

厚生労働科学研究費補助金
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

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 東 範 行

平成16年(2004年)3月

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. ムコ多糖症 VII 型モデルマウスの角膜混濁および網膜変性に対する
アデノウイルスベクターによる新生仔期の遺伝子治療
奥山 虎之 国立成育医療センター遺伝診療科 12
2. Cre/lox P 系・アデノウイルスベクターを用いた Caspase 8 導入による
白色家兎水晶体吸引術後の水晶体上皮細胞増殖の抑制
根岸 一乃 慶應義塾大学眼科 15
3. 水晶体特異的転写因子 MafA/L-Maf の機能に関する研究
片岡 浩介 奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 19
4. 網膜特異的銅依存性アミン酸化酵素 (AOC2) の機能解析
田中 靖彦 国立病院東京医療センター 20
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 22
6. 幹細胞からの網膜細胞の分化誘導に関する研究
渡邊 卓 杏林大学医学部臨床検査医学教室 24
7. 細胞外シグナル伝達物質 Shh の網膜形成への役割
東 範行 国立成育医療センター 眼科 26

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 30

IV. 研究成果の刊行物、別刷 35

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。まず、ムコ多糖症 VII 型モデルマウスの角膜混濁および網膜変性に対する生後早期におけるアデノウイルスベクターによって欠損遺伝子を補充し、遺伝子治療法の有効性を明らかにした。Cre/lox P 系・アデノウイルスベクターを用いた Caspase8 導入による家兎水晶体上皮細胞増殖の抑制実験を行い、後発白内障の治療として応用できる可能性を示した。水晶体細胞特異的な遺伝子発現を司る転写因子 MafA/L-Maf と c-Maf の発現と機能を解析した。緑内障で最も障害を受ける網膜神経節細胞で発現する網膜特異的なアミノ酸化酵素 (AOC2) を検討し、血管内皮細胞でリンパ球の接着機能を持ち、VAP-1 からタンパク質進化して網膜特異的な機能を持つに至ったと考えられた。幹細胞の特性を明らかにする目的で、マウス胚性幹(ES)細胞の生存・死・分化誘導を主要な細胞内情報伝達系である MAP キナーゼ(ERK や SAPK/JNK)系や眼形成関連の転写因子 PAX6 の観点から検討した。その結果、ES 細胞の生存維持には ERK 系が、分化誘導に伴う遺伝子発現には SAPK/JNK 系が関与することを見出した。また、PAX6 遺伝子をマウス胎児の色素上皮に導入することによって、ニワトリ同様に網膜組織へと分化誘導する可能であることを見出した。ES 細胞の可能性を検証する目的で、in vitro, in vivo において発生期マウス網膜の環境の中に置かれたマウス ES 細胞の網膜細胞への分化の可能性を検討した。in vitro で発生期網膜細胞と混合培養された ES 細胞の多くは神経系細胞へと分化することが明らかとなった。シグナル伝達物質 Shh が Pax6 を制御して網膜の分化を決定している証拠を得た。まず、Shh 変異をもつ holoprosencephaly 軽症例で黄斑の位置異常が起こることを見出した。鶏胚における in vivo 異所導入実験で、Shh の gain of function では Pax6 の発現、網膜の発育、眼球の成長がいずれも抑制され、loss of function では逆に Pax6 の発現、網膜の発育、眼球の成長が亢進した。したがって、顔面で発現する Shh が Pax6 の発現に影響を及ぼし、網膜の分化や眼球の形態、ひいては黄斑の位置付けや視線を決定していることが示唆された。

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
片岡 浩介 奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科
分子発生生物学講座助教授
根岸 一乃 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検査医学教
室 教授

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ることには期待でき、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。

初年度は、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。

2 年度は、Cre-loxP システムと組織特異的遺伝子のプロモーターを用いて、複雑な構造をもつ眼の組織において選択した組織に遺伝子を導入させる方法を開発した。これを用いて白内障術後の水晶体細胞増殖予防を行った。角膜においては創傷治癒に関係する遺伝子の検索をヒト cDN A アレーを用いて行った。水晶体においては、レンズ細胞に特異的な転写因子 MafA/L-Maf の発現と機能を解析した。網膜では、眼形成転写因子 PAX6 を薬剤の除去 (Tet-off) によって誘導可能なマウス胚性幹 (ES) 細胞を樹立し、MAP キナーゼファミリーの機能を検討し、これらを用いる網膜細胞ペレット培養法を作成した。さらに、Pax6 の exon 5a をもつ isoform の機能を解析した。

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胎児遺伝子治療を行った。水晶体においては、Cre-loxP システムとアポトーシス遺伝子のプロモーターを用いて、白内障手術後の水晶体細胞増殖予防を行った。またレンズ細胞特異的転写因子 MafA/L-Maf の発現と機能を解析した。網膜では、網膜特異的銅依存性アミン酸化酵素 (AOC2) の機能解析を行った。ES 細胞の生存維持には ERK 系が、分化誘導に伴う遺伝子発現には SAPK/JNK 系が関与することを見出した。また、PAX6 遺伝子をマウス胎児の色素上皮に導入することによって、網膜組織へと分化誘導する可能であることを見出した。ES 細胞のは in vitro で発生期網膜細胞と混合培養すると、神経系細胞へと分化することが明らかとなった。さらにシグナル伝達物質 Shh が Pax6 を制御して網膜の分化を決定している証拠を得た。顔面で発現する Shh が Pax6 の発現に影響を及ぼし、網膜の分化や眼球の形態、ひいては黄斑の位置付けや視線を決定していることが示唆された。

B. 研究方法

1) 新生仔ムコ多糖症角膜混濁の遺伝子治療

ヒト β -グルクロニダーゼ遺伝子を発現するアデノウイルスベクター AxCAGUS を作成し、このウイルスベクター AxCAGUS 1×10^7 pfu を生後 24 時間以内の新生仔ムコ多糖症 VII 型マウスの浅側頭静脈から全身投与した。投与 30 日後に眼球を摘出し、導入遺伝子発現を調べるため角膜および網膜の β -グルクロニダーゼ活性染色を行った。また治療効果を検討するため治療群と無治療群のムコ多糖症 VII 型マウスの角膜および網膜の組織病理所見について比較検討した。

2) Cre/loxP システムを用いた caspase 8 導入による水晶体上皮細胞増殖の抑制

Cre/loxP 系・アデノウイルスベクターを用いた Fas リガンド導入により白色家兎水晶体吸引術後の水晶体上皮細胞増殖の抑制について検討した。白色家兎に対する水晶体吸引術後、Cre/loxP 系により CAG プロモーターを用いて caspase 8 遺伝子を導入した。また水晶体に特異的な $\alpha 1$ クリスタリンプロモーターを用いて caspase 8 を導入した。LacZ 染色あるいは TUNEL 法によって発現を確認した。

3) レンズ細胞特異的転写因子 MafA/L-Maf

L-maf ホモログは膵島 β 細胞に特異的に発現していたので、 β 細胞株を用いてその転写活性化能、活性制御機構などを生化学的に調べた。

4) 網膜特異的銅依存性アミン酸化酵素 (AOC2) の機能解析

ヒト AOC2 の cDNA をプローブとしてマウス

及びラットの cDNA 及び遺伝子をクローニングして全塩基配列を決定した。さらに周辺の遺伝子をクローニングしてシーケンスした結果と CELERA 社のゲノムデータベースによる解析を行った。タンパク質構造解析プログラム LOOK を用いて、AOC2 と類似する大腸菌銅依存性アミノ酸化酵素の結晶構造から AOC2、AOC3 の構造推測を行う。免疫染色等の方法によって AOC2 が膜タンパク質であることを証明した。

5) 幹細胞から眼組織への分化に関する研究

阻害剤や遺伝子破壊法を用いてマウス ES 細胞における MAP キナーゼ系の役割を検討した。また、ヒト眼疾患関連遺伝子として見出された *PAX6* をマウス胎児の色素上皮に導入し、新たに網膜が構築されるか否かを検討した。

6) 幹細胞から網膜細胞への分化誘導に関する研究

マウス ES 細胞を網膜の細胞環境に置くことにより網膜細胞への分化誘導が可能であるか否かを検討するため、発生期網膜内への幹細胞の直接的な移植を試みるとともに、発生期ラット網膜の pellet 培養系を応用した混合培養を行った。いずれの場合にも、幹細胞を識別する目的でレトロウイルスを用いて幹細胞に GFP 遺伝子を組み込んだ上でこれを用い、また網膜細胞への分化の指標として、網膜の光受容体細胞に固有なロドプシンに対する抗体を用いた。移植実験では、胎生 11-13 日マウス胎仔の硝子体下腔に細胞を注入した。pellet 培養での混合実験では、GFP 陽性神経幹細胞を発生期網膜細胞と少なくとも 2 週間混合培養した後、GFP 陽性細胞に関して、ロドプシン等の発現の状況を検討した。

7) 細胞外シグナル伝達物質 Shh の網膜形成への役割

a. Shh の変異の検討

Holoprosencephaly の軽症例で Shh の変異を検討した。

b. Shh の Pax6 発現に対する生化学的検討

P19 細胞を用いて、Shh の Pax6 発現に対する影響を検討した。Shh-WT と 1) で見つけた変異体を量依存的に P19 細胞で強制発現させ、内因性 Pax6 の発現を RT-PCR で検討した。

c. Shh の gain-of-function に関する in vivo 実験

鶏受精卵を孵卵器で発生を進め、2-7 日胚の眼球外間葉組織に Shh 遺伝子を電気穿孔法で導入した。10-20 日胚で実体顕微鏡下と病理変化を検討した。

d. Shh の loss-of-function に関する in vivo 実験

2-7 日胚の鶏胚眼球外間葉組織に Shh 抑制物質 cyclopamine を染み込ませたマイクロビーズを埋め込んだ。10-20 日胚で実体顕微鏡下と病理変化を検討した。

