

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。

(9) 良好な視野を獲得するための眼球構造に SHH と PAX6 が関与：視野と中心視力は、(レンズにより点対称となるが) 対応する網膜上の部位における光受容体の密度と相関することが知られている。最も視力の高い中心視力は黄斑の位置に対応する。ヒトを含む類人猿やフクロウなどは明確な顔を持ち、眼は顔に、すなわち前面に位置するが、その場合でも視野は左右に均等ではなく、鼻側に狭く、外側に広い(網膜上では逆に鼻側に狭く、側頭側に広い)。一方、多くの脊椎動物では眼は頭の側部に位置するが、その場合でも、単に左右方向(前方に直交する)を見るのに適しているのではなく、前方を見るのに適するように黄斑(またはそれに代わる部位)は側頭側に位置している。

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

(10) PAX6 のエクソン 5a の機能：我々は以前に、孤立性黄斑低形成症の患者で、PAX6 のペアドドメイン C 末端半分にミスセンス変異を見出した(Nature Genet. 1996)。無虹彩症では眼の外部の形成不全に加え網

膜部位にも症状が見られ、一方、PAX6 のペアドドメイン N 末半分に位置するミスセンス変異は眼の外部のみの異常を伴う Peter 奇形となることから、ペアドドメイン N 末半分の DNA 結合によって眼の外部の形成が制御され、一方、C 末半分の DNA 結合によって眼の内部(網膜)の形成が制御されるという仮説を提唱した。PAX6 のエクソン 5a 有無による 2 種類のアイソフォームの転写量比についてはこれまでも報告があり、エクソン 5a を含まないアイソフォームが多いという結果が一般的である。マウスの発生時期での 2 種類のアイソフォームの発現量比を解析した。特に、眼に付いては微細に解剖し、各部位での量比を詳細に解析した。ステージ 12 は眼胞が形成される時期であるが、それ以降、各組織を通じて、基本的にエクソン 5a の無いアイソフォームが主要な転写物であった。しかしステージ 36-45 では、網膜の視神経乳頭に近い位置ではエクソン 5a 付きのアイソフォームの発現が増加し、場合によってエクソン 5a 無しのアイソフォームの量を超えることがわかった。それぞれのアイソフォームによる産物を区別できる特異性の高い抗体を用いて解析した結果も同様であった。エクソン 5a 付きの転写産物の増大の見られた部位では視神経への分化が進み、視細胞が蓄積してやがて黄斑が形成される部位に一致する。したがって、エクソン 5a の付いたアイソフォームは視神経の分化=黄斑形成に関与する可能性があることが本解析によっても確かめられた。

(11) 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。本年度、PAX6 のエクソン 5a 有無による 2 種類のアイソフォームの発現ベクターをニワトリ胚の眼部に注入し、発現させ、形態への影響を精査した。ステージ 14-16 のニワトリ胚の眼(原器)部位に発現ベクターを導入したところ、導入後 1-2 日に導入部位を中心に細胞分裂が活発化し、特に網膜層の限定された部位(点状)に肥

大化が認められ、孵化時には大きな眼が形成されていた。この効果はどちらのアイソフォームでも見られ、ほとんど差が無かった。しかし、眼の内部構造には著しい差が認められた。すなわち、エクソン 5a の無いアイソフォームでは、網膜層の限定された部位に肥大化が認められ、一定時期持続するが、やがて網膜層の肥大化は顕著でなくなった。稀に、肥大化した網膜層から視神経が眼腔内へ伸長している像が認められた。一方、エクソン 5a の有るアイソフォームでは、網膜層の限定された部位に肥大化が認められ、それが次第に拡大し、紐状構造が眼腔内へ伸長している像が多く得られた。場合によっては壁状構造が突出していた。紐あるいは壁状構造は、病理学的解析から網膜と同様の層構造をとり、また視細胞に分化した細胞が密集していた。したがって、エクソン 5a の付いた PAX6 は網膜にある視細胞前駆体からの分化を促進し、網膜の眼球に沿った伸展を促進したが、眼球内の表面に限りがあるため、伸展した網膜が眼腔内に突出したと推定した。この結果からもエクソン 5a の付いたアイソフォームは視神経の分化＝黄斑形成に関与することが示された。

(12) カスパーズの細胞内分布：アポトーシス反応は、最終的にカスパーズと呼ばれるシステインプロテアーゼによって実行される。現在までにヒトで 15 種類のカスパーズが同定され、そのうち 8 種類程度が主としてアポトーシスの実行分子として機能している。これらの酵素学的特性は詳細に解析されているが、細胞内分布について包括的な研究が無く、また相互に一致しない結果も多い。我々は発光クラゲ由来の緑色蛍光蛋白質と各カスパーズを融合蛋白質として発現させ、生細胞において共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内分布を解析した。その結果、多くのカスパーズが細胞質に存在したのに対し、カスパーズ 2 は核蛋白質であること、カスパーズ 8、10 は著明な繊維状構造物を形成すること等、いくつかの新しい知見を得た (Shikama et al. 2002)。

