

PAX6(+5a)の間で差がなかった。

2) RT-PCRによる網膜形成におけるPax6のisoformの発現

発生期の鶏胚網膜では、Pax6(-5a)とPax6(+5a)のいずれも発現していたが、一般にPax6(-5a)が優位であった。しかし、発生後期では、網膜の後部においてPax6(+5a)の発現の方が優位であった。

3) 免疫染色による網膜形成におけるPax6のisoformの発現

コモンマーモセットの網膜では、14アミノ酸に対する抗体の免疫染色が、後極にことに黄斑付近に強く、周辺部では僅かしか見られなかった。

4) 鶏胚網膜へのPAX6遺伝子導入

発生初期の網膜にPAX6(-5a)を過剰導入すると、網膜の厚みが増加した。組織所見は、遺伝子の導入部位ではPCNAの染色性が増加し、細胞の増殖が亢進していた。また、ことに神経節細胞の分化亢進がみられた。さらに、神経節細胞のaxonが束となって硝子体腔へ異所性に成長していた。

一方、PAX6(+5a)を導入した網膜は、PAX6(-5a)導入による部分的なものだけでなく、層全体が過剰に成長し嚢を形成していた。また、過剰に形成された網膜嚢においては、視細胞の分化で錐体細胞の亢進がみられた。

D. 考察

PAX6遺伝子はほぼすべての動物で眼の形成に関与しており、ショウジョウバエでは胚に異所性に発現させると触覚や翅、肢などに複眼が発生することができる。したがって、下等動物では眼の器官形成全体を支配するマスターコントロール遺伝子であると考えられている。この異所眼は、脊椎動物ではアフリカツメガエルでも作ることができるが、眼を構成する組織はいずれも不完全な構造であり、視覚を得ることは不可能であった。しかし、部分的な組織であれば作ることが可能であるかもしれないと考え、今回動物実験でPAX6遺伝子を色素上皮細胞に導入した。その結果、ほぼ完全な構造をもつ網膜を作ることができた。しかし、網膜は部位によって視覚感度が異なり、その違いがどのように作られるのかは不明である。

PAX6遺伝子はヒト標本のin situ hybridizationや免疫染色で、初期には眼球全体に、その後角膜、水晶体、網膜に発現することから、ヒトでもさまざまな役割を果たすことが示唆されていた。そして、先天無虹彩、前眼部形成不全、黄斑低形成、視神経形成不全で変異が見出されたが、ことに我々が黄斑低形成の変異を初めて発見し、これに続いて世界中でも見つかったことは、この遺伝子が黄斑などの網膜の高度な視覚に関する網膜構造の形成に関与していることを意味している。

PAX6遺伝子がコードするPAX6蛋白は、転写活性部位 paired domainが標的遺伝子に接着して制御する。paired domainには、2つのsubdomain N-terminal subdomain (NTS)とC-terminal subdomain (CTS)のがあり、おのおのが異なる標的遺伝子に接着する。過去の我々の機能解析では、NTSとCTSが互いに抑制し合う自動制御機構があることも判明した。そして、選択的スプライス exon 5aが働くこととCTSが働く。しかし、CTSの下流遺伝子はまったく知られておらず、PAX6にexon 5aが加わった意義も不明である。しかし、これまでに黄斑形成でみつかったPAX6の変異は、いずれもexon 5aあるいはCTS内に集中していたので、黄斑の形成に重要な役割をもっている可能性が考えられた。

今回、このexon 5aによる14アミノ酸をもつ isoform PAX6(+5a)の発現様式を検討した結果、黄斑を含む後極に集中して発現していることが判明した。さらに、このPAX6(+5a)はexon 5aをもたないPax6(-5a)に比べて網膜を发育・分化させる機能がずっと高いことが明らかになった。さらに直接ではないかもしれないが錐体視細胞の分化にも関わっていることが示唆された。したがって、PAX6(+5a)は黄斑を中心とする網膜の高度な構造形成の形成に関与していることを強く示している。

本研究事業で、黄斑を中心とする高度視覚の成立と、これが障害される疾患の原因を明らかになった。これらの成果は、遺伝診療のみならず、将来は網膜を再生させて失われた視覚を復元させる医療にも応用できることが期待される。

E. 結論

眼の形態形成遺伝子 PAX6 を網膜色素上皮細胞に導入すると、ほぼ完全な層構造をもつ神経網膜を作ることができた。PAX6 で exon 5 による 14 アミノ酸を余分にもつ isoform は、網膜後極部に強く発現し、網膜細胞の发育と分化を亢進させる。したがって、この isoform は黄斑などの網膜の高度な視覚に関する網膜構造の形成に関与していることが示唆された。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kamata Y, Tanabe A, Kanaji A, Kosuga M, Fukuhara Y, Li X-K, Suzuki S, Yamada M, Azuma N, Okuyana T. Long-term normalization in the central nervous system, ocular manifestations, and skeletal deformities by a single systemic adovirus injection

into neonatal mice with mucopolysaccharoidosis. Gene Therapy 2002; in press.

