

厚生労働科学研究費補助金

感覚器障害研究事業

眼疾患に対する遺伝子・細胞治療に関する研究

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

眼疾患に対する遺伝子・細胞治療に関する研究 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. リソゾーム蓄積症に合併する眼疾患に対する遺伝子治療法の開発 奥山 虎之 国立成育医療センター 遺伝診療科	12
2. 眼形成にかかわる疾患責任遺伝子産物の機能 山田正夫 国立成育医療センター研究所 成育遺伝研究部	14
3. 緑内障原因遺伝子オプチニューリン(OPTN)の機能解析 岩田 岳 国立病院東京医療センター 臨床研究センター	18
4. 眼疾患に対する遺伝子・細胞治療に関する研究 —視細胞の分化調節機構に関する研究— 岡野 栄之 慶應義塾大学医学部生理学教室	20
5. 幹細胞から眼組織への分化誘導に関する研究 仁科 博史 東京大学大学院薬学系研究科	23
6. 眼の各組織に特異的に遺伝子導入するためのベクターシステムの開発 東 範行 国立成育医療センター 眼科	25

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	29
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物、別刷	35
-----------------	----

眼疾患に対する遺伝子・細胞治療に関する研究

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：複雑な構造をもつ眼の組織に特異的に与える遺伝子・細胞治療の開発を目的とした。ムコ多糖症角膜病変に対する遺伝子治療の可能性を検討した。疾患モデルマウスの角膜に切開を加えそこに、アデノウイルスベクターを局所投与し、欠損酵素であるβ-グルコニダーゼを遺伝子導入で発現させ、角膜混濁の原因である角膜細胞の空胞変性が短期間で正常化することが示された。PAX6 ミスセンス変異を持つ発現ベクターを構築し、試験管内反応および培養細胞実験系によって、それらの転写調節能・DNA結合能を解析し、転写制御と形態形成の関係を明らかにした。ヒト DRPLA は神経変性疾患の責任遺伝子として同定単離されたが、他生物種における研究から、DRPLA ホモログは眼と四肢の形成に係わる転写調節因子であることが明らかとなった。ヒト DRPLA が転写調節に関与するか否かを明らかにし、眼形成へ関与の可能性を追求した。緑内障原因遺伝子として発見されたオプチニューリン(OPTN)は発症頻度がきわめて低いことが明らかとなってきたが、E50K 変異については正常者では未だ発見されていない。OPTN 遺伝子変異や多型が RAB8 タンパク質の結合部位に近いことから、OPTN への変異が及ぼす OPTN-RAB8 相互作用への影響を水晶発振子によって調べた。原発性・続発性に障害された神経網膜、特に網膜視細胞の再生を可能にするために、マウス網膜を用いて網膜視細胞の分化誘導に関与する調節機構の一部を明らかにした。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。眼組織に特異的な遺伝子治療を行うため、クリスタリン、ミオシリンあるいはオプシン遺伝子のプロモーター領域の遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを作成し、Cre 組み換え酵素により水晶体および隅角でのみ導入遺伝子を発現できるシステムを構築した。ウイルスベクターを導入した際、周囲の組織にも浸潤していたが、導入遺伝子の発現は水晶体、隅角あるいは網膜視細胞に限局していた。

分担研究者 奥山 虎之 国立成育医療センター 眼科医長
 山田 正夫 国立成育医療センター 研究所 成育遺伝研究部部長
 岩田 岳 国立病院東京医療センター 臨床研究センター 研究室長
 岡野 栄之 慶應義塾大学医学部生理学教室 教授
 仁科 博史 東京大学大学院薬学系研究科 助教授

A. 研究目的
 視覚器の構造は他の臓器に比べると、角膜、水晶体、網膜、視神経など多くの組織を持ち、きわめて複雑であることが特徴である。おのおのの組織に特異的な疾患が起こるので、視覚障害の原因も多彩であり、これらが複雑に相俟って重症化することもある。これまでに個々の疾患に応じて薬物や手術の治療法が開発され、大きな成果をあげてきている。しかし、薬物はある程度は組織特異的に効果を示すが他組織へも影響を及ぼし、手術は顕微鏡下で行っても微細な眼組織では限界がある。しかも、疾患の原因を根本的に治すことが

できるものは少ない。

近年、分子生物学の進歩によって、多くの疾患で原因あるいは病態が分子レベルで明らかになりつつある。基礎医学でも、研究対象が設計図である遺伝子から蛋白の特性、さらにはこれを産生する細胞へと移りつつある。臨床においては、眼科以外の分野で、先天代謝異常に酵素補充療法あるいは遺伝子治療が行われ、腫瘍にも遺伝子治療が試みられている。細胞治療は、血液疾患で骨髄移植が行われ、神経変性疾患で幹細胞の移植が試みられている。これらは、疾患の原因を除くに近い治療法であるが、眼科領域では、研究レベルでもごくわずかしが行われていない。しかし、眼の疾患の多くがさまざまな組織内で別個に起こる以上、個々の組織に応じた治療が必要である。我々は、これまでに組織に固有な遺伝子のプロモータを用いて、組織特異的に発現させる遺伝子導入法を開発した。これを用いれば、角膜（疾患は混濁）、隅角（緑内障）、水晶体（白内障）あるいは網膜（ジストロフィ、腫瘍）で組織特異的かつ限局した遺伝子治療を行うことができる。また我々は、動物実験ではあるが、代謝性角膜混濁に酵素補充、遺伝子導入あるいは産生細胞移植を行って、角膜を透明化させることに成功した。さらに、幹細胞と形態形成遺伝子を用いて、水晶体や網膜の細胞あるいは組織を再生させる研究を行ってきた。近年、さまざまな臓器で再生医学の研究が行われているが、再生細胞の移植も補充療法として行われるべきである。これら欠損した遺伝子、蛋白、細胞の補充や投与は、まず酵素欠損症やジストロフィ、緑内障などに対する効果が期待される。さらに、薬物代謝酵素が発現されるような遺伝子・細胞を用いれば、その部位に限って投与された薬物の効果を上げることができる。これらは内科的治療の側面であるが、さらに外科的操作へも応用が可能である。例えば限局してアポトーシス遺伝子を導入すれば、腫瘍を治療したり、顕微鏡手術器具が届かない微細な組織に切開を行うこともできる。これらは、molecular surgery（分子手術）、cellular surgery（細胞手術）とも呼ぶべきものである。

本研究は、眼の個々の組織に特異的に遺伝子や蛋白の発現させ、あるいは適切な細胞を移植することによって、組織独自のあるいは微細領域で行う治療法を開発することを目的とする。これによって、複雑な組織の集合体である眼の疾患において、効果的な治療が行われることが期待される。

B. 研究方法

1) リソゾーム蓄積症に合併する眼疾患に対する遺伝子治療法の開発

a. アデノウイルスベクターの作成： ヒトβ-グルクロニダーゼ遺伝子をCAGプロモーターの制御下で発現するアデノウイルスベクターを作成する。

b. モデルマウスへの投与： ムコ多糖症（先天性β-グルクロニダーゼ欠損症）のモデルマウスであるB6/MPSVIIマウスに上記のアデノウイルスとマーカー遺伝子であるβ-ガラクトシダーゼ遺伝子を発現するアデノウイルスAxCALacZを、種々の投与方法で角膜に投与し、その効果を活性染色法を用いた組織学的方法で検討する。