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

(14) 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ァイルを解析した結果、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。

(15) カスパーズ 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

シス実行プロテアーゼであるカスペースは、アポトーシスの刺激に応じて、先ず上流のカスペース（カスペース 2, 9, 10）が活性化され、次に、下流のカスペース（カスペース 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、カスペース 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ペース 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. 2001)。

(16) 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ペースの基質であること、伸長したポリグルタミンがカスペース活性化カスケードの引き金を引くことを報告し「カスペース活性化→ポリグルタミンを含む蛋白質の切断→凝集体の形成→カスペース活性化」という悪循環が生ずることを提唱してきた。本年度、このアポトーシス過程で、カスペース 8 とカスペース 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ペース 3 の活性化が生じることを明らかとした (U et al. 2001)。

(17) グルココルチコイド標的遺伝子の解析: グルココルチコイド (GC) は生体内で産生されるステロイドホルモンであるが、白血病などに対する化学療法剤としても使用される。GC は幼若なリンパ球や白血病

細胞に細胞周期の停止とアポトーシス (細胞死) を誘導することが知られており、これが抗がん剤としての作用機序と考えられるが、その詳細な機構は不明である。これまでに、癌遺伝子 bcl-2 がカスペースの上流で GC によるアポトーシスを抑制することなどを明らかにしてきた。今年度、GC でアポトーシスを起こす白血病細胞株を用いて、遺伝子発現プロファイルの変化を DNA マイクロアレイ法で解析し、GC によって発現量の増加する遺伝子 93 個と減少する遺伝子 28 個を同定した (Yoshida et al. 2002)。これらの遺伝子の多くが複数の白血病細胞株で同様の変動を示すことがわかったことから、これらの研究成果は GC の薬効機序の解明に寄与すると考える。

(18) アポトーシス誘導による形態形成不全症モデル構築: 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、足の形態変形を誘導した。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、各部位の形成は維持されるが、形成軸に変化を生じ、ポラリティーの変化した足が形成された。

(19) DRPLA 遺伝子の機能解析とヒトにおける形態形成への関与の検討: DRPLA 遺伝子はトリプレットリピート伸長により神経変性疾患を生じる。最近、ショウジョウバエの DRPLA ホモログは転写制御因子をコードし、初期胚におけるパターン制御に関与し、変異体では眼や羽の形成異常を呈することが示された。ヒト DRPLA が形態形

成に関与するか否かを明らかにするために、まず発生時期における発現様式を検討した。RT-PCR 法により、9.5 日マウス胚以降で検出された。In sit ハイブリッド法により、予想通り、神経管を中心に強い発現が認められたが、それに加えて、肢芽で高い発現を認めた。ショウジョウバエにおける羽の形成異常との関係で興味深い知見である。転写調節因子の可能性を検討するため、まず DRPLA 蛋白のリン酸化状態を検討した。DRPLA 蛋白質ではセリン残基がリン酸化を受けていることを見出した。リン酸化過程に JNK キナーゼが関与することを in vitro 反応で確認し、また主たる標的残基を特定した。

D. 結論

発生時期に作動する転写因子は変異（特にミスセンス変異）によって様々な病態を呈することを明らかにしてきた。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 N. Azuma, A. Hirakiyama, T. Inoue, A. Asaka, & M. Yamada. Mutations of a human homologue of the Drosophila eyes absent gene (EYA1) detected in patients with congenital cataracts and ocular anterior segment anomalies. Hum. Mol. Genet. 9, 363-366, 2000.

2 K. Komatsu, T. Miyashita, H. Hang, K. M. Hopkins, W. Zheng, S. Cuddeback, M. Yamada, H. B. Lieberman & H.-G. Wang. Human homologue of S. pombe Rad9 interacts with BCL-2/BCL-XL and promotes apoptosis. Nature Cell Biol., 2, 1-6, 2000.

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

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

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

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

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

8 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..