C. 研究結果および考察

1) 新生仔ムコ多糖症角膜混濁の遺伝子治療

生後早期に AxCAhGUS を投与されたムコ多糖症 VII 型マウスの角膜および網膜における β -グルクロニダーゼ活性染色を行ったところ、生後早期にウイルスベクターの投与を受けたムコ多糖症 VII 型 I マウスの網膜色素細胞は、ほとんどが β -グルクロニダーゼ陽性細胞であった。角膜および網膜上皮の組織病理所見を検討したところ、生後早期にウイルスベクター投与を受けたムコ多糖症 VII 型マウスでは、無治療のムコ多糖症 VII 型マウスと比較して、角膜組織および網膜上皮における空胞変性細胞の数および腫大が明らかに減少していた。これらの結果から生後早期の AxCAhGUS 全身投与により、ムコ多糖症 VII 型マウスの角膜および網膜に遺伝子導入は可能となり、角膜および網膜上皮は病理組織学的に改善されることが確認された。本研究の結果から、新生仔期に AxCAhGUS を経静脈的に全身投与することによりムコ多糖症 VII 型マウスの角膜や網膜に対し、遺伝子導入が可能になり、角膜混濁や網膜病変の正常化が可能であることが示された。一般に組換えアデノウイルスベクター

AxCAhGUS を成熟したムコ多糖症 VII 型マウスに対して経静脈的に全身投与すると、肝・脾・心臓などの罹患臓器における β -グルクロニダーゼ酵素の活性上昇し、罹患臓器における病理所見の改善が認められる。しかし角膜や網膜での酵素活性の上昇や角膜混濁や網膜病変などの眼の病理所見の改善は認められない。理由としては、角膜混濁や網膜変性が不可逆的に進行していること、角膜は無血管野で血液網膜関門が存在するため、アデノウイルスベクターによる経静脈的な遺伝子導入方法が困難であることが考えられる。生後早期におけるアデノウイルスベクター投与により、角膜や網膜に遺伝子導入が可能となり、成熟期では治療が困難である角膜混濁や網膜病変の改善が認められた。今後の臨床応用を考えた場合、幹細胞移植などによる眼組織の再生や修復による根治的な治療と、アデノウイルスベクターによる一過性の高い遺伝子導入効率をもつ遺伝子治療の組み合わせが現実的であると考えられる。本疾患などの先天代謝異常症の進行性の眼病変に対しては、新生仔期にまず本法により眼病変の進行を予防し、その後、幹細胞移植などによる根治的治療を行うことにより治療効果が高まると考えられる。

2) Cre/lox P システムを用いた caspase 8 導入による水晶体上皮細胞増殖の抑制

通常のカグプロモータを用いたアデノウイルスを用いた場合は、水晶体上皮細胞にアポトーシ

スがみられ、同時に隅角や網膜の細胞にも同様にアポトーシスがみられた。しかし、クリスタリンプロモータを用いた Cre/loxP システムウイルスベクターを投与した場合は、水晶体上皮細胞には高率でアポトーシスが起ったが、隅角や網膜にはアポトーシス細胞はみられなかった。いずれの群においても前房内の組織に異常な炎症や組織損傷の所見はなかった。水晶体上皮細胞に組織特異的に効率よく遺伝子が入ったが、それでも水晶体上皮細胞の除去は不完全であり、臨床応用のためには、第一に発現効率の向上が重要である。また、このような系はその組織特異性から白内障治療の際の薬物投与などにも応用できる可能性があると考えられた。

3) レンズ細胞特異的転写因子 MafA/L-Maf

L-*maf* 遺伝子の哺乳類ホモログ (*mafA* と命名) は、クリスタリン遺伝子群の転写制御領域に存在する DNA 配列 (MARE) に結合し、転写を活性化することを確認した。MafA は膵島β細胞でのみ発現がみられたことから派生して、MafA がインスリン遺伝子の膵島β細胞特異的かつグルコース濃度依存的な転写制御を行うことを見いだした。また、Maf 関連遺伝子産物であり、哺乳類の水晶体の発生に必須な c-Maf が膵島α細胞に特異的に発現しているグルカゴン遺伝子の転写制御を行っていることも併せて見いだした。哺乳類の水晶体では L-Maf ホモログではなく関連遺伝子産物である c-Maf や MafB が発現しており、動物種によって Maf ファミリーの使い分けが異なっていると思われる。

4) 網膜特異的銅依存性アミン酸化酵素(AOC2)の機能解析

AOC2 の周辺遺伝子について解析した結果、AOC2 と最も相同性のある AOC3 遺伝子がわずか 1 Kb 下流に存在することが明らかとなった。ラット AOC2 はエクソン1にトランスポゾン DNA の挿入が確認され、ストップコドンが存在するために、127アミノ酸の未熟なタンパク質しか生成できないことが明らかとなった。AOC2 のアミノ酸配列及び構造からこのタンパク質は 2 量体を形成して N 末端は膜を貫通し、タンパク質の大部分は細胞質外に存在することが予測された。AOC2 を CHO 細胞で強制発現させて免疫染色した結果、このタンパク質が細胞外に存在することが明らかとなった。AOC2 と縦列に存在する AOC3 は Vascular Adhesion Protein-1 としてかなり詳しく解析されており、組織内の炎症箇所において血管内皮細胞やリンパ節で発現して遊走してくるリンパ球の捕捉や細胞内への誘導を行う。大腸菌銅依存性アミン酸化酵素の結晶構造から AOC2 と AOC3 はきわめて類似しており、アミノ

酸配列から予測された、モチーフ、活性部位、銅接着部位、糖修飾部位など、多くの点について類似していることが明らかとなった。AOC2 は AOC3 から誕生したと考えられ、AOC3 が組織特異的でないのとは対照的に AOC2 は網膜特異的な遺伝子として進化を遂げたと考えられる。網膜に特異的な銅依存性アミン酸化酵素がなぜ、必要なのか？ラットには AOC2 が存在しないが、AOC3 はその働きを代行しているのか？これらの疑問を追及することが神経節細胞の機能を理解するために必要と考えられる。

5) 幹細胞から眼組織への分化に関する研究

MAP キナーゼ系が ES 細胞の生存維持や分化誘導に必須の役割を果たすこと、またニワトリ同様、マウスにおいても色素上皮には Pax6 感受性の幹細胞が存在し網膜組織へと分化誘導可能であることを見出した。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されている。マウス眼形成においても眼形成関連の転写因子を制御している可能性が示唆された。また、哺乳動物においても幹細胞から網膜組織を構築できることが示唆された。

6) 幹細胞から網膜細胞への分化誘導に関する研究

発生期網膜細胞の pellet 培養中に ES 細胞を混合して培養したところ、ES 細胞の多くが神経幹細胞のマーカーとされる nestin を発現した細胞に分化することが確認された。また、ES 細胞が map2 陽性の神経細胞、GFAP 陽性の星状グリア細胞等の神経系細胞に分化していることも確認された。ES 細胞由来の細胞中において、オプシン等、網膜細胞に特有な分子の発現は確認されていないが、現在この点に関してはさらに詳細な検討を行っている。ES 細胞の胎生期網膜への移植に関しては、妊娠母体を麻酔したうえで開腹し、子宮壁上から直接眼球内に細胞を移植するという方法をとっている。移植する細胞の量、具体的な移植手技等に関する検討を行ったうえで最適と考えられた条件を設定することはできたと考えている。ただし、移植そのものは成功しても、母体の死、流産等が多くみられ、実際に移植細胞が眼球内に保たれたままの状態でも成育に成功した個体は得られていないのが現状である。現在これらの問題を含めて、さらに検討を進めている状況である。ES 細胞に関しては、これを培養下で発生期網膜の環境に暴露することによりこの細胞を神経系細胞へと分化誘導可能であることが明らかにされた。しかしながら、現時点では網膜細胞に特有の分子の発現を誘導するに至っていない状況である。今後、これらの神経系細胞に網

膜固有のアイデンティティを付与するための何らかの工夫を行うなど、さらに検討が必要であると考えている。このような現状では、培養条件に較べてより生理的な条件、すなわち正常の発生過程にある網膜内でES細胞が実際に網膜細胞への分化を示すか否かを検討することは重要であり、また興味深い問題でもある。しかしながら、胎仔に対する細胞移植実験は、技術的な理由からあまり行われてこなかったのが実情であろう。本研究では、この点を克服するべくマウス胎仔眼内にES細胞を移植し、その後妊娠を継続させ、分娩後、眼組織の発生を待って結果の判定を行うという実験計画をたて、各段階における技術的な問題の克服に取り組んだ。残念ながら、移植そのものは再現性よく行うことが可能となったが、その後の母体の死、流産等で実際に移植細胞を持った状態で成育に成功した例は得られていない。今後継続してさらに検討を進める予定である。

