

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

(課題番号H15-感覚器-002)

平成16年度 総括・分担報告書

平成17年(2005年)3月

主任研究者 東 範 行
(国立成育医療センター眼科医長)

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. 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	9
2. 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	13
3. 遺伝性眼疾患の遺伝子・細胞治療に関する研究 奥山 虎之 国立成育医療センター 遺伝診療科	17
4. 幹細胞から眼組織への分化誘導能に関する研究 仁科 博史 東京医科歯科大学難病治療研究所	19
5. 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	21
6. 先天ムコ多糖症の角膜混濁に対する細胞治療 東 範行 国立成育医療センター 眼科	23

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 25

IV. 研究成果の刊行物、別刷 28

眼疾患に対する遺伝子・細胞治療に関する研究

(課題番号H15-感覚器-002)

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行える遺伝子・細胞治療の開発を目的とした。眼形成過程に中心的な役割を果たす PAX6 の機能について、野生型・変異型の転写調節能と形態形成能との関係を明らかにした。眼と四肢の形成に係わる転写調節因子 DRPLA の眼形成へ関与の可能性を追求した。また、これらの遺伝子の選択的スプライスによる遺伝子産物の多様性について明らかにした。緑内障原因遺伝子 オプチニューリン (OPTN) の変異を導入したトランスジェニックマウスを作製した。OPTN の変異体と Rab8 との相互作用を解析を行うために、Rab8 タンパク質の発現・精製法を確立した。神経幹細胞移植による中枢神経系再生の応用へ向けて、ニューロスフェア法で得られた神経幹細胞の表面抗原の発現について検討した。MHC class II、CD80、CD86、ICAM1 等の細胞表面抗原が発現しておらず、移植後の急性拒絶反応がおきにくく、アロ移植のドナー細胞に適することが示された。幹細胞の眼組織への分化誘導能を検討する目的で、マウスの各種幹細胞の生存・死・分化誘導能等細胞内情報伝達系である MAP キナーゼ (ERK や SAPK/JNK) 系や PAX6 遺伝子を用いた眼組織への分化誘導能の観点から検討した。その結果、p38MAP キナーゼが ES 細胞から外胚葉系の神経細胞分化誘導に対しては抑制的に制御すること、また、PAX6 遺伝子のアイソフォーム 5a 型が強い神経細胞分化誘導能を示すことを見出した。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。先天ムコ多糖症モデルマウスの角膜混濁の細胞治療を行った。β-グルクロニダーゼ活性の高い骨髄間葉細胞株の中をモデルマウスの角膜実質内に移植し、角膜混濁の原因であるムコ多糖症の沈着を消失させ、細胞治療の可能性を示した。

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
 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ーを用いて、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) 眼形成にかかわる疾患責任遺伝子産物の機能
 (1) PAX6 の正常型およびミスセンス変異を持つ発現ベクターを培養細胞にトランスフェクトし、転写調節能と DNA 結合能を解析した。

(2) ヒト DRPLA および RERE（の正常型およびミスセンス変異を持つ発現ベクターを培養細胞にトランスフェクトし、転写調節能について解析した。

(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した。

(4) 選択的スプライスによって、塩基配列あるいはアミノ酸配列に微細な変化を生じる例を収集し、RT-PCR によって確認した。

2) 緑内障原因遺伝子オプチニューリン(OPTN)の機能解析

(1) C57/BL6 マウス脳から、Super Script First-strand Synthesis System for RT-PCR (invitrogen)を用いてマウス OPTN 遺伝子のクローニングした。次にこの cDNA に PCR 反応で点変異を導入した

(2)上記のマウス OPTN 遺伝子変異体をマウス受精卵にマイクロインジェクションし、OPTN 変異体遺伝子のトランスジェニックマウスを作成した。マウス眼底の観察をおこなった。

(3) pRSET(invitrogen) に導入した Rab8 を BL21(DE3)pLysS に形質転換させ、可溶化 Rab8 を含むサンプルとした。Rab8 を含む画分 500 ul を AKTA system (amersham pharmacia)を用いて分画

後、各画分を SDS-PAGE により分離しクマシーブルー染色によって検出した。

3) 遺伝性眼疾患の遺伝子・細胞治療に関する研究

(1) 妊娠 14 日目の B6 マウス胎児脳の線状体から採取した細胞群を、EGF 及び FGF などの成長因子を加えた無血清培地(MHM)中で7日間培養して神経幹細胞のみを分離し(ニューロスフィア法)、培地から成長因子を取り除き血清入りの培地に変更し、分化を観察した。

(2) マウス神経幹細胞の細胞表面抗原に関し、MHC class I、MHC class II、CD80、CD86、ICAM I について、フローサイトメーターで検出を試みた。

4) 幹細胞から眼組織への分化誘導能に関する研究

阻害剤や遺伝子誘導法を用いて、マウス ES 細胞における各種 MAP キナーゼと Pax6 の神経細胞分化誘導に対する影響を検討した。

5) 視細胞の分化調節機構に関する研究

我々はマウス神経網膜を器官培養し、外的因子 CNTF が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。活性型 Notch および、細胞内で Notch を不活性化しうる分子 Numb を、正常網膜器官培養へ導入し、その解析を行った。

6) 先天ムコ多糖症の角膜混濁に対する細胞治療
マウス骨髄間葉細胞株の β -グルクロニダーゼ活性測定および染色を行い、ドナー細胞を選択した。これをムコ多糖症(先天性 β -グルクロニダーゼ欠損症)モデルマウスの角膜実質に移植した。角膜内沈着物に対する治療効果を病理組織的に検討した。

(倫理面への配慮) いずれの研究も、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、各施設における研究所動物実験指針に従った。培養細胞を用いた試験管内実験であり、倫理的な問題を生じない。しかし、一部はこれまでの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おり、眼における PAX6 遺伝子解析は、(当時の)国立小児病院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. 研究結果および考察

1) 眼形成にかかわる疾患責任遺伝子産物の機能
(1) これまでに同定した 12 種類のミスセンス変

異の発現ベクターについて、3 種類のコンセンサス DNA 結合部位に対する結合能と、それを介した転写調節能を測定し、また、トランス転写活性化能を解析した。さらに、野生型および変異型間の相互作用について順次解析した。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。

(2) DRPLA と RERE の転写調節能は、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。この因子が DRPLA の神経変性部位を決定することにかかわっている可能性について追求している。