- 9 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.
- 10 E. Kawase, K. Tanaka, T. Honna & N. Azuma. A case of atypical WAGR syndrome with anterior segment anomaly and microphthalmos. *Arch. Ophthalmol.* 119, 1855-1856, 2001.
- 11 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.
- 12 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.
- 13 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.
- 14 Y. Mashima, Y. Suzuki, Y. Sergeev, Y. Ohtake, T. Tanino, I. Kimura, H. Miyata, M. Aihara, H. Tanihara, M. Inatani, N. Azuma, T. Iwata & M. Araie. Novel cytochrome P4501B1 (CYP1B1) gene mutations in Japanese patients with primary congenital glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 2211-2216, 2001.
- 15 Y. Okamura-Oho, T. Miyashita & M. Yamada. Distinctive tissue distribution and phosphorylation of IRSp53 isoforms. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 289, 957-960, 2001.
- 16 Y. Shikama, M. U, T. Miyashita & 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.
- 17 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.
- 18 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..
- 19 M. Ayaki, N. Ohoguro, N. Azuma, Y. Majima, K. Yata, N. Ibaraki, DP. Singh, V. Ko & T. Shinohara. Detection of cytotoxic anti-LEDGF autoantibodies in atopic dermatitis. *Autoimmunity*, 35, 319-327, 2002.
- 20 H. Inoue, H. Takemura, Y. Kawai, A. Yoshida, T. Ueda & T. Miyashita. Dexamethasone-resistant human pre-B leukemia 697 cell line evolving elevation of intracellular glutathione level: An additional resistance mechanism. *Jpn. J. Cancer Res.* 93, 582-590, 2002.
- 21 S. Nishina & N. Azuma. Severe macular pucker after retinal detachment surgery in an infant. *Br. J. Ophthalmol.* 86, 354-355, 2002.
- 22 X. -K. Li, M. Kosuga, K. Tokieda, A. Kanaji, Y. Fukuhara, M. Hashimoto, K. Okabe, H. Yaginuma, M. Yamada, S. Suzuki & T. Okuyama. Prolongation of transgene expression by coexpression of cytokine response modifier a in rodent liver after adenoviral gene transfer. *Mol. Ther.*, 5, 262-268, 2002.
- 23 Y. Sano, J. Yamada, Y. Ishino, W. Adachi,

S. Kawasaki, T. Suzuki, S. Kinoshita, T. Okuyama & N. Azuma. Non-cleavable mutant Fas ligand transfection of donor cornea abrogates ocular immune privilege. *Exp Eye Res* 75, 475-483, 2002.

外国 12件

詳細は省略

24 Y. Shikama, L. Shen, M. Yonetani, J. Miyauchi, T. Miyashita & M. 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.

25 N. L. Yoshida, T. Miyashita, M. U, M. Yamada, J. C. Reed, Y. Sugita & T. Oshida. Analysis of gene expression patterns during glucocorticoid-induced apoptosis using oligonucleotide arrays. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 1254-1261, 2002.

26 Y. Kamata, A. Tanabe, A. Kanaji, M. Kosuga, Y. Fukuhara, X.K. Li, S. Suzuki, M. Yamada, N. Azuma & T. Okuyama. Long-term normalization in the central nervous system, ocular manifestations, and skeletal deformities by a single systemic adenovirus injection into neonatal mice with mucopolysaccharidosis VII. *Gene Ther.* 10, 406-414, 2003.

27 K. Fujii, T. Miyashita, T. Omata, K. Kobayashi, J-I. Takanashi, K. Kochi, M. Yamada & Y. Kohno. Gorlin syndrome with ulcerative colitis in a Japanese Girl. *Am. J. Med. Genet.* (in press).

28 K. Fujii, Y. Kohno, K. Sugita, M. Nakamura, Y. Moroi, K. Urabe, M. Furue, M. Yamada & T. Miyashita. Mutations in the human homologue of *Drosophila* patched in Japanese nevoid basal cell carcinoma syndrome patients. *Human Mutation* (in press).

29 N. Azuma, Y. Yamaguchi, H. Handa, A. Asaka, K. Tadokoro & M. Yamada. Mutations of the PAX6 gene detected in patients with a variety of optic nerve malformations. *Am. J. Hum. Genet.* (in press).

2.学会発表

国内 61件

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、ペアドドメインの N 末側、C 末側およびホメオドメインの計 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 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、転写調節因子相互のネットワークを明らかにした。また神経変性疾患の責任遺伝子である DRPLA について、形態形成責任遺伝子の可能性を追求した。

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。責任遺伝子が明らかになると的確な診断は可能となるが、治療法の開発など患者のためには責任遺伝子の機能研究が必須である。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）と WT1（腎形成不全症）を中心に、蛋白質の機能解析を行う。特に、試験管内反応によって転写調節能を解析する。この結果と、分担研究者による

形態形成の解析やアポトーシスの解析結果とあわせ、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) 疾患責任遺伝子の機能を培養細胞系などで解析する。PAX6 と WT1 の、正常型および変異型蛋白質の転写調節能を解析し、転写因子のネットワークを明らかにする。
(3)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 遺伝子について神経細胞死の観点から解析してきた。2002 年 1

月に、ショウジョウバエの DRPLA は転写調節因子であり、初期胚のパターン形成制御を介して形態形成に関与することが報告された。従って平成 14 年度から、ヒト DRPLA が形態形成に関与するか否かの解析を本研究課題に組み入れた。

