

厚生労働科学研究費補助金
感覚器障害研究事業

難治性感覚器疾患の遺伝情報網および遺伝子診断システムの確立
に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岩田 岳

平成14(2002)年 3月

目次

- I. 総括研究報告書 1
 - 難治性感覚器疾患の遺伝情報網および遺伝子診断システムの確立に関する研究 - 1
 - 岩田 岳
 - 田中 靖彦

- II. 分担研究報告書
 - 1. 先天無虹彩における PAX6 遺伝子の変異 ----- 5
 - 東 範行

 - 2. 成育医療センターを利用した小児異常症における遺伝子診断システムの確立 -- 9
 - 奥山 虎之

- III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 13

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
研究報告書

難治性感覚器疾患の遺伝情報網および遺伝子診断システムの確立

主任研究者 岩田 岳 国立病院東京医療センター・感覚器センター 主任研究員
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： 我国には存在しない感覚器疾患の遺伝情報網を確立するために感覚器ネットワーク (www.kankakuki.go.jp) を構築して国立病院を中心とする患者紹介システム、遺伝子診断システム、感覚器遺伝情報データベースおよびその情報公開システムを平成15年度中に完成をめざしてインフラの整備、研究を行っている。

A. 研究目的

国立病院東京医療センター・感覚器センターを中心とした感覚器ネット (www.kankakuki.go.jp) を構築し16の関連施設との連携で(1)難治性感覚器疾患患者紹介システムの整備、(2)感覚器遺伝子診断システムの開発、(3)日本人に特化した遺伝子変異データベースの構築、(4)臨床に役立つ感覚器疾患遺伝子情報公開システムの構築を目的とする。

B. 研究方法

(1) 国立病院東京医療センターを中心とした患者紹介システムの確立

国立病院東京医療センターを中心とする遺伝性感覚器疾患症例入力システム、暗号化システム、匿名化システムの骨格となるインフラの整備を行う。参加していただく関連施設としては国立療養所西札幌病院、国立療養所小樽病院、国立療養所札幌西病院、国立仙台病院、国立千葉病院、国立名古屋病院、国立金沢病院、国立京都病院、国立大阪病院、国立療養所千石荘病院、国立病院岡山医療センター、国立善通寺病院、国立療養所香川小児病院、国立病院九州医療センター、国立病院長崎医療センター、国立熊本病院の計16施設を予定している。最初のプロジェクトとして緑内障の症例入力システムの開発を行った。

(2) 日本人を対象とした遺伝子診断システムの確立および臨床への応用

日本人に多く発見される遺伝子変異および眼疾患と相関性の高い遺伝子多型を解析するための遺伝子診断システムの開発を行う。この数年間に新たに開発された多数の遺伝子検出法の中で、

特に将来が期待される、インバーダー法(BML)、スタンフォード型ガラスチップ(日本レーザー電子)、ECAチップ(TUM研究所)などについて検討を行った。特に検出感度、作業工程数、検出機や試薬の価格などを検討した。

C. 研究結果

(1) 患者紹介システム

インターネットを使って感覚器ネット症例登録ウェブページ <https://niso.kankakuki.go.jp/karte/login.jsp> から患者情報を安全に入力できるシステムを確立した。暗号化は一般に使われているSSL方式を採用し、通信は双方向ではなく一回限りの受信方向のみとすることにより安全性を高めている。登録用ウェブサーバーは受信した内容を復号化して内容をチェックする。チェック項目としては入力規定に沿った内容であるか、ウイルスの感染はないか、不正なスクリプトが含まれていないかである。内容に不備がある場合には新規に送信を要求するメッセージを端末の画面に出力するようにした。内容に不備がない場合にはデータは東京医療センター内の厳重に管理された部屋に設置されているデータ格納用サーバーに移されここで保存される。オペレーターによってCD-Rへの書き込みが行われ、サーバー内のデータが消去されることにより不正アクセスが内・外部からあったとしても物理的にデータが存在しないようにした。

