

な網膜にあるが偏心度が大きく視力が不良である場合が混在しているためであると考えられた。また、今回の検討では、近見視力の測定には小数視力表を用いたが、小数視力は等差級数のため視角の変化が均等ではない。0.3以上の比較的良好な視力では視角と視力の変化がほぼ均等であるが、0.2と0.1では視角にすると2倍の差がある。同じ0.1と称する視力でも実際の視力の質には差がある。これも同じ視力で倍率が異なる原因のひとつであると考えた。

エイドの種類は、大まかに近見視力が0.2以上、偏心度が2度以内の症例では至近距離眼鏡が選択された。至近距離眼鏡は加入度数を大きくすると、読材料と眼の距離を短くする必要があり、約2倍の倍率が限界であるため偏心度が小さく視力が良好な症例に限られるためと考えた。拡大鏡は低倍率から高倍率まで選択の幅があるが、近見視力が0.1未満、偏心度5度以上の症例では選択されなかった。拡大鏡では高倍率になるほどレンズの口径が小さくなることから確保できる視野が制限され、数文字は見えるが、読書には適していないと考えられた。拡大読書器では拡大鏡と同じ倍率であっても、視野が広く視対象を探しやすい。また、高いコントラストが得られる。偏心度が大きくなるとコントラスト感度が低下する<sup>2)</sup>ことが知られており、偏心度が大きい症例には高いコントラストが得られるエイドが有用である。そこで偏心度が大きな症例では拡大読書器が選択されたと考えた。

## E. 結論

加齢黄斑変性に対する読書用エイドの倍率の選定には近見視力0.2以下ではPRLの偏

心度も考慮する必要がある。また、エイドの種類は視力と偏心度で規定された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 藤田京子他：加齢黄斑変性瘢痕期での preferred retinal locus のロービジョンエイド選択への影響。日眼会誌 108：202-206, 2004.

### 2. 学会発表

1. 藤田京子他：加齢黄斑変性瘢痕期の preferred retinal locus. 第106回日本眼科学会総会, 仙台,

## 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

## I. 参考文献

1. Sloan LL, Brown DJ: Reading cards for selection of optical aids for the partially sighted. Am J Ophthalmol. 55:1187-1199, 1963.
2. Rijdsdijk JP, Kroon JN, van der Wildt GJ: Contrast sensitivity as a function of position on the retina. Vision Res 20: 235-241, 1980.

## 加齢黄斑変性癥痕期での preferred retinal locus の ロービジョンエイドの選択への影響

藤田 京子, 湯沢美都子, 中村 仁美

日本大学医学部附属駿河台病院眼科

### 要 約

**目的:** 両眼性加齢黄斑変性癥痕期の preferred retinal locus (PRL) での近見視力, 偏心度と新聞を読むためのロービジョンエイド(エイド)の倍率, 種類との関係について検討する。

**対象と方法:** 対象は両眼性加齢黄斑変性癥痕期 44 例の日常使用している方の眼 44 眼とした。Scanning laser ophthalmoscope microperimetry で PRL を確認し, 中心窩からの偏心度を測定した。エイドは MNREAD-J を用いて求めた臨界文字サイズから倍率を決定し, 至近距離眼鏡, 拡大鏡, 拡大読書器の中から選定した。近見視力, PRL の中心窩からの偏心度と患者が選定したエイドの倍率および種類との関係について検討した。

**結果:** 近見視力 0.3 以上では倍率と PRL の偏心度に相関はみられなかったが, 0.2 以下では有意な相関がみられた。至近距離眼鏡は視力 0.2 以上, 偏心度 2 度以内, 拡大鏡は 0.1 以上, 5 度以内, 拡大読書器は 0.1 以下, 5 度以上で選定された。

**結論:** 加齢黄斑変性に対する読書用エイドの倍率の選定には, 近見視力 0.2 以下では偏心度も考慮する必要がある。エイドの種類は視力と偏心度で規定された。(日眼会誌 108: 202-206, 2004)

**キーワード:** ロービジョンエイド, 加齢黄斑変性, Preferred retinal locus, 偏心度

## Low Vision Aids for Reading in Scar Stage of Age-related Macular Degeneration

Kyoko Fujita, Mitsuko Yuzawa and Hitomi Nakamura

Department of Ophthalmology, Surugadai Hospital of Nihon University

### Abstract

**Purpose:** To evaluate the inter-relationship among near visual acuity, eccentricity of preferred retinal locus (PRL), and choice of low vision aids for reading in patients with bilateral age-related macular degeneration (AMD).