Nishina S, Azuma N. Severe macular pucker after infantile retinal detachment surgery. Br J Ophthalmol 86:354-355, 2002.

Sano Y, Yamada J, Ishino Y, Adachi W, Kawasaki S, Suzuki T, Kinoshita S, Okuyama T, Azuma N. Non-cleavable mutant Fas ligand transfection of donor cornea abrogates ocular immune privilege. Exp Eye Res 75:475-83, 2002

Ayaki M, Ohoguro N, Azuma N, Majima Y, Yata K, Ibaraki N, Singh DP, Ko V, Shinohara T. Detection of cytotoxic anti-LEDGF autoantibodies in atopic dermatitis. Autoimmunity 35:319-27, 2002

Mashima Y, Suzuki Y, Sergeev Y, Ohtake Y, Tanino T, Kimura I, Miyata H, Aihara M, Tanihara H, Inatani M, Azuma N, Iwata T, Araie M. Novel cytochrome P4501B1 (CYP1B1) gene mutations in Japanese patients with primary congenital glaucoma. Invest Ophthalmol Vis Sci 42:2211-2216, 2002

仁科幸子・新井千賀子・越後貫滋子・赤池祥子・富田 香・守田好江・千田耕基・東 範行. 乳幼児のロービジョンケアの現状と問題点ー医療機関と教育機関の共同ケアによる成果. 眼臨医 96:37-61, 2002.

仁科幸子・越後貫滋子・赤池祥子・三井田千春・東 範行・富田 香. 視覚障害児に対する遮光レンズ選定のためのコントラストグレアテストの利用. 眼臨医 96:395-399, 2002

東 範行. 分子生物学による疾患の解明ー眼形態形成遺伝子とその変異ー. 眼科 44:813-821, 2002.

東 範行. 先天白内障の問題点. 日眼会誌 106:263-264, 2002.

東 範行. 検眼鏡による視神経乳頭のみかた. 眼科診療プラクティス 5:2-11, 2002.

東 範行. 機能弱視. 薬の知識 53:2-4, 2002.

東 範行. 国立成育医療センター. 日本の眼科 73:879-890, 2002.

東 範行. 見下すことによって距離を判断する. 日本の眼科 73:225-226, 2002.

東 範行. 骨髄由来の網膜血管新生. 日本の眼

科 73:995-996, 2002.

東 範行. 分子生物学による疾患の解明. 日眼会誌増刷「20世紀における眼科学の総括」 259-262, 2002.

2. 学会発表

東 範行. ワークショップ 視覚進化と高等動物の視覚. 日本分子生物学会 2001年12月(横浜)

川瀬英理子・山田正夫・東 範行. Pax6 と Pax2 の相互作用. 日本分子生物学会 2001年12月(横浜)

東 範行. 小児の視覚. 東京都眼科医会 2001年12月(東京)

東 範行. 小児の視覚障害とその管理. 神奈川県眼科医会 2002年2月(横浜)

東 範行. 眼の形態形成遺伝子とその変異. 感覚器障害研究講演会 2002年2月(東京)

東 範行. 眼の形態形成遺伝子. 宮崎眼科医会 2002年2月(宮崎)

東 範行. シンポジウム「20世紀の総括」分子生物学による疾患の解明. 日本眼科学会 2002年5月(仙台)

東 範行. 講習会 小児眼科の診療「後眼部疾患」. 日本小児眼科学会 2002年4月(豊橋)

川瀬英理子・山田正夫・東 範行. Pax6 と Pax2 の相互作用. 日本小児眼科学会 2002年4月(豊橋)

仁科幸子・東 範行・宮内 潤・金子 剛. 眼瞼に再発を繰り返した若年性黄色肉芽腫の1例. 日本小児眼科学会 2002年4月(豊橋)