(2) 遺伝子診断システム

今回遺伝子診断の対象に日本人での解析が進んでいる緑内障遺伝子ミオシリンを選択した。試

験的に20の変異を選別してインベーター法とスタンフォード型ガラスチップなどを検討中である。

D. 考察

今回構築した感覚器ネット症例登録システムで問題となっているのが眼底写真などの添付ファイルの増加にともなう送信時間の延長である。各病院でのインターネットへの接続環境が異なり、中にはホスピネット以外にインターネットへの接続手段を持たない病院が多数あることが判明した。ホスピネットの送信速度では画像を送るのに時間がかかり効率的な症例登録が困難な状況にある。今回、我々は最近一般家庭でも普及してきたADSLなどの高速回線を利用してインターネット経由でも安全に症例を登録できるシステムを構築した。暗号化はオンライン銀行振り込みやオンラインショッピングなどで世界的に信頼を得ているSSL暗号化方式を採用した。端末コンピューターのOSをWindows 2000あるいはWindows XPに限定し、ブラウザもInternet Explorer 6.0以上の制限を設けることにより、暗号化が確実に行われるようにした。送り手と受け手との通信回数を1回に限定した結果、データ更新を行う際に過去のデータをサーバーから端末側に送信しない設計になっている。そのため過去データを見ながら更新内容のみを変更することができない。この問題を解決する手段として入力項目のテンプレート(FileMaker)を各施設に供給してこのプログラムで症例登録項目を入力し、CVSファイルを作成して、これを症例登録ウェブページに画像と同じよう手順で添付できるようにした。この改善によって入力者は送信済みのデータを手元に保存できるだけでなく、17施設が統一された入力項目形式を扱っているため、相互に情報を交換することも可能になった。今後細部にわたってこのネットワークの調整を行いたい。

遺伝子変異検出装置については近年原理的に異なる多数の方法が考案され紹介されているが感覚器疾患を対象としたもので稼動しているのではない。今回の調査で検出感度について満足できるものが複数存在することが確認された。しかしながらインベーター法を除く全ての方法ではPCRをする必要があり、この工程が入ることにより自動化が困難となり、また自動化した場合に高価な検出機になってしまうことが判明した。検出感度が高く、作業工程数が最も少ないインベーター法についてミオシリン遺伝子、オプチニュー

リン遺伝子で発見されている20の異なる変異を検出できる緑内障患者と正常者のDNA検体を使って現在実験が行われている。緑内障遺伝子診断システムの開発についてはすでに東京医療センター倫理委員会で承認されており、関連施設についても同様に申請を行うように要請を行っている。

E. 結論

国立病院と国立療養所あわせて17施設からなる感覚器ネットワークを構築してインターネットを用いた症例登録システムの試験運転を開始した。新たに開発した暗号化ウェブページ<https://niso.kankakuki.go.jp/karte/login.jsp>から東京医療センターのデータ格納用サーバーへ直接症例情報を入力することが可能となった。現在稼働中のプロジェクトは緑内障で、今後は黄斑変性などの他に耳鼻科のプロジェクトが参加する予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

岩田 岳

眼科診療 Q&A、先天異常・遺伝、東京、六法出版 28: 154-157 (2001)

2. 学会発表

Takeshi Iwata, Takatsune Nishiyama, Masato Wakakura, Shinsuke Umeda, Yukihiko Mashima, Yasuhiko Tanaka. Isolation of novel gene specifically expressed in rat retinal Muller cells and lung. The Association of Research in Vision and Ophthalmology, April-May 2001, Fort Lauderdale Florida USA

Yasuhiko Tanaka, Minoru Obazawa, Yukihiko Mashima, Setsuko Noda, Jun Kudoh, Nobuyoshi Shimizu, Takeshi Iwata. Cloning and characterization of porcine MYOC in culture porcine trabecular meshwork cells and astrocytes from optic nerve head. The Association of Research in Vision and Ophthalmology, April-May 2001, Fort Lauderdale

Florida USA

Fumino Iwata, Shinsuke Umeda, Michihiro T. Suzuki, Yasuhiro Yoshikawa, Keiko Fujiki, Atsushi Kanai, Yasuhiko Tanaka, Takeshi Iwata. Isolation of novel genes enriched in macular region of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) retina. The Association of Research in Vision and Ophthalmology, April-May 2001, Fort Lauderdale Florida USA

Yutaka Imamura, Qiang Zhang, Yukihiro Mashima, Setsuko Noda, Shinsuke Umeda, Jun Kudoh, Nobuyoshi Shimizu, Yasuhiko Tanaka, Takeshi Iwata. Cloning of novel amine oxidase gene specifically expressed in mouse retinal ganglion cells. The Association of Research in Vision and Ophthalmology, April-May 2001, Fort Lauderdale Florida USA

Y Mashima, Y Suzuki, Y Ohtake, T Tanino, M Aihara, H Tanihara, M Inatani, N Azuma, T Iwata, M Araie. Low incident of the *CYP11B1* gene mutation in Japanese patients with primary congenital glaucoma. The Association of Research in Vision and Ophthalmology, April-May 2001, Fort Lauderdale Florida USA

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。 日本眼科学会 2001年4月 (横浜)

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。 ブタ MYOC 遺伝子のクローニングおよび発現機構の解析。 日本眼科学会 2001年4月 (横浜)

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。 日本眼科学会 2001年4月 (横浜)

岩田 岳・梅田慎介・鈴木通弘・吉川泰弘・藤木慶子・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解析。 日本眼科学会 2001年4月 (横浜)