**Subjects and Methods:** The preferred eye of 44 patients having bilateral disciform stage AMD was examined. The PRL was detected and its eccentricity from the fovea was measured by scanning laser ophthalmoscopic microperimetry. Magnification of a low vision aid for reading newsprint was determined by the critical print size which was calculated using the MNREAD-J. The type of preferred aid was chosen from high-plus lens glasses, magnifiers, and closed-circuit televisions. The inter-relationship among near visual acuity, eccentricity of the PRL, and magnification and type of low vision aid for reading were evaluated.

**Results:** The magnification of the aid was correlated with the eccentricity of PRL in eyes with near visual acuity of 0.2 or less although no correla-

tion was found in eyes with near visual acuity better than 0.3. High plus lens glasses were selected by patients with near visual acuity better than 0.2 and eccentricity of 2 degrees or less. Magnifiers were selected by patients with near visual acuity better than 0.1 and eccentricity of 5 degrees or less. Closed-circuit televisions were selected by patients with near visual acuity of 0.1 or less and eccentricity of 5 degrees or more.

**Conclusion:** The eccentricity of PRL should be taken into account in determining low vision aids for reading, especially in patients with near visual acuity of 0.2 or less. Choice of the type of low vision aid depends on not only near visual acuity but also on eccentricity of PRL.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 108: 202-206, 2004)

**Key words:** Low vision aid, Age-related macular degeneration, Preferred retinal locus, Eccentricity

別冊請求先: 101-8309 東京都千代田区神田駿河台 1-8-13 駿河台日本大学病院眼科 藤田 京子  
(平成 15 年 3 月 11 日受付, 平成 15 年 8 月 29 日改訂受理)

Reprint requests to: Kyoko Fujita, M. D. Department of Ophthalmology, Surugadai Hospital of Nihon University,  
1-8-13 Surugadai, Kanda, Chiyoda-ku Tokyo 101-8309, Japan

(Received March 11, 2003 and accepted in revised form August 29, 2003)

## I 緒 言

両眼性加齢黄斑変性(age-related macular degeneration, AMD)では中心窩を含む萎縮、瘢痕病巣が形成されると、新しく固視点となった部位、すなわち preferred retinal locus(PRL)で物を見るようになる<sup>1)</sup>。PRLを使って、文章を読むなどの作業にはロービジョンエイド(以下、エイド)が必要になるため、近見視用のエイドの選定を行う。エイドの倍率の選定には、近見視力と読みたい文字を読むために必要とされる視力の比率から倍率を推定する方法がある<sup>2)3)</sup>が、著者らは本症においては近見視力を基準にした倍率では読書に不十分であること、読書成績から求めた臨界文字サイズを基準として倍率を選定する方法が有用であることを報告<sup>4)</sup>した。また、AMD症例では同じ視力であっても、PRLの中心窩からの偏心度が異なり、網膜の状態も異なることも報告<sup>5)</sup>した。今回は両眼性AMD瘢痕期症例の日常使用している方の眼で、新聞を読むためのロービジョンケアを行い、近見視力、PRLの中心窩からの偏心度と患者が選択したエイドの倍率および種類との関係について検討した。

## II 対象と方法

対象は、駿河台日本大学病院眼科で経過観察中の両眼性AMD瘢痕期で、ロービジョンケアを希望した44例の日常使用している方の44眼である。44例の年齢は56~88歳、平均76歳、女性10例、男性34例であった。ロービジョンケアを行うに当たり、患者の現在の病状および視力予後について説明し、残存視機能を活用するロービジョンケアについてインフォームド・コンセントを行い患者の同意を得た。これらの症例にランドルト環を用いた遠見および近見の矯正視力を測定した。走査レーザー検眼鏡(scanning laser ophthalmoscope, SLO) microperimetryを用いてPRLの位置を確認した。PRLの中心窩からの偏心度は、画角40°のSLO microperimetryの画像上にPRLと中心窩をマーキングし、3回測定し平均値を求めた。読書能力の測定には縦書きのMNREAD-Jを用い、各文字サイズにおける読書速度を測定し、最大読書速度が得られる最小の文字サイズ、すなわち、臨界文字サイズを求めた。文字サイズとエイドの関係を明らかにするために読材料は新聞に統一した。新聞を読むためのエイドの倍率の選定は、読書成績から得られた臨界文字サイズに相当するM値を参考にした。M値は1mの距離で視角5分のサイズになる大きさを基準にした単位で、30~40cmの視距離で新聞を読むのに必要な理論的倍率を表し<sup>6)</sup>、 $M=10$ 〔臨界文字サイズのthe logarithm of the minimum of resolution(log MAR)-0.4〕で求められる。M値付近の倍率のエイドを数個選び、各々のエイドを用いて実際に新聞を読んで