7) 細胞外シグナル伝達物質 Shh の網膜形成への役割

Holoprosencephaly の軽症例 2 例で E167G と V185M の Shh 変異がみつかった。いずれも眼底には黄斑の位置異常や形成不全がみられた。Shh の Pax6 発現に対する生化学的検討では、Shh-WT は Patched や Gli1 の発現を亢進し、Pax6 の発現を抑制した。しかし 1) でみつかった Shh 変異体ではこの効果がみられなかった。Shh の gain-of-function に関する *in vivo* 実験で、Shh を眼球外に過剰導入すると、その付近の網膜の形成が遅れ、Pax6 の発現も抑制された。Loss-of-function に関する *in vivo* 実験では、cyclopamine を染み込ませたマイクロビーズを埋め込んだ付近の網膜は厚くなり、Pax6 の発現が亢進していた。Shh は発生初期には神経管腹側に発現し、その変異で重度 holoprosencephaly が起こる。軽度の holoprosencephaly で顔面形成異常が起こる機転は不明であったが、最近、発生の比較的初期で顔面正面に Shh が発現し、この異常で顔面形成異常が起こることが明らかになった。黄斑は顔面の反対側に位置する。顔面正面からの Shh に濃度勾配があれば、眼球の対側にある黄斑領域では Shh による Pax6 の抑制効果が最も少なくなり、網膜形成が相対的に最も高度になる。昨年度、Pax6(+5a) isoform が黄斑領域に発現して高度な網膜形成を行っていることを明らかにしたが、今回の Shh の位置情報と合わせて、高度な視覚の形成が決定されると考えられる。このような網膜の細胞密度、分化を決めるシステムの解明は、正常に近い視感度をもつ網膜再生のために有用と思われる。

D. 結論

ムコ多糖症 VII 型モデルマウスの角膜混濁および網膜変性に対する生後早期におけるアデノウイルスベクターによって欠損遺伝子を補充し、遺伝子治療法の有効性を明らかにした。Cre/lox P 系・アデノウイルスベクターを用いた Caspase8 導入による家兎水晶体上皮細胞増殖の抑制実験を行い、後発白内障の治療として応用できる可能性を示した。水晶体細胞特異的な遺伝子発現を司る転写因子 MafA/L-Maf と c-Maf の発現と機能を解析した。緑内障で最も障害を受ける網膜神経節細胞で発現する網膜特異的なアミン酸化酵素

(AOC2) を検討し、血管内皮細胞でリンパ球の接着機能を持ち、VAP-1 からタンパク質進化して網膜特異的な機能を持つに至ったと考えられた。幹細胞の特性を明らかにする目的で、マウス胚性幹(ES)細胞の生存・死・分化誘導を主要な細胞内情報伝達系である MAP キナーゼ (ERK や SAPK/JNK) 系や眼形成関連の転写因子 PAX6 の観点から検討した。その結果、ES 細胞の生存維持には ERK 系が、分化誘導に伴う遺伝子発現には SAPK/JNK 系が関与することを見出した。また、PAX6 遺伝子をマウス胎児の色素上皮に導入することによって、ニワトリ同様に網膜組織へと分化誘導する可能であることを見出した。ES 細胞の可能性を検証する目的で、*in vitro*, *in vivo* において発生期マウス網膜の環境の中に置かれたマウス ES 細胞の網膜細胞への分化の可能性を検討した。*in vitro* で発生期網膜細胞と混合培養された ES 細胞の多くは神経系細胞へと分化することが明らかとなった。シグナル伝達物質 Shh が Pax6 を制御して網膜の分化を決定している証拠を得た。顔面で発現する Shh が Pax6 の発現に影響を及ぼし、網膜の分化や眼球の形態、ひいては黄斑の位置付けや視線を決定していることが示唆された。

E. 健康危険情報 特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

Kamata Y, Tanabe A, Kanaji A, Kosuga M, Fukuhara Y, Li XK, 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 mucopolysaccharidosis VII. *Gene Ther* 10: 406-414, 2003.

Kanaji A, Kosuga M, Li XK, Fukuhara Y, Tanabe A, Kamata Y, Azuma N, Yamada M, Sakamaki T,

Toyama Y, Okuyama T. Improvement of skeletal lesions in mice with mucopolysaccharidosis type VII by neonatal adenoviral gene transfer. *Mol Ther.* 8:718-725, 2003.

Fujino M, Kawasaki M, Funeshima N, Kitazawa Y, Kosuga M, Okabe K, Hashimoto M, Yaginuma H, Mikoshiba K, Okuyama T, Suzuki S, Li XK. CrmA gene expression protects mice against concanavalin-A-induced hepatitis by inhibiting IL-18 secretion and hepatocyte apoptosis. *Gene Ther.* 10:1781-1790, 2003.

M. Takahashi, N.J. Deb, Y. Kawashita, S.W. Lee, J. Furgueil, T. Okuyama, N. Roy-Chowdhury, B. Vikram, J. Roy-Chowdhury, C. Guha. A novel strategy for in vivo expansion of transplanted hepatocytes using preparative hepatic irradiation and FasL-induced hepatocellular apoptosis. *Gene Ther* 10:304-313. 2003.

M. Takahashi, H. Saito, K. Atsukawa, H. Ebinuma, T. Okuyama, H. Ishii. Bcl-2 prevents doxorubicin-induced apoptosis of human liver cancer cells. *Hepatol Res* 25:192-201. 2003.

Y. Abe, M. Takamura, M. Sawada, M. Hisano, Y. Tsuji, N. Saikawa, T. Okuyama, Y. Odajima, K. Fujita, H. Chikaoka, Y. Iikura. Case of insertion, inversion and deletion of chromosome 6. *Pediatr Int* 44: 530-533. 2003.

小須賀基通, 奥山虎之: 出生前における遺伝性疾患の遺伝子診断. *医学のあゆみ* 2003; 204: 987-990

Kobayashi K, Shibutani M, Takeuchi G, Ohnuma K, Miyake Y, Noda T, Negishi K, Ohno K. Ocular single-pass MTF calculation and retinal image simulation from measurements of the polarized double-pass ocular PSF. *Journal of Biomedical Optics.* 2004; 9: 154-161.

Kobayashi K, Shibutani M, Takeuchi G, Ohnuma K, Miyake Y, Negishi K, et al. Measurement of the single-pass modulation transfer function and simulation of the retinal image of the human eye with a newly developed point spread function analysis system. *Proceeding of SPIE*, 2003; 4951: 112-119.

Negishi K, Asaka A, Yamada M, Nishina S, Uemura Y, Yasuda K, Azuma N. Pax6 expression in the after-cataract formation following lens aspiration in chick. *Invest Ophthalmol Vis Sci* [in submission].

Negishi K, Okuyama T, O'hira A, Kosuga M, Asaka A, Sasaki K, Yamada M, Yasuda K, Azuma N:

Inhibition of Rabbit Lens Epithelial Cell Proliferation by Adenovirus-mediated Fas-ligand Gene Expression using Cre/loxP System. *Human gene therapy* [投稿準備中].

Negishi K, Ohnuma K, Ikeda T, Noda T. Visual Simulation of Retinal Images through a Decentered Monofocal and a Refractive Multifocal IOL and Evaluation of the Optical Performance. *Am J Ophthalmol* [in submission]

Negishi K, Kobayashi K, Ohnuma K, et al. Objective Evaluation of Visual Function using a New Point Spread Function Analysis System in Eyes with Cataract, Pseudophakia, and after LASIK. *Invest Ophthalmol Vis Sci* [in submission]

根岸一乃ほか: 各部観察の要点とコツ. *眼科診療プラクティス* 6:55-61, 2003

根岸一乃: 徹照像からの後発白内障の定量的解析法. *眼科診療プラクティス* 6:62-63, 2003

根岸一乃: 術後視機能の再評価. *眼科手術* 16: 441-446, 2003

横山 康弘, 平松宏一, 大沼一彦, 小林克彦, 根岸一乃, 野田徹: PSF アナライザーによるコンタクトレンズ装着眼の網膜像評価, あたらしい眼科 20:263-269, 2003

Ando, K. et al. 2003. Isolation and characterization of an alternatively spliced variant of transcription factor Islet-1. *J. Mol. Endocrinol.* 31:419-425.

Kataoka, K. et al. 2004. Differentially expressed Maf family transcription factors, c-Maf and MafA, activate glucagon and insulin gene expression in pancreatic islet α - and β -cells. *J. Mol. Endocrinol.* 32: 9-20.

Kishimoto, H. et al. Different Properties of SEK1 and MKK7 in Dual Phosphorylation of Stress-induced Activated Protein Kinase SAPK/JNK in Embryonic Stem Cells: *J. Biol. Chem.* 278, 16595-16601 (2003).

Okamura-Oho, Y. et al. Dentatorubral-pallidolucylian atrophy (DRPLA) protein is phosphorylated by c-Jun NH₂-Terminal Kinase. *Hum. Mol. Genet.*, 12, 1535-1542 (2003).

Saibil, SD. et al. Weak agonist self-peptides promote selection and tuning of virus-specific T cells. *Eur. J. Immunol.* 33, 685-696 (2003).

Nishina, H. et al. Activation Mechanism and

Physiological Roles of Stress-Activated Protein Kinase/c-Jun NH₂-Terminal Kinase in Mammalian Cells. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* (2003) in press.

Momose, H. et al. Dual Phosphorylation of Phosphoinositide 3-Kinase Adaptor Grb2-Associated Binder 2 Is Responsible for Superoxide Formation Synergistically Stimulated by Fcγ and Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine Receptors in Differentiated THP-1 Cells. *J. Immunol.*, 171, 4227-4234 (2003).