(3) データベースに登録されているいくつかの DRPLA 配列の間に、cDNA では CAG の有無、また蛋白ではグルタミン 1 残基の有無という相違がある。この相違はエクソン-イントロン境界に位置するので、選択的スプライスによる可能性があり、ミニジーンを用いた実験で確認した。公開データベースを検索し、1 アミノ酸残基の有無の相違のなかでエクソン-イントロン境界に位置するものを選択し、実験的に確認し、少なくとも 3 例を見出した。さらに、選択的スプライスに関する WWW サイトで解析したところ、スプライス受容部位および供与部位の違いによる選択的スプライスは近接部位で頻繁に生じ、結果的に、微細な差違を生じる例が極めて多いことがわかった。3 塩基離れた 2 ヶ所のスプライス受容部位を共用するためには、その配列上大きな制約がある。さらに、この二者の内、どちらが優先されるのか(強弱)についても当然制御されている。従って、このような例を枚挙し、実験的に確認していくと、スプライス制御の規則の解明などに役立つと考える。特に、選択的スプライスによる転写産物の割合が時間的・空間的に変化する例も数例見出し、スプライス制御機構の解明の有力な手段となると考える。

(4) 眼形成過程で PAX6 のエクソン 5a 付加型アイソフォームの発現を解析した。網膜中心窩に相当する部位となる領域でエクソン 5a 付加型アイソフォームの発現が亢進していた。ニワトリ胚に発現ベクターを導入したところ、両アイソフォームに顕著な違いが見られた。エクソン 5a 付加型アイソフォームを強発現した場合には、網膜の平

面方向への伸展が著しく促進され、分化が進行していた。これらのことは、エクソン 5a 付加型 PAX6 アイソフォームは網膜の分化を強く促進すること示している。

2) 緑内障原因遺伝子オプチニューリン(OPTN)の機能解析

(1) OPTN 変異体を過剰発現しているトランスジェニックマウスを♂10 匹、♀7 匹の計 17 匹得ることができた。これらのマウスは全頭生存中で、F1 世代のマウスを作製している。また、691 番目の塩基と 692 番目の塩基との間に 2 塩基挿入し exon5 以降を欠落した OPTN のトランスジェニックマウスについては生存できなかった。眼底観察では、OPTN 変異体のトランスジェニックマウスは視神経乳頭の顕著な陥凹が観察された。神経節細胞を抗ミオシリン抗体で、アストロサイトを抗 GFAP 抗体で染色した結果、トランスジェニックマウスでは視神経乳頭部の構造が崩れ、大きく陥凹していることが明らかになった。

(2) Rab8 タンパク質の単離精製を試みた。大腸菌内での可溶性に影響を与える、ベクターの種類、大腸菌の系統、発現誘導条件、溶解バッファーに含まれる塩濃度、界面活性剤の種類、などの種々の条件を検討した結果、pRSET に挿入した Rab8 を BL21(DE3)pLysS に形質転換し、25℃で発現誘導を行うことにより可溶性 Rab8 タンパク質を得ることが出来た。またこのサンプルを TALON Beads を用いたアフィニティー精製により高い純度で Rab8 タンパク質を精製することが可能であった。

今回の実験によってこの遺伝子変異変異のもたらす影響を *in vivo* で確認することができた。この遺伝子による緑内障発症は少ないとされているが、今回の実験によって緑内障との関係が証明され、今後このマウスモデルを用いた実験によって正常眼圧緑内障の発症機序の解明に役立つデータが得られると考えられる。

3) 遺伝性眼疾患の遺伝子・細胞治療に関する研究

ニューロスフィア法で分離した神経幹細胞は、ニューロンだけでなくアストロサイトおよびオリゴデンドロサイトにも分化することが、免疫染色法で確認された。これは、分離した細胞の「多分化能」を示すものであり、今回分離した細胞が確かに神経幹細胞であることを示していた。神経幹細胞の脳内移植を適切に行うことにより、種々の先天異常症の治療につながる可能性が期待されている。昨年度の検討で、神経幹細胞の移植がリソゾーム蓄積症の治療

に有用である可能性が明らかとなった。しかし、先天異常症の細胞治療においては、アロ移植か遺伝的に改変した自家移植のどちらかが必要になる。今回の検討で、アロ移植としての有用性が示された。

4) 幹細胞から眼組織への分化誘導能に関する研究

MAP キナーゼ系が ES 細胞から神経細胞分化誘導に抑制的役割を果たすこと、また PAX6 アイソフォーム 5a 型が強い神経細胞分化誘導能を示すことを見出した。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。

5) 視細胞の分化調節機構に関する研究

(1) 正常発生における、Notch、Numb の発現パターンを発生段階ごとに解析した。Notch シグナルは、視細胞の分化に先駆けて不活性化していた。これに対し、Notch シグナルの不活性化に関与している Numb は同部位で同時期に発現していた。

(2) マウス神経網膜の器官培養で、活性型 Notch および Numb の遺伝子導入を行った。活性型 Notch 遺伝子が導入されると、ミューラー (グリア) 細胞が増加するだけでなく、一部の介在ニューロンにも分化しており、視細胞への分化は抑制されていた。これに対し、Numb 遺伝子が導入されると、視細胞に分化する傾向にあった。

(3) 次に視細胞への分化に Numb が必要かどうかを解析するため、網膜器官培養へ Numb RNAi の導入をエレクトロポレーションで行った。導入された細胞では、視細胞への分化が抑制される傾向にあった。

胎生期の網膜 (*in vivo*) で高値を示す CNTF の活性が出生後急激に下降するのと同期して、視細胞の最終分化マーカーロドプシンの発現が開始すること、*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は従来知られていたが、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は既に報告した。今回の結果から、活性化 STAT3 と同様に、未分化維持の機能を持つことで知られる Notch シグナルは、最終分裂後、直ちに不活性化を受ける必要がある。それにより、速やかに未分化維持に関わる下流の分子の発現を低下させ、タイミング良くその他の因子の影響も受け、視細胞への分化がおこる可能性がある。これに対し、Numb は細胞の分化を促

進していたが、エンドサイトーシスによる Notch シグナル抑制能を持つことが知られている。今後、Notch シグナルの発現低下が Numb によって行われているのかどうか、Notch シグナルの視細胞分化への負の調節、および Numb による正の調節が *crx*、ロドプシンのいずれの段階で生じているのか、などを解析する必要がある。

6) 先天ムコ多糖症の角膜混濁に対する細胞治療
マウス骨髄間葉細胞株のうち、 β -グルクロニダーゼ活性測定および染色によって、最も高値を示した 9-15C 細胞をドナー細胞に選定した。角膜実質に移植した後、2週間までは、セルトラッカーの蛍光顕微鏡下観察で、少数ながら細胞の生存が確認された。病理組織的には、角膜内に沈着したムコ多糖変性物が、移植細胞の周囲で特に消失していた。

ムコ多糖症に対する全身的治療法では、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、後者は、無血管組織という角膜組織の特殊な構造が影響していると考えられ、局所療法が重要である。先に我々は、アデノウイルスベクターによって β -グルクロニダーゼ遺伝子を導入する遺伝子治療の有用性を示したが、恒久的治療を目指して今回は細胞治療を試みた。その結果、細胞の生存と、その周囲のムコ多糖沈着物の消失が確認されたが、なお長期間かつ多数の細胞を生存させる技術の向上が必要である。これが達成できれば、早期に臨床応用できる可能性がある。