2) 眼形成にかかわる疾患責任遺伝子産物の機能
a. PAX6の正常型(エクソン5aを含む型と含まない型の2アイソフォーム)およびこれまでに見出したミスセンス変異を持つ発現ベクターについて、培養細胞にトランスフェクトし、試験管内反応によって活性を測定し、転写調節能とDNA結合能を解析する。

b. ヒトDRPLAおよびRERE(それぞれの変異体を含む)について発現ベクターを構築し、培養細胞にトランスフェクトし、試験管内反応によって活性を測定し、転写調節能について解析する。

b. 内在性およびトランスフェクションによって導入・発現させたDRPLA蛋白質のリン酸化状態を、培養細胞および試験管内反応によって解析する。

3) 緑内障原因遺伝子オプチニューリン(OPTN)の機能解析

ヒトOPTN cDNAをクローニングしてこれに報告されている遺伝子変異および遺伝子多型配列(458G>A, 691_692insert AG, 1944G>A, 603T>A)を導入した。cDNAは大腸菌で発現させ、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過によって精製を行った。RAB8についても精製はほぼ同様に行った。100ngのRAB8を水晶発振子の中心に位置する金メッキ上に固定し、PBSで満たされた反応チャンバー内に入れて振動数が安定した後、正常及び変異OPTNを8μl(100-1,000μg)加えて振動数を測定した。

4) 視細胞の分化調節機構に関する研究

マウス神経網膜を器官培養する方法を導入した。この方法ではマウス網膜の正常発生の過程をよく再現することが知られていた。これを利用し、外的因子であるCNTFが、その下流のいずれのシグナル伝達機構を介し、視細胞の分化マーカーであるロドプシンの発現を抑制するかを解析した。そのために、我々は、周産期マウスの器官培養した網膜を、免疫染色法や*in situ* hybridization法を用いて定性的に解析すると共に、イムノブロット法やreal-time RT-PCR法を用いて定量的にも解析した。この器官培養法を活用し、ノックアウトマ

ウスの網膜組織と、エレクトロポレーションによる遺伝子導入法を用い、CNTFの影響の原因となった細胞内シグナル伝達機構を明らかにした。エレクトロポレーション法は、器官培養下の正常神経網膜に、直接遺伝子を導入する方法を新たに確立した。また、CNTF/gp130の下流のシグナルがそれぞれ阻害された遺伝子改変マウスを交配により準備した。さらに、このシグナルの生体内での視細胞分化における機能に関し、定性的、定量的手法を用いてノックアウトマウスを解析した。

5) 幹細胞から眼組織への分化に関する研究
a) 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) 眼内の各組織に特異的に遺伝子導入するためのベクターシステムの開発

a) 隅角組織で特異的に発現するベクターの構築

ミオシリンは隅角組織に特異的に発現する遺伝子で、緑内障の発症と密接な関係が指摘されている。同遺伝子の5'プロモーター領域の500塩基対のDNA断片をCre組み換え酵素遺伝子の5'領域に組み込んだアデノウイルスベクターAxMyoNCreをCOS-TPC法で構築した。このベクターとAxCALNLacZ(Cre組み換え酵素の存在下でLacZを発現するアデノウイルスベクター)をマウスの前眼部に投与し、導入遺伝子の発現をLacZに対する活性染色を後に評価した。組織非特異的プロモーターであるCAGプロモーターでLacZ遺伝子を発現するアデノウイルスAxCALacZを投与した場合の活性染色結果を比較対照とした。

b) 水晶体組織で特異的に発現するベクターの構築

水晶体で特異的に発現している蛋白であるクリスタリン遺伝子の5'プロモーター領域の750塩基対をCre組み換え酵素遺伝子の5'領域に組み込んだアデノウイルスベクターAxCrNCreをCOS-TPC法で構築した。このベクターとAxCALNLacZをマウスの水晶体内に投与し、導入遺伝子の発現をLacZに対する活性染色を後に評価した。

c) 網膜視細胞で特異的に発現するベクターの構築

オペリン(青、赤、緑)は視物質として網膜視細胞に特異的に発現する遺伝子である。同遺伝子の5'プロモーター領域1000塩基対のDNA断片をCre組み換え酵素遺伝子の5'領域に組み込んだアデノウイルスベクターAxOpsNCreをCOS-TPC法

で構築した。このベクターとAxCALNLacZ(Cre組み換え酵素の存在下でLacZを発現するアデノウイルスベクター)をマウスの網膜に投与し、導入遺伝子の発現をLacZに対する活性染色を後に評価した。

研究結果および考察

1) リソソーム蓄積症に合併する眼疾患に対する遺伝子治療法の開発

a) 導入遺伝子の発現: AxCALacZを角膜実質内に投与した場合、投与部位に局限してLacZ陽性細胞が認められた。これに対して、AxCAhGUSを投与した角膜では、角膜全層にわたってGUS陽性細胞が認められた。
b) モデルマウスにおける治療効果: ムコ多糖症マウスの角膜には、細胞内に多量のグリコズミルグリカンが蓄積する。組織学的には、細胞内空胞として検出される。アデノウイルスを投与したマウスでは、投与一週間後にはこの細胞内空胞がほぼ完全に消失することが示された。

ムコ多糖症では、骨髄移植療法や酵素補充療法が開発されている。これらの全身的治療法では、骨病変や内臓病変における治療効果が認められるが、中枢神経病変や角膜病変に対する効果は期待できない。前者は、血液脳関門の存在が、後では、無血管組織という角膜組織の特殊な構造が関係していると考えられる。いずれの組織においても、局所療法が重要と考えられる。今回の検討で、遺伝子治療による角膜病変の治療の有用性が示された。今後はさらに長期間の効果やベクターの角膜組織への毒性などを検討し、臨床応用をめざす必要がある。

2) 眼形成にかかわる疾患責任遺伝子産物の機能

a) 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クソン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。これまでに同定した12種類のミスセンス変異のそれぞれを持つ発現ベクターを構築した(合計26個)。これらの発現ベクターについて、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レポーターアッセイによって解析した。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、さらに、PAX6発現ベクターを導入して内在性PAX2発現レベルの変動を解析した。一部の変異体にドミナントネガティブ効果を認めたので、トランスフェクション系で、変異発現ベクターと正常型発現ベクターを