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

先天無虹彩における PAX6 遺伝子の変異

分担研究者 東 範行 国立成育医療センター眼科医長

研究要旨：先天無虹彩 4 2 例で染色体検査と PAX6 遺伝子変異の検索を行った。3 例で 1 1 番染色体短腕欠損があり、1 8 例（家族性 4 家系、孤発例 1 4 例）で PAX6 変異がみつかった。3 例で初めて missense 変異が見いだされた。遺伝子型と表現型に相関はなく、これは Pax6 が下流に膨大な遺伝子を従え、その発現様式に差があるためと思われた。

A. 研究目的

PAX6 遺伝子は、眼形成の master control 遺伝子であり、ヒトでは先天無虹彩、Peters 奇形などの前眼部疾患で変異が見つかっている。しかし、その遺伝子型と変異型の関係に関する検討は少ない。先天無虹彩は、虹彩にとどまらず眼球全体に障害が起こる。PAX6 遺伝子の変異が先天無虹彩であることはほぼ確立されたが、これまでに報告された症例は約 90 例に過ぎない。本研究では、先天無虹彩における PAX6 遺伝子の変異を検索し、その遺伝子型と変異型の関係を検討した。

B. 研究方法

インフォームドコンセントをとった後、先天無虹彩 4 2 例の末梢血を採取し、まず染色体検査を行った。さらに余剰血液からゲノム DNA を調整した。これらの DNA を用いて、PAX6 遺伝子の各 exon を PCR-SSCP 法でスクリーニングした。band shift が認められたものは subcloning を行い、塩基配列を決定した。

変異のみつかった症例では、遺伝子型と表現型（虹彩欠損の程度、角膜混濁、白内障、緑内障、黄斑低形成、視神経低形成の有無、視力）を比較検討した。

C. 研究結果

4 2 例中 3 例で 1 1 番染色体短腕欠損があり、さらに他の 1 8 例（家族性 4 家系、孤発例 1 4 例）で PAX6 変異がみつかった。その内訳は以下の通りである。

Exon5 : frameshift(ins527G) ; S24F(C488 → T) ; Q27X(C496 → T) ; R44(G548 → A) ; N17S(A467 → G)I29V(A502 → G)3'intron 12塩基挿入(以上 3 つは同一症例) ; 3'splice error (別個に 2 例)

Exon 8 : Q178H(G951 → T); frameshift(ins969G); R203X(C1024 → T) (別個に 2 例)

Exon 9 : R240X(C1135 → T) (別個に 2 例)

Exon 10 : Q277X(C1246 → T)

Exon 11 : frameshift(del1434 → T)

各症例で、虹彩欠損の程度、角膜混濁や白内障の有無、緑内障の合併と発症年齢はさまざまであった。黄斑低形成はすべての症例に合併し、視神経低形成は 1 例だけにみられた。視力も白内障を有するものを除いて、0.01-0.4 と多彩であり、主に黄斑障害が原因であると思われた。これらの遺伝子型と表現型に明らかな相関はなかった。家族性のものでも、虹彩の欠損が完全であったり、一部分であったり、臨床像が多彩であった。しかし、同一症例の左右眼では、虹彩の形態や視力など、臨床像はほぼ同一であった。

D. 考察

PAX6 は先天無虹彩の原因遺伝子として 1991 年に positional cloning によって発見された。以来多くの変異が見いだされ、先天無虹彩の原因遺伝子であることが確立されている。変異の発見率は無虹彩症例の 60-70% であるといわれるが、今回も、ほぼ半数症例に該当領域の染色体異常ないしは PAX6 変異がみつかった。変異の見つからなかった例は、他の遺伝子が関与していることも否定はできないが、むしろ PAX6 遺伝子を含む領域が欠損しているが染色体検査レベルでは検出できない microdeletion である可能性が高い。個別の症例で同じ変異が見つかったものがあり、これは founder effect も否定はできないが、両親に変異のない明らかな孤発例であったので、変異の起こりやすい hot spot であると考えられる。これら同一変異であっても、表現型は多彩であった。

先天無虹彩の PAX6 変異は、これまでの報告ではいずれも nonsense、frameshift、splice error であった。これにより、片側の allele が機能しないために疾患が起こる haploinsufficiency 説が支持されてきた。しかし、今回 3 例の missense 変異が見つかったことは、本疾患の成立に dominant negative のような他の機能が働いていることを示唆している。