(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おり、(旧) 国立小児病院倫理委員会で討論し、また審査を受けた。この間の検討は、直接間接的に、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。個別の疾患に対する遺伝子解析は国立小児病院の共同研究者から申請してもらい、倫理委員会の承認を受けている。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、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。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た。患者の病態と PAX6、EYA1、SHH 遺伝子変異などに関しては、共同研究者である、東分担研究者の総合分担研究報告書に記載されているので、ここでは省略した。
- (2) 肝胆管形成不全症と JAG1：Alagille 症候群(OMIM#118450)は肝内胆管形成不全に基づく新生児黄疸を主徴とし、また心臓・肺動脈・神経の形成異常を伴う優性遺伝病である。1997 年に米国の 2 グループが、Notch リガンドをコードする JAG1 を責任遺伝子として単離同定した。我々が収集した 13 家系について JAG1 遺伝子に変異を同定し、報告した。関連疾患について JAG1 変異を同定した。
- (3) 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報告した (Kobayashi et al. 2002)

- (4) 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、ペアドドメインの N 末側、C 末側およびホメオドメインの計 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 12 種類の PAX6 ミスセンス変異を持つ発現ベクターを構築した。これらについて、ペアドドメインの N 末側、C 末側およびホメオドメインの計 3 個のコンセンサス DNA 結合部位に対する転写調節能を解析した。各種の培養細胞株の内在性 PAX2 および PAX6 の発現レベルを解析した。PAX6 発現ベクターを培養細胞に導入し、内在性 PAX2 発現レベルの変動を解析した。PAX6 発現ベクターを培養細胞に導入し、PAX2 プロモーター領域の転写調節能を解析した。これらの結果から、視神経低形成症患者で見られた変異、すなわちホメオドメイン近傍および転写活性化 PTS 領域は

ホメオドメインを介する DNA 結合に大きく作用し、また別の因子との相互作用を介してペアドメインの DNA 結合にも関与することを見出した。しかし、いずれの反応も複雑な応答を示し、視神経の形成程度と直接相関を示唆する結果は得られなかった。

(5) 転写因子間の相互作用。眼形成にかかわる上記の PAX6 に加え、病態から推定された PAX2、ウィルムス腫瘍および泌尿生殖器の形成に関与する WT1 は転写因子をコードする。WT1 遺伝子の研究から、WT1 と PAX2 および p53 との関係が指摘されている。そこで、PAX6・PAX2・WT1・p53 の各転写調節因子間の相互作用を解析した。正常型および同定した変異を持つ遺伝子産物を大腸菌や哺乳動物細胞で発現させ、コンセンサス配列やその他の配列に対する結合能や、転写調節能をレポーターアッセイなどにより解析した。これらが相互に調節しあうネットワークを形成することを明らかにした。

(6) DRPLA 遺伝子の機能解析とヒトにおける形態形成への関与の検討: DRPLA 遺伝子はトリプレットリピート伸長により神経変性疾患を生じる。最近、ショウジョウバエの DRPLA ホモログは転写制御因子をコードし、初期胚におけるパターン制御に関与し、変異体では眼や羽の形成異常を呈することが示された。ヒト DRPLA が形態形成に関与するか否かを明らかにするために、まず発生時期における発現様式を検討した。RT-PCR 法により、9.5 日マウス胚以降で検出された。In situ ハイブリッド法により、予想通り、神経管を中心に強い発現が認められたが、それに加えて、肢芽で高い発現を認めた。ショウジョウバエにおける羽の形成異常との関係で興味深い知見である。転写調節因子の可能性を検討するため、まず DRPLA 蛋白質のリン酸化状態を検討した。DRPLA 蛋白質ではセリン残基がリン酸化を受けていることを見出した。リン酸化過程に JNK キナーゼが関与することを in vitro 反応で確認し、また主たる標的残基を特定した。

D. 結論

発生時期に作動する転写因子は変異（特にミスセンス変異）によって様々な病態を呈することを明らかにしてきた。試験管内反応によって転写調節能を解析し、また、東分担研究者による形態形成能を直接評価できる実験系の結果と合わせ、形態不全症の発生機序の解明にアプローチした。

E. 健康危険情報

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

F. 研究発表

別紙に一括して記載した。

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。

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) カスペーシンの細胞内分布：アポトーシス反応は、最終的にカスペーシと呼ばれるシステインプロテアーゼによって実行される。現在までにヒトで15種類のカスペーシが同定され、そのうち8種類程度が主としてアポトーシスの実行分子として機能している。これらの酵素学的特性は詳細に解析されているが、細胞内分布について包括的な研究が無く、また相互に一致しない結果も多い。我々は発光クラゲ由来の緑色蛍光蛋白質と各カスペーシを融合蛋白質として発現させ、生細胞において共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内分布を解析した。その結果、多くのカスペーシが細胞質に存在したのに対し、カスペーシ2は核蛋白質で