D. 結論

発生時期に作動する転写因子の調節能を解析した。選択的スプライスは、一定数の遺伝子から多様な蛋白質を形成する重要な機構で、微細な差違を生じるスプライスは普遍的であることを見出した。この系は、病態におけるスプライスパターン変動解析のプロープとしての活用が考えられ、患者における変異による cryptic スプライス部位の活性化機構、また、スプライスを使用する治療法開発につながるものと考えられる。

正常眼圧緑内障を発症する OPTN 変異体トランスジェニックマウスを作製し、ヒト正常眼圧緑内障に類似する疾患マウスの作製に成功した。

神経幹細胞が、アロ移植のドナー細胞として有用であることが示された。

神経細胞への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。

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であり、活性化 STAT3 は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。Notch シグナルは視細胞への分化の運命を負に、Notch の細胞内拮抗分子 Numb は正に、調節していた。

先天ムコ多糖症モデルマウスの角膜混濁に、 β -グルクロニダーゼ活性の高い正常マウス由来骨髄間葉細胞を移植した。移植細胞は少ないながら生着し、その周囲では角膜混濁の原因であるムコ多糖沈着が消失しており、細胞治療の可能性が示された。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

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.

M. U, L. Shen, T. Oshida, J. Miyauchi, M. Yamada & T. Miyashita. Identification of novel direct transcriptional targets of glucocorticoid receptor. *Leukemia*, 18, 1850-1856, 2004

K. Nagao, M. Toyoda, K. Takeuchi-Inoue, K. Fuji i, M. Yamada & T. Miyashita. Identification and characterization of multiple isoforms of a murine and human tumor suppressor, Patched, having distinct first exons. *Genomics*, 85, 462-471, 2005.

Tanaka Y, Utsumi J, Matsui M, Sudo T, Nakamura N, Mutoh M, Kajita A, Sone S, Kigasawa K, Shibuya M, Reddy VN, Zhang Q, Iwata T. Purification, Molecular Cloning, and Expression of a Novel Growth Promotive Factor for Retinal Pigment Epithelial Cells, REF-1/TFPI-2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004 45:245-252

Obazawa M, Mashima Y, Sanuki N, Noda S, Kudoh J, Shimizu N, Tanaka Y, and Iwata T. Comparable Analysis of Porcine Optineurin and Myocilin Expression in Trabecular Meshwork Cells and Astrocytes from Optic Nerve Head. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004 45:2652-2659

Niizeki H, Matsunaga T, Iwata T, Shimizu T, Kurimoto I, Naruse T, Inoko H, Streilein JW. The MICA5.1 allele is not associated with susceptibility to effects of ultraviolet-B radiation on induction of contact hypersensitivity. *J Dermatol Sci* 2004

Ishikawa K, Funayama T, Ohtake Y, Tanino T, Kurosaka D, Suzuki K, Ideta H, Fujimaki T, Tanihara H, Asaoka R, Naoi N, Yasuda N, Iwata T, Mashima Y. Novel MYOC Gene Mutation, Phe369Leu, in Japanese Patients with Primary Open-Angle Glaucoma Detected by Denaturing High-Performance Liquid Chromatography. *J Glaucoma* 2004 13:466-471

Funayama T, Ishikawa K, Ohtake Y, Tanino T, Kurosaka D, Kimura I, Sohma K, Suzuki K, Ideta H, Nakamoto K, Yasuda N, Fujimaki T, Murakami A, Asaoka R, Hotta Y, Kimura A, Tanihara H, Kanemoto T, Mishima H, Fukuchi T, Abe H, Iwata T, Oguchi Y, Kudoh J, Shimizu N, and Mashima Y. Variants in Optineurin Gene and their Association with Tumor Necrosis Factor-alpha (-857C>T) Polymorphisms in Japanese Patients with Glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004 45:4359-4367

Umeda S, Ayyagari R, Allikmets R, Suzuki MT, Karoukis AJ, Ambasadhan R, Zernant J, Okamoto H, Ono F, Terao K, Atsushi M, Yoshikawa Y, Tanaka Y, and Iwata T. Early onset macular degeneration with drusen in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) pedigree caused by a novel gene mutation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005 46:683-691

岩田 岳、真島 行彦. インベーター法を用いた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/application_r.html, 株式会社メディカル デウ

岩田 岳、渋谷 昌彦. REF-1の機能解析: Applied Biosystems 1700 ケミルミネッセントマイクログレイアナライザを用いた網膜色素上皮細胞増殖因子 REF-1の機能解析. バイオビート
<http://www.appliedbiosystems.co.jp/website/jp/biobeat> 日本アプライドバイオシステムズ株式会社

Fujimoto Y, Okuyama T, Iijima M, Tanaka T, Reiko Horikawa R, Yamada K, Ogata T. Genitourinary phenotype in XX patients with distal 9p monosomy. *Molecular Genetics and metabolism* 2004;82:173-9.

小須賀基通、奥山虎之. 小児科医は知っておきたい眼科疾患「遺伝」小児科診療 2004 ; 99 : 1303-1308

Wada, T. et al. MKK7 couples stress signaling to G2/M cell cycle progression and cellular senescence. *Nat. Cell Biol.* 6, 215-226 (2004).

Matsuoka, M. et al. Requirement of MKK4 and MKK7 for CdCl₂- or HgCl₂-induced Activation of c-Jun NH₂-terminal Kinase in Mouse Embryonic Stem Cells. *Toxicol. Lett.* 152, 175-181 (2004).

Sakaida, I. et al. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 40, 1304-1311 (2004).

Furutani-Seiki, M. et al. Asystematic genome-wide screen for mutations affecting organogenesis in Medaka, *Oryzias latipes*. *Mech. Dev.* 121, 647-658 (2004).

Kitagawa, D. et al. Genetic dissection of the formation of the forebrain in Medaka, *Oryzias latipes*. *Mech. Dev.* 121, 673-685 (2004).

Watanabe, T. Mutations affecting liver development and function in Medaka, *Oryzias latipes*, screened by multiple criteria. *Mech. Dev.* 121, 791-802 (2004).

Nishina H. et al. [review] Physiological roles of SAPK/JNK signaling pathway. *J. Biochem.* 136: 123-126 (2004).

Ozawa, Y., Nakao, K., Shimazaki T., Takeda, J., Akira S., Ishihara Hirano T., Oguchi, Y. and Okano, H.: Downregulation of STAT3-activation is required for presumptive rod photoreceptor cells to differentiate in the postnatal retina. *Mol.Cell.Neurosci* 26:258-270 (2004)

小沢洋子、中尾啓子、島崎琢也、岡野栄之. 視細胞の分化調節機構—活性化 STAT3 による負の制御—炎症再生医学会誌 (2005 in press)

Azuma N, Tadokoro K, Asaka A, Yamada M, Yamaguchi Y, Handa H, Matsushima S, Watanabe T, Kohsaka S, Kida Y, Shiraishi T, Ogura T, Shimamura K and Nakafuku M. The *Pax6* isoform bearing an alternative spliced exon promotes the development of the neural retinal structure. *Hum Mol Genet*, 2005; 14: 735-745.