混合して導入し、同様に解析した。正常型変異型発現ベクターについて、トランス活性効果を解析した。これらの解析による膨大な結果を得ている。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ドメインの DNA 結合にも関与することを見出した。一部の変異(部位)によって機構を推定できたが、反応は複雑な応答を示しており、より普遍的な解釈をすることは困難であり、今後も解析を継続する必要がある。

b. DRPLA 産物のリン酸化: ヒト DRPLA 蛋白がリン酸化を受けていることは、フォスファターゼ処理することによって電気泳動時の易動度に変化することにより、想定されていた。リン酸化に関与する各種の主経路を順次解析し、最終的に、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ので本年度報告した。DRPLA と同様のポリグルタミン病であるハンチントン舞踏病の産物ハンチンチンと、脊髄球筋萎縮症の産物アンドロゲン受容体が同様に Akt によってリン酸化を受けることが報告されたのは 2001-2 年と最近のことであり、それぞれのリン酸化が異常蛋白質の分解との関係も示唆されているため、大きな注目を集めた。また、多くの転写調節因子はリン酸化によってその能力が調節を受けることが知られている点でも意義がある。

c. DRPLA と RERE の発現様式: DRPLA およびそのホモログである RERE が形態形成に関与するか否かを明らかにするために、発生時における発現様式を検討した。RT-PCR 法では 9.5 日マウス胚以降で検出され、それ以降量的な変動はあるが、出生時およびそれ以降も持続した。In situ ハイブリッド法により発現部位を特定した。比較的初期の胚では、予想通り、神経管を中心に強い発現が認められ、それに加えて肢芽でも高い発現を認めた。肢芽での発現は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。

d. DRPLA と RERE の転写調節能: 発現ベクター導入とレポーター活性によって転写調節を検討した。これまで解析した培養細胞では、上皮系細胞では DRPLA は強い転写促進効果があり、RERE は弱い転写促進効果を示したが、神経系由来の培養細胞では逆に、RERE が強い転写抑制効果を示し、DRPLA は弱い転写抑制効果を示した。ショウジョウバエでは co-repressor とされ、共同して作用する他因子の存在が示差されている。ヒト DRPLA と RERE の場合も、まだ直接の作用か間接の効果かの解析は済んでいない。上皮系と神経

系で異なる方向の作用をする点も合せ解析を進めたい。いずれにしても、転写調節に関与することは確かとなったので、眼で作動する転写調節因子(PAX6 を含む)や他の遺伝子との調節関係を解析していきたい。

3) 緑内障原因遺伝子オプチニューリン(OPTN)の機能解析

OPTN 458 G>A, 691_692 insert AG, 1944G>A, 603 T>A そして RAB8 の何れについても均一に精製することができた。水晶発振子による OPTN-RAB8 の相互作用を振動数で計測した結果、458 G>A 以外の OPTN は RAB8 と結合可能であることが明らかとなった。

OPTN 458 G>A は世界的に未だ正常者で発見されていない、OPTN 唯一の遺伝子変異である。その他の変異については正常者でも発見されており、危険因子と考えられている。今回の解析によって OPTN-RAB8 の相互作用が断たれることが証明された。RAB8 は細胞内小胞体郵送に直接関与するタンパク質として知られており、今後我々は RAB8 と緑内障との関連について詳細な研究を行う予定である。

4) 視細胞の分化調節機構に関する研究

a. 生後 0 日目のマウス神経網膜を CNTF 存在下で器官培養したところ (5~9 日間)、予定視細胞層(presumptive rod photoreceptor cell layer) において、*crx* およびロドプシンの発現は抑制され、STAT3 は活性化されていた。また、CNTF を添加して培養した後、CNTF を除いて培養すると、活性化 STAT3 の発現は低下し、ロドプシンの発現が開始した。

b. 網膜特異的 STAT3 conditional KO マウスの網膜では、CNTF 存在下で器官培養しても、*crx* およびロドプシンの発現は保たれていた。これに対し、SHP2 活性化が阻害された gp130 レセプター変異マウスの網膜では、CNTF 存在下で器官培養すると、正常網膜細胞と同様、*crx* およびロドプシンの発現は抑制された。また、正常網膜でも STAT3 ドミナントネガティブ変異株を導入され、STAT3 活性化を阻害された細胞での一部では、CNTF が存在しても、*crx* およびロドプシンの発現は保たれていた。すなわち、SHP2 ではなく、STAT3 の活性化を阻害すると、CNTF を添加しても *crx* およびロドプシンの発現は抑制されなかった。

c. 網膜特異的 STAT3 conditional KO マウスの胎生 18 日目の網膜では、正常網膜と異なり STAT3 の活性化が見られないのだが、real-time RT-PCR において、*crx* mRNA の発現上昇が正常より早期に見られた。ただし、ロドプシンの発現時期に明

らな変化は見られなかった。

本来ロドプシンの発現が開始する生後0日目以降の網膜細胞でも、*in vitro*において、CNTFを添加するとロドプシンの発現が抑制されることが知られていた。これはCNTF/gp130レセプター下流の主な2つのシグナル伝達経路のうち、STAT3の活性化を介して生じ、ロドプシンの上流の転写因子*crx*の発現抑制を伴っていることが明らかになった。網膜特異的にSTAT3を発現しないSTAT3 conditional KOマウスやSHP2リン酸化能を欠くgp130レセプター変異マウスの網膜器官培養、リン酸化能を持たないSTAT3ドミナントネガティブ変異株の遺伝子を導入した網膜器官培養の解析から、SHP2ではなく、STAT3の活性化が生じない状況下では、CNTFによる視細胞分化の抑制が解除されることが明らかになった。よってCNTFが*crx*とロドプシン発現を抑制するには、STAT3の活性化が必要であるといえた。

正常より早期に、活性化STAT3の低下が生じる網膜特異的STAT3 conditional KOマウスで、正常より早期に*crx*の発現上昇があったことから、活性化STAT3の発現低下は視細胞の分化時期を決定する因子の一つとして関与していると考えられた。ただし、網膜特異的STAT3 conditional KOマウスでもロドプシンの発現開始時期に変化は無く、視細胞分化のためには、活性化STAT3以外にも解除されるべき負の調節因子や、新たに発現すべき正の調節因子の存在する可能性が示唆された。幹細胞から眼組織への分化に関する研究から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) 眼内の各組織に特異的に遺伝子導入するためのベクターシステムの開発

a. 隅角組織特異的な遺伝子発現
マウスの前眼部にアデノウイルス、AxCALacZを投与し、LacZに対する活性染色で導入遺伝子の発現を検討したところ、遺伝子発現は角膜内皮、水晶体前面、隅角など広範囲に及んでいた。これに対して、AxMyNCreとAxCALNLacZの2種のウイルスベクターをマウスの前眼部に同時投与した場合、LacZで染色される組織は隅角組

織に局限しており、隅角組織特異的な遺伝子発現であることが示された。

b. 水晶体組織特異的な遺伝子発現

マウスの水晶体内の溶液を吸引した後、AxCALacZを含むウイルス溶液を水晶体内に注入し、LacZに対する活性染色で導入遺伝子の発現を検討したところ、遺伝子発現はおもに水晶体全域で認められたが、水晶体外組織である角膜や網膜にも及んでいた。これに対して、AxCrNCreとAxCALNLacZの2種のウイルスベクターをマウスの水晶体内部に同時投与した場合、LacZで染色される組織は、水晶体組織に局限していた。これより、水晶体組織特異的な遺伝子発現であることが示された。

c. 網膜視細胞特異的な遺伝子発現

マウスの硝子体内にAxCALacZを含むウイルス溶液を注入し、LacZに対する活性染色で導入遺伝子の発現を検討したところ、遺伝子発現はおもに網膜全層で認められた。これに対して、AxOpsNCreとAxCALNLacZの2種のウイルスベクターをマウスの硝子体内に同時投与した場合、LacZで染色される組織は、網膜視細胞に局限していた。これより、網膜特異的な遺伝子発現であることが示された。