Terai, S. et al. An *in vivo* model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J. Biochem.*, 134, 551-558 (2003).

Yamamoto, N. et al. A subpopulation of bone marrow cells depleted by a novel antibody, anti-Liv8, is useful for cell therapy to repair damaged liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 1110-1118 (2004).

Nishitai, G. et al. Stress induces mitochondria-mediated apoptosis independent of SAPK/JNK activation in ES cells. *J. Biol. Chem.* 279, 1621-1626 (2004).

Wada, T. et al. MKK7 couples stress signaling to G2/M cell cycle progression and cellular senescence. *Nat. Cell Biol.* in press (2004).

Nishina, H. et al. (2004) [book] SAPK/JNK signaling participates in embryonic hepatoblast proliferation via a pathway different from NF-κB-induced anti-apoptosis. in *Stem Cell and Liver Regeneration*. pp. 1-14, Springer-Verlag Tokyo, Inc., Tokyo.

Abe N, Watanabe T, Suzuki Y, Matsumoto N, Masaki T, Mori T, Sugiyama M, Chiappetta G, Fusco A, Atomi Y: An increased high-mobility group A2 expression level is associated with malignant phenotype in pancreatic exocrine tissue. *Br. J. Cancer* 89: 2104-2109 (2003)

Abe N, Watanabe T, Izumisato Y, Suzuki Y, Masaki T, Mori T, Sugiyama M, Fusco A, Atomi Y: High mobility group A1 [HMGA1] is expressed in metastatic adenocarcinoma to the liver and intrahepatic cholangiocarcinoma, but not in hepatocellular carcinoma: its potential use in the diagnosis of liver neoplasms. *J Gastroenterol.* 38: 1144-1149 (2003)

Kishino T, Mori H, Nishikawa K, Ishiyama N, Yasui H, Sugiyama M, Atomi Y, Sakamoto M, Saito S,

Ishida H, Takahashi S, Watanabe T: Hepatocellular carcinoma containing sarcomatous lesions in a normal liver, accompanied by secondary Budd-Chiari syndrome. *J Clin. Gastroenterol.* 38: - (2004)

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)

Abe N, Watanabe T, Izumisato Y, Suzuki Y, Masaki T, Mori T, Sugiyama M, Fusco A, Atomi Y: High mobility group A1 [HMGA1] is expressed in metastatic adenocarcinoma to the liver and intrahepatic cholangiocarcinoma, but not in hepatocellular carcinoma: its potential use in the diagnosis of liver neoplasms. *J Gastroenterol.* 38: 1144-1149 (2003)

Abe N, Watanabe T, Sugiyama M, Yanagida O, Masaki T, Mori T, Atomi Y: Endoscopic treatment or surgery for undifferentiated early gastric cancer? *Am. J Surg.* (in press)

Ohtake Y, Tanino T, Suzuki Y, Miyata H, Taomoto M, Azuma N, Tanihara H, Araie M, Mashima Y. Phenotype of cytochrome P4501B1 gene (CYP1B1) mutations in Japanese patients with primary congenital glaucoma. *Br J Ophthalmol.* 87:302-304, 2003.

Azuma N, Yamaguchi Y, Handa H, Tadokoro K, Asaka A, Yamada M. Mutations of the PAX6 gene detected in patients with a variety of optic nerve malformations. *Am J Hum Genet.* 72:1565-1570, 2003.

Siozawa N, Tazima S, Azuma N, Hiroki K, Kono T, Itou M. Histological study of the hypertrophic placentas and open eyelid observed in cloned fetuses. *J Reprod. Dev.* 49:221-226, 2003.

Kanaji A, Kosuga M, Li X-K, Fukuhara Y, Tanabe A, Kamata Y, Azuma N, Yamada M, Sakamaki T, Toyama Y, Okuyama T. Improvement of skeletal lesions in mice with mucopolysaccharidosis type vii by neonatal adenoviral gene transfer. *Molecular Therapy*, In press.

Nishitai G, Shimizu N, Negishi T, Kishimoto H, Nakagawa K, Kitagawa D, Watanabe T, Momose H, Ohata S, Tanemura S, Asaka S, Kubota J, Saito R, Yoshida H, Mak TW, Wada T, Penninger JM, Azuma N, Nishina H, Katada T. Stress induces mitochondria-mediated apoptosis independent of SAPK/JNK activation in ES cells. *J. Biol. Chem.* In press.

Nishina H, Nakagawa K, Azuma N, Katada T.
[review] Activation mechanism and physiological roles of stress-activated protein Kinase/c-Jun NH2-terminal kinase in mammalian cells. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*. In press.

Azuma N, Kawase E, Suzuki Y, Yamada M. Mutation of PAX6 gene detected in patients with congenital optic nerve anomalies. *European Society of Ophthalmology*, 337-343, 2003.

東 範行. 視線と視野の成り立ち. *日本視能訓練士協会誌*, 32:33-34, 2003.

東 範行. 網膜光障害の分子メカニズム. *日本の眼科*, 74:223-224, 2003.

東 範行. 先天白内障の原因遺伝子. *日本の眼科*, 74:113-114, 2003.

大西克尚・東 範行・雨宮次生. 小児の悪性腫瘍. *眼科*, 45:753-756, 2003.

東 範行. 画像ファイリングシステム NAVIS. *眼科診療プラクティス*, 文光堂, 東京, 6: 170-174, 2003.

東 範行. 眼組織. *Critical Neuroscience*. 中外医学社, 21, 1187-1191, 2003.

東 範行. 未熟児網膜症の管理. *眼科診療の最前線*, 金原出版(株), 東京, 223-230, 2003.

川瀬英理子・東 範行. 学校保健. *小児眼科のABC*. 日本医事新報社, 東京, 174-177, 2003.

東 範行(編). *視神経乳頭のみかた*. *眼科診療プラクティス*, 文光堂, 東京, 2003.

東 範行. 目の異常. *最新保育保健の基礎知識*. 日本小児医事出版社, 東京, 298-300, 2003.

東 範行. 感覚器疾患. *新体系看護学 29 小児看護②健康障害をもつ小児の看護*. メジカルフレンド社, 東京, 338-343, 2003.

野田英一郎・東 範行. 眼疾患 結膜炎. *実践小児診療*. 日本医師会, 東京, 318. 2003.

野田英一郎・東 範行. 眼疾患 睫毛内反. *実践小児診療*. 日本医師会, 東京, 318. 2003.

鈴木由実・東 範行. 眼疾患 屈折異常. *実践小児診療*. 日本医師会, 東京, 318. 2003.

芝 大介・東 範行. 眼疾患 斜視. *実践小児診療*. 日本医師会, 東京, 319. 2003.

鈴木由実・東 範行. 眼疾患 眼異物. *実践小児診療*. 日本医師会, 東京, 319. 2003.

芝 大介・東 範行. 眼疾患 眼振. *実践小児診療*. 日本医師会, 東京, 320. 2003.

2. 学会発表

Ozaki M, Haga S, Zhang H-Q, Terui K, Ogawa W, Inoue H, Okuyama T, Takeda K, Akira S, Enosawa S, Suzuki S. Constitutive Activation of Stat3 by Adenoviral Gene Transfer Confers Resistance to Liver Against Fas-Mediated Liver Injury: Caspase Inhibition and Redox-dependent Mechanisms. *The American Society of Gene Therapy ANNUAL MEETING (6th)*. June. 5, 2003, Washington, D.C.

Kosuga M, Kanaji A, Sakamaki T, Toyama Y, Okuyama T. Improvement of Skeletal Lesions in Mice with Mucopolysaccharidosis Type VII by Neonatal Adenoviral Gene Transfer. *The American Society of Gene Therapy ANNUAL MEETING (6th)*. June. 7, 2003, Washington, D.C.

Fukuhara Y, Hara Y, Okuyama T, Kato M, Li X-K. Hemagglutinating Virus of Japan (HVJ) Envelope Vector Successfully Mediated β -Glucuronidase Gene into Mucopolysaccharidosis VII Mice. *The American Society of Gene Therapy ANNUAL MEETING (6th)*. June. 8, 2003, Washington, D.C.

福原康之、李小康、小須賀基通、島崎琢也、岡野栄之、山田正夫、鈴木盛一、奥山虎之: 神経幹細胞を用いたムコ多糖症 VII 型マウスの中樞神経病変に対する細胞治療法. 第 2 回日本再生医療学会、神戸、2003.3.18

Y.Fukuhara, Y.Hata, T. Okuyama, M.Kato, X-K.Li Hemagglutinating Virus of Japan (HVJ) Envelope Vector Successfully Mediated Beta-Glucuronidase Gene into Mucopolysaccharidosis VII Mice. *The 9th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy*, Tokyo, 2003.7.19

福原康之、李小康、小須賀基通、袴田陽二、遠藤仁司、島崎琢也、岡野栄之、山田正夫、奥山虎之: 神経幹細胞を用いたムコ多糖症 VII 型マウスの中樞神経病変に対する細胞治療法の開発. 日本人類遺伝学会第 48 回大会、長崎、2003.10.22.

深見真紀、奥山虎之、小須賀基通、西村玄、室谷浩二、服部義、佐藤直子、緒方勤：SHOX ホモの異常とヘテロの異常を伴う Langer 中肢骨短縮症の 2 例。日本人類遺伝学会第 48 回大会、長崎、2002.10.22.