Azuma N, Tadokoro K, Asaka A, Yamada M, Yamaguchi Y, Handa H, Matsushima S, Watanabe T, Kida Y, Ogura T, Shimamura K and Nakafuku M. Transdifferentiation of the retinal pigment epithelia to the neural retina by transfer of the *Pax6* transcriptional factor. *Hum Mol Genet*, 2005; 14: (in press).

Kawase E, Nishina S, Kumagai K and Azuma N. Infantile case for occlusive microvascular retinopathy after bone marrow transplantation. *Jpn J Ophthalmol* (in press).

Nishina S, Azuma N, Miyauchi J and Kaneko T. Surgical treatment of recurrent juvenile xanthogranuloma of the eyelid. Jpn J Ophthalmol, 2004; 48:598-599.

Suzuki Y, Nishina S, Azuma N. Two case with different features of congenital optic disc anomalies in each eye. Graefe Arch Clin Exp Ophthalmol (in press).

東 範行. 水晶体の形成遺伝子とその変異. 日本白内障学会誌, 2004; 16:13-22.

東 範行. 完全ペーパーレス電子カルテの現状と問題点. 新しい眼科, 2004; 21:867-872.

東 範行. 未熟児網膜症. 小児科診療, 2004; 8:1217-1223.

鈴木由美, 川瀬英理子, 仁科幸子, 東 範行. 乳頭ぶどう腫の光干渉断層像. 臨眼, 2004; 58, 1241-1243.

仁科幸子, 東 範行. 臨床の場における弱視の治療方針. 日本の眼科, 2004; 75, 157-161.

東 範行. 視交叉の謎. 日本の眼科, 2004; 75, 447-448.

東 範行. 網膜の再生と移植. 日本の眼科, 2004; 75, 1223-1224.

仁科幸子, 東 範行. 先天白内障. 臨眼, 2004; 58 増刊, 264-267.

東 範行. 緑内障の原因遺伝子. 日本の眼科, 2004; 76, (印刷中)

2. 学会発表

Shibuya M, Tanaka Y, Utsumi J, Mutoh M, Reddy VN, Iwata T. Characterization of Novel Growth Promotive Factor for Retinal Pigment Epithelial Cells, REF-1/TFPI-2. Association for Research in Vision and Ophthalmology, Ft. Lauderdale, Florida, USA

S Umeda, R Ayyagari, R Allikmets, H Okamoto, M T Suzuki, K Terao, Mizota A, Y Yoshikawa, Y Tanaka, T Iwata. Linkage and mutation analysis to identify the gene associated with macular degeneration segregating in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) pedigree. Association for Research in Vision and Ophthalmology, Ft. Lauderdale, Florida, USA

Izumi K, Kurosaka D, Mashima Y, Taya T, Osada N, Oguchi Y, Tanaka Y, Iwata T. cDNA Microarray Analysis of Gene Expression in Cultured Human

Corneal Fibroblasts following TGF- β 2 Stimulation. Association for Research in Vision and Ophthalmology, Ft. Lauderdale, Florida, USA

Iwata T, Akahori M, and Tanaka Y. Analysis of Optineurin-RAB8 Protein Interaction Using Quartz-Crystal Microbalance. India Eye Research Group, Chennai, India

Iwata T and Tanaka Y. Analysis of Optineurin-RAB8 Protein Interaction Using Quartz-Crystal Microbalance. International Congress of Eye Research, Sydney, Australia

Iwata T, Akahori M, and Tanaka Y. Analysis of Optineurin-RAB8 Protein Interaction Using Quartz-Crystal Microbalance. American Society of Cell Biology, Washington DC, USA

Ayyagari R, Umeda S, Allikmets R, Karoukis AJ, Ambasadhan R, Okamoto H, Suzuki MT, Terao K, Mizota A, Yoshikawa Y, Tanaka Y, Iwata T. Autosomal dominant macular degeneration in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) pedigree: Linkage and mutation analysis. American Society of Human Genetics, Toronto, Canada

Fukuhara Y, Okuyama T, et al. Long-term behavioral improvement after intra-cerebral transplantation of neural stem cells into the mice with mucopolysaccharidosis VII. 10th annual meeting of the gene therapy 2004, 8月 5日、東京

Hiroshi Nishina: Signaling molecules in proliferation of liver stem cells and liver regeneration by using bone marrow cells. Taiwan Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, Taipei, Taiwan, October, 2004.

第 77 回日本生化学会, 横浜, 2004 年 10 月

第 27 回日本分子生物学会, 神戸, 2004 年 12 月

小沢洋子、中尾啓子、島崎琢也、坪田一男、岡野栄之 視細胞の分化調節機構—活性化 STAT3 による負の制御—第 25 回炎症再生医学会 2004.7. 東京

小沢洋子、中尾啓子、島崎琢也、坪田一男、岡野栄之 視細胞の分化調節機構—遺伝子導入を用いた、活性化 STAT3 による負の制御の解析—第 4 回再生医療学会 2005.3. 大阪

仁科幸子、鎌田裕子、越後貫滋子、赤池祥子、東範行、平形恭子. 水平筋上方移動術施行例の検討. 第 60 回日本弱視斜視学会総会 第 29 回日本小児

眼科学会総会合同学会 2004年6月、沖縄

鈴木由美、仁科幸子、野田英一郎、芝大介、東 範行. 両眼の巨大裂孔網膜剥離を呈した被虐待児症候群の1例. 第29回日本小児眼科学会総会合同学会 2004年6月、沖縄

東 範行. 網膜の再生 Japan Macula Club Meeting 2004年8月、蒲郡

東 範行. シンポジウム 網膜芽細胞腫の全国登録. がん治療学会 2004.10月、京都

鎌田裕子、仁科幸子、鈴木由美、石川薫、東 範行. 両眼に高度な先天瞳孔閉鎖と白内障を認めた双子例. 第57回日本臨床眼科学会 2004年11月、東京

東 範行. 特別講演 未熟児網膜症の光凝固 第57回日本臨床眼科学会 光凝固専門別研究会 2004年11月、東京

東 範行. 教育講演 小児白内障手術後の合併症. 眼科手術学会 2005年1月、大阪

浜 由紀子、仁科幸子、東 範行. 小児網膜剥離手術後の体位保持のための持続鎮静. 眼科手術学会 2005年1月、大阪

石川 薫、山田昌和、東 範行. 小児涙液内のイムノグロブリン. 角膜カンファレンス、2005年2月、徳島

浜 由紀子、山田昌和、東 範行. 角膜内水晶体を認めた Peters 奇形の4例. 角膜カンファレンス、2005年2月、徳島

Nishina S, Ogonuki S, Akaike S, Azuma N. Early surgery of infantile constant exotropia. American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus. 2005年3月、Orlando

石川 薫、東 範行、梅沢明弘. 先天ムコ多糖症の角膜混濁に対する細胞治療. 日眼、2005.3月、京都.