D. 結論

1) 糖尿病では、骨髄移植療法や酵素補充療法など全身的治疗法で骨病変や内臓病変において治療効果が認められるが、中枢神経病変や角膜病変に対する効果は期待できない。これは血液脳関や無血管組織という特殊構造が関係している。いずれの組織においても、局所療法が重要と考えられ、今回の検討で遺伝子治療による角膜病変の治療の有用性が示された。

分子機構を明らかにした。組織・器官形成に係わる主要な転写調節因子の機能と制御方法が解明できれば、遺伝子・細胞医療に役立ち、再生医療にも貢献できる。

正常眼圧緑内障を発症する OPTN 変異体 458 G>A は RAB8 と相互作用できないことが明らかとなった。

マウス視細胞(rod)の分化マーカーである *crx* およびロドプシンの発現には、活性化 STAT3 の発現低下が必要であることが明らかになった。しかし、単独で最終分化マーカー、ロドプシンの発現開始を早めるものではなく、他の因子も共に関与する可能性が考えられた。すなわち、活性化 STAT3 は発生過程において視細胞分化に対し抑制的に働き、その発現低下は視細胞の分化の時期を決める因子の一つとして、部分的に関与していると考えられた。

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。

クリスタリンおよびミオシリン遺伝子のプロモーター領域の遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを作成し、Cre 組み換え酵素により水晶体および隅角でのみ導入遺伝子を発現できるシステムを構築した。複雑な組織から成る眼の遺伝子治療に有効であることが示された。

E: 健康危険情報
特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

Sanae Haga, Keita Terui, Hui Qi Zhang, Shin Enosawa, Wataru Ogawa, Hiroshi Inoue, Torayuki Okuyama, Kiyoshi Takeda, Shizuo Akira, Tetsuya Ogino, Kaikobad Irani and Michitaka Ozaki. Stat3 protects against Fas-induced liver injury by redox-dependent and -independent mechanisms. *J. Clin. Invest.* 112:989-998 (2003).

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

M. Fujino, M. Kawasaki, N. Funeshima, Y. Kitazawa, M. Kosuga, K. Okabe, M. Hashimoto, H. Yaginuma, K. Mikoshiba, T. Okuyama, S. Suzuki, X-K. Li. CrmA gene expression protects mice against concanavalin-A induced hepatitis by inhibiting IL-18

secretion and hepatocyte apoptosis. *Gene Ther.* 2003 Sep;10:1781-1790.

M. Fujino, K. Adachi, M. Kawasaki, Y. Kitazawa, N. Funeshima, T. Okuyama, H. Kimura, S. Suzuki, X-K. Li. Prolonged Survival of Rat Liver Allograft with Adenoviral Gene Transfection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) *nef*. *Liver Transplant. Liver Transpl.* 2003 ;9:805-813.

Fukuhara Y, Hirasawa A, Li XK, Kawasaki M, Fujino M, Funeshima N, Katsuma S, Shiojima S, Yamada M, Okuyama T, Suzuki S, Tsujimoto G. Gene expression profile in the regenerating rat liver after partial hepatectomy. *J Hepatol.* 2003 Jun;38:784-92.

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* 2003 ; 10: 406-414

M. Takahashi, N.J. Deb, Y. Kawashita, S.W. Lee, J. Furgeuil, 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* 2003; 10: 304-313

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* 2003; 25, 192-201

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.

Y. Okamura-Oho, T. Miyashita, K. Nagao, S. Shima, Y. Ogata, T. Katada, H. Nishina & M. Yamada. Dentatorubral-pallidolusian atrophy (DRPLA) protein is phosphorylated by c-Jun NH2-Terminal Kinase. *Hum. Mol. Genet.*, 12, 1535-1542, 2003.

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

2003) *Am J Med Genet* 121A:65-68 (2003)

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* 121A:65-68 (2003)

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* 21:451-452 (2003)

Y. Shikama, M. Yamada & T. Miyashita. Caspase-8 and caspase-10 activate NF- κ B through RIP, NIK and IKK α kinases. *Eur J Immunol* 33:11998-2006 (2003)

A. Miyahara, Y. Okamura-Oho, T. Miyashita, A. Hoshika & M. Yamada. Genomic structure and alternative splicing of the insulin receptor tyrosine kinase substrate of 53 kDa protein. *J Hum Genet* 48:410-414 (2003)

K. Nagao, K. Fujii, M. Yamada & T. Miyashita. Identification of a novel polymorphism involving a CGG-repeat in the PTCH gene and a genome-wide screening of CGG-containing genes. *J Hum Genet* 49:97-101 (2004)

Connie Darmanin, Takeshi Iwata, Deborah A. Carper, Lindsay G. Sparrow, Roland P.-T. Chung, and Ossama El-Kabbani. Expression, purification and preliminary crystallographic analysis of human sorbitol dehydrogenase. *Acta Crystallographica* D59:558-560 (2003)

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, Yukihiko Mashima, Setsuko Noda, Yutaka Imanura, 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, Yukihiko 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. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:245-252 (2004)

岩田岳, 真島行彦. 緑内障の遺伝子解析. *Bio Medical Quick Review Net* 2004 (記事番号 4001)

<http://www.medicaldo.co.jp/>
株式会社メディカルド
Minoru Obazawa, Yukihiko 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)

Tonchev AB, Yamashima T, Zhao L, Okano HJ, Okano H. Proliferation of neural and neuronal progenitors after global brain ischemia in young adult macaque monkeys. *Mol Cell Neurosci* 23: 292-301, 2003

Kayahara T, Sawada M, Takaishi S, Fukui H, Seno H, Fukuzawa H, Suzuki K, Hiai H, Kageyama R, Okano H, Chiba T. Candidate markers for stem and early progenitor cells, Musashi-1 and Hes1, are expressed in crypt base columnar cells of mouse small intestine. *FEBS Letter* 535: 131-135, 2003

Sasaki T, Kitagawa K, Sugimura S, Omura-Matsuoka E, Tanaka S, Yagita Y, Okano H, Matsumoto M, Hori M. Implication of Cyclooxygenase-2 on Enhanced Proliferation of Neural Progenitor Cells in the Adult Mouse Hippocampus After Ischemia. *J Neurosci Res* 72: 461-471, 2003

Nakamura Y, Yamamoto M, Oda E, Yamamoto A, Kanemura Y, Hara M, Suzuki A, Yamasaki M, Okano H. Expression of tubulin beta II in neural stem/progenitor cells and radial fibers during human fetal brain development. *Lab Invest* 83: 479-489, 2003

Yuasa Y, Okabe M, Yoshikawa S, Tabuchi K, Xiong W-C, Hiromi Y, Okano H. Drosophila homeodomain

protein REPO controls glial differentiation by cooperating with ETS and BTB transcription factors. *Development* 130: 2419-2428, 2003

