障における各種クリスタリンの発現は、 δ クリスタリンは胎生期および正常水晶体と差がないが、 α および β B1クリスタリンの発現は胎生期および正常よりも後発白内障の方が強いという結果だった。すなわち後発白内障におけるpax6, L-maf, 各種クリスタリンの発現パターンは明らかに正常発生とは異なっていた。

D. 考察

研究結果より、後発白内障においては、正常発生時にみられるPax6、L-maf、クリスタリンの発現がみられるものの、その発現パターンは正常発生および正常眼とは異なっていることが明らかになった。とくにPax6については、Transgenic miceの実験からpax6(+5a)とpax6(-5a)の2つのisoformのバランスが水晶体の正常発生に重要であることが報告されており、後発白内障において発現のバランスが正常発生と大きく異なっていたのは注目に値する。後発白内障の発生機序の詳細、とくに転写因子については未だ不明な点が多いが、Pax6やL-mafの発現を正常発生のように適切にコントロールできれば、白内障術後に残存する水晶体上皮細胞をstem cellとして透明な水晶体を再生できる可能性もあり、これにより現在白内障術後

の屈折矯正手段として用いられている眼内レンズにおける主な問題点である調節力の欠如、あるいは正常人の加齢による老視の問題等も同時に解決できるであろう。

E. 結論

Pax6やL-mafの発現を正常発生のように適切にコントロールできれば、後発白内障の原因である水晶体上皮細胞をstem cellとして、後発白内障から透明な水晶体を再生できる可能性があるのではないかと考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Negishi K, Ohnuma K, Hirayama N, Noda T: Effect of chromatic aberration on contrast sensitivity in pseudophakic eyes. Arch Ophthalmol 119:1154-1158,2001
2. 根岸一乃: 前眼部解析装置. 臨床検査 45:1579-1582,2001
3. 根岸一乃: 色収差. IOL&RS 15:9-12,2001
4. 小林克彦, 根岸一乃: PSF: IOL&RS 15:205-210,2001

2. 学会発表

1. Negishi K, Kobayashi K, Ohnuma K, Ohno K, Noda T: Visual simulation system according to the point spread function analysis in various patients. American Society of Cataract and Refractive Surgery, Annual meeting, 2001, San Diego, USA
2. Kosaka K, Negishi K, Yamazaki S, Yoshino M, Nakamura K, Kurosaka D, Mashima Y: The effect of pupil size on night vision contrast sensitivity in LASIK patients. American Society of Cataract and Refractive Surgery, Annual meeting, 2001, San Diego, USA
3. Yamazaki S, Negishi K, Kosaka K, Yoshino M, Nakamura K, Kurosaka D, Mashima Y: The effect of central glare on night vision contrast sensitivity in LASIK patients. American Society of Cataract and Refractive Surgery, Annual meeting, 2001, San Diego, USA
4. Negishi K, Kobayashi K, Shibutani M, Takeuchi G, Ohnuma K, Hirayama N, Ohno K, Noda T: Evaluation of visual function using a new point spread function analysis system in normal, cataractous, and pseudophakic eyes. The association for research in vision and ophthalmology, Annual meeting, 2001, Florida, USA
5. Kobayashi K, Shibutani M, Takeuchi G, Ohnuma K, Noda T, Negishi K, Ohno K: A comparison of

scattering reflection and specular reflection for couple-pass MTF of the human eye. The association for research in vision and ophthalmology, Annual meeting, 2001, Florida, USA

6. 根岸一乃: エキシマレーザー手術の合併症第1回感覚器疾患講習会講演, 2001, 東京

7. 根岸一乃: エキシマレーザー手術の適応と禁忌. 第1回感覚器疾患講習会講演, 2001, 東京

8. 根岸一乃: 屈折矯正手術の課題. 城南眼科集談会, 特別講演, 2001, 東京

9. 根岸一乃: 眼科学の臨床からみたレーザーの安全. 第2回日本レーザー医学会安全教育セミナー, 教育講演, 2002, 東京

10. 根岸一乃: 屈折矯正手術(LASIK)--診療の実際と今後の課題--. 杏林アイセンター招待講演, 2002, 東京

11. 根岸一乃: ポイントスプレッドファンクション解析装置によるLASIK術後眼の視機能評価, 第1回東北屈折矯正研究会, 招待講演, 2002, 仙台

12. 根岸一乃, 大沼一彦, 平山典夫, 大野建治, 野田徹: 眼内レンズ挿入眼における色収差の偽調節への影響. 第24回日本手術学会総会, 2001, 大阪

13. 小坂晃一, 吉野真未, 中村邦彦, 根岸一乃, 黒坂大次郎, 真島行彦: LASIK術前後の夜間コントラスト感度と瞳孔径. 第24回日本手術学会総会, 2001, 大阪