あること、カスパーズ 8、10 は著明な繊維状構造物を形成すること等、いくつかの新しい知見を得た (Shikama et al. 2002)。

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

(3) 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。

(4) カスパーズ 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ズは、アポトーシスの刺激に応じて、先ず上流のカスパーズ (カスパーズ 2, 9, 10) が活性化され、次に、下流のカスパーズ (カスパーズ 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、カスパーズ 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ズ 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. 2001)。

(5) 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ズの基質であること、伸長したポリグルタミンがカスパーズ活性化カスケードの引き金を引くことを報告し「カスパーズ活性化→ポリグルタミンを含む蛋白質の切断→凝集体の形成→カスパーズ活性化」という悪循環が生ずることを提唱してきた。本年度、このアポトーシス過程で、カスパーズ 8 とカスパーズ 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ズ 3 の活性化が生じることを明らかとした (U et al. 2001)。

(6) グルココルチコイド標的遺伝子の解析：グルココルチコイド (GC) は生体内で産生されるステロイドホルモンであるが、白血病などに対する化学療法剤としても使用される。GC は幼若なリンパ球や白血病細

胞に細胞周期の停止とアポトーシス（細胞死）を誘導することが知られており、これが抗がん剤としての作用機序と考えられるが、その詳細な機構は不明である。これまでに、癌遺伝子 *bcl-2* がカススペースの上流で GC によるアポトーシスを抑制することなどを明らかにしてきた。今年度、GC でアポトーシスを起こす白血病細胞株を用いて、遺伝子発現プロファイルの変化を DNA マイクロアレイ法で解析し、GC によって発現量の増加する遺伝子 93 個と減少する遺伝子 28 個を同定した (Yoshida et al. 2002)。これらの遺伝子の多くが複数の白血病細胞株で同様の変動を示すことがわかったことから、これらの研究成果は GC の薬効機序の解明に寄与すると考える。

(7) アポトーシス誘導による形態形成不全症モデル構築：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、足の形態変形を誘導した。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、各部位の形成は維持されるが、形成軸に変化を生じ、ポラリティーの変化した足が形成された。この条件を基礎に、肢芽以外の部位にも導入し、様々な異常を観察したが、再現性は必ずしも高くなかった。発現ベクターが導入される場所を詳細に特定できないためと考える。

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。

F. 研究発表

別紙に一括して記載した。

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。別のタイプの眼形成不全症患者でも PAX6 変異の検索を進め、神経低形成症患者で PAX6 ミスセンス変異を検出し報告した。あるタイプの病態を呈する眼形成不全症患者で、腹側中心線を決定する因子であるソニックヘッジホッグ (Sonic Hedgehog, SHH) 遺伝子にミスセンス変異を同定した。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、色素上皮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、「眼先天異常における形態形成遺伝子異常の検索」課題を国立小児病院倫理委員会に倫理審査を申請し、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、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。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。PAX6、EYA1、SHH 変異などを見出してきている。

(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 結合部位であるホメオドメインの近傍、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った。

これらのミスセンス変異を持つ発現ベクターを構築し、試験管内反応によって転写調節能について解析を進めたが、結果は複雑であった(山田分担報告に記載)。そこで方針を変換し、変異と病態との関係を中心に論文をまとめた(Azuma et al. in press)。現在の OMIM には視神経低形成症関係として様々な項目があり、必ずしもよく分離されていない。これまでも、視神経低形成症に SHH, PAX2 変異などが報告されており、我々の PAX6 変異などとあわせ、遺伝子変異に基づく分類が進むものと考える。

(3) 眼形成不全症と EYA1 : eyes absent (eya) はショウジョウバエで眼の形成にかかわるとして単離された遺伝子であり、他生物種でも眼の形成に関与することが知られている。一方、そのヒトホモログ EYA1 は branchio-oto-renal 症候群(OMIM#113650)の責任遺伝子として、ポジショナルクローニングによって 1997 年に単離された。Branchiootic 病(OMIM#602588)もアレリッ

クであるとされたが、これらの患者には眼の異常を伴わない。我々は広範な眼形成不全症患者を検索し、白内障 3 例で EYA1 のミスセンス変異を見出し、EYA 遺伝子群がヒトでも眼形成に関与することを初めて明らかとした。(Azuma et al., 2000)

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

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

(6) SHH の発現部位の解析 : 発生初期に SHH は神経管腹側中心線で発現し、腹一背の濃度勾配を形成し、腹背軸の形成に関与していることが知られている。ニワトリおよびマウス胚を使用し、発生の各段階での