福原康之、小須賀基通、島崎琢也、岡野栄之、遠藤仁司、李小康、山田正夫、奥山虎之：神経幹細胞を用いたムコ多糖症 VII 型マウスの中樞神経病変に対する細胞治療。第 46 回日本先天代謝異常学会、松江、2003.11.21.

福原康之、李小康、小須賀基通、島崎琢也、岡野栄之、山田正夫、鈴木盛一、奥山虎之：神経幹細胞を用いたムコ多糖症 VII 型マウスの中樞神経病変に対する細胞治療。第 9 回日本ライソゾーム病研究会、東京、2003.12.5.

小須賀基通、金治有彦、福原康之、鎌田裕子、東範行、奥山虎之：アデノウイルスベクターを用いた新生児ムコ多糖症 VII 型マウスの骨病変に対する遺伝子治療。第 9 回日本ライソゾーム病研究会、東京、2003.12.5.

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.. Photonics West, Biomedical Optics 2003, San Jose, USA

Negishi K, Ohnuma K., Kobayashi K., Shibutani M., Takeuchi G, Ohno K., Noda T. A New system to estimate Modulation transfer function in a human aftercataract eye by analyzing a digital transillumination photograph. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual meeting, 2003, Fort Lauderdale, USA..

Kaneda E, Negishi K, Shimizu S, Yamazaki S, Kurosaka D, Yamada, M, Mashima, Y. Accuracy of intraocular lens power calculation after PTK using different methods of determining corneal refractive power. Symposium on cataract, IOL, and Refractive Surgery, 2003, San Francisco, USA.

Negishi K, Yamazaki S, Shimizu S, Ohno K, Noda T, Ohnuma K, Okazaki Y, Shioiri T. Comparing the spatially resolved refractometer and the Hartmann-Shack sensor to measure the ocular wave aberration. Symposium on cataract, IOL, and Refractive Surgery, 2003, San Francisco, USA

Kawamura R, Noda K, Negishi K, Inoue M, Tomiyama A, Kurihara T, Imamura Y, Ishida S,

Oguchi Y. Scleral buckling surgery for retinal detachment after laser epithelial keratomileusis. 19th APAO meeting 2003 November, Bangkok, Thailand

根岸一乃:術後視機能の再評価.第 18 回日本眼内レンズ屈折手術学会 (H15.6.27~29) シンポジウム 5「QOV をめざした白内障手術」、京都 (招待講演)

根岸一乃: Wavefront でみる屈折矯正手術.第 18 回日本眼内レンズ屈折手術学会 (H15.6.27~29) シンポジウム 6「QOV をめざした屈折矯正手術」、京都 (招待講演)

根岸一乃:夜間視機能低下.The 4th Annual Ocular Surgery News Symposium in NAGOYA (H15.9.28~29)、名古屋 (招待講演)

根岸一乃:コントラスト感度測定の臨床的有用性.第 4 回眼科臨床機器研究会シンポジウム (H15.11.29)、横浜 (招待講演)

根岸一乃、大沼一彦、小林克彦、竹内楽、渋谷雅博、大野建治、野田徹:デジタル徹照写真解析による後発白内障眼の MTF 推定モデル構築.第 107 回日本眼科学会総会、福岡、2003

太刀川貴子、後藤郁子、佐藤絹枝、松原正男、根岸一乃、野田徹、大野建治、林 健史、西尾幸治、福間康文:両眼同時自覚他覚検眼装置の屈折弱視、不同視弱視眼への検討.第 107 回日本眼科学会総会、福岡、2003

野田 徹、大野建治、饗庭秀剛、岡崎芳郎、福間康文、平山典夫、根岸一乃、大沼一彦

周辺部眼底観察像の光学的評価.第 107 回日本眼科学会総会、福岡、2003

小坂晃一、根岸一乃、山崎重典、清水里美、大沼一彦、大野建治、野田徹:測定眼閉鎖および開放時の瞳孔径の比較.第 18 回日本眼内レンズ屈折手術学会 (H15.6.27~29)、京都

重安千花、根岸一乃、山崎重典、清水里美、黒坂大次郎、真島行彦:新しい照射プログラム OATZ による LASIK の術後早期成績.第 18 回日本眼内レンズ屈折手術学会 (H15.6.27~29)、京都

太田博仁 根岸一乃 山崎重典 清水里美 黒坂大次郎 真島行彦:遠見低矯正を目標とした LASIK 患者の満足度.第 18 回日本眼内レンズ屈折手術学会 (H15.6.27~29)、京都

大野建治、野田 徹、根岸一乃、大沼一彦:入射瞳中心と視線の瞳孔径による変化. 第回日本臨床眼科学会 (H15.10.31~11.3)、名古屋

根岸一乃、大沼一彦、小林克彦、渋谷雅博、竹内楽、大野建治、野田徹:PSF 解析装置による多焦点眼内レンズ挿入眼の網膜像推定. 第回日本臨床眼科学会 (H15.10.31~11.3)、名古屋

渋谷雅博、竹内楽、小林克彦、大沼一彦、根岸一乃、大野建治、野田 徹:PSF 解析装置による非対称性収差の網膜像シミュレーション第 39 回日本眼光学学会・第 18 回眼科 ME 合同学会総会 (H15.9.13~14)、大阪

横山康弘、大沼一彦、竹内楽、小林克彦、根岸一乃、大野建治、野田 徹:PSF アナライザーによる単焦点および二重焦点ソフトコンタクトレンズ装着の視機能評価.第 39 回日本眼光学学会・第 18 回眼科 ME 合同学会総会 (H15.9.13~14)、大阪

太刀川貴子、後藤郁子、佐藤絹枝、松原正男、根岸一乃、野田徹、大野建治、林 健史、西尾幸治、福間康文:両眼同時自覚他覚検眼装置における自覚および他覚屈折値の検討. 第 39 回日本眼光学学会・第 18 回眼科 ME 合同学会総会 (H15.9.13~14)、大阪

石井和彦、大沼一彦、根岸一乃、大野建治、野田徹:水晶体の波面解析方法. 第39回日本眼光学学会・第18回眼科ME合同学会総会 (H15.9.13~14)、大阪

内野裕一・根岸一乃・山崎重典・清水里美・黒坂大次郎・真島行彦: Laser in situ keratomileusis 追加矯正症例の検討.第 27 回日本眼科手術学会総会 (H16.1.30~2.1)、東京

K. Kataoka et al. MafA/L-maf in insulin gene regulation. JBS Bio-Frontier Symposium. 2003. Tsukuba, Japan.

Keystone Symposia,カナダ国,バンフ,2003 年 1 月

3rd European Meeting on Zebrafish and Medaka Development and Genetics,フランス国,パリ,2003 年 6 月

第 76 回日本生化学会,横浜,2003 年 10 月

第 26 回日本分子生物学会,神戸,2003 年 12 月

東 範行. 教育講演 小児の眼疾患. 第 28 回日本小児科学会東京地方会 (東京) 2003 年 3 月.

東 範行. 教育講演 電子カルテにおけるファイリングシステム. 日本白内障・眼内レンズ・屈折矯正学会 (神戸) 2003 年 6 月.

東 範行. 特別講演 眼の形態形成遺伝子. 生理化学談話会 (大阪) 2003 年 11 月

東 範行. シンポジウム 硝子体網膜手術の限界とこれからの対応—小児硝子体手術の適応と限界. 日本眼科学会 (福岡) 2003 年 4 月.

東 範行. シンポジウム 眼をつくる仕組みと再生医療. 成育公開シンポジウム (東京) 2003 年 5 月.

東 範行. シンポジウム 網膜芽細胞腫全国登録. 第 28 回日本小児眼科学会 (神戸) 2003 年 6 月.

東 範行. シンポジウム 電子カルテ化と眼科診療—ペーパーレス電子カルテの現状と問題点. 第 57 回日本臨床眼科学会 (名古屋) 2003 年 10 月.

東 範行. シンポジウム Vision2020 の進展—我が国における小児失明の現状と対策. 第 57 回日本臨床眼科学会 (名古屋) 2003 年 10 月.

東 範行. 25G 径結膜硝子体手術. 第 57 回日本臨床眼科学会 (名古屋) 2003 年 10 月.

東 範行. 25G 径結膜硝子体手術の幕明け. 第 57 回日本臨床眼科学会 (名古屋) 2003 年 10 月.

Azuma N. Update treatment of retinopathy of prematurity in Japan. Advanced Vitreous Surgery Course. (Tokyo) 2003 年 10 月.

Azuma N. PAX6 mutations in congenital eye anomalies and role of the gene on retinal development. International Symposium of the Pax6 Gene (Sendai) 2003 年 7 月.

Azuma N, Kawase E, Suzuki Y, Yamada M. Mutation of the PAX6 gene detected in patients with congenital optic nerve anomalies. The 14 th Congress of the European Society of Ophthalmology (Madrid) 2003 年 6 月.

芝 大介・東 範行. 先天網膜ひだの硝子体手術. 日本眼科手術学会 (京都) 2003 年 1 月.

鈴木由美・川瀬英理子・仁科幸子・東 範行. 左右の異なった視神経異常を呈した3症例. 第28回日本小児眼科学会(神戸)2003年6月.

仁科幸子・越後貫滋子・赤池祥子・東 範行. 早期発症外斜視手術例の検討. 第28回日本小児眼科学会(神戸)2003年6月.

鈴木由美・川瀬英理子・仁科幸子・東 範行. 乳頭周囲ぶどう腫の光干渉断層像. 第57回日本臨床眼科学会(名古屋)2003年10月.