Kamata Y, Tanabe A, Kanaji A, Kosuga M, Fukuhara Y, Li X-K, Suzuki S, Yamada M, Azuma N, Okuyama T. Long-term normalization in the central nervous system, ocular manifestations, and skeletal deformities by a single systemic adenovirus injection into neonatal mice with mucopolysaccharoidosis. 米国遺伝子治療学会 2002年6月(ボストン)

東 範行. シンポジウム 眼の形態形成遺伝子の機能と眼先天異常における変異. 日本先天異常学会 2002年6月(宮崎)

東 範行. 電子カルテ. Japan Macula Club 2002
年 8 月 (蒲郡)

東 範行. 小児の視覚障害とその管理. 信州眼
科医会 2002 年 9 月 (松本)

東 範行. 電子カルテ. 日本臨床眼科学会
2002 年 9 月 (盛岡)

東 範行. 生涯教育講習会 乳幼児の集団検診.
日本臨床眼科学会 2002 年 9 月 (盛岡)

川瀬英理子・山田正夫・東 範行. 視神経先天
異常における PAX6 遺伝子の変異. 日本臨床眼
科学会 2002 年 9 月 (盛岡)

野田英一郎・仁科幸子・東 範行. 小角膜を伴
う両眼先天白内障の手術成績. 日本臨床眼科
学会 2002 年 9 月 (盛岡)

仁科幸子・東 範行. 乳幼児における遮断弱視
の治療経過. 日本臨床眼科学会 2002 年 9 月 (盛
岡)

鎌田裕子・仁科幸子・川瀬英理子・高本紀子・東
範行・河村益徳. 眼科診療における電子カルテ
運用のためのデータファイリングシステムの効
用. 日本臨床眼科学会 2002 年 9 月 (盛岡)

綾木 雅彦・大黒伸行・末野利治・東 範行・馬
嶋清如・他: アトピー性皮膚炎患者では水晶体上
皮細胞由来の自己抗体が高い. 日本臨床眼科
学会 2002 年 9 月 (盛岡)

仁科幸子・野田英一郎・東 範行. 重複障害児
における両眼先天・発達白内障術後のハビリテー
ション. 日本ロービジョン学会 2002 年 10 月
(仙台)

東 範行. 特別講演 眼を作るしくみ. 九州硝
子体研究会 2002 年 10 月 (宮崎)

東 範行. 眼の形成と Pax6. 開放的融合研究
公開シンポジウム「ゲノム機能から個体発生を探
る」2002 年 10 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

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
野田 徹	MTF, PSF.		角膜トポグラフィ ーと波面センサー	メジカル ビュー社	東京	2002	224-229
奥山虎之	遺伝性疾患の治 療		小児科学第2版	医学書院	東京	2002	248-251

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
野田 徹、秋山邦彦	血管新生緑内障に対する網膜硝子体手術	眼科手術	15	447-454	2002
大野建治、野田 徹	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	眼紀	53	202-204	2002
細田ひろみ、野田 徹	真性小眼球に伴う uveal effusion に対するマイトマイシンC併用強膜開窓術	臨床眼科	56	613-616	2002
Kurokawa N, Hayashi K, Konishi M, Yamada M, Noda T, Mashima Y	Increasing Ofloxacin Resistance of Bacterial Flora from Conjunctival Sac of Preoperative Ophthalmic Patients in Japan	J J Ophthalmol	46	586-589	2002
Kobayashi K, Shibutani M, Takeuchi G, Ohnuma K, Miyake Y, Noda T, Negishi K, Ohno K	Measurement of the single-pass MTF and simulation of the retinal image of the human eye developed Point Spread Function Analysis System	Proceeding of SPIE's Biomedical Optics 2003 of Ophthalmic technologies VIII			2003
Kobayashi K, Shibutani M, Takeuchi G, Kubotera Y, Ohnuma K, Miyake Y, Noda T, Negishi K, Ohno	KMeasuring the single-pass MTF and simulating using the incoherent polarized reflection component of the human eye	Journal of Biomedical Optics		in press	2002
天野恵美、佐藤美保	網膜芽細胞腫の最近の治療戦略	現代医学	49	101-105	2001
佐藤美保	小児屈折検査の現状	視覚の科学		印刷中	
天野恵美、佐藤美保、岡本洋子、寺崎浩子、三宅養三	広画角デジタル眼底カメラ Ret Cam 120 による蛍光眼底造影	臨床眼科		印刷中	
Takahashi M, Deb NJ, Kawashita Y, Lee SW, Furgue J, Okuyama T, Roy-Chowdhury N, Bhadrasain Vikram, Jayanta Roy-Chowdhury, Guha	CA Novel strategy for in vivo expansion of transplanted hepatocytes using preparative hepatic irradiation and FasL-induced hepatocellular apoptosis.	Gene Therapy		in press	
Kamata Y, Tanabe A,	Long-term normalization in the central	Gene Therapy		in press	