Uchida K, Okano H, Hayashi T, Mine Y, Tanioka Y, Nomura T, Kawase T: Grafted swine neuroepithelial stem cells can form myelinated axons and both efferent and afferent synapses with xenogeneic rat neurons. *J Neurosci Res* 72: 661-669, 2003

Kokuzawa J, Yoshimura S, Kitajima H, Shinoda J, Kaku Y, Iwama T, Morishita R, Shimazaki T, Okano H, Kunisada T, Sakai N: Hepatocyte growth factor promotes proliferation and neural differentiation of neural stem cells from mouse embryos. *Mol Cell Neurosci* 24: 190-197, 2003

Ishizuya-Oka A, Shimizu K, Sakakibara SI, Okano H, Ueda S: Thyroid hormone-upregulated expression of Musashi-1 is specific for progenitor cells of the adult epithelium during amphibian gastrointestinal remodeling. *J Cell Sci* 116: 3157-3164, 2003

Kanuka H, Kuranaga E, Hiratou T, Igaki T, Nelson B, Okano H, Miura M: Cytosol-endoplasmic reticulum interplay by Sec61alpha translocon in polyglutamine-mediated neurotoxicity in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 11723-11728, 2003

Baker H, Kobayashi K, Okano H, Saino-Saito S: Cortical and striatal expression of tyrosine hydroxylase mRNA in neonatal and adult mice. *Cell Mol Neurobiol* 23: 503-518, 2003

Tamaki T, Akatsuka A, Okada Y, Matsuzaki Y, Okano H, and Kimura M: Growth and differentiation potential of main- and side-population cells derived from murine skeletal muscle. *Exp Cell Res* 291: 83-90, 2003

Miyanomori Y, Kobayashi H, Watanabe M, Nagata T, Imai T, Uesugi S, Okano H, Katahira M: Origin of higher affinity to RNA of the N-terminal RNA-binding domain than that of the C-terminal one of a mouse neural protein, musashi1, as revealed by comparison of their structures, modes of interaction, surface electrostatic potentials, and backbone dynamics. *J Biol Chem* 278: 41309-41315, 2003

Yoshida T, Tokunaga A, Nakao K, Okano H: Distinct expression patterns of splicing isoforms of mNumb in the endocrine lineage of developing pancreas. *Differentiation* 71: 486-495, 2003

Hu QD, Ang BT, Karsak M, Hu WP, Cui XY, Duka T, Takeda Y, Chia W, Natesan S, Ng YK, Ling EA, Israel A, Maciag T, Small D, Trifonova R, Kopani R, Okano H, Nakafuku M, Chiba S, Hirai H, Schachner

M, Pallen CJ, Watanabe K, Xiao ZC: F3/Contactin acts as a functional ligand for Notch during oligodendrocyte maturation. *Cell* 115: 163-175, 2003

Okada S, Nakamura M, Mikami Y, Shimazaki T, Ohsugi Y, Yoshizaki K, Kishimoto T, Toyama Y, Okano H: Blockade of interleukin-6 receptor ameliorates functional recovery in spinal cord injury. *J Neurosci Res* In press, 2004

Yamashima T, Tonchev BA, Seki T, Sawamoto K, Okano H: Vascular adventitia generates neuronal progenitors in monkey hippocampus after ischemia. *Hippocampus* In press, 2004

Matsuzaki Y, Kinjo K, Mulligan RC, Okano H: Unexpectedly, efficient homing capacity of purified murine hematopoietic stem cell. *Immunity* 20: 87-93, 2004

Murata J, Murayama A, Horii A, Doi K, Harada T, Okano H, Kubo T: Expression of Musashi1, a neural RNA-binding protein, in the cochlea of young adult mice. *Neuroscience Letter* 354: 201-204, 2004

Ieda M, Fukuda K, Kimura K, Hisaka Y, Kawaguchi H, Shimoda K, Takeshita E, Okano H, Kurihara Y, Kurihara H, Ishida J, Fukamizu A, Salamone L, Howard JF, Ogawa S: Endothelin-1 regulates cardiac sympathetic nerve innervation in the rodent heart by controlling nerve growth factor expression. *J Clin Invest* In press, 2004

Watanabe K, Nakamura M, Iwanami A, Fujita Y, Kanemura Y, Toyama Y, Okano H: Comparison between fetal spinal cord and forebrain-derived neural stem/progenitor cells as a source of transplantation for spinal cord injury. *Dev Neurosci* In Press, 2004

Ohba H, Chiyoda T, Endo E, Yano M, Hayakawa Y, Sakaguchi M, Darnell RB, Okano HJ, Okano H: Sox21 is a repressor of neuronal differentiation and is antagonized by YB-1. *Neurosci Lett* In Press, 2004

Mikami Y, Okano H, Sakaguchi M, Nakamura M, Shimazaki T, Okano HJ, Kawakami Y, Toyama Y, Toda M: Implantation of dendritic cells in the injured adult spinal cord results in activation of the endogenous neural/progenitor cells for de novo neurogenesis and axonal regeneration, leading to functional recovery. *J Neurosci Res* In Press, 2004

Ozawa Y, Nakao K, Takeda J, Akira, Gruss P, Hirano T, Oguchi Y, Okano H: Down-regulation of STAT3 activation is required as an intrinsic factor to complete rod photoreceptor differentiation. *Mol Cell Neurosci* In Press, 2004

Sakaguchi H, Yaoi T, Suzuki T, Okano H, Hisa Y, Fushiki N. Spatiotemporal patterns of Musashi1 expression during inner ear development. *Neuroreport* In Press, 2004

Tokunaga A, Kohyama J, Yoshida T, Nakao K, Sawamoto K, Okano H. Mapping spatio-temporal activation of Notch signaling during neurogenesis and gliogenesis in the developing mouse brain. *J Neurochem* In Press, 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 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 the 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.

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 mucopolysaccharidosis 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 placenta 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, 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

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

小沢洋子、中尾啓子、島崎琢也、竹田潤二、審良静男、石原 克彦、平野俊夫、小口佳久、岡野栄之. Downregulation of STAT3-activation is required for presumptive rod photoreceptor cells to differentiate in the postnatal retina. 第26回分子生物学会年会、神戸、2003年12月.

