

水晶体特異的転写因子 MafA/L-Maf の機能に関する研究

分担研究者 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

研究要旨：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。

A. 研究目的

ニワトリにおける水晶体細胞の分化のマスター遺伝子である転写因子 L-Maf の哺乳類ホモログの性状を調べることで、哺乳類の眼の発生における役割をあきらかにする。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果

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て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。

D. 考察

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。

E. 結論

新規 Maf 関連遺伝子産物 MafA の機能解析を行い、水晶体および膵島内分泌細胞の発生と機能維持における Maf 転写因子群の機能をあきらかにすることができた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 論文発表

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.

2. 学会発表

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

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 |

網膜特異的銅依存性アミン酸化酵素（AOC2）の機能解析

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：今回の研究によって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アミン酸化酵素（AOC2）は血管内皮細胞でリンパ球の接着機能を持つ、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るいくつかの証拠を得ることができた。

A. 研究目的

緑内障によって障害を受ける網膜神経節細胞で最大の発現量のある網膜特異的銅依存性アミン酸化酵素（AOC2）の機能をヒト、マウス、ラットの遺伝子、及びタンパク質の解析によって明らかにする。

B. 研究方法

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CELLERA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ン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。

C. 研究結果

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1Kb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。

D. 考察

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。

E. 結論

網膜特異的銅依存性アミン酸化酵素の遺伝子構造解析によってこの遺伝子と最も類似する血管接着分子AOC3と縦列して存在することを発見する。AOC2とAOC3のアミノ酸配列がきわめて類似していることから、AOC2は神経節細胞に隣接する細胞との接着に必要な新しい接着因子と考えられ、複数の実験によってこれを証明した。

F. 健康管理情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shinsuke Umeda, Michihiro T. Suzuki, Yasuhiro Yoshikawa, Fumino Iwata, Keiko Fujiki, Atsushi Kanai, Naoko Sanuki, Yasuhiko Tanaka, and Takeshi Iwata. Cloning and Characterization of ELVLO4 Gene in Cynomolgus (*Macaca fascicularis*) Monkey. *Experimental Animal* 52:(2) (2003)

Qiang Zhang, Yukihiro Mashima, Setsuko Noda, Yutaka Imamura, Jun Kudoh, Nobuyoshi Shimizu, Takatsune Nishiyama, Shinsuke Umeda, Yasuhiko Tanaka, and Takeshi Iwata. Characterization of AOC2 Gene Encoding a Copper-binding Amine Oxidase Expressed Specifically in Retina *Gene* 318:45-53 (2003)

Kanako Izumi, Yukihiro Mashima, Minoru Obazawa, Yuichiro Ohtake, Tomihiko Tanino, Hiroshi Miyata, Yasuhiko Tanaka, and Takeshi Iwata. Variants of Myocilin Gene in Japanese Patients With Normal Tension Glaucoma. *Ophthalmic Research* 35:345-350 (2003)

Yasuhiko Tanaka, Jun Utsumi, Mizuo Matsui, Tetsuo Sudo, Noriko Nakamura, Masato Mutoh, Akemi Kajita, Saburo Sone, Kazuteru Kigasawa, Masahiko Shibuya, Venkat N. Reddy, Qiang Zhang, and Takeshi Iwata. Purification, Molecular Cloning, and Expression of a Novel Growth Promotive Factor for Retinal Pigment Epithelial Cells, REF-1/TFPI-2 *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:245-252 (2004)

Minoru Obazawa, Yukihiro Mashima, Naoko Sanuki, Setsuko Noda, Jun Kudoh, Nobuyoshi Shimizu, Yasuhiko Tanaka, and Takeshi Iwata. Comparable Analysis of Porcine Optineurin and Myocilin Expression in Trabecular Meshwork Cells and Astrocytes from Optic Nerve Head. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2004 in press)

2. 学会発表

岩田岳、讃岐奈緒子、真島行彦、田中靖彦. 水晶発振子マイクロバランスを用いた OPTN と RAB8 の分子間相互作用の解析. 日本眼科学会 2003年5月 (福岡)

尾羽澤実、真島行彦、讃岐奈緒子、野田節子、工藤純、清水信義、田中靖彦、岩田岳. 日本眼科学会 2003年5月 (福岡)

Iwata T, Sanuki N, Mashima Y, Tanaka Y. Analysis of Optineurin-RAB8 Protein Interaction Using Quartz-Crystal Microbalance (QCM) The Association of Research in Vision and Ophthalmology, May 2003, Fort Lauderdale Florida USA

Obazawa M, Sanuki N, Mashima Y, Noda S, Kudo J, Shimizu N, Tanaka Y, Iwata T. Expression of Porcine Myocilin and Optineurin in Trabecular Meshwork Cells and Astrocytes from Optic Nerve Head. The Association of Research in Vision and Ophthalmology, May 2003, Fort Lauderdale Florida USA