芝 大介・東 範行. 電子カルテにおけるデータファイリング. 第57回日本臨床眼科学会(名古屋)2003年10月.

仁科幸子・東 範行. 先天・発達白内障術後の緑内障. 第57回日本臨床眼科学会(名古屋)2003年10月.

鎌田裕子・仁科幸子・東 範行. 瞳孔形成を行った角膜水晶体分離不全の1例. 第57回日本臨床眼科学会(名古屋)2003年10月.

羽藤 晋・仁科幸子・東 範行・山田昌和. 早期発症調節性内斜視の治療経過. 第57回日本臨床眼科学会(名古屋)2003年10月.

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

ムコ多糖症 VII 型モデルマウスの角膜混濁および網膜変性に対する アデノウイルスベクターによる新生仔期の遺伝子治療

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 VII 型モデルマウスの角膜混濁および網膜変性に対する生後早期におけるアデノウイルスベクターによって欠損遺伝子を補充し、遺伝子治療法の有効性を明らかにした。

A. 研究目的

ムコ多糖症 VII 型などの先天代謝異常症に合併する角膜混濁および網膜変性などの眼病変は、生後早期から徐々に進行するため、症状が軽微な新生仔期の治療は症状進行の予防に有効である。そこで本研究は、ムコ多糖症 VII 型マウスに対してヒト β -グルクロニダーゼを発現するアデノウイルスベクターを新生仔期に経静脈的全身投与を行い、網膜病変および角膜混濁に対する治療効果について、生化学的・病理組織学的な評価を行い、検討することを目的とした。

B. 研究方法

ヒト β -グルクロニダーゼ遺伝子を発現するアデノウイルスベクター AxCAhGUS を作成し、このウイルスベクター AxCAhGUS 1×10^7 pfu を生後 24 時間以内の新生仔ムコ多糖症 VII 型マウスの浅側頭静脈から全身投与した。投与 30 日後に眼球を摘出し、導入遺伝子発現を調べるため角膜および網膜の β -グルクロニダーゼ活性染色を行った。また治療効果を検討するため治療群と無治療群のムコ多糖症 VII 型マウスの角膜および網膜の組織病理所見について比較検討した。すべての動物実験は、国立成育医療センター研究所実験動物使用指針および動物実験指針を遵守して行われた。

C. 研究結果

生後早期に AxCAhGUS を投与されたムコ多糖症 VII 型マウスの角膜および網膜における β -グルクロニダーゼ活性染色を行ったところ、生後早期にウイルスベクターの投与を受けたムコ多糖症 VII 型 I マウスの網膜色素細胞は、ほとんどが β -グルクロニダーゼ陽性細胞であった。角膜および網膜上皮の組織病理所見を検討したところ、生後早期にウイルスベクター投与を受けたムコ多糖症 VII 型マウスでは、無治療のムコ多糖症 VII

型マウスと比較して、角膜組織および網膜上皮における空胞変性細胞の数および腫大が明らかに減少していた。これらの結果から生後早期の AxCAhGUS 全身投与により、ムコ多糖症 VII 型マウスの角膜および網膜に遺伝子導入は可能となり、角膜および網膜上皮は病理組織学的に改善されることが確認された。

D. 考察

本研究の結果から、新生仔期に AxCAhGUS を経静脈的に全身投与することによりムコ多糖症 VII 型マウスの角膜や網膜に対し、遺伝子導入が可能になり、角膜混濁や網膜病変の正常化が可能であることが示された。一般に組換えアデノウイルスベクター AxCAhGUS を成熟したムコ多糖症 VII 型マウスに対して経静脈的に全身投与すると、肝・脾・心臓などの罹患臓器における β -グルクロニダーゼ酵素の活性上昇し、罹患臓器における病理所見の改善が認められる。しかし角膜や網膜での酵素活性の上昇や角膜混濁や網膜病変などの眼の病理所見の改善は認められない。理由としては、角膜混濁や網膜変性が不可逆的に進行していること、角膜は無血管野で血液網膜関門が存在するため、アデノウイルスベクターによる経静脈的な遺伝子導入方法が困難であることが考えられる。生後早期におけるアデノウイルスベクター投与により、角膜や網膜に遺伝子導入が可能となり、成熟期では治療が困難である角膜混濁や網膜病変の改善が認められた。今後の臨床応用を考えた場合、幹細胞移植などによる眼組織の再生や修復による根治的な治療と、アデノウイルスベクターによる一過性の高い遺伝子導入効率をもつ遺伝子治療の組み合わせが現実的であると考えられる。本疾患などの先天代謝異常症の進行性の眼病変に対しては、新生仔期にまず本法により眼病変の進行を予防し、その後、幹細胞移植などによる根治

的治療を行うことにより治療効果が高まると考えられる。

E. 結論

ムコ多糖症 VII 型モデルマウスの角膜混濁および網膜変性に対する生後早期におけるアデノウイルスベクターによる遺伝子治療法の有効性を明らかにした。本法と幹細胞移植療法を併用することにより、先天代謝異常症の進行性眼病変の根治治療が可能になると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1) 国内

1. 論文発表

小須賀基通, 奥山虎之: 出生前における遺伝性疾患の遺伝子診断. 医学のあゆみ 2003; 204: 987-990

2. 学会発表

福原康之、李小康、小須賀基通、島崎琢也、岡野栄之、山田正夫、鈴木盛一、奥山虎之: 神経幹細胞を用いたムコ多糖症 VII 型マウスの中枢神経病変に対する細胞治療法. 第 2 回日本再生医療学会、神戸、2003.3.18

Y.Fukuhara, Y.Hata, T. Okuyama, M.Kato, X-K.Li Hemagglutinating Virus of Japan (HVJ) Envelope Vector Successfully Mediated Beta-Glucuronidase Gene into Mucopolysaccharidosis VII Mice. The 9th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, 2003.7.19

福原康之、李小康、小須賀基通、袴田陽二、遠藤仁司、島崎琢也、岡野栄之、山田正夫、奥山虎之: 神経幹細胞を用いたムコ多糖症 VII 型マウスの中枢神経病変に対する細胞治療法の開発. 日本人類遺伝学会第 48 回大会、長崎、2003.10.22.

深見真紀、奥山虎之、小須賀基通、西村玄、室谷浩二、服部義、佐藤直子、緒方勤: SHOX ホモの異常とヘテロの異常を伴う Langer 中肢骨短縮症の 2 例. 日本人類遺伝学会第 48 回大会、長崎、2002.10.22.

福原康之、小須賀基通、島崎琢也、岡野栄之、遠藤仁司、李小康、山田正夫、奥山虎之: 神経幹細胞を用いたムコ多糖症 VII 型マウスの中枢神経病変に対する細胞治療. 第 46 回日本先天代謝異常学会、松江、2003.11.21.

福原康之、李小康、小須賀基通、島崎琢也、岡野栄之、山田正夫、鈴木盛一、奥山虎之: 神経幹細胞を用いたムコ多糖症 VII 型マウスの中枢神経病変に対する細胞治療. 第 9 回日本ライソゾーム病研究会、東京、2003.12.5.

小須賀基通、金治有彦、福原康之、鎌田裕子、東範行、奥山虎之: アデノウイルスベクターを用いた新生児ムコ多糖症 VII 型マウスの骨病変に対する遺伝子治療. 第 9 回日本ライソゾーム病研究会、東京、2003.12.5.

2) 海外

1. 論文発表

Kamata Y, Tanabe A, Kanaji A, Kosuga M, Fukuhara Y, Li XK, 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 mucopolysaccharidosis VII. *Gene Ther* 10: 406-414, 2003.

Kanaji A, Kosuga M, Li XK, Fukuhara Y, Tanabe A, Kamata Y, Azuma N, Yamada M, Sakamaki T, Toyama Y, Okuyama T. Improvement of skeletal lesions in mice with mucopolysaccharidosis type VII by neonatal adenoviral gene transfer. *Mol Ther* 8:718-725, 2003.

Fujino M, Kawasaki M, Funeshima N, Kitazawa Y, Kosuga M, Okabe K, Hashimoto M, Yaginuma H, Mikoshiba K, Okuyama T, Suzuki S, Li XK. CrmA gene expression protects mice against concanavalin-A-induced hepatitis by inhibiting IL-18 secretion and hepatocyte apoptosis. *Gene Ther* 10:1781-1790, 2003.

M. Takahashi, N.J. Deb, Y. Kawashita, S.W. Lee, J. Furgeil, T. Okuyama, N. Roy-Chowdhury, B. Vikram, J. Roy-Chowdhury, C. Guha. A novel strategy for in vivo expansion of transplanted hepatocytes using preparative hepatic irradiation and FasL-induced hepatocellular apoptosis. *Gene Ther* 10:304-313. 2003.

M. Takahashi, H. Saito, K. Atsukawa, H. Ebinuma, T. Okuyama, H. Ishii. Bcl-2 prevents doxorubicin-induced apoptosis of human liver cancer cells. *Hepato Res* 25:192-201. 2003.

Y. Abe, M. Takamura, M. Sawada, M. Hisano, Y. Tsuji, N. Saikawa, T. Okuyama, Y. Odajima, K. Fujita, H. Chikaoka, Y. Iikura. Case of insertion, inversion and deletion of chromosome 6. *Pediatr Int* 44: 530-533. 2003.