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

リソゾーム蓄積症に合併する眼疾患に対する遺伝子治療法の開発

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：ムコ多糖症角膜病変に対する遺伝子治療の可能性を検討した。疾患モデルマウスの角膜に切開を加えそこに、アデノウイルスベクターを局所投与し、欠損酵素であるβ-グルクロニダーゼを遺伝子導入で発現させたところ、角膜混濁に原因である角膜細胞の空胞変性が短期間で正常化することが示された。

A. 研究目的

リソゾーム蓄積症は、リソゾームに局在する酵素の先天的な欠損により、消化しきれない中間代謝産物が細胞内外に蓄積し、全身的な症状を呈する単一遺伝病である。最近、ゴーシェ病、ファブリー病、ムコ多糖症など一部の疾患で、骨髄移植や酵素補充療法が開発されその有効性が示されている。しかし、眼病変、とくに角膜混濁については、効果が乏しいのが現状で、新たな治療法の開発が期待されている。本研究の目的は、アデノウイルスベクターの角膜組織内投与の有効性をムコ多糖症モデルマウスを用いて検討することである。

B. 研究方法

(1) アデノウイルスベクターの作成： ヒトβ-グルクロニダーゼ遺伝子をCAGプロモーターの制御下で発現するアデノウイルスベクターを作成する。

(2) モデルマウスへの投与： ムコ多糖症（先天性β-グルクロニダーゼ欠損症）のモデルマウスであるB6/MPSVIIマウスに上記のアデノウイルスとマーカー遺伝子であるβ-ガラクトシダーゼ遺伝子を発現するアデノウイルスAxCALacZを種々の投与方法で、モデル動物の角膜に投与し、その効果を活性染色法を用いた組織学的方法で検討する。

（倫理面への配慮）本研究では、動物実験のみでヒトの材料を使った研究は計画されていない。動物実験については、国立成育医療センター研究所動物実験指針に従って実験した。

C. 研究結果

(1) 導入遺伝子の発現： AxCALacZを角膜実質内に投与した場合、投与部位に局限してLacZ陽性細胞が認められた。これに対して、AxCAhGUSを投与した角膜では、角膜全層にわたって

GUSB陽性細胞が認められた。

(2) モデルマウスにおける治療効果： ムコ多糖症マウスの角膜には、細胞内に多量のグリコアミノグリカンが蓄積する。組織学的には、細胞内空胞として検出される。アデノウイルスを投与したマウスでは、投与一週間後にはこの細胞内空胞がほぼ完全に消失することが示された。

D. 考察

ムコ多糖症では、骨髄移植療法や酵素補充療法が開発されている。これらの全身的治療法では、骨病変や内臓病変における治療効果が認められるが、中枢神経病変や角膜病変に対する効果は期待できない。前者は、血液脳関門の存在が、後では、無血管組織という角膜組織の特殊な構造が関係していると考えられる。いずれの組織においても、局所療法が重要と考えられる。今回の検討で、遺伝子治療による角膜病変の治療の有用性が示された。今後は、さらに長期間の効果やベクターの角膜組織への毒性などを検討し、臨床応用をめざす必要がある。

E. 結論

ベクターの局所投与によりリソゾーム蓄積症の角膜病変が改善できることが示された。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sanae Haga, Keita Terui, Hui Qi Zhang, Shin Enosawa, Wataru Ogawa, Hiroshi Inoue, Torayuki Okuyama, Kiyoshi Takeda, Shizuo Akira, Tetsuya Ogino, Kaikobad Irani and Michitaka Ozak Stat3 protects against Fas-induced liver injury by redox-dependent and -independent mechanisms. *J. Clin. Invest.* 112:989-998 (2003).

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

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

4) M. Fujino, K. Adachi, M. Kawasaki, Y. Kitazawa, N. Funeshima, T. Okuyama, H. Kimura, S. Suzuki, X-K. Li. Prolonged Survival of Rat Liver Allograft with Adenoviral Gene Transfection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) *nef*. *Liver Transplant. Liver Transpl.* 2003 ;9:805-813.

5) Fukuhara Y, Hirasawa A, Li XK, Kawasaki M, Fujino M, Funeshima N, Katsuma S, Shiojima S, Yamada M, Okuyama T, Suzuki S, Tsujimoto G. Gene expression profile in the regenerating rat liver after partial hepatectomy. *J Hepatol.* 2003 Jun;38:784-92.

6) 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* 2003 ; 10: 406-414

7) M. Takahashi, N.J. Deb, Y. Kawashita, S.W. Lee, J. Furgeuil, 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.* 2003; 10: 304-313

8) 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* 2003; 25: 192-201.

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

（表紙）
 1. 肝臓がんの発生メカニズム
 2. 肝臓がんの診断
 3. 肝臓がんの治療
 4. 肝臓がんの予防
 5. 肝臓がんの最新研究
 6. 肝臓がんの臨床応用
 7. 肝臓がんの基礎研究
 8. 肝臓がんの分子生物学
 9. 肝臓がんの遺伝子工学
 10. 肝臓がんの免疫学
 11. 肝臓がんの薬理学
 12. 肝臓がんの放射線生物学
 13. 肝臓がんの外科学
 14. 肝臓がんの内科学
 15. 肝臓がんの緩和ケア
 16. 肝臓がんの公衆衛生
 17. 肝臓がんの社会医学
 18. 肝臓がんの医療経済学
 19. 肝臓がんの国際協力
 20. 肝臓がんの未来展望

肝臓がんの発生メカニズム
 肝臓がんの診断
 肝臓がんの治療
 肝臓がんの予防
 肝臓がんの最新研究
 肝臓がんの臨床応用
 肝臓がんの基礎研究
 肝臓がんの分子生物学
 肝臓がんの遺伝子工学
 肝臓がんの免疫学
 肝臓がんの薬理学
 肝臓がんの放射線生物学
 肝臓がんの外科学
 肝臓がんの内科学
 肝臓がんの緩和ケア
 肝臓がんの公衆衛生
 肝臓がんの社会医学
 肝臓がんの医療経済学
 肝臓がんの国際協力
 肝臓がんの未来展望

眼形成にかかわる疾患責任遺伝子産物の機能

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 部長

研究要旨：PAX6は眼形成過程に中心的な役割を果たす転写制御因子をコードする。PAX6のハプロ不全(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。従来の解析によって見出したミスセンス変異を持つ発現ベクターを構築し、試験管内反応および培養細胞実験系によって、それらの転写調節能・DNA結合能を解析し、転写制御と形態形成の関係を明らかにする。ヒトDRPLAは神経変性疾患の責任遺伝子として同定単離されたが、他生物種における研究から、DRPLAホモログは眼と四肢の形成に係わる転写調節因子であることが明らかとなった。ヒトDRPLAが転写調節に関与するか否かを明らかにし、眼形成へ関与の可能性を追求する。

A. 研究目的

1個の受精卵から細胞分裂を繰り返し、それぞれの細胞が特定の機能を持つように分化し、組織や器官、さらには個体が形成される。この一連の過程には多数の遺伝子が協調して作動し、高度に組織化された複雑な反応過程である。しかし、これまでの疾患責任子研究や実験発生学の結果から、少数の、時には単一の転写調節因子が大きな役割を果たしていることが明らかとなった。すなわち、器官形成の主要な転写調節因子がまず機能し、その制御下で別の転写調節遺伝子が発現し、その他の構造・機能蛋白をコードする遺伝子の発現が順次制御されるという経路である。器官形成の主要な転写調節因子をコードする遺伝子における変異、特にミスセンス変異は、多様な病態を生じさせることも明らかとなり、このことは一連の形成経路の反映である。