発現部位を解析した。眼球の構造が前方を見るのに適する時期（以下に記載）に、SHHは顔の中心（鼻の部位）で発現していることを確認した。

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

(8) 良好な視野を獲得するための眼球構造にSHHとPAX6が関与：視野と中心視力は、（レンズにより点对称となるが）対応する網膜上の部位における光受容体の密度と相関することが知られている。最も視力の高い中心視力は黄斑の位置に対応する。ヒトを含む類人猿やフクロウなどは明確な顔を持ち、眼は顔に、すなわち前面に位置するが、その場合でも視野は左右に均等ではなく、鼻側に狭く、外側に広い（網膜上では逆に鼻側に狭く、側頭側に広い）。一方、多くの脊椎動物では眼は頭の側部に位置するが、その場合でも、単に左右方向（前方に直交する）を見るのに適しているのではなく、前方を見るのに適するように黄斑（またはそれに代わる部位）は側頭側に位置している。

患者でのSHH変異、試験管内反応およびニワトリ胚でのSHHによるPAX6の抑制結果と併せると、以下のことが考えられる。脊椎動物では眼の原基は、頭の側部に形成される。その場合、眼の前後軸に沿って網膜の分化が進み、後端に位置する部位で光受容体の数的増加が生じるであろう。その

後、鼻部位で発現して浸透してくるSHHのシグナルによって、眼の形成の主要な制御因子であるPAX6が抑制を受けるが、その程度は前後軸後端より鼻側で大きく、前後軸後端より側頭側で小さい。その結果、光受容体の形成は、前後軸後端（この部位はやがて視神経乳頭になる）から少し側頭側にずれた位置で最も活性化され、その部位に黄斑が形成される。これらのことは、明確な顔を持つ生物種にとっても、そうでない生物種にとっても、より高い視力で前方見ることに貢献する結果となる。

(9) PAX6のエクソン5aの機能：我々は以前に、孤立性黄斑低形成症の患者で、PAX6のペアドドメインC末端半分にミスセンス変異を見出した(Nature Genet. 1996)。無虹彩症では眼の外部の形成不全に加え網膜部位にも症状が見られ、一方、PAX6のペアドドメインN末半分に位置するミスセンス変異は眼の外部のみの異常を伴うPeter奇形となることから、ペアドドメインN末半分のDNA結合によって眼の外部の形成が制御され、一方、C末半分のDNA結合によって眼の内部（網膜）の形成が制御されるという仮説を提唱した。PAX6のエクソン5a有無による2種類のアイソフォームの転写量比についてはこれまでも報告があり、エクソン5aを含まないアイソフォームが多いという結果が一般的である。マウスの発生時期での2種類のアイソフォームの発現量比を解析した。特に、眼に付いては微細に解剖し、各部位での量比を詳細に解析した。ステージ12は眼胞が形成される時期であるが、それ以降、各組織を通じて、基本的にエクソン5aの無いアイソフォームが主要な転写物であった。しかしステージ36-45では、網膜の視神経乳頭に近い位置ではエクソン5a付きのアイソフォームの発現が増加し、場合によってエクソン5a無しのアイソフォームの量を超えることがわかった。それぞれのアイソフォームによる産物を区別できる特異性の高い抗体を用いて解析した結果も同様であった。エクソン5a付きの転写産物の増大の見られた部位では視神経への分化が進み、視細胞が蓄積してやがて

黄斑が形成される部位に一致する。したがって、エクソン 5a の付いたアイソフォームは視神経の分化＝黄斑形成に関与する可能性があることが本解析によっても確かめられた。

(10) 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。本年度、PAX6 のエクソン 5a 有無による 2 種類のアイソフォームの発現ベクターをニワトリ胚の眼部に注入し、発現させ、形態への影響を精査した。ステージ 14-16 のニワトリ胚の眼（原器）部位に発現ベクターを導入したところ、導入後 1-2 日に導入部位を中心に細胞分裂が活発化し、特に網膜層の限定された部位（点状）に肥大化が認められ、孵化時には大きな眼が形成されていた。この効果はどちらのアイソフォームでも見られ、ほとんど差が無かった。しかし、眼の内部構造には著しい差が認められた。すなわち、エクソン 5a の無いアイソフォームでは、網膜層の限定された部位に肥大化が認められ、一定時期持続するが、やがて網膜層の肥大化は顕著でなくなった。稀に、肥大化した網膜層から視神経が眼腔内へ伸長している像が認められた。一方、エクソン 5a の有るアイソフォームでは、網膜層の限定された部位に肥大化が認められ、それが次第に拡大し、紐状構造が眼腔内へ伸長している像が多く得られた。場合によっては壁状構造が突出していた。紐あるいは壁状構造は、病理学的解析から網膜と同様の層構造をとり、また視細胞に分化した細胞が密集していた。したがって、エクソン 5a の付いた PAX6 は網膜にある視細胞前駆体からの分化を促進し、網膜の眼球に沿った伸展を促進したが、眼球内の表面に限りがあるため、伸展した網膜が眼腔内に突出したと推定した。この結果からもエクソン 5a の付いたアイソフォームは視神経の分化＝黄斑形成に関与することが示された。