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

幹細胞から眼組織への分化に関する研究

分担研究者 仁科 博史 東京大学大学院薬学系研究科 助教授

研究要旨：再生医療の材料として期待されている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い出した。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い出した。これらの結果は、再生医療に求められる幹細胞の試験管内培養法や眼組織への分化誘導系を確立する上で重要な知見を提供すると考えられる。

A. 研究目的

眼組織構築に関わるシグナル伝達系を解明し、将来の再生医療の基盤となる眼組織分化誘導系の開発を行う。

B. 研究方法

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。実験動物の取り扱いは、東京大学動物実験委員会の承認を得、そのプロトコールに従って遂行されている。

C. 研究成果

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い出した。

D. 考察

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。

E. 結論

ES 細胞の生存や分化誘導に関わるシグナル伝達系の一端が解明された。また、哺乳動物においても PAX6 発現誘導系を利用した幹細胞から眼組織への分化誘導系の開発が期待される。

F. 健康危険情報

該当する危険はなし

G. 研究発表

1. 論文発表

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-pallidolusian 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- κ B-induced anti-apoptosis. in *Stem Cell and Liver Regeneration*. pp. 1-14, Springer-Verlag Tokyo, Inc., Tokyo.

2. 学会発表

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

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 本研究プロジェクトで作製されたMAPキナーゼ関連分子特異抗体が、(株)生物医学研究所から発売されている。

幹細胞からの網膜細胞の分化誘導に関する研究

分担研究者 渡邊 卓 杏林大学医学部臨床検査医学教室 教授

研究要旨：多分化能を持つES細胞は組織もしくは臓器の再生、再建治療のための格好の細胞供給源となる可能性を有している。本研究では、網膜再建・再生治療のための細胞供給源としての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が、現時点ではこれらの神経系細胞中に網膜細胞に特有なマーカーの保有を確認し得るに至っていない。*in vivo*の実験としては胎子の眼球内へのES細胞の移植を試みているが、現在結果を得るに至っていない。いずれの実験についても今後さらに広範な検討を継続する必要があると考えている。

A. 研究目的

網膜に起因する視覚障害に対して根本的な治療法が全く確立されていない現状において網膜の再生・再建による治療法の開発が待たれているが、これには、神経幹細胞を含む各種幹細胞より効率的に網膜細胞・網膜組織を分化誘導する手法の開発が必須である。

当グループではこの目的に向けて、成体脳（海馬）由来の神経幹細胞および胚性幹細胞から網膜細胞を誘導するための様々な試みを行ってきたが、本年度は胚性幹細胞（ES細胞）を網膜細胞の細胞源として用いる可能性に関する検討を行った。

B. 研究方法

【マウス胚性幹細胞（ES細胞）より網膜細胞を分化誘導する試み】

多分化能を持つES細胞は、組織もしくは臓器の再生、再建治療のための格好の細胞供給源となる可能性を有している。我々はマウスの系を用い、ES細胞より効率的に網膜細胞を分化誘導する方策の検討を行った。この際、昨年度までに行ったラット脳由来神経幹細胞におけると同様の手法を用いた。すなわち、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日マウス胎子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。

（倫理面への配慮）本研究では、ヒトのサンプル等は使用していない。実験動物の取り扱いについては、ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Researchに準拠した。

C. 研究結果

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、ロドプシン等、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に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。

D. 考察

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。

E. 結論

多分化能を持つES細胞は、組織もしくは臓器の再生、再建治療のための格好の細胞供給源となる可能性を有している。本研究では、網膜再建・再生治療のための細胞供給源としてのES細胞の可能性を検証する目的で、*in vivo*, *in vitro*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。現時点では、残念ながらES細胞から、網膜細胞そのものを誘導したと断定できる所見を得るに至っていない。おそらく、考え得る誘導の条件をさらに広範に検討することが必要であろうと考えている。

F. 健康危険情報

該当する危険はなし

G. 研究発表

1. 論文発表

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)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

細胞外シグナル伝達物質 Shh の網膜形成への役割

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：Pax6 遺伝子の変異が黄斑低形成で見つかり、この遺伝子が網膜の高度な関与し、初期網膜で運命づけを行うと考えられる。今回、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。

A. 研究目的

Pax6 遺伝子は、眼の形成に重要な働きをしており、ショウジョウバエ初期胚に発現させると (target expression)、触覚や翅、肢などに異所性に複眼が発生する。発生期の網膜にも発現し、その形成に関与していることが良く知られている。また、ヒトの黄斑低形成で PAX6 の変異が見つかったので、高次の視覚に関する構造形成に関与している可能性がある。しかし、これらの位置づけや部位における分化の差がどのように決定されているかは知られていない。