変異の遺伝子型と表現型の間には相関がなかった。しかも、家族例あるいは孤発例同士で同一の変異をもっているにもかかわらず、臨床像は多彩であった。しかも染色体異常があり、片側 allele がすべて欠損しているにもかかわらず、軽度の missense 変異であっても同様に無虹彩症を起こしていた。これは、PAX6 が角膜、虹彩、水晶体、網膜の発生において運命づけには重要であっても、個々の組織の細かい形成過程は下流の遺伝子が担っているからである。いいかえれば、眼発生のさまざまな時期に発現し、しかも下流に膨大な遺伝子を支配しているため、これら下流遺伝子のわずかな発現様式に差が起こっても表現型に違いが起こるためと思われる。その発現様式は、個人差があるものの、同一個人内では同じであり、このため症例間では表現型が多彩になる一方で、一個人の左右眼の所見には差がなかったと説明できる。

今後は、これらの変異体を用いた *in vivo* の系で、疾患の成立機転に関する研究を行う必要がある。

E. 結論

先天無虹彩 4 2 例で染色体検査と PAX6 遺伝子変異の検索を行った。3 例で 1 1 番染色体短腕欠損があり、1 8 例（家族性 4 家系、孤発例 1 4 例）で PAX6 変異が見つかった。3 例で初めて missense 変異が見いだされた。遺伝子型と表現型に相関はなく、これは Pax6 が下流に膨大な遺伝子を従え、その発現様式に差があるためと思われた。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

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

Kosuga M, Sasaki K, Tanabe A, Li XK, Okawa H, Ogino I, Okuda O, Arai H, Sakuragawa N, Kamata Y, Azuma N, Suzuki S, Yamada M, Okuyama T.
Engraftment of genetically engineered amniotic epithelial cells corrects lysosomal storage in multiple areas of the brain in Mucopolysaccharidosis type VII mice. *Molecular therapy* 2001; 3: 139-148.

Kawase E, Azuma N. A case of atypical WAGR syndrome with anterior segment anomaly and microphthalmos. *Arch Ophthalmol* 2001; 119:1855-1856.

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

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 長崎眼科学研究会 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

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kamata Y, Okuyama T, Kosuga M, O'hira A, Kanaji A, Sasaki K, Yamada M, Azuma N	Adenovirus-mediated gene therapy for corneal clouding in mice with mucopolysaccharidosis type VII.	Mol Ther	4(4)	307-312	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, Yamada M, Okuyama T.	Engraftment of genetically engineered amniotic epithelial cells corrects lysosomal storage in multiple areas of the brain in mucopolysaccharidosis type VII mice.	Mol Ther	3(2)	139-148	2001
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	日眼会誌	104	960-985	2001
Kawase E, Azuma N.	A case of atypical WAGR syndrome with anterior segment anomaly and microphthalmos	Arch Ophthalmol	119	1855-1856	2001
Nishina S, Azuma N.	Severe macular pucker after infantile retinal detachment surgery	Br J Ophthalmol		in press	2001
東 範行	視線を合せる脳の領域	日本の眼科	72	335	2001
東 範行	未熟児網膜症	あたらしい眼科	12	1460-1488	2001
東 範行	未熟児網膜症の眼底検査法	日本の眼科	73	11-14	2002

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
分担研究報告書

成育医療ネットワークを利用した小児先天異常症における遺伝子診断システムの確立

分担研究者： 奥山虎之 国立成育医療センター 遺伝診療科 医長

研究要旨： 小児先天異常症の多くは、稀少疾患であり、遺伝子診断にあたっては多くの研究施設が協力してネットワークを形成することが必要である。われわれは、国立病院成育医療ネットワークに参画している全国の国立病院における遺伝子診断の実施状況とその問題点について調査研究を行った。その結果、小児先天異常症のうち約 20 種類について遺伝子診断が可能であることが判明した。しかし、検査前の遺伝カウンセリングなどの倫理的配慮は不十分であり、遺伝専門医の育成を含めた遺伝医療システムの構築の必要性が示された。

A. 研究目的

小児先天異常症の多くは稀少疾患であり、その遺伝子診断は、それぞれの疾患を専門的に研究する研究施設に依存している場合がほとんどである。しかし、臨床診断として確立されるに従い、研究的な意義が薄れていくのが現状であり、臨床目的での遺伝子診断を存続させることは困難な状況となっている。今回、国立病院成育医療ネットワークに参画している国立病院のなかで実際に診断目的での遺伝子診断を実施している施設を対象として遺伝子診断の現状とその問題点について検討した。

B. 研究方法

小児先天異常症の遺伝子診断を院内で実施している成育医療ネットワーク参加国立病院・療養所 5 施設（国立成育医療センター、国立南札幌病院、国立療養所東埼玉病院、国立三重病院、国立香川小児病院）で過去 5 年間に行われた遺伝子診断の疾患名を調査した。また、遺伝子診断の実施上の問題点についても検討した。