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

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眼形成不全症を生じることを明らかにしてきた。PAX6 産物の機能について、野生型・変異型の発現ベクターを構築し、試験管内反応や動物胚・培養細胞に及ぼす効果を解析し、転写調節能と形態形成能と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。また、これらの遺伝子について、選択的スプライスによる遺伝子産物の多様性について明らかにする。

A. 研究目的

1 個の受精卵から細胞分裂を繰り返して、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、絞りに相当する虹彩、レンズ、フィルムに相当する網膜など、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成果が得られている。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、それが何らか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。

ヒトのような高度に複雑な生命体を形成・維持するためには多数の遺伝子が必要であると考えられていたが、ヒトゲノム計画によって、わずか 3 万程度しか存在しないことが明らかにされた。一定数の遺伝子から、多様な機能を持つ蛋白質群を生じさせるには、選択的スプライスと翻訳後修飾が重要な役割を果たしている。スプライスに関与する因子が単離され、その分子機構が次第にあきらかになっているが、選択的スプライス、特に組織や発生分化時に転写産物の割合が変化するような、時間的・空間的な制御機構は不明である。PAX6 についてはエクソン 5a の有無という 2 つのアイソフォームが存在し、エクソン 5a のコードする 14 アミノ酸がペアドドメインの切り替えスイッチとして機能していると推知している。このように選択的スプライスは器官形成などにおいても重要な機能を果たしており、この点へのアプローチも図る。

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。

(4) 選択的スプライスによって、塩基配列あるいはアミノ酸配列に微細な変化を生じる例を収集し、RT-PCR によって確認する。これらの事例から、スプライス部位選択機構を明らかにすることを旨とする。

(倫理面での配慮)

本研究課題では、基本的に患者を直接対称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、倫理的な問題を生じない。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、3 種類のコンセンサス DNA 結合部位に対する結合能と、それを介した転写調節能を測定し、また、トランス転写活性化能を解析した。さらに、野生型および変異型間の相互作用について順次解析した。

(2) 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。細胞株を増やして検討を継続している。

(3) 微細な差を生じる選択的スプライス: 我々は 1994 年に DRPLA の cDNA 配列を報告したが、その後、複数の研究室からも報告され、データベースにはいくつかの DRPLA 配列が登録されている。

これらの配列の間に、cDNA 配列では CAG の有無、また蛋白の配列ではグルタミン 1 残基の有無という相違に気が付いた。この相違はエクソン-イントロン境界に位置することから、選択的スプライスによる可能性を考え、実際、ミニジーンを用いた実験で確認した。3 塩基離れた 2 ヶ所のスプライス受容部位を使用する選択的スプライスは、これまでに、数個の遺伝子について報告されていることがわかったが、一般には注目されておらず、このような微細な差違は塩基配列決定あるいは人為的なエラーとして処理されていることが多いと考えられる。公開データベースを検索し、1 アミノ酸残基の有無の相違（あるいは 2 残基と 1 残基の場合もありうる）を検索し、エクソン-イントロン境界に位置するものを選択し、実験的に確認し、少なくとも 3 例を見出した。さらに、選択的スプライスに関する WWW サイトの 1 つで、基となるデータ一式が公開されていることに気づき、ダウンロードして独自に解析したところ、スプライス受容部位および供与部位の違いによる選択的スプライスは近接部位で頻繁に生じ、結果的に、微細な差違を生じる例が極めて多いことがわかった。データベースに記載された約 200 例について、RT-PCR 法によって順次確認を進めた。

(4) PAX6 のエクソン 5a の機能：黄斑低形成症でペアドメインの C 末部位に変異を見出したことから、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、また、選択的スプライスによる 14 アミノ酸の挿入は 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を提唱してきた。ニワトリ胚の眼形成過程で、眼の各部位を詳細に解剖し、PAX6 の古典型とエクソン 5a 付加型アイソフォームの発現を解析した。網膜中心窩に相当する部位となる領域でエクソン 5a 付加型アイソフォームの発現が亢進していた。ニワトリ胚に電気穿孔法によって発現ベクターを導入したところ、両アイソフォームともに、一過的に眼の形成が促進され、たとえば網膜が肥大化し、ハッチ時に眼が巨大化した。それらに加え、眼の内部構造については両アイソフォームに顕著な違いが見られた。すなわち、エクソン 5a 付加型アイソフォームを強発現した場合には、網膜の平面方向への伸張が著しく促進され、一部が管状あるいは層状となって眼の内部へ突出する像が得られた。また、これらの部位では網膜の分化が進行していた。これらのことは、エクソン 5a 付加型 PAX6 アイソフォームは網膜の分化を強く促進することを直接実験系で証明した。

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 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。この因子が DRPLA の神経変性部位を決定することにかかわっている可能性について追求している。
- (3) 微細な差を生じる選択的スプライス：3 塩基離れた 2 ヶ所のスプライス受容部位を共用するためには、その配列上大きな制約がある。さらに、この 2 者の内、どちらが優先されるのか（強弱）についても当然制御されている。従って、このような例を枚挙し、実験的に確認していくと、スプライス制御の規則の解明などに役立つと考える。特に、選択的スプライスによる転写産物の割合が時間的・空間的に変化する例も数例見出しており、スプライス制御機構の解明の有力な手段となると考える。
- (4) PAX6 のエクソン 5a の機能：エクソン 5a 付加型 PAX6 アイソフォームは網膜の分化を強く促進することを証明した。選択的アイソフォームの機能について、自身の偏位同定に基づき、機能を推定し、それを実験的に証明した例となった。

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。

選択的スプライスは、一定数の遺伝子から多様な蛋白質を形成する重要な機構である。微細な差違を生じるスプライスは普遍的であることを見出した。この系は、病態におけるスプライスパターン変動解析のプロープとしての活用が考えられ、また、スプライス制御機構の解明に役立ち、さらには、患者における変異による cryptic スプライス部位の活性化機構、また、スプライスを使用する治療法開発につながるものと考えられる。

F. 健康危険情報

本研究の結果、また得られた成果に関して、国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす情報として、

特に報告するものは無い。

G. 研究発表

I. 論文発表

- 1) 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) M. U, L. Shen, T. Oshida, J. Miyauchi, M. Yamada & T. Miyashita. Identification of novel direct transcriptional targets of glucocorticoid receptor. *Leukemia*, 18, 1850-1856, 2004
- 3) N. Azuma, K. Tadokoro, A. Asaka, M. Yamada, K. Yamaguchi, H. Handa, S. Matsushima, T. Watanabe, S. Kohsaka, Y. Kida, T. Ogura, K. Shimamura & M. Nakafuku. Thee Pax6 isoform bearing an alternative spliced exon promotes the development of the neural retinal structure. *Hum. Mol. Genet.*, 14, 735-745,

2005.