2. 学会発表

Ozaki M, Haga S, ZhangH-Q, Terui K, Ogawa W, Inoue H, Okuyama T, Takeda K, Akira S, Enosawa S, Suzuki S. Constitutive Activation of Stat3 by Adenoviral Gene Transfer Confers Resistance to Liver Against Fas-Mediated Liver Injury: Caspase Inhibition and Redox-dependent Mechanisms. The American Society of Gene Therapy ANNUAL MEETING (6th). June. 5, 2003, Washington, D.C.

Kosuga M, Kanaji A, Sakamaki T, Toyama Y, Okuyama T. Improvement of Skeletal Lesions in Mice with Mucopolysaccharidosis Type VII by Neonatal Adenoviral Gene Transfer. The American Society of Gene Therapy ANNUAL MEETING (6th). June. 7, 2003, Washington, D.C.

Fukuhara Y, Hara Y, Okuyama T, Kato M, Li X-K. Hemagglutinating Virus of Japan (HVJ) Envelope Vector Successfully Mediated β - Glucuronidase Gene into Mucopolysaccharidosis VII Mice The American Society of Gene Therapy ANNUAL MEETING (6th). June. 8, 2003, Washington, D.C.

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

Cre/lox P 系・アデノウイルスベクターを用いた Caspase 8 導入による 白色家兎水晶体吸引術後の水晶体上皮細胞増殖の抑制

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：現在の白内障術後の主要合併症である後発白内障の治療法の一環として、Cre/lox P 系・アデノウイルスベクターを用いた Caspase 8 導入により白色家兎水晶体吸引術後の水晶体上皮細胞増殖の抑制が可能かどうかについて検討した。方法は白色家兎に対する水晶体吸引術後、Cre/loxP 系により LacZ を発現させる群（グループ 1：

AxCALNLacZ+AxCANCre）、Cre/loxP 系を用いて caspase 8 を発現させる群（グループ 2：AxCALNcas8+AxCANCre）、Cre/loxP 系において Cre 酵素のプロモーターとして水晶体に特異的な $\alpha 1$ クリスタリンプロモーターを用い caspase 8 を発現させる群

（AxCALNcas8+ α -1-crystalline-AxCANCre）の 3 種のアデノウイルスを前房内投与し、術 2 日後に眼球を摘出、グループ 1 に対しては β ガラクトシダーゼ活性、グループ 2、3 に対してはアポトーシス細胞の出現に関して組織化学的に検討した。組織科学的な検討の結果、グループ 1 では水晶体上皮細胞が染色され LacZ の発現がみられ、同時に虹彩や隅角にも lacZ が発現していた。グループ 2 では、水晶体上皮細胞にアポトーシスがみられ、同時に隅角や網膜の細胞にも同様にアポトーシスがみられた。しかし、グループ 3 では、水晶体上皮細胞には高率でアポトーシスが起ったが、隅角や網膜にはアポトーシス細胞はみられなかった。また、いずれの群においても前房内の組織に異常な炎症や組織損傷の所見はなかった。結論として、Cre/lox P 系・アデノウイルスベクターを用いた Caspase 8 導入による家兎水晶体上皮細胞増殖の抑制は後発白内障の治療として応用できる可能性があるが、臨床応用のためには発現率を向上させる必要があると考えられた。

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る。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る。年間 100 万件以上という白内障の手術件数を考えると、これは医学的ばかりでなく、医療経済上も大きな問題である。後発白内障の治療としては、古くは観血的治療、すなわち再手術による混濁の

除去、また現在の主流はレーザーによる後囊切開であるが、観血的治療では患者の肉体的、精神的負担が大きく、両者とも術後炎症を惹起するという問題が解決されていない。近年の新しい試みとして行われている前房内への薬物投与は、非組織特異的であるため、眼球のような一つのコンパートメントに複数の組織がある臓器では、他組織への障害が強く、これも問題である。そこで、近年もうひとつの試みとしておこなわれているのが遺伝子治療である。遺伝子治療には、組織特異的なプロモーター、すなわち、網膜であればロドプシン、水晶体であれば α クリスタリンのプロモーターにつなげて標的遺伝子を発現させる方法があるが、プロモーターの発現量が低く、効率が変わるという問題がある。このような問題をふまえ、昨年度の研究では、部位特異的組換え酵素 CreloxP 系と、Fas を発現する細胞においてアポトーシスを誘導する Fas リガンド（以下 FasL と略す）を用いて、水晶体上皮細胞に特異的に FasL を発現させ、アポトーシスを誘導することにより、術後に増殖した水晶体上皮細胞を選択的かつ効率的に

除去できるかどうかについて検討した。その結果、応用のためには発現率を向上させる必要があると考えられた。今回は同様のシステムを用いて Caspase 8 を発現させて水晶体上皮細胞特異的にアポトーシスを誘導する方法について検討した。

B. 研究方法

アデノウイルス

この研究では、COS-TPC method(Kanegae *et al.*, 1995). を用いて、AxCANLacZ, AxCALNLacZ, AxCANCre, AxCALNCas 8, alpha-1-crystallin-AxCANCre, の 4 種類のアデノウイルスを用いた。AxCANLacZ と AxCANCre は CAG プロモーター制御下において、それぞれ E.coli beta-galactosidase と Cre recombinase を発現する E1/E3-deleted アデノウイルスベクターである(Sato *et al.* 1998)。Alpha-1-crystallin-AxCANCre は $\alpha 1$ クリスタリンプロモーター制御下において Cre recombinase を発現するアデノウイルスベクターである。AxCALNLacZ, AxCALNCas8, は Cre recombinase 存在下でプロモーターとそれぞれ LacZ, Caspase 8 の間の stuffer sequence が欠失したときに、LacZ, Caspase 8 を発現するアデノウイルスベクターである。抗体価は AxCALNLacZ, AxCALNCas8, AxCANCre, alpha-1-crystallin-AxCANCre の順に 2.5×10^9 pfu/ μ l, 1×10^9 pfu/ μ l, 1×10^9 pfu/ μ l, 9×10^9 pfu/ μ l であった。

材料と手術方法

材料は体重約 2 Kg の白色家兎で、手術 1 時間前に 0.3% ノルフロキサシンと 0.1% ジクロフェナクナトリウムを点眼し、手術 1 時間前より 0.5% トロピカミドと 5% フェニレプリンの点眼を 3 回行った。白色家兎に対し、ケタミン(45mg/kg)(三共)とキシラジン(8mg/kg)(バイエル)の筋注にて全身麻酔を行った。手術顕微鏡下にて 0.4% イソジン液(明治)にて手術眼を消毒後、3mm 角膜切開、連続前囊切開後に超音波水晶体手術装置(Cavitron 9001™, Alcon Surgical, Fort Worth)を用いて水晶体超音波乳化吸引術を施行した。術中の前房保持にはヒアルロン酸ナトリウム、灌流液はヘパリン(5,000 U/500ml)、エピネフリン(2mg/500ml)、デキサメサゾン(2mg/500ml)入りの BSS plus®(Alcon Laboratories)を用いた。術創は 10-0 ナイロン糸で 1 針縫合した。手術終了時に以下に示すようなアデノウイルスベクターを前房内注射した。注入したアデノウイルスは、グループ 1 :

AxCALNLacZ(0.25ml)+ AxCANCre(0.25ml)

(Cre/loxP 系により LacZ を発現させる群)、グループ 2 : AxCALNCas 8(0.25ml)+

AxCANCre(0.25ml) (Cre/loxP 系を用いて Caspase 8 を発現させる群)、グループ 3 : AxCALNCas 8(0.25ml)+ alpha-1-crystallin-AxCANCre(0.25ml)

この方法の臨床

(Cre/loxP 系において Cre 酵素のプロモーターとして水晶体に特異的な $\alpha 1$ クリスタリンプロモーターを用い Caspase 8 を発現させる群) である。最後に 12 mg のトブラマイシン (Shionogi, Osaka, Japan を結膜下注射し、テラマイ眼軟膏® (Pfizer, New York, NY) を点入した。

組織

手術後 2 日でペントバルビタールの過剰投与にて白色家兎を処理し、眼球を摘出したあと、直ちに 4% 中性緩衝ホルマリンにて固定し、組織を切断した。また、一部は通常の方法でパラフィン包埋したのち、2- μ m の切片として TUNEL 法を行った。

白色家兎眼における β ガラクトシダーゼ活性の組織化学的検出

X-gal 溶液は 44 mM Hepes, 3mM フェリシアンカリウム, 150mM 塩化ナトリウム, 1.3mM 塩化マグネシウムを含む緩衝液を用いて作成した。切断した組織を X-gal 溶液でインキュベート後、アルコール脱水を行い、パラフィン包埋し、4 μ m の切片を作成した。切片は核染ののち、光学顕微鏡で観察した。

白色家兎眼におけるアポトーシス細胞の組織化学的検出

アポトーシス細胞の検出は ApopTag plus kit (Oncor, Gaithersburg, MD, and USA)を用いて、Tunel nick-end labeling 法で行った。

C. 研究結果

組織科学的な検討の結果、グループ 1 では水晶体上皮細胞が染色され LacZ の発現がみられ、同時に虹彩や隅角にも lacZ が発現していた。グループ 2 では、水晶体上皮細胞にアポトーシスがみられ、同時に隅角や網膜の細胞にも同様にアポトーシスがみられた。しかし、グループ 3 では、水晶体上皮細胞には高率でアポトーシスが起こったが、隅角や網膜にはアポトーシス細胞はみられなかった。また、いずれの群においても前房内の組織に異常な炎症や組織損傷の所見はなかったが、前回報告した Fas リガンドによるアポトーシスと発現効率あまり変化がなかった。