(哺乳動物の)眼はカメラにたとえられ、絞りに対応する虹彩、レンズ、フィルムに対応する網膜など、高度に組織化された器官である。しかし、その形成には1個の転写因子PAX6が重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。少なくともショウジョウバエでは、PAX6ホモログを異所的に発現させると、その部位に光を感じる眼が形成できることが示されている。我々はこれまで、広範な眼形成不全症の患者を検索し、多数のPAX6変異を見出してきた。PAX6のナンセンス変異や欠失・挿入によって一方の対立遺伝子から完全な蛋白が形成できない場合、すなわちハプロ不全によって無虹彩症を生じ、一方、PAX6のミスセンス変異によっては、黄斑低形成症・白内障・Peter奇形など多様な病態を生じることを見出し

た。PAX遺伝子群はペアドドメインをDNA結合部位とする転写調節因子をコードする。ペアドドメインはN側半分とC側半分とに二分されるが、C側半分は機能上不要であるとされてきたが、黄斑低形成症でC末部位に変異を見出したことによって、従来の定説を覆した(Azuma et al. Nature Genet 1996)。選択的スプライスによる14アミノ酸はN側半分とC側半分のDNA結合能を切り替える分子スイッチとして機能すること、またN末半分を介して眼の外側、C末半分を介して内側(網膜)の形成を制御する機構などを提唱した。また、PAX6はホメオドメインも持ち、その部位もDNA結合部位として機能する。PAX遺伝子群は重要な転写調節因子をコードしており、転写調節能などについて一定の研究結果が得られている。しかし、DNA結合部位が3ヶ所あるなど複雑であり、不明な点も多い。

そこで、我々が見出した各種のミスセンス変異を組み込んだ発現ベクターを構築し、試験管内反応および培養細胞実験系によって、それらの転写調節能・DNA結合能を解析する。特に、これまで解析が進んでいないPAX6のホメオドメインの機能に重点を置く。転写調節能と形態形成の関係を明らかにすることを最終目的とする。

歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)は常染色体優性遺伝様式を示す神経変性疾患の1つであり、失調と不随意運動の両者を伴う点に特徴がある。この疾患は、染色体12p13に位置するDRPALの翻訳領域に位置するCAGリピートの伸長に起因することを先に明らかとした(Nagafuchi et al. 1994)。CAGリピート伸長により、伸長したグルタミン鎖を持つ産物が形成され、それが何ら

がの毒性を示すことで神経細胞が変性死すると考えられる。細胞死の機構解明は重要であり、我々はこれまでもカスパーゼ 8 と 10 の早期活性化などを明らかにして貢献してきた。神経細胞死の生じる部位の決定には DRPLA 産物の機能と関係があると考えられるので、これまでも DRPLA の機能解析を進め、いくつかの機能ドメインを明らかにしてきた。最近、ショウジョウバエの DRPLA ホモログは眼と四肢の形成に係わる転写調節因子をコードしていることが明らかとなったそこで、ヒト DRPLA および関連遺伝子で我々が単離した RERE について、まず転写調節に関係するか否かを再検討し、次にヒトの眼の形成に関与するか否かを明らかにする研究を開始した。

これらの研究は、器官・組織の形成にかかわる転写調節因子についての機能解析である。従って、研究成果に基づいて、遺伝子を巧妙に使用することによって、組織や器官の形成を制御する方法を見出すことにつながり、遺伝子治療や細胞療法に役立つと考える。

B. 研究方法

- (1) PAX6 の正常型 (エクソン 5a を含む型と含まない型の 2 アイソフォーム) およびこれまでに見出したミスセンス変異を持つ発現ベクターについて、培養細胞にトランスフェクトし、試験管内反応によって活性を測定し、転写調節能と DNA 結合能を解析する。
- (2) ヒト DRPLA および RERE (それぞれの変異体を含む) について発現ベクターを構築し、培養細胞にトランスフェクトし、試験管内反応によって活性を測定し、転写調節能について解析する。
- (3) 内在性およびトランスフェクションによって導入・発現させた DRPLA 蛋白質のリン酸化状態を、培養細胞および試験管内反応によって解析する。

(倫理面での配慮)

本研究課題では、基本的に患者を直接対象とするものではなく培養細胞を用いた試験管内実験であり、倫理的問題を生じない。しかし、本研究課題の基盤となっているのは、これまでに患者を対象とした遺伝子解析によって得られた変異に基づいている。眼における PAX6 遺伝子解析は、(当時の) 国立小児病院関係者を代表として倫理委員会に申請され、承認を得ており、国立成育医療センター改組後も承認されている。DNA 組換え実験については組換え DNA 安全委員会の承認を得ている。動物実験については各種の規定を遵守し、機関の承認を得ている。

- C. 研究結果
 - (1) 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クソン 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。これまでに同定した 12 種類のミスセンス変異のそれぞれを持つ発現ベクターを構築した (合計 26 個)。これらの発現ベクターについて、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レポーターアッセイによって解析した。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、さらに PAX6 発現ベクターを導入して内在性 PAX2 発現レベルの変動を解析した。一部の変異体にはミナンドネガティブ効果を認めたので、トランスフェクション系で、変異発現ベクターと正常型発現ベクターを混合して導入し、同様に解析した。正常型変異型発現ベクターについて、トランス活性効果を解析した。これらの解析による膨大な結果を得ている。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ドメインの DNA 結合にも関与することを見出した。
 - (2) DRPLA 産物のリン酸化：ヒト DRPLA 蛋白質がリン酸化を受けていることは、フォスファターゼ処理することによって電気泳動時の易動度が変化することにより、想定されていた。リン酸化に関与する各種の主経路を順次解析し、最終的に 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ので本年度報告した (Okamura-Oho et al 2003)。
 - (3) DRPLA と RERE の発現様式：DRPLA およびそのホモログである RERE が形態形成に関与するか否かを明らかにするために、発生時における発現様式を検討した。RT-PCR 法では 9.5 日マウス胚以降で検出され、それ以降量的な変動はあるが、出生時およびそれ以降も持続した。In situ ハイブリッド法により発現部位を特定した。比較的初期の胚では、予想通り、神経管を中心に強い発現が認められ、それに加えて肢芽でも高い発現を認めた。
 - (4) DRPLA と RERE の転写調節能：発現ベクター導入とレポーター活性によって転写調節を検討した。これまで解析した培養細胞では、上皮系細胞では DRPLA は強い転写促進効果があり、RERE は弱い転写促進効果を示したが、神経系由来の培養細胞では逆に、RERE が強い転写抑制効

果を示し、DRPLAは弱い転写抑制効果を示した。

D. 考察

(1) PAX6変異型の転写調節能：一連の解析によって膨大な結果を得ている。一部の変異(部位)によって機構を推定できたが、反応は複雑な応答を示しており、より普遍的な解釈をすることは困難であり、今後も解析を継続する必要がある。

(2) DRPLA産物のリン酸化：DRPLAと同様のポリグルタミン病であるハンチントン舞踏病の産物ハンチンチンと、脊髄球筋萎縮症の産物アンドロゲン受容体が同様にAktによってリン酸化を受けることが報告されたのは2001-2年と最近のことであり、それぞれのリン酸化が異常蛋白質の分解との関係も示唆されているため、大きな注目を集めた。また、多くの転写調節因子はリン酸化によってその能力が調節を受けることが知られている点でも意義がある。

(3) DRPLAとREREの発現様式：肢芽での発現はショウジョウバエにおける羽の形成異常との関係に興味深い知見である。

(4) DRPLAとREREの転写調節能：ショウジョウバエではco-repressorとされ、共同して作用する他因子の存在が示差されている。ヒトDRPLAとREREの場合も、まだ直接の作用か間接の効果かの解析は済んでいない。上皮系と神経系で異なる方向の作用をする点も合せ解析を進めたい。いずれにしても、転写調節に関与することは確かとなったので、眼で作動する転写調節因子(PAX6を含む)や他の遺伝子との調節関係を解析していきたい。

E. 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、形態形成の分子機構を明らかにする解明を行った。組織・器官形成に係わる主要な転写調節因子の機能が明確化でき、またその制御方法が解明できれば、その成果は、遺伝子活用による遺伝子治療あるいは細胞医療に役立ち、また、遺伝子活用による組織・器官構築を通じて、再生医療にも貢献できる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1 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.*, 72, 1565-1570, 2003.