4) K. Nagao, M. Toyoda, K. Takeuchi-Inoue, K. Fuji i, M. Yamada & T. Miyashita. Identification and characterization of multiple isoforms of a murine and human tumor suppressor, Patched, having distinct first exons. *Genomics*, 85, 462-471, 2005.

5) N. Azuma, K. Tadokoro, A. Asaka, M. Yamada, Y. Yamaguchi, H. Handa, S. Matsushima, T. Watanabe, Y. Kida, T. Ogura, K. Shimamura & M. Nakafuku. Transdifferentiation of the retinal pigment epithelia to the neural retina by transfer of the Pax6 transcriptional factor. *Hum. Mol. Genet.* (in press).

2.学会発表

詳細は省略

H. 知的所有権の取得状況
無し。

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
細胞・分子生物学研究室長

研究要旨：オプチニューリン (OPTN) は、アミノ酸数 577 をコードする遺伝子で、開放隅角緑内障患者に 3 つの遺伝子変異と遺伝子多型が 2 つ報告されている。Rab8 をはじめとした複数のタンパク質との相互作用が確認されている。本研究では OPTN の変異による緑内障の発症機構について *in vivo* および *in vitro* での解析を行った。まず、OPTN の遺伝子操作による緑内障マウスモデルの作製、特に重篤な症状を引き起こす E50K 変異とエクソン 5 欠損トランスジェニックマウスを作製した。次に、*in vitro* での OPTN の変異体と Rab8 との相互作用を解析を行うために困難であった Rab8 タンパク質の発現・精製法の確立を行った。

A. 研究目的

緑内障は視神経乳頭陥凹と視神経萎縮を特徴とする視神経障害を来す慢性進行性疾患であり、我が国の失明原因としては 2 番目に多い眼疾患である。岐阜県多治見市で行われた疫学調査（多治見スタディー）の結果から 40 歳以上の人口の有病率は約 5% であり、緑内障の 80% を占める開放隅角緑内障患者の約 90% が正常眼圧緑内障であることが報告されている。今後、高齢化が進むことが予想される我が国においては、緑内障、特に正常眼圧緑内障の発症機序の解明、治療法の確立は急務であると考えられ、正常眼圧緑内障モデル動物の作製が求められている。1997 年に緑内障の原因遺伝子として Stone らによって MYOC が、そして Sarfarazi らによって CYP1B1 が報告され、2002 年には再び Sarfarazi らによって新たに OPTN が加えられた。いずれの遺伝子に対しても盛んに研究がおこなわれているが、タンパク質機能の詳細な解析をおこなった報告は少なく、その機能の大部分は不明のままである。また、正常眼圧緑内障の原因遺伝子として OPTN が報告された後に、複数の研究グループにより追試されたが、その多くは遺伝子多型であることが明らかとなった。しかし、その OPTN 遺伝子変異による症例は少ないものの、変異と疾患との相関は 100% であり、しかも重症の緑内障に発展している。また、これまで複数の研究グループによって OPTN は Huntingtin, Rab8, Transcription factor IIIA, Adenovirus E3-14.7K など複数のタンパク質と相互作用することがすでに報告されており、複雑な細胞内制御に関連していると考えられる。

これまでに正常眼圧緑内障患との相関性が確認されている OPTN (E50K) 変異体が Rab8 と結合できないことを明らかにしており、OPTN と Rab8 との相互作用が正常眼圧緑内障に深く関係していることを報告した(2003 年 日本眼科学会、2003 年 アメリカ眼科学会)。Rab8 は細胞内小胞体輸送に深くかかわる Rab ファミリーの 1 つであり、近年、アストロサイトや神経細胞の分化、成長に必須な役割を果たしていることが明らかにされている。

これらの背景から、本研究では、正常眼圧緑内障モデルマウスの作製を目的として、正常眼圧緑内障との相関性が最も高い OPTN E50K 変異体に着目し、この変異体を全身に発現するトランスジェニックマウスを作製した。このトランスジェニックマウスの視神経乳頭部の観察を行うことを目的としてマウスの眼底写真撮影装置の構築を行った。また、OPTN E50K 変異による正常眼圧緑内障の発症機構を解析するために、種々の OPTN 変異体と Rab8 の相互作用解析を行うことを目的として、これまでに *in vitro* での発現精製が困難であった Rab8 タンパクの発現精製法の検討を行った。

B. 研究方法

マウス OPTN 遺伝子のクローニング

C57/BL6 マウス脳 500 mg をホモジナイズし、TRIzol (*invitrogen*) 10 ml と懸濁し氷上に 1 時間静置した。次にクロロホルム 2 ml を加え 5000×g, 30 分間遠心後、上清をイソプロパノール 5 ml と懸濁し-20℃で保存した。このサンプルを 5000×g, 30 分間遠心した後に沈殿を回収し 75%エタノール

で洗浄後、風乾し 500 μ l の超純水で溶解し total RNA サンプルとした。この total RNA 5 μ g を Oligo(dT)を用いて 1st strand 伸長反応を Super Script First-strand Synthesis System for RT-PCR (invitrogen)を用いて行い cDNA を調製した。

次にこの cDNA 1 μ l をテンプレートとして、ExTaq (takara) 1.25 U, primer (CCCAAGCTTCCACCATGTCCCATCAACCTCT, GCTCTAGAGCTCAAATGATGCAGTCCATCA) 0.5 μ M, dNTP 0.2 mM, の条件で 94°C 0.5 分間, 58°C 0.5 分間, 72°C 1 分間の PCR 反応を 30 サイクルおこないマウス OPTN 遺伝子を増幅させた。増幅させた OPTN 遺伝子は制限酵素 HindIII および XbaI で切断後、トランスジェニックマウス作製用ベクター pBroad2 に挿入した。

OPTN 遺伝子変異体の作製

単離したマウス OPTN 10 ng をテンプレートとし、Quick Change XL Site-Directed Mutagenesis kit (stratagene)を用いて 95°C 1 分間, 64°C 50 秒間, 68°C 7 分間の反応条件で 18 サイクル PCR 反応を行い点変異を導入した。

トランスジェニックマウスの作製

上記の方法により得られたマウス OPTN 遺伝子変異体を Prasmid Max-Prep(qiagen)により精製した後に制限酵素 ApaLI により直鎖状にしたサンプルを、YS 研究所に依頼しマウス受精卵にマイクロインジェクションした。生まれてきたマウスについて、尻尾を約 1 cm 切断し Puregene (gentra system)を用いて genomic DNA を抽出精製した。この genomic DNA をテンプレートとしてマウス OPTN 遺伝子とベクター配列を挟むように設計した primer 0.5 μ M, ExTaq 1.25 U, dNTP 0.2 mM, の条件で 94°C 0.5 分間, 62°C 0.5 分間, 72°C 1 分間の PCR 反応を 35 サイクルおこない OPTN 変異体遺伝子のトランスジェニックマウス個体を識別した。