C. 研究結果

成育医療ネットワーク参加病院で実施された遺伝子診断は、合計 18 疾患であり、その内訳は、先天代謝異常症 7、神経筋疾患 5、骨系統疾患 3、内分泌 2、腎 1 である、眼疾患は網膜分離症のみであった。詳細を以下に示す。

先天代謝異常症

フェニルケトン尿症
持続性高メチオニン血症
古典的シトルリン血症
成人型（II 型）シトルリン血症

中鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症
糖原病 Ia 型
カルバミルリン酸合成酵素欠損症

神経・筋疾患

Pelizaeus-Merzbacher 病
神経管開存症
RETT 症候群
Duchenne/Becker 型 筋ジストロフィー
Waardenburg-Hirschsprung 病

骨系統疾患

軟骨無形成症
致死性四肢短縮症
Cleidocranial dysplasia

内分泌疾患

先天性甲状腺機能低下症
先天性副腎皮質過形成

腎疾患

シスチン症

眼疾患

網膜分離症

D. 考察

今回の検討により、18 疾患の遺伝子診断が成育医療ネットワークで実施されていることが判明した。これらの検査技術は、あらたな症例にたいしても実施可能な状態にあるので、今後は、ホスピタル等のコンピューターネットワークを利用し広く情報を公開する方向で検討し、新たな症例の出現に備える必要がある。

今回の検討は、遺伝子診断を実施する際の問題

点についても同時に明らかにすることが出来た。遺伝子診断については、発症者の診断結果が家族の他のメンバーにも影響を与える可能性があること、疾患によっては病気を発症するまえに高い確立で発症の予測ができることなど一般的な臨床検査と異なる問題があり、さらに小児の場合親の代諾による遺伝子診断がどこまで許されるかなど倫理的な配慮が必要になる。それらの問題は検査前の遺伝カウンセリングで十分に説明する必要があるが、遺伝カウンセリングを行える遺伝専門医は明らかに不足しており、これをいかに補うかが今後の課題といえる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yuko Kamata, Torayuki Okuyama, Motomichi Kosuga, Aya O'hira, Arikano Kanaji, Kyoko Sasaki, Masao Yamada, and Noriyuki Azuma. Adenovirus-mediated Gene Therapy for corneal clouding in mice with mucopolysaccharidosis type VII. *Molecular Therapy* 4, 307-312, 2001

Fujino M, Li XK, Kitazawa Y, Funeshima N, Guo L, Okuyama T, Amano T, Amemiya H, Suzuki S. Selective repopulation of mice liver after Fas-resistant hepatocyte transplantation. *Cell Transplant.* 10: 353-361 2001;.

Kosuga M, Sasaki K, Tanabe A, Li XK, Ohkawa H, Ogino I, Okuda O, Arai H, Sakuragawa N, Kamata Y, Azuma N, Suzuki S, Yamada M, Okuyama T. 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;..

Hirotohi Ebinuma, Hidetsugu Saito, Motomichi Kosuga, Kanji Wakabayashi, Yoshimasa Saito, Tamako Takagi, Nobuhiro Nakamoto, Satoshi Kurita, Torayuki Okuyama and Hiromasa Ishii. Reduction of c-myc expression by an antisense approach under Cre/loxP switching induces apoptosis in human liver cancer cells. *Journal of Cellular Physiology* . 188:56-66, 2001.

Fujino M, Li XK, Suda T, Hashimoto M, Okabe K, Yaginuma H, Mikoshiba K, Guo L, Okuyama T, Enosawa S, Amemiya H, Amano T, Suzuki S. In vitro prevention of cell-mediated xenograft rejection via the Fas/FasL-pathway in CrmA-transduced porcine kidney cells. *Xenotransplantation.*8:115-124, 2001.

Li XK, Fujino M, Sugioka A, Morita M, Okuyama T, Guo L, Funeshima N, Kimura H, Enosawa S, Amemiya H, Suzuki S. 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.* 27; 503-508, 2001

Ohba M, Li XK, Kita Y, Enosawa S, Funeshima N, Nagai H, Zhang HQ, Okuyama T, Ogoshi S, Sasaguri S, Amemiya S, Suzuki S. The combined therapy of CTLA4Ig-gene transfection with FTY720: FTY720 may enhance the effect of gene therapy. *World J Surg.* 25:391-397, 2001

Motomichi Kosuga, Satoru Takahashi, Akiko Tanabe, Masayuki Fujino, Xiao-Kang Li, Seiichi Suzuki, Masao Yamada, Kohji Kakishita, Fumiko Ono, Norio Sakuragawa, and Torayuki Okuyama. Widespread distribution of adenovirus-transduced monkey amniotic epithelial cells after local intra-cerebral injection: Implication for cell-mediated therapy for lysosome storage disorders. *Cell Transplant.* 10:435-439, 2001.