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、色素上皮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

別紙に一括して記載した。

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
Mutations of a human homologue of the Drosophila eyes absent gene (EYA1) detected in patients with congenital cataracts and ocular anterior segment anomalies. Hum. Mol. Genet. 9, 363-366.	2000		<u>N. Azuma</u> , A. Hirakiyama, T. Inoue, A. Asaka, & <u>M. Yamada</u> .
Human homologue of S. pombe Rad9 interacts with BCL-2/BCL-XL and promotes apoptosis. Nature Cell Biol., 2, 1-6.	2000		K. Komatsu, <u>T. Miyashita</u> , H. Hang, K. M. Hopkins, W. Zheng, S. Cuddeback, <u>M. Yamada</u> , H. B. Lieberman & H.-G. Wang.
Strong, long-term transgene expression in rat liver using chicken b-actin promoter associated with cytomegalovirus immediate-early enhancer (CAG promoter). Cell Transplant., 9: 675-680.	2000		M. Kosuga, S. Enosawa, X-K. Li, S. Suzuki, N. Matsuo, <u>M. Yamada</u> , J. R. Chowdhury, O. Koiwai & T. Okuyama.
Phenotype correction in murine mucopolysaccharidosis type VII by transplantation of human amniotic epithelial cells after adenovirus-mediated gene transfer. Cell Transplant. 9: 687-692.	2000		M. Kosuga, S. Takahashi, K. Sasaki, S. Enosawa, X-K. Li, S. Okuyama, M. Fujino, S. Suzuki, <u>M. Yamada</u> , N. Matsuo, N. Sakuragawa & T. Okuyama.
Adenovirus-mediated gene therapy for mucopolysaccharidosis VII : Involvement of cross-correction in wide-spread distribution of the gene-products and long-term effects of CTLA-4Ig co-expression. Mol. Therapy 1, 406-413.	2000		M. Kosuga, S. Takahashi, K. Sasaki, X-K. Li, M. Fujino, H. Hamada, S. Suzuki, <u>M. Yamada</u> , N. Matsuo & T. Okuyama.
Bax is a transcriptional target and mediator of c-myc-induced apoptosis. Cancer Res., 60, 6318-6325.	2000		K. O. Mitchell, M. S. Ricci, <u>T. Miyashita</u> , D. T. Dicker, Z. Jin, J. C. Reed & W. S. El-Deiry.
Protein binding of a DRPLA family through arginine-glutamic acid dipeptide repeats is enhanced by extended polyglutamine. Hum. Mol. Genet. 9, 1433-1442.	2000		H. Yanagisawa, M. Bundo, T. Miyashita, Y. Okamura-Oho, K. Tadokoro, K. Tokunaga & <u>M. Yamada</u> .
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		S. M. Cuddeback, H. Yamaguchi, K. Komatsu, <u>T. Miyashita</u> , <u>M. Yamada</u> , C. Wu, S. Singh & H-G. Wang.

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
Adenovirus-mediated gene therapy for corneal clouding in mice with mucopolysaccharidosis type VII. <i>Mol. Therapy</i> , 4, 307-312.	2001		Y. Kamata, T. Okuyama, M. Kosuga, A. O'hira, A. Kanaji, K. Sasaki, <u>M. Yamada</u> & <u>N. Azuma</u> .
A case of atypical WAGR syndrome with anterior segment anomaly and microphthalmos. <i>Arch. Ophthalmol.</i> 119, 1855-1856.	2001		E. Kawase, K. Tanaka, T. Honna & <u>N. Azuma</u> .
No evidence of PEG1/MEST gene mutations in Silver-Russell syndrome patients. <i>Am. J. Med. Genet.</i> 104, 225-231.	2001		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, <u>M. Yamada</u> , O. Tsutsumi, N. Niikawa, T. Kaneko-Ishino & F. Ishino.
Widespread distribution of adenovirus-transduced monkey amniotic epithelial cells after local intracerebral injection: Implication for cell-mediated therapy for lysosome storage disorders. <i>Cell Transplant.</i> , 10, 435-439.	2001		M. Kosuga, S. Takahashi, A. Tanaka, M. Fujino, X.-K. Li, S. Suzuki, <u>M. Yamada</u> , K. Kakishita, F. Ono, N. Sakuragawa & T. Okuyama.
Engraftment of genetically-engineered amniotic epithelial cells corrects lysosomal storage in multiple areas of the brain in mucopolysaccharidosis type VII mice. <i>Mol. Therapy</i> , 3, 139-148.	2001		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, <u>M. Yamada</u> & T. Okuyama.
Novel cytochrome P4501B1 (CYP1B1) gene mutations in Japanese patients with primary congenital glaucoma. <i>Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.</i> 42, 2211-2216.	2001		Y. Mashima, Y. Suzuki, Y. Sergeev, Y. Ohtake, T. Tanino, I. Kimura, H. Miyata, M. Aihara, H. Tanihara, M. Inatani, <u>N. Azuma</u> , T. Iwata & M. Araie.
Distinctive tissue distribution and phosphorylation of IRSp53 isoforms. <i>Biochem. Biophys. Res. Comm.</i> , 289, 957-960.	2001		Y. Okamura-Oho, <u>T. Miyashita</u> & <u>M. Yamada</u> .
Comprehensive studies on subcellular localizations and cell death-inducing activities of eight GFP-tagged apoptosis-related caspases. <i>Exp. Cell Res.</i> 264, 315-325.	2001		Y. Shikama, M. U, <u>T. Miyashita</u> & <u>M. Yamada</u> .