Kanaji A, Kosuga M, Fukuhara Y, Li XK, Suzuki S, Yamada M, Azuma N, Okuyama T	nervous system, ocular manifestations, and skeletal deformities by a single systemic adenovirus injection into neonatal mice with mucopolysaccharidosis VII.				
Kurosawa K, Sasaki H, Sato Y, Yamanaka M, Shimizu M, Ito Y, Okuyama T, Matsuo M, Imaizumi K, Kuroki Y, Nishimura G	Paternal UPD14 is responsible for a distinctive malformation complex.	Am J Med Genet	110	268-272	2002
Li XK, Kosuga M, Tokieda K, Kanaji A, Fukuhara Y, Hashimoto M, Okabe K, Yaginuma H, Yamada M, Suzuki S, Okuyama T	Prolongation of transgene expression by coexpression of cytokine response modifier a in rodent liver after adenoviral gene transfer.	Mol Ther	5	262-268	2002
Fujino M, Li XK, Guo L, Kitazawa Y, Funeshima N, Fukuda S, Kimura H, Miyashita T, Okuyama T, Amano T Suzuki S	T-cell apoptosis triggered by FTY720 via mitochondrial pathway.	Transplant Proc	33	3084-3085	2002
Abe Y, Takamura M, Sawada M, Hisano M, Tsuji Y, Saikawa N, Okuyama T, Odajima Y, Fujita K, Chikaoka H, Iikura Y	Case of insertion, inversion and deletion of chromosome 6.	Pediatr Int	44	530-533	2002
Nishina S, Azuma N	Severe macular pucker after infantile retinal detachment surgery.	Br J Ophthalmol	86	354-355	2002
Sano Y, Yamada J, Ishino Y, Adachi W, Kawasaki S, Suzuki T, Kinoshita S, Okuyama T, Azuma N	Non-cleavable mutant Fas ligand transfection of donor cornea abrogates ocular immune privilege.	Exp Eye Res	75	475-483	2002
Ayaki M, Ohoguro N, Azuma N, Majima Y, Yata K, Ibaraki N, Singh DP, Ko V, Shinohara T	Detection of cytotoxic anti-LEDGF autoantibodies in atopic dermatitis.	Autoimmunity	35	319-327	2002
Mashima Y, Suzuki Y, Sergeev Y, Ohtake Y, Tanino T, Kimura I, Miyata H, Aihara M, Tanihara H, Inatani M, Azuma N, Iwata T, Araie M	Novel cytochrome P4501B1 (CYP1B1) gene mutations in Japanese patients with primary congenital glaucoma.	Invest Ophthalmol Vis Sci	42	2211-2216	2002
仁科幸子・新井千賀子・越後貫滋子・赤池祥子・富田 香・守田好江・千田耕基・東 範行	乳幼児のロービジョンケアの現状と問題点－医療機関と教育機関の共同ケアによる成果.	眼臨医	96	37-61	2002
仁科幸子・越後貫滋子・赤池祥子・三井田千春・東 範行・富田 香	視覚障害児に対する遮光レンズ選定のためのコントラストグレアテストの利用.	眼臨医	96	395-399	2002

東 範行	分子生物学による疾患の解明－眼形態形成遺伝子とその変異－.	眼科	44	813-821	2002
東 範行	先天白内障の問題点.	日眼会誌	106	263-264	2002
東 範行	検眼鏡による視神経乳頭のみかた.	眼科診療プラクティス	5	2-11	2002
東 範行	機能弱視.	薬の知識	53	2-4	2002
東 範行	国立成育医療センター.	日本の眼科	73	879-890	2002
東 範行	見下すことによって距離を判断する.	日本の眼科	73	225-226	2002
東 範行	骨髄由来の網膜血管新生.	日本の眼科	73	995-996	2002
東 範行	分子生物学による疾患の解明.	日眼会誌増刷		259-262	2002

20020680

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.22- P.24の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。