マウス眼底の観察

マウス眼球にミドリリンPを滴下した後にネブタールによる麻酔下で Nikon デジタルカメラを接続したスリットランプと前置レンズを用いてマウス眼底の観察をおこなった。

Rab8 タンパクの発現法の確立

pRSET(invitrogen) に導入した Rab8 を BL21(DE3)pLysS に形質転換させ、5 ml の LB 培地で 37°C、O/N 振倒培養し、1 ml を 100 ml の LB 培地に移しさらに 6 時間 37°C で振倒培養を行った。そこに終濃度 0.4 mM IPTG を添加しさらに 4 時間 25°C で振倒培養をおこなった。次に遠心により大腸菌を回収し凍結溶解後、溶解バッファー(50 mM Na₂H₂PO₄ H7.0, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole) 10 ml に懸濁し超音波処理をおこなった。このサン

プルを 4°C, 7000 \times g, 30 分間遠心し、上清を回収し可溶性 Rab8 を含むサンプルとした。

Rab8 タンパクの精製法の確立

TALON-Beads (clontech) 1 ml をカラム体積の 5 倍量の D₂O で洗浄後、5 倍量の溶解バッファーで平衡化し上記の方法により得られた Rab8 タンパク質を含むサンプルを 10 ml 添加した。このカラムを 5 倍量の溶解バッファーで洗浄した後に、洗浄バッファー(50 mM Na₂H₂PO₄ pH5.2, 500mM NaCl, 50 mM imidazole)で洗浄し、溶出バッファー(50 mM Na₂H₂PO₄ H7.0, 500 mM NaCl, 100 mM imidazole)で溶出した。Rab8 を含む画分 500 μ l を AKTA system (amersham pharmacia)を用いて分画後、各画分を SDS-PAGE により分離しクマシーブルー染色によって検出した。

C. 研究結果

OPTN 変異体遺伝子トランスジェニックマウスの作製

C57BL6 の脳から抽出した total RNA を用いて RT-PCR を行い、マウス OPTN 遺伝子を単離し、この遺伝子に点変異を導入した。この点変異を導入した OPTN を受精卵にマイクロインジェクションした結果、OPTN 変異体を過剰発現しているトランスジェニックマウスを♂10 匹、♀7 匹の計 17 匹得ることができた。これらのマウスは全頭生存中であり、現在、wild type のマウスと交配をおこない F1 世代のマウスを作製している。また、691 番目の塩基と 692 番目の塩基との間に 2 塩基挿入し exon5 以降を欠落した OPTN のトランスジェニックマウスについては生存できなかった。

トランスジェニックマウスの一部を用いて眼底の観察を試みたところ、OPTN 変異体のトランスジェニックマウスは視神経乳頭の顕著な陥凹が観察された。

神経節細胞が抗ミオシリン抗体により FITC で、アストロサイトが抗 GFAP 抗体で TexRed で染色した結果、OPTN 変異体のトランスジェニックマウスでは視神経乳頭部の構造が崩れ、大きく陥凹していることを明らかにした。

可溶性 Rab8 タンパク質の発現法と精製法の検討

これまで、可溶性 Rab8 タンパク質の発現精製は困難であったため、今回、変性剤の非存在下での Rab8 タンパク質の単離精製を試みた。大腸菌内での可溶性に影響を与える、ベクターの種類、大腸菌の系統、発現誘導条件、溶解バッファーに含まれる塩濃度、界面活性剤の種類、などの種々の条件を検討した結果、pRSET に挿入した Rab8 を

BL21(DE3)pLysS に形質転換し、25℃で発現誘導を行うことにより可溶性 Rab8 タンパク質を得ることが出来た。またこのサンプルを TALON Beads を用いたアフィニティー精製により高い純度で Rab8 タンパク質を精製することが可能である。

D. 考察

OPTN E50K 変異は緑内障患者での頻度はきわめて少ないが、正常者で未だ発見されていない。今回の実験によってこの遺伝子変異はヒト緑内障に類似する神経乳頭の陥凹、アストロサイトの異常、ミエリンの形成異常などが観察され、変異のもたらす影響を *in vivo* で確認することができた。複数のグループによる研究からこの遺伝子による緑内障発症は少ないとされているが、今回の実験によって緑内障との関係が証明され、今後このマウスモデルを用いた実験によって正常眼圧緑内障の発症機序の解明に役立つデータが得られると考えられる。

E. 結論

正常眼圧緑内障を発症する OPTN 変異体 458 G>A (E50K) のトランスジェニックマウスを作製し、ヒト正常眼圧緑内障に類似する疾患マウスの作製に成功した。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tanaka Y, Utsumi J, Matsui M, Sudo T, Nakamura N, Mutoh M, Kajita A, Sone S, Kigasawa K, Shibuya M, Reddy VN, Zhang Q, Iwata T. Purification, Molecular Cloning, and Expression of a Novel Growth Promotive Factor for Retinal Pigment Epithelial Cells, REF-1/TFPI-2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004 45:245-252

Obazawa M, Mashima Y, Sanuki N, Noda S, Kudoh J, Shimizu N, Tanaka Y, and Iwata T. Comparable Analysis of Porcine Optineurin and Myocilin Expression in Trabecular Meshwork Cells and Astrocytes from Optic Nerve Head. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004 45:2652-2659

Niizeki H, Matsunaga T, Iwata T, Shimizu T, Kurimoto I, Naruse T, Inoko H, Streilein JW. The MICA5.1 allele is not associated with susceptibility to effects of ultraviolet-B radiation on induction of contact hypersensitivity. *J Dermatol Sci* 2004 35:221-223

Ishikawa K, Funayama T, Ohtake Y, Tanino T, Kurosaka D, Suzuki K, Ideta H, Fujimaki T, Tanihara H, Asaoka R, Naoi N, Yasuda N, Iwata T, Mashima Y. Novel MYOC Gene Mutation, Phe369Leu, in Japanese Patients with Primary Open-Angle Glaucoma Detected by Denaturing High-Performance Liquid Chromatography. *J Glaucoma* 2004 13:466-471

Funayama T, Ishikawa K, Ohtake Y, Tanino T, Kurosaka D, Kimura I, Sohma K, Suzuki K, Ideta H, Nakamoto K, Yasuda N, Fujimaki T, Murakami A, Asaoka R, Hotta Y, Kimura A, Tanihara H, Kanemoto T, Mishima H, Fukuchi T, Abe H, Iwata T, Oguchi Y, Kudoh J, Shimizu N, and Mashima Y. Variants in Optineurin Gene and their Association with Tumor Necrosis Factor-alpha (-857C>T) Polymorphisms in Japanese Patients with Glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004 45:4359-4367