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
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		M. U, <u>T. Miyashita</u> , Y. Shikama, K. Tadokoro & <u>M. Yamada</u> .
Extended polyglutamine selectively interacts with caspase-8 and -10 in nuclear aggregates. Cell Death and Differ. 8, 377-386.	2001		M. U, <u>T. Miyashita</u> , Y. Ohtsuka, Y. Okamura-Oho, Y. Shikama & <u>M. Yamada</u> .
Detection of cytotoxic anti-LEDGF autoantibodies in atopic dermatitis. Autoimmunity, 35, 319-327.	2002		M. Ayaki, N. Ohoguro, <u>N. Azuma</u> , Y. Majima, K. Yata, N. Ibaraki, DP. Singh, V. Ko & T. Shinohara.
Dexamethasone-resistant human pre-B leukemia 697 cell line evolving elevation of intracellular glutathione level: An additional resistance mechanism. Jpn. J. Cancer Res. 93, 582-590.	2002		H. Inoue, H. Takemura, Y. Kawai, A. Yoshida, T. Ueda & <u>T. Miyashita</u> .
Severe macular pucker after retinal detachment surgery in an infant. Br. J. Ophthalmol. 86, 354-355.	2002		S. Nishina & <u>N. Azuma</u> .
Prolongation of transgene expression by coexpression of cytokine response modifier a in rodent liver after adenoviral gene transfer. Mol. Ther., 5, 262-268.	2002		X. -K. Li, M. Kosuga, K. Tokieda, A. Kanaji, Y. Fukuhara, M. Hashimoto, K. Okabe, H. Yaginuma, <u>M. Yamada</u> , S. Suzuki & T. Okuyama.
Non-cleavable mutant Fas ligand transfection of donor cornea abrogates ocular immune privilege. Exp Eye Res 75, 475-483.	2002		Y. Sano, J. Yamada, Y. Ishino, W. Adachi, S. Kawasaki, T. Suzuki, S. Kinoshita, T. Okuyama & <u>N. Azuma</u> .
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		Y. Shikama, L. Shen, M. Yonetani, J. Miyauchi, <u>T. Miyashita</u> & <u>M. Yamada</u> .
Analysis of gene expression patterns during glucocorticoid-induced apoptosis using oligonucleotide arrays. Biochem. Biophys. Res. Commun. 293, 1254-1261.	2002		N. L. Yoshida, <u>T. Miyashita</u> , M. U, <u>M. Yamada</u> , J. C. Reed, Y. Sugita & T. Oshida.
Long-term normalization in the central nervous system, ocular manifestations, and skeletal deformities by a single systemic adenovirus injection into neonatal mice with mucopolysaccharidosis VII. Gene Ther. 10, 406-414.	2003		Y. Kamata, A. Tanabe, A. Kanaji, M. Kosuga, Y. Fukuhara, X.K. Li, S. Suzuki, <u>M. Yamada</u> , <u>N. Azuma</u> & T. Okuyama.

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
Gorlin syndrome with ulcerative colitis in a Japanese Girl. Am. J. Med. Genet. (in press).			K. Fujii, <u>T. Miyashita</u> , T. Omata, K. Kobayashi, J-I. Takanashi, K. Kochi, <u>M. Yamada</u> & Y. Kohno.
Mutations in the human homologue of Drosophila patched in Japanese nevoid basal cell carcinoma syndrome patients. Human Mutation (in press).			K. Fujii, Y. Kohno, K. Sugita, M. Nakamura, Y. Moroi, K. Urabe, M. Furue, <u>M. Yamada</u> & <u>T. Miyashita</u> .
Mutations of the PAX6 gene detected in patients with a variety of optic nerve malformations. Am. J. Hum. Genet. (in press).			<u>N. Azuma</u> , Y. Yamaguchi, H. Handa, A. Asaka, K. Tadokoro & <u>M. Yamada</u> .