Shh は発生初期に神経管腹側に発現し、その変異によって holoprosencephaly が起こる。しかし、やや遅れて顔面にも発現し、その異常によって holoprosencephaly の軽症例が起こると考えられている。Shh が Pax6 の発現に影響することが知られているので、今回は Shh の網膜の分化への役割を検討した。

B. 実験方法

1) Shh の変異の検討

Holoprosencephaly の軽症例で Shh の変異を検討した。

2) 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。

3) 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。

4) 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

1) Shh の変異の検討

Holoprosencephaly の軽症例 2 例で E167G と V185M の Shh 変異が見つかった。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。

2) Shh の Pax6 発現に対する生化学的検討

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) でみつけた Shh の変異体ではこの効果がみられなかった。

3) Shh の gain-of-function に関する in vivo 実験

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。

4) Shh の loss-of-function に関する in vivo 実験

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。

D. 考察

今回の研究によって、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。

Shh の変異によって黄斑の位置異常や形成不全がみられた。生化学的検討で Shh が Pax6 を抑制し、Shh 変異体ではこの効果がみられなかった。さらに、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。

Shh は発生初期には神経管腹側に発現し、その変異で重度の 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。

E. 結論

顔面で発現するシグナル伝達物質 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を含む高度な視機能形成を決定していることが示唆された。

F. 健康危険情報

該当する危険は無し

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, Okuyama 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 VII. *Gene Therapy*,10:406-414, 2003.

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A B C. 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. 眼科診療ブックティス,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

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ー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ー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の進展ー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 14th 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涉断層像. 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

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
Nishina, H. et al.	SAPK/JNK signaling participates in embryonic hepatoblast proliferation via a pathway different from NF- κ B-induced anti-apoptosis.		Stem Cell and Liver Regeneration.	Springer-Verlag Tokyo, Inc.	Tokyo	2004	1-14
東 範行	未熟児網膜症の管理.		眼科診療の最前線	金原出版	東京	2003	223-230
川瀬英理子 東 範行	学校保健.		小児眼科の A B C.	日本医事新報社	東京	2003	174-177
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	2003	298-300
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	2003	338-343
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	2003	318
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	2003	318
鈴木由美 東 範行	眼疾患 屈折異常.		実践小児診療	日本医師会	東京	2003	318
芝 大介 東 範行	眼疾患 斜視.		実践小児診療	日本医師会	東京	2003	319
鈴木由美 東 範行	眼疾患 眼異物.		実践小児診療	日本医師会	東京	2003	319
芝 大介 東 範行	眼疾患 眼振.		実践小児診療	日本医師会	東京	2003	320

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, Tanabe A, Kanaji A, Kosuga M, Fukuhara Y, Li XK,	Long-term normalization in the central nervous system, ocular manifestations, and skeletal deformities by a single	Gene Ther	10	406-414	2003

Suzuki S, Yamada M, Azuma N, Okuyama T.	systemic adenovirus injection into neonatal mice with mucopolysaccharidosis VII.				
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	781-1790	2003
M. Takahashi, NJ. Deb, Y. Kawashita, SW. 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	204	987-990	2003
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.	J. Biomedical Optics	9	154-161	2004
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	4951	112-119	2003
根岸一乃ほか	各部観察の要点とコツ	眼科診療ブ 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.	眼科診療ブ 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.	Isolation and characterization of an	J. Mol.	31	419-425	2002

	alternatively spliced variant of transcription factor Islet-1.	Endocrinol.			
Kataoka, K. et al.	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	2004
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-pallidoluysian atrophy (DRPLA) protein is phosphorylated by c-Jun NH ₂ -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 NH ₂ -Terminal Kinase in Mammalian Cells.	J. Biol. Regul. Homeost. Agents.		in press	2004
Momose, H. et al.	Dual Phosphorylation of Phosphoinositide 3-Kinase Adaptor Grb2-Associated Binder 2 Is Responsible for Superoxide Formation Synergistically Stimulated by Fc γ and Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine Receptors in Differentiated THP-1 Cells.	J. Immunol.	171	4227-4234	2003
Terai, S. et al.	An <i>in vivo</i> 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	2003
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
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,	Hepatocellular carcinoma containing	J Clin.		in press	2004

Nishikawa K, Ishiyama N, Yasui H, Sugiyama M, Atomi Y, Sakamoto M, Saito S, Ishida H, Takahashi S, Watanabe T	sarcomatous lesions in a normal liver, accompanied by secondary Budd-Chiari syndrome.	Gastroenterol.			
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	2004
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	2004
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	2004
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	2004
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	2004
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	6	170-174	2003
東 範行	眼組織.	Critical Neuroscience.	21	1187-1191	2003
東 範行 (編)	視神経乳頭のみかた.	眼科診療プラクティス			2003

20030410

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表」をご参照ください。