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

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yuko Kamata, Torayuki Okuyama, Motomichi Kosuga, Aya O'hira, Arihiko Kanaji, Kyoko Sasaki, Masao Yamada, and Noriyuki Azuma	Adenovirus-mediated Gene Therapy for corneal clouding in mice with mucopolysaccharidosis type VII.	Molecular Therapy	4	307-312	2001
Fujino M, Li XK, Kitazawa Y, Funeshima N, Guo L, Okuyama T, Amano T, Amemiya H, Suzuki S	Selective repopulation of mice liver after Fas-resistant hepatocyte transplantation.	Cell Transplant	10	353-361	2001
Kosuga M, Sasaki K, Tanabe A, Li XK, Ohkawa H, Ogino I, Okuda O, Arai H, Sakuragawa N, Kamata Y, Azuma N, Suzuki S, Yamada M, Okuyama T	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
Hirotoishi Ebinuma, Hidetsugu Saito, Motomichi Kosuga, Kanji Wakabayashi, Yoshimasa Saito, Tamako Takagi, Nobuhiro Nakamoto, Satoshi Kurita, Torayuki Okuyama and Hiromasa Ishii.	Reduction of c-myc expression by an antisense approach under Cre/loxP switching induces apoptosis in human liver cancer cells.	Journal of Cellular Physiology	188	56-66	2001
Fujino M, Li XK, Suda T, Hashimoto M, Okabe K, Yaginuma H, Mikoshiba K, Guo L, Okuyama T, Enosawa S, Amemiya H, Amano T, Suzuki S	In vitro prevention of cell-mediated xenograft rejection via the Fas/FasL-pathway in CrmA-transduced porcine kidney cells.	Xenotransplantation	8	115-124	2001
Li XK, Fujino M, Sugioka A, Morita M, Okuyama T, Guo L, Funeshima N, Kimura H, Enosawa S, Amemiya H, Suzuki S.	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	27	503-508	2001
Ohba M, Li XK, Kita Y, Enosawa S, Funeshima N, Nagai H, Zhang HQ, Okuyama T, Ogoshi S, Sasaguri S, Amemiya S, Suzuki S	The combined therapy of CTLA4lg-gene transfection with FTY720: FTY720 may enhance the effect of gene therapy.	World J Surg	25	391-397	2001
Motomichi Kosuga, Satoru Takahashi, Akiko Tanabe, Masayuki Fujino, Xiao-Kang Li, Seiichi Suzuki, Masao Yamada, Kohji Kakishita, Fumiko Ono, Norio Sakuragawa, and Torayuki Okuyama	Widespread distribution of adenovirus-transduced monkey amniotic epithelial cells after local intra-cerebral injection: Implication for cell-mediated therapy for lysosome storage disorders.	Cell Transplant	10	435-439	2001

Program Nr: 1083

Isolation of Novel Gene Specifically Expressed in Rat Retinal Muller Cells and Lung. T. Iwata¹, T. Nishiyama^{1,2}, M. Wakakura³, S. Umeda^{1,4}, Y. Mashima², Y. Tanaka¹. National Institute of Sensory Organs, National Tokyo Medical Center, Tokyo, Japan¹, Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan², Department of Ophthalmology, Kitasato University School of Medicine, Sagamihara, Japan³, Department of Biomedical Science, Graduate School of Agriculture and Life Sciences, University of Tokyo, Tokyo, Japan⁴.

Purpose: To clone and characterize novel gene specifically expressed in retinal Muller cells.

Methods: Muller cells were isolated from Sprague-Dawley rat retina and cultured as previously described (Wakakura, et al., IOVS 29:892-900, 1988). Muller cells cDNA was subtracted by pool of cDNA from brain, kidney, skeletal muscle, and skin using PCR-select cDNA subtraction method (PCR-Select cDNA Subtraction Kit, Clontech Laboratories, Inc.). Amplified subtracted genes were subcloned into TA-cloning vector (AdvanTAge PCR Cloning Kit, Clontech Laboratories, Inc.) for dye-labeled terminator cycle sequencing (CEQ2000XL, Beckman Coulter, Inc.). Northern blot analysis and real-time quantitative PCR (GeneAmp5700, PE Biosystems, Inc.) were performed to compare expression levels in various tissues. **Results:** Four PCR products were obtained from this subtraction. One unknown gene (MC1) and three known genes (elongation factor-1-alpha, mitochondria cytochrome oxidase subunit, staufer isoform Stau-16) were identified. Among the eight different total RNA samples (Muller cells, Eye, Brain, Heart, Kidney, Liver, Lung) tested, MC1 showed significant higher expression in Muller cells and lung compared to other tissues. MC1 expression level was 128-fold higher than the brain. The size of MC1 mRNA was determined to be approximately 5 Kb by northern blot analysis. **Conclusions:** A novel gene specific to Muller cells and lung was isolated from primary rat Muller cells by PCR-select cDNA subtraction method. Detail characterization of this gene is in progress.