Umeda S, Ayyagari R, Allikmets R, Suzuki MT, Karoukis AJ, Ambasadhan R, Zernant J, Okamoto H, Ono F, Terao K, Atsushi M, Yoshikawa Y, Tanaka Y, and Iwata T. Early onset macular degeneration with drusen in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) pedigree caused by a novel gene mutation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005 46:683-691

岩田 岳、真島 行彦

「インベーター法を用いた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/application_r.html
株式会社メディカル デウ

岩田 岳、渋谷 昌彦

「REF-1 の機能解析: Applied Biosystems 1700 ケミルミネッセントマイクロアレイアナライザを用いた網膜色素上皮細胞増殖因子 REF-1 の機能解析」 バイオビート

<http://www.appliedbiosystems.co.jp/website/jp/biobeat>
日本アプライドバイオシステムズ株式会社

2. 学会発表

Shibuya M, Tanaka Y, Utsumi J, Mutoh M, Reddy VN, Iwata T. Characterization of Novel Growth Promotive Factor for Retinal Pigment Epithelial Cells, REF-1/TFPI-2. Association for Research in Vision and Ophthalmology, Ft. Lauderdale, Florida, USA

S Umeda, R Ayyagari, R Allikmets, H Okamoto, M T Suzuki, K Terao, Mizota A, Y Yoshikawa, Y Tanaka, T Iwata. Linkage and mutation analysis to identify the gene associated with macular degeneration segregating in a cynomolgus monkey (*Macaca*

fascicularis) pedigree. Association for Research in Vision and Ophthalmology, Ft. Lauderdale, Florida, USA

Izumi K, Kurosaka D, Mashima Y, Taya T, Osada N, Oguchi Y, Tanaka Y, Iwata T. cDNA Microarray Analysis of Gene Expression in Cultured Human Corneal Fibroblasts following TGF- β 2 Stimulation. Association for Research in Vision and Ophthalmology, Ft. Lauderdale, Florida, USA

Iwata T, Akahori M, and Tanaka Y. Analysis of Optineurin-RAB8 Protein Interaction Using Quartz-Crystal Microbalance. India Eye Research Group, Chennai, India

Iwata T and Tanaka Y. Analysis of Optineurin-RAB8 Protein Interaction Using Quartz-Crystal Microbalance. International Congress of Eye Research, Sydney, Australia

Iwata T, Akahori M, and Tanaka Y. Analysis of Optineurin-RAB8 Protein Interaction Using Quartz-Crystal Microbalance. American Society of Cell Biology, Washington DC, USA

Ayyagari R, Umeda S, Allikmets R, Karoukis AJ, Ambasudhan R, Okamoto H, Suzuki MT, Terao K, Mizota A, Yoshikawa Y, Tanaka Y, Iwata T. Autosomal dominant macular degeneration in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) pedigree: Linkage and mutation analysis. American Society of Human Genetics, Toronto, Canada

H. 知的所有権の出願・取得状況（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 |

遺伝性眼疾患の遺伝子・細胞治療に関する研究

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

研究要旨：神経幹細胞は、移植により中枢神経系の再生を促す可能性があり、細胞治療法への応用が期待されている。今回、ニューロスフェア法で得られた神経幹細胞の表面抗原の発現について検討した。神経幹細胞は、MHC class II、CD80、CD86、ICAM I等の細胞表面抗原が発現しておらず、移植後の急性拒絶反応がおきにくい細胞であること、すなわちアロ移植のドナー細胞に適することが示された。

A. 研究目的

本研究の目的は、神経幹細胞を分離・培養し、その機能の解明と治療への可能性を検討し、遺伝性眼疾患に適用することである。遺伝性の眼疾患のなかには、中枢神経系の障害に起因するものがあり、この病態の治療に、神経幹細胞の眼内移植療法が期待されている。今回われわれは、ニューロスフェア法により神経幹細胞を分離・培養し、拒絶反応に関連するMHC class I、MHC class II、CD80、CD86、ICAM I等の細胞表面抗原の発現を検討し、アロ移植におけるドナー細胞としての有用性を検討した。

B. 研究方法

1) マウス神経幹細胞の分離と同定

妊娠14日目のB6マウス胎児脳の線状体から採取した細胞群を、20ng/ml上皮増殖因子(EGF)及び20ng/ml繊維芽細胞増殖因子(FGF)などの成長因子を加えた無血清培地(MHM)中で7日間培養し、神経幹細胞のみを分離した(ニューロスフェア法)。同細胞の培地から成長因子を取り除き、血清入りの培地に変更し、その分化を観察した。

(2) マウス神経幹細胞の細胞表面抗原の検出
ニューロスフェア法により得られたマウス神経幹細胞のMHC class I、MHC class II、CD80、CD86、ICAM Iについて、フローサイトメーターで検出を試みた。同一個体の脾細胞を抽出して比較検討した。

(倫理面への配慮) 本研究では、ヒト検体は利用していない。動物実験においては、施設の動物実験指針にもとづいて行った。

C. 研究結果

(1) マウス神経幹細胞の分離と同定
ニューロスフェア法で分離した神経幹細胞は、

ニューロンだけでなくアストロサイトおよびオリゴデンドロサイトにも分化することが、免疫染色法で確認された。これは、分離した細胞の「多分化能」を示すものであり、今回分離した細胞が確かに神経幹細胞であることを示していた。

D. 考察

神経幹細胞は、胎生期の脳において中枢神経系の分化・成熟に中心的な役割を果たしている。また、神経幹細胞の脳内移植を適切に行なうことにより、種々の先天異常症の治療につながる可能性が期待されている。昨年度の検討で、神経幹細胞の移植がリソゾーム蓄積症の治療に有用である可能性が明らかとなった。しかし、先天異常症の細胞治療においては、アロ移植が遺伝的に改変した自家移植のどちらかが必要になる。今回の検討で、アロ移植としての有用性が示された。

E. 結論

神経幹細胞が、アロ移植のドナー細胞として有用であることが、示された。

F. 健康危険情報 特になし。

C. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujimoto Y, Okuyama T, Iijima M, Tanaka T, Reiko Horikawa R, Yamada K, Ogata T. Genitourinary phenotype in XX patients with distal 9p monosomy. *Molecular Genetics and Metabolism* 2004;82:173-9.

2. 小須賀基通、奥山虎之。小児科医は知っておきたい眼科疾患「遺伝」小児科診療 2004; 99:1303-1308

2. 学会発表

5日、東京

1. Fukuhara Y, Okuyama T, et al. Long-term behavioral improvement after intra-cerebral transplantation of neural stem cells into the mice with mucopolysaccharidosis VII. 10th annual meeting of the gene therapy 2004, 8月

D. 知的財産権の出願・登録
本年度は特に予定していない。