14. 根岸一乃, 大野建治, 平井香織, 高橋慶子, 野田徹, 林達敏: オゾン水によるLASIK術前消毒とフラップ下洗浄. 第25回角膜カンファレンス. 2001, 大阪

15. 大野建治, 野田徹, 平井香織, 黒川直行, 根岸一乃, 佐野雄太: 蛍光濾過フィルターを用いた細隙灯顕微鏡による角結膜フルオレセイン染色所見の観察・撮影法. 第25回角膜カンファレンス. 2001, 大阪

16. 根岸一乃, 小林克彦, 渋谷雅博, 竹内 楽, 大沼一彦, 平山典夫, 大野建治, 野田徹: 新しいPoint Spread Function解析装置による正常眼、白内障眼および偽水晶体眼の視機能評価. 第105回日本眼科学会総会, 2001, 横浜

17. 大野建治, 小林克彦, 渋谷雅博, 竹内 楽, 大沼一彦, 平山典夫, 根岸一乃, 野田徹: 新しいPoint Spread Function解析システムによる正常眼のdouble-pass MTFの解析. 第105回日本眼科学会総会, 2001, 横浜

18. 吉野真未, 中村邦彦, 加藤克彦, 根岸一乃, 黒坂大次郎: 眼内レンズ後面突出度の水晶体上皮細胞に対する影響. 第16回日本眼内レンズ屈折手術学会, 2001, 福岡

19. 平井香織, 細田ひろみ, 大野建治, 野田徹, 根岸一乃: 前囊切開窓の完全閉鎖に対しNd:YAGレーザー前囊切開術を行った1例. 第16回日本眼内レンズ屈折手術学会, 2001, 福岡

20. 井上達也, 奥田恵美, 吉野真未, 中村邦彦, 加藤克彦, 根岸一乃, 黒坂大次郎: 層間白内障の視力予後. 第16回日本眼内レンズ屈折手術学会, 2001, 福岡

21. 山崎重典, 根岸一乃, 吉野真未, 中村邦彦, 黒坂大次郎, 小坂晃一: LASIK術前後のコントラスト感度へのグレアの影響. 第16回日本眼内レンズ屈折手術学会, 2001, 福岡

22. 黒川直行, 細田ひろみ, 林康司, 野田徹, 根岸一乃, 森實秀子, 秋山健一: 自然治癒をみた朝顔症候群に伴う網膜剥離の一例. 第26回小児眼科学会総会, 2001, 東京

23. 根岸一乃, 仁科幸子, 山田正夫, 東範行: PAX6変異を伴う先天無虹彩の一家系. 第26回小児眼科学会総会, 2001, 東京

24. 根岸一乃, 清水里美, 山崎重典, 小坂晃一, 吉野真未, 中村邦彦, 黒坂大次郎, 真島行彦: 慶應義塾大学病院におけるLASIK診療の実際. 第719回 東京都眼科集談会, 2001, 東京

25. 根岸一乃, 小林克彦, 渋谷雅博, 竹内 楽, 大沼一彦, 平山典夫, 大野建治, 野田徹: Point Spread Function解析装置によるLASIK術後眼の視機能評価. 第55回日本臨床眼科学会総会, 2001, 京都

26. 平井香織, 大野建治, 野田徹, 小林克彦, 渋谷雅博, 竹内 楽, 大沼一彦, 平山典夫, 根岸一乃: Point Spread Function解析装置による他覚的視機能評価. 第55回日本臨床眼科学会総会, 2001, 京都

27. 大野建治, 平井香織, 野田徹, 佐野雄太, 山崎重典, 清水里美, 根岸一乃: LASIK術後の近見視機能の変化. 第55回日本臨床眼科学会総会, 2001, 京都

28. 根岸一乃, 小林克彦, 渋谷雅博, 竹内 楽, 大沼一彦, 平山典夫, 大野建治, 野田徹: Point Spread Function解析装置による後発白内障眼の視機能評価. 第25回日本手術学会総会, 2002, 広島

29. 山崎重典, 根岸一乃, 清水里美, 小坂晃一, 吉野真未, 中村邦彦, 黒坂大次郎, 真島行彦: Laser in situ keratomileusis(LASIK)による惹起乱視. 第25回日本手術学会総会, 2002, 広島