CR: None Support: The Japanese Ministry of Health and Welfare, The Japanese Ministry of Education, Science, Sports and Culture.

Program Nr: 4455

Cloning and Characterization of Porcine MYOC in Cultured Porcine Trabecular Meshwork Cells and Astrocytes from Optic Nerve Head. Y. Tanaka ¹, M. Obazawa ^{1,2}, Y. Mashima ², S. Noda ³, J. Kudoh ⁴, N. Shimizu ⁴, T. Iwata ¹. National Institute of Sensory Organs, National Tokyo Medical Center, Tokyo, Japan¹, Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan², Department of Nursing, School of Health Science, Tokai University, Isehara, Kanagawa, Japan³, Department of Molecular Biology, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan⁴.

Purpose: Porcine MYOC gene was cloned and investigated for change in expression level in cultured porcine trabecular meshwork cells (TMC) and astrocytes from optic nerve head treated with dexamethasone and TGF- β 1. **Methods:** Coding region of porcine MYOC cDNA was amplified by RT-PCR using primers designed from conserved sequence between human, mouse, rat, and bovine. The lacking 5' and 3' cDNA ends were amplified by 5' and 3' RACE method respectively. Cultured cells were treated with dexamethasone (500nM, for 2weeks) and TGF- β 1 (10ng/ml, for 3days). The expression level of the MYOC gene in TMC and astrocytes were analyzed by real-time quantitative PCR (GeneAmp5700, PE Biosystems, Inc.). **Results:** Porcine MYOC protein was composed of 489 amino acids, which was 79.4% identical with that of human MYOC protein. Porcine MYOC protein also contained leucine zipper motif ranging from 103 to 152 aa similar to human MYOC protein. Most of the mutated amino acid residues reported for glaucoma in human MYOC were conserved in the porcine MYOC protein. Treatment with dexamethasone was shown to increase MYOC expression by 31.5 fold and 1.78 fold in TMC and astrocytes respectively. Unexpectedly, MYOC expression in TGF- β 1 treated TMC decreased by 4.72-fold while astrocytes increased by 1.85-fold. **Conclusions:** A full-length porcine MYOC gene was identified. High degree of sequence similarity was observed between porcine and human MYOC gene. The effect of MYOC expression by dexamethasone and TGF- β 1 treatment were significantly different for TMC and astrocytes. **CR:** None **Support:** The Japanese Ministry of Health and Welfare, the Japanese Ministry of Education

Program Nr: 1206

Isolation of Novel Genes Enriched in Macular Region of Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*) Retina. F. Iwata ¹, S. Umeda ^{2,3}, M.T. Suzuki ⁴, Y. Yoshikawa ³, K. Fujiki ¹, A. Kanai ¹, Y. Tanaka ², T. Iwata ². Department of Ophthalmology, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan¹, National Institute of Sensory Organs, National Tokyo Medical Center, Tokyo, Japan², Department of Biomedical Science, Graduate School of Agriculture and Life Sciences, University of Tokyo, Tokyo, Japan³, The Corporation for Production and Research of Laboratory Primate, Tsukuba, Japan⁴.

Purpose: To clone and characterize novel genes enriched in the macular region of primate retina.

Methods: Maintenance and care of monkeys was in accordance with the NIH Guide for the use and care of laboratory animals. The experiments were conducted according to the ARVO resolution.

Macular and peripheral region of five years old Cynomolgus monkey retina were punched out as 3 mm disks. Both retina and RPE layers were separated from choroids and mRNA was isolated. From each punched tissue sample, 140 ng of mRNA was isolated. Double strand cDNA was developed from 50 ng of mRNA and amplified to 2.5g by 17 cycles of LD-PCR (PCR cDNA Synthetic Kit, Clontech Laboratories, Inc.). PCR-select cDNA subtraction method (PCR-Select cDNA Subtraction Kit, Clontech Laboratories, Inc.) was performed to selectively amplify macular enriched genes compared to peripheral retina. Subtracted cDNA were then subcloned for dye-labeled terminator cycle sequencing (CEQ2000XL, Beckman Coulter, Inc.). Expression level of each gene was compared between macular and peripheral total RNA using real-time quantitative PCR method (GeneAmp5700, PE Biosystems, Inc.).