2 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.

3 Y. Okamura-Oho, T. Miyashita, K. Nagao, S. Shima, Y. Ogata, T. Katada, H. Nishina & M. Yamada. Dentatorubral-pallidolucyian atrophy (DRPLA) protein is phosphorylated by c-Jun NH2-Terminal Kinase. *Hum. Mol. Genet.*, 12, 1535-1542, 2003.

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

5 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.*, 121A, 65-68, 2003.

6 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*, 21, 451-452, 2003.

7 Y. Shikama, M. Yamada & T. Miyashita. Caspase-8 and caspase-10 activate NF- κ B through RIP, NIK and IKK α kinases. *Eur. J. Immunol.* 33, 1998-2006, 2003.

8 A. Miyahara, Y. Okamura-Oho, T. Miyashita, A. Hoshika & M. Yamada. Genomic structure and alternative splicing of the insulin receptor tyrosine kinase substrate of 53 kDa protein. *J. Hum. Genet.* 48, 410-414, 2003.

9 K. Nagao, K. Fujii, M. Yamada & T. Miyashita. Identification of a novel polymorphism involving a CGG repeat in the PTCH gene and a genome-wide screening of CGG-containing genes. *J. Hum. Genet.*, 49, 97 - 101, 2004.

2. 学会発表 (雑誌論文掲載回数・大会発表回数) なし(学会発表回数・大会発表回数)
 9件 (詳細は省略) 6件(学会発表回数)

H. 知的財産の出願・登録状況(OPIN)の登録状況(特許庁データベース)

特許庁データベース(特許庁ウェブサイト)に特許出願・特許権取得の登録状況

特許庁データベース(特許庁ウェブサイト)に特許出願・特許権取得の登録状況

A. 特許出願
 OPIN-RA88の特許出願は、特許庁データベース(特許庁ウェブサイト)に特許出願・特許権取得の登録状況

B. 特許権取得
 OPIN-RA88の特許権取得は、特許庁データベース(特許庁ウェブサイト)に特許出願・特許権取得の登録状況

C. 特許権喪失
 OPIN-RA88の特許権喪失は、特許庁データベース(特許庁ウェブサイト)に特許出願・特許権取得の登録状況

D. 特許権の範囲
 OPIN-RA88の特許権の範囲は、特許庁データベース(特許庁ウェブサイト)に特許出願・特許権取得の登録状況

E. 特許権の効力
 OPIN-RA88の特許権の効力は、特許庁データベース(特許庁ウェブサイト)に特許出願・特許権取得の登録状況

F. 特許権の侵害
 OPIN-RA88の特許権の侵害は、特許庁データベース(特許庁ウェブサイト)に特許出願・特許権取得の登録状況

G. 特許権の譲渡
 OPIN-RA88の特許権の譲渡は、特許庁データベース(特許庁ウェブサイト)に特許出願・特許権取得の登録状況

A. 特許出願
 OPIN-RA88の特許出願は、特許庁データベース(特許庁ウェブサイト)に特許出願・特許権取得の登録状況

B. 特許権取得
 OPIN-RA88の特許権取得は、特許庁データベース(特許庁ウェブサイト)に特許出願・特許権取得の登録状況

C. 特許権喪失
 OPIN-RA88の特許権喪失は、特許庁データベース(特許庁ウェブサイト)に特許出願・特許権取得の登録状況

D. 特許権の範囲
 OPIN-RA88の特許権の範囲は、特許庁データベース(特許庁ウェブサイト)に特許出願・特許権取得の登録状況

緑内障原因遺伝子オプチニューリン(OPTN)の機能解析

分担研究者 岩田岳 国立病院東京医療センター臨床研究センター 研究室長

研究要旨:第3番目の緑内障原因遺伝子として発見されたオプチニューリン(OPTN)は発症頻度がきわめて低いことが明らかとなってきたが、E50K 変異については正常者では未だ発見されていない。我々は OPTN 遺伝子変異や多型が RAB8 タンパク質の結合部位に近いことから、OPTN への変異が及ぼす OPTN-RAB8 相互作用への影響を水晶発振子によって調べた。

A. 研究目的

最近発見された緑内障原因遺伝子オプチニューリンの変異は RAB8、Huntingtin、Transcription Factor IIIA 等と相互作用のあることがわかっている。遺伝子変異の多くが RAB8 との結合部位に近いこと我々は報告されている遺伝子変異や遺伝子多型が及ぼす OPTN-RAB8 相互作用への影響を調べた。

B. 研究方法

ヒト OPTN cDNA をクローニングしてこれに報告されている遺伝子変異および遺伝子多型配列 (458 G>A, 691_692 insert AG, 1944G>A, 603 T>A) を導入した。cDNA は大腸菌で発現させ、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過によって精製を行った。RAB8 についても精製はほぼ同様に行った。100ng の RAB8 を水晶発振子の中心に位置する金メッキ上に固定し、PBS で満たされた反応チャンパー内に入れて振動数が安定した後、正常及び変異 OPTN を 8 μl (100-1,000 μg) 加えて振動数を測定した。

C. 研究結果

OPTN 458 G>A, 691_692 insert AG, 1944G>A, 603 T>A そして RAB8 の何れについても均一に精製することができた。水晶発振子による OPTN-RAB8 の相互作用を振動数で計測した結果、458 G>A 以外の OPTN は RAB8 と結合可能であることが明らかとなった。

D. 考察

OPTN 458 G>A は世界的に未だ正常者で発見されていない、OPTN 唯一の遺伝子変異である。その他の変異については正常者でも発見されており、危険因子と考えられている。今回の解析によって OPTN-RAB8 の相互作用が断たれることが証明された。RAB8 は細胞内小胞体郵送

に直接関与するタンパク質として知られており、今後我々は RAB8 と緑内障との関連について詳細な研究を行う予定である。

E. 結論

正常眼圧緑内障を発症する OPTN 変異体 458 G>A は RAB8 と相互作用できないことが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Connie Darmanin, Takeshi Iwata, Deborah A. Carper, Lindsay G Sparrow, Roland P.-T. Chung, and Ossama El-Kabbani. Expression, purification and preliminary crystallographic analysis of human sorbitol dehydrogenase. *Acta Crystallographica* D59:558-560 (2003)

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