30. 野田徹, 大野建治, 秋山邦彦, 黒川直行, 春畑裕二, 林康司, 細田ひろみ, 根岸一乃, 小林克彦, 平山典夫, 大沼一彦: Point Spread Function解析による人眼光学機能評価. 第56回国立病院療養所総合医学会, 仙台, 2001

31. 秋山邦彦, 野田徹, 大野建治, 黒川直行,

春畑裕二、林康司、細田ひろみ、Point Spread Function解析システムによる人眼眼球光学系 double-pass MTFの解析—正常眼における年齢別の散乱反射成分および鏡面反射成分の比較—第56回国立病院療養所総合医学会、仙台、2001
32. 細田ひろみ、尾藤誠司、野田徹、根岸一乃、水野谷智、柳田隆、砂川光子、石本一郎、大島浩一、小木曾正博、高木郁江、久保田敏昭、手島倫子、田中靖彦:白内障手術患

者のクリティカルパス:患者立脚型医療アウトカムによる臨床評価.第56回国立病院療養所総合医学会、仙台、2001

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得 無し
2. 実用新案登録 無し

網膜特異的アミン酸化酵素に関する研究

分担研究者 田中靖彦 国立病院東京医療センター 院長

研究要旨：マウス・アミン酸化酵素（AOC2）のクローニングおよびその機能解析によってこの酵素が網膜特異的に発現し、相同性が最も高い AOC3 遺伝子とタンデムに位置することが明らかとなった。

A. 研究目的

網膜特異的に発現するアミン酸化酵素遺伝子（AOC2）は銅依存性アミン酸化酵素と高いアミノ酸配列の相同性を示し命名されたが、その活性や機能については全く未知であった。我々はこの遺伝子の機能解明を目的としてマウスAOC2遺伝子のクローニングを行い、遺伝子構造、アミノ酸配列、転写制御領域の解析を行い、さらに、この遺伝子がコードするタンパク質を発現して酵素活性の測定、抗体作製などを行った。

B. 研究方法

ヒトAOC2 cDNAをプローブにしてマウス網膜cDNAライブラリーのスクリーニングを行い、さらに5' /3- RACE法によってマウスAOC2の全長を得て、全塩基配列を決定した。リアルタイム定量PCR法によって組織別にAOC2の発現量を比較し、In situ hybridization法によって網膜組織内での発現部位を解析した。ヒトとマウスのAOC2プロモーター、遺伝子構造の決定、および周辺遺伝子の解析を行った。Sf21昆虫細胞を用いてAOC2タンパク質を発現し、ニッケルカラムで精製、回収を行った。精製されたAOC2タンパク質についてPutrescineとBenzylamineを基質にして酵素活性を測定した。さらに、分子構造のシュミレーションによってヒトおよびマウスのAOC2タンパク質の立体構造を計算した。

C. 研究結果

マウスRAO遺伝子は全長2,535bpでヒトAOC2やその他のアミン酸化酵素と75-85%の相同性が確認された。リアルタイム定量PCR法によってAOC2の組織別発現量が比較された結果、網膜のみに発現が確認された。また、In situ hybridization法によって神経節細胞層に発現が集中していることが確認された。Sf21の細胞外へ放出されたAOC2タンパク質は培養液の回収によって集められ、ニッケルカラムによって約80%まで精製された。AOC2の酵素活性はBenzylamineを基質に

した場合に特に顕著であった。マウスAOC2の遺伝子構造とその周辺にある遺伝子を解析した結果、AOC2の約1Kb下流にはPsmc3遺伝子、約1.3Kb下流にはAOC2の兄弟遺伝子であるAOC3が発見された。AOC2とAOC3のプロモーターの相同性はきわめて少なく15%であった。現在AOC2とAOC3の機能の比較を解析している。

D. 考察

AOC2は神経細胞で発見されたはじめての銅依存性アミン酸化酵素であり、網膜、特に神経節での役割が注目されている。我々はマウスAOC2のクローニングによってその遺伝子構造と周辺遺伝子の構造を明らかにして、多数の組織で発現が確認されているAOC3とタンデムに存在することを発見した。2つの遺伝子は同じ祖先を持つ遺伝子と考えられ、AOC2がなぜ網膜特異的なプロモーターを持つに至ったかは興味深い。AOC2はモノアミン酵素としての活性を持っており、神経節細胞での代謝にどのように関与しているのか継続して研究を行う予定である。さらに、この遺伝子のプロモーターを利用して神経節細胞に神経保護作用を持つ遺伝子を特異的に導入するベクターの開発を行っており、臨床応用可能な遺伝子治療法を開発している。このシステムが確立すれば、緑内障以外の視神経萎縮を来す重篤な疾患（レーベル遺伝性視神経症、前部虚血性視神経症）に対してもアポトーシス阻害遺伝子の網膜神経節細胞への導入等臨床応用への道が開かれる。