D. 考察

今回用いた系では、 α クリスタリンプロモーターによって水晶体特異的に発現する Cre により、特異的に Stuffer が切り出され、強力な CAG プロモーターから目的遺伝子である FasL が発現した。この Cre 酵素による ON/OFF 発現法は従来の誘導法にくらべて、1)誘導前の発現が極めて低い、2)誘導後の発現は強力な CAG プロモーターから行われるので格段に高い、3)組換えアデノウイルスをスイッチに使うことにより、培養細胞系だけで

なく動物個体にも用いることが可能である、などの際立った特長がある。結果で示されたごとく、今回は水晶体上皮細胞に組織特異的に効率よく遺伝子が入ったが、前回の Fas リガンドを用いた方法と効率に大差はなく、水晶体上皮細胞の除去は不完全であった。解決法としては、反復投与を行う可能性も考えられるが、静脈注射によるアデノウイルスベクターの投与が可能である肝臓などと違い、眼への投与法は局所投与でなければならぬため、反復投与は侵襲が強く、臨床的には実現困難である。ただし、今回のような1回の投与に限っては、術後炎症は通常の手術後の反応と組織学的には差がなく、投与自体の副作用と考えられる所見はなかった。以上より、臨床応用のためには、第一に発現効率の向上が重要である。また、今回の検討とは離れるが、このような系はその組織特異性から白内障治療の際の薬物投与などにも応用できる可能性があると考えられた。

E. 結論

Cre/lox P 系・アデノウイルスベクターを用いた Caspase8 導入による家兎水晶体上皮細胞増殖の抑制は後発白内障の治療として応用できる可能性があるが、臨床応用のためには発現率を向上させる必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kobayashi K, Shibutani M, Takeuchi G, Ohnuma K, Miyake Y, Noda T, Negishi K, Ohno K. Ocular single-pass MTF calculation and retinal image simulation from measurements of the polarized double-pass ocular PSF. *Journal of Biomedical Optics*. 2004; 9: 154-161.

Kobayashi K, Shibutani M, Takeuchi G, Ohnuma K, Miyake Y, Negishi K, et al. Measurement of the single-pass modulation transfer function and simulation of the retinal image of the human eye with a newly developed point spread function analysis system. *Proceeding of SPIE*, 2003; 4951: 112-119.

Negishi K, Asaka A, Yamada M, Nishina S, Uemura Y, Yasuda K, Azuma N. Pax6 expression in the after-cataract formation following lens aspiration in chick. *Invest Ophthalmol Vis Sci* [in submission].

Negishi K, Okuyama T, O'hira A, Kosuga M, Asaka A, Sasaki K, Yamada M, Yasuda K, Azuma N: Inhibition of Rabbit Lens Epithelial Cell Proliferation by Adenovirus-mediated Fas-ligand Gene Expression using Cre/loxP System. *Human gene therapy* [投稿準備中].

備中].

Negishi K, Ohnuma K, Ikeda T, Noda T. Visual Simulation of Retinal Images through a Decentered Monofocal and a Refractive Multifocal IOL and Evaluation of the Optical Performance. *Am J Ophthalmol*[in submission]

Negishi K, Kobayashi K, Ohnuma K, et al. Objective Evaluation of Visual Function using a New Point Spread Function Analysis System in Eyes with Cataract, Pseudophakia, and after LASIK. *Invest Ophthalmol Vis Sci* [in submission]

根岸一乃ほか:各部観察の要点とコツ. *眼科診療プラクティス* 6:55-61,2003

根岸一乃: 徹照像からの後発白内障の定量的解析法. *眼科診療プラクティス* 6:62-63,2003

根岸一乃: 術後視機能の再評価. *眼科手術* 16: 441-446, 2003

横山 康弘、平松宏一、大沼一彦、小林克彦、根岸一乃、野田徹:PSF アナライザーによるコンタクトレンズ装着眼の網膜像評価, *あたらしい眼科* 20:263-269, 2003

2. 学会発表

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. *Photonics West, Biomedical Optics 2003, San Jose, USA*

Negishi K, Ohnuma K., Kobayashi K., Shibutani M., Takeuchi G, Ohno K., Noda T. A New system to estimate Modulation transfer function in a human aftercataract eye by analyzing a digital transillumination photograph. *The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual meeting, 2003, Fort Lauderdale, USA.*

Kaneda E, Negishi K, Shimizu S, Yamazaki S, Kurosaka D, Yamada, M, Mashima, Y. Accuracy of intraocular lens power calculation after PTK using different methods of determining corneal refractive power. *Symposium on cataract, IOL, and Refractive Surgery, 2003, San Francisco, USA.*

Negishi K, Yamazaki S, Shimizu S, Ohno K, Noda T, Ohnuma K, Okazaki Y, Shioiri T. Comparing the spatially resolved refractometer and the Hartmann-Shack sensor to measure the ocular wave aberration. *Symposium on cataract, IOL, and*

Refractive Surgery, 2003, San Francisco, USA

Kawamura R, Noda K, Negishi K, Inoue M, Tomiyama A, Kurihara T, Imamura Y, Ishida S, Oguchi Y. Scleral buckling surgery for retinal detachment after laser epithelial keratomileusis. 19th APAO meeting 2003 November, Bangkok, Thailand

根岸一乃:術後視機能の再評価.第18回日本眼内レンズ屈折手術学会 (H15.6.27~29) シンポジウム5 「QOVをめざした白内障手術」、京都 (招待講演)

根岸一乃: Wavefront でみる屈折矯正手術.第18回日本眼内レンズ屈折手術学会 (H15.6.27~29) シンポジウム6「QOVをめざした屈折矯正手術」、京都 (招待講演)

根岸一乃:夜間視機能低下.The 4th Annual Ocular Surgery News Symposium in NAGOYA (H15.9.28~29)、名古屋 (招待講演)

根岸一乃:コントラスト感度測定の臨床的有用性.第4回眼科臨床機器研究会シンポジウム (H15.11.29)、横浜 (招待講演)

根岸一乃、大沼一彦、小林克彦、竹内楽、渋谷雅博、大野建治、野田徹:デジタル徹照写真解析による後発白内障眼のMTF推定モデル構築.第107回日本眼科学会総会、福岡、2003

太刀川貴子、後藤郁子、佐藤絹枝、松原正男、根岸一乃、野田徹、大野建治、林健史、西尾幸治、福岡康文:両眼同時自覚他覚検眼装置の屈折弱視、不同視弱視眼への検討.第107回日本眼科学会総会、福岡、2003

野田 徹、大野建治、饗庭秀剛、岡崎芳郎、福岡康文、平山典夫、根岸一乃、大沼一彦

周辺部眼底観察像の光学的評価.第107回日本眼科学会総会、福岡、2003

小坂晃一、根岸一乃、山崎重典、清水里美、大沼一彦、大野建治、野田徹:測定眼閉鎖および開放時の瞳孔径の比較.第18回日本眼内レンズ屈折手術学会 (H15.6.27~29)、京都

重安千花、根岸一乃、山崎重典、清水里美、黒坂大次郎、真島行彦:新しい照射プログラム OATZ による LASIK の術後早期成績.第18回日本眼内レンズ屈折手術学会 (H15.6.27~29)、京都

太田博仁 根岸一乃 山崎重典 清水里美 黒

坂大次郎 真島行彦:遠見低矯正を目標とした LASIK 患者の満足度.第18回日本眼内レンズ屈折手術学会 (H15.6.27~29)、京都

大野建治、野田 徹、根岸一乃、大沼一彦:入射瞳孔中心と視線の瞳孔径による変化.第回日本臨床眼科学会 (H15.10.31~11.3)、名古屋

根岸一乃、大沼一彦、小林克彦、渋谷雅博、竹内楽、大野建治、野田徹:PSF解析装置による多焦点眼内レンズ挿入眼の網膜像推定.第回日本臨床眼科学会 (H15.10.31~11.3)、名古屋

渋谷雅博、竹内楽、小林克彦、大沼一彦、根岸一乃、大野建治、野田 徹:PSF解析装置による非対称性収差の網膜像シミュレーション.第39回日本眼光学学会・第18回眼科ME合同学会総会 (H15.9.13~14)、大阪

横山康弘、大沼一彦、竹内楽、小林克彦、根岸一乃、大野建治、野田 徹:PSFアナライザーによる単焦点および二重焦点ソフトコンタクトレンズ装着の視機能評価.第39回日本眼光学学会・第18回眼科ME合同学会総会 (H15.9.13~14)、大阪

太刀川貴子、後藤郁子、佐藤絹枝、松原正男、根岸一乃、野田徹、大野建治、林健史、西尾幸治、福岡康文:両眼同時自覚他覚検眼装置における自覚および他覚屈折値の検討.第39回日本眼光学学会・第18回眼科ME合同学会総会 (H15.9.13~14)、大阪

石井和彦、大沼一彦、根岸一乃、大野建治、野田徹:水晶体の波面解析方法.第39回日本眼光学学会・第18回眼科ME合同学会総会 (H15.9.13~14)、大阪

内野裕一・根岸一乃・山崎重典・清水里美・黒坂大次郎・真島行彦: Laser in situ keratomileusis 追加矯正症例の検討.第27回日本眼科手術学会総会 (H16.1.30~2.1)、東京

H. 知的財産の出願・登録状況
なし