For internal control, 18S ribosomal RNA, GAPDH, β -actin, and transcription factor IID were used. **Results:** Out of 100 subtracted genes, 35 were unknown genes. Expression levels of 14 unknown genes were then compared between macular and peripheral retina. Two novel genes (M1, M2) were confirmed to express higher in macular region. M1 and M2 showed 305 % and 273 % higher expression than peripheral retina respectively. **Conclusions:** Two novel genes enriched in macular region of Cynomolgus monkey retina were isolated. Approximately 3-fold higher expression were measured in macular compared to peripheral retina for both genes.

CR: None Support: The Japanese Ministry of Health and Welfare, The Japanese Ministry of Education, Science, Sports and Culture.

Program Nr: 2227

Cloning of Novel Amine Oxidase Gene Specifically Expressed in Mouse Retinal Ganglion Cells.

Y. Imamura ^{1,2}, Q. Zhang ^{2,1}, Y. Mashima ¹, S. Noda ³, S. Umeda ^{2,4}, J. Kudoh ⁵, N. Shimizu ⁵, Y. Tanaka ², T. Iwata ². Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan¹, National Institute of Sensory Organs, National Tokyo Medical Center, Tokyo, Japan², Department of Nursing, School of Health Science, Tokai University, Kanagawa, Japan³, Department of Biomedical Science, Graduate School of Agriculture and Life Sciences, University of Tokyo, Tokyo, Japan⁴, Department of Molecular Biology, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan⁵.

Purpose: To characterize novel amine oxidase specifically expressed in mouse retinal ganglion cells. **Methods:** The human retina specific amine oxidase (RAO) cDNA previously cloned by subtractive differential screening was used to screen mouse retinal cDNA library. Northern blot analysis and real-time quantitative PCR analysis were performed to compare expression levels in various mouse tissues. *In situ* hybridization was performed to locate mouse RAO transcript in the eye tissue section. Promoter sequence was also characterized and compared with human RAO promoter. Three peptide antibodies of human RAO were developed for immunostain and western blot analysis. The coding sequence of human RAO cDNA was cloned into expression vectors (pTrcHis & pTrcHis2, Invitrogen, Inc.) for bacteria expression. Purified protein was test for diamine oxidase acitivity using putrescine as substrate. **Results:** Mouse RAO cDNA sequence (2,535 bp) had 75-85 % homology with human RAO and other amine oxidases. Northern blot analysis and real-time quantitative PCR analysis showed specific expression in the eye. Majority of RAO expression was observed in retinal ganglion cells by *In situ* hybridization and immunostain. Neighboring gene was identified upstream of both mouse (-1.3 Kb) and human (-0.8 Kb) gene. Sequence comparison of these limited promoters revealed less than 20 % homology. Only 4 short stretch of sequences were identical in the entire promoter sequence. **Conclusions:** A novel amine oxidase was cloned and localized specifically to mouse retinal ganglion cells. Further characterization of this protein is in progress.

CR: None Support: The Japanese Ministry of Health and Welfare, The Japanese Ministry of Education, Science, Sports and Culture.

Low Incidence of the *CYP1B1* Gene Mutation in Japanese Patients with Primary Congenital Glaucoma. Y. Mashima¹, Y. Suzuki², Y. Ohtake¹, T. Tanino¹, M. Aihara², H. Tanihara³, M. Inatani⁴, N. Azuma⁵, T. Iwata⁶, M. Araie². Dept. of Ophthalmology, School of Medicine Keio University, Tokyo, Japan¹; Dept. of Ophthalmology, University of Tokyo Graduated School of Medicine, Tokyo, Japan²; Dept. of Ophthalmology, Tenri Yorozu Hospital, Nara, Japan³; Dept. of Ophthalmology and Visual Sciences, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan⁴; Dept. of Ophthalmology, National Children's Hospital, Tokyo, Japan⁵; National Institute of Sensory Organs, National Tokyo Medical Center, Tokyo, Japan⁶

Purpose. To investigate mutations in the *CYP1B1* gene in Japanese patients with primary congenital glaucoma (PCG).

Methods. We screened 65 unrelated Japanese patients with PCG by PCR-SSCP followed by direct sequencing analysis. PCG haplotypes were constructed with intragenic polymorphisms in affected individuals.

Results. Seven novel mutations were detected in 9 (14%) of the 65 unrelated patients. Three of the 7 mutations were predicted to truncate the *CYP1B1* open reading frame. Four were missense mutations and located in the conserved core structures that determine the proper folding and heme-binding ability of cytochrome P450 molecules. Only one patient showed a homozygous mutation. A Val364Met mutation was detected in 6 of the 9 PCG patients (6 of the 18 alleles) with the same intragenic haplotype.

Conclusions. The incidence of a mutation in the *CYP1B1* gene in patients with PCG is low in Japan. A Val364Met may be a founder mutation in Japanese patients.

CR:N

20010770

以降は雑誌/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」をご参照ください。