E. 結論

マウスAOC2遺伝子はヒトと同様に神経節細胞に局在する遺伝子であることが確認された。我々は継続して神経節細胞に特異的なプロモーターの解析を進め、その転写機序を解明していく予定である。

F. 健康管理情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Minoru Obazawa, Yukihiko Mashima, Setsuko Noda, Jun Kudoh, Nobuyoshi Shimizu, Yasuhiko Tanaka, and Takeshi Iwata. Expression of Porcine Myocilin in Trabecular Meshwork Cells and Astrocytes from Optic Nerve Head. (Submitted to *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2001)

2) Qiang Zhang, Yukihiko Mashima, Setsuko Noda, Yutaka Imamura, Jun Kudoh, Nobuyoshi Shimizu, Shinsuke Umeda, Yasuhiko Tanaka, and Takeshi Iwata. Cloning and Characterization of Copper-Binding Amine Oxidase (AOC2) Specifically Expressed in Mouse Retina. (submitted to *Genomics* 2001)

3) Takeshi Iwata, Naoko Sanuki, Keiko Fujiki, Ha Nguyen Thanh, Atsushi Kanai, Michihiro T. Suzuki, Yasuhiro Yoshikawa, Shinsuke Umeda, Takatsune Nishiyama, Yukihiko Mashima, Yasuhiko Tanaka. Identification of Erythrocyte Antigen PBDX Expressed in Human Cornea Epithelial Cells and Keratocytes. (Submitted to *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2001)

4) Shinsuke Umeda, Michihiro T. Suzuki, Yasuhiro Yoshikawa, Fumino Iwata, Keiko Fujiki, Atsushi Kanai, Naoko Sanuki, Yasuhiko Tanaka, and Takeshi Iwata. Cloning and Characterization of ELVLO4 Gene in Cynomolgus (*Macaca fascicularis*) Monkey. (Submitted to *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2001)

2. 学会発表

The Association for Research in Vision and Ophthalmology, *IOVS*, 38(4) 2001.

1) F. IWATA, S. UMEDA, M.T. SUZUKI, Y. YOSHIKAWA, K. FUJIKI, A. KANAI, Y. TANAKA, T. IWATA. ISOLATION OF NOVEL GENES ENRICHED IN MACULAR REGION OF CYNOMOLGUS MONKEY MACACA FASCICULARIS RETINA.

2) T. IWATA, T. NISHIYAMA, M. WAKAKURA, S. UMEDA, Y. MASHIMA, Y. TANAKA. ISOLATION OF NOVEL GENE SPECIFICALLY EXPRESSED IN RAT RETINAL MULLER CELLS AND LUNG.

3) Y. IMAMURA, Q. ZHANG, Y. MASHIMA, S. NODA, S. UMEDA, J. KUDOH, N. SHIMIZU, Y. TANAKA, T. IWATA. CLONING OF NOVEL AMINE OXIDASE GENE SPECIFICALLY EXPRESSED IN MOUSE RETINAL GANGLION CELLS.

4) Y. TANAKA, M. OBAZAWA, Y. MASHIMA, S. NODA, J. KUDOH, N. SHIMIZU, T. IWATA. CLONING AND CHARACTERIZATION OF PORCINE MYOC IN CULTURED PORCINE TRABECULAR MESHWORK CELLS AND ASTROCYTES FROM OPTIC NERVE HEAD.

日本眼科学会雑誌 第105巻 臨時増刊号2001 第105回日本眼科学会総会講演抄録

P61 田中靖彦、讃岐奈緒子、藤木慶子、金井淳、西山隆恒、真島行彦、岩田岳
ヒト角膜内皮細胞に特異的に発現する未知遺伝子の検索

P149 尾羽澤実、真島行彦、野田節子、工藤純、清水信義、田中靖彦、岩田岳 プタMYOC遺伝子のクローニングおよび発現機構の解析

P219 西山隆恒、張強、今村裕、真島行彦、野田節子、工藤純、清水信義、田中靖彦、岩田岳 マウス神経節細胞に特異的に発現するアミン酸化酵素のクローニングおよびその機能解析

P221 岩田岳、梅田慎介、鈴木通弘、吉川泰弘、藤木慶子、岩田文乃、金井淳、野田徹、田中靖彦 カニクイザル網膜黄斑部で発現する未知遺伝子のクローニングおよび機能

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得 無し
2. 実用新案登録 無し