もらい、時間を計って最も早い読書速度が得られるエイドを第一選択とした。しかし、そのエイドが患者にとって使用しづらい場合には、患者が最も読みやすいと自覚したものを選定した。エイドには至近距離眼鏡、拡大鏡、拡大読書器を用いた。至近距離眼鏡は近見視用眼鏡に凸レンズを加入し、通常の読書より読材料と眼の距離を短く保つことによって1.5から3倍程度の拡大率が得られる。凸レンズの加入度数は1~4Dとした。拡大鏡は倍率が2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12倍の手持ち式またはスタンド式を用いた。拡大読書器はモニターとカメラが別れている分離型の据え置き型、スキャナー型、ポータブル型を用いた。拡大読書器の倍率の設定は、臨界文字サイズ(log MAR)を視角(度)に換算し、換算した視角を拡大読書器のモニターと眼の間の距離に応じた文字の縦幅(cm)に換算した。例えば、患者の臨界文字サイズが2.0 log MARの場合、視角は18.67°になり、モニターと眼の間の距離を30cmにした場合には、文字の縦幅は9.7cmになる。モニターと眼の間の距離を40cmにした場合には、文字の縦幅は13.3cmになる。今回は近見矯正視力、偏心度と選定されたエイドの倍率と種類との関係を検討した。倍率と偏心度との相関の検定には単変量回帰分析を用いた。

## III 結 果

44眼の近見矯正視力は、0.5が5眼、0.4が5眼、0.3が6眼、0.2が13眼、0.1が13眼、0.09が1眼、0.08が1眼であった。PRLは全眼で中心窩から移動しており、中心窩からの偏心度は0.3~7.0度、平均 $2.0 \pm 1.7$ (平均値±標準偏差)度であった。臨界文字サイズは0.1~1.5 log MAR(平均 $0.9 \pm 0.3$  log MAR)であった。臨界文字サイズに相当するM値は、0.5~12.6であった。M値と最終的に選定したエイドの倍率には有意な

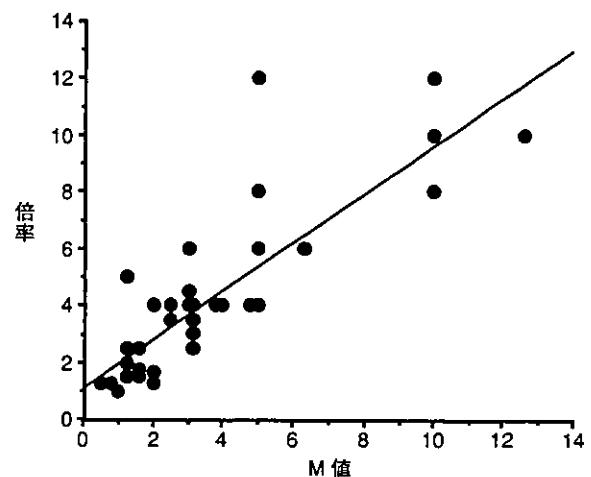


図1 M値と最終的に選定したエイドの倍率。  
M値と最終的に選定したエイドの倍率には有意な相関がみられた( $r^2=0.711$ ,  $p<0.0001$ )。

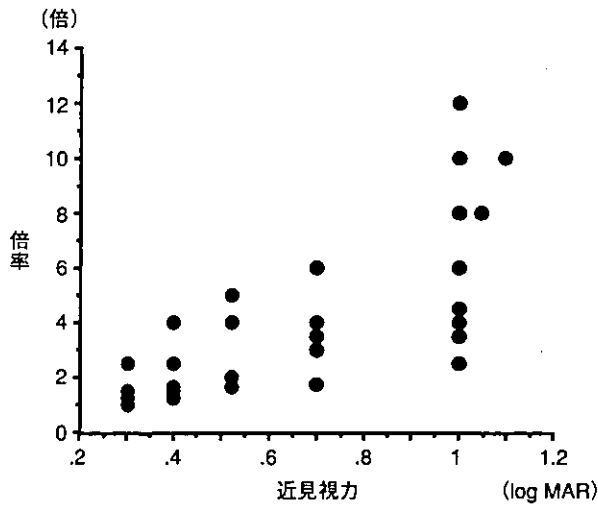


図 2 近見視力と新聞を読むために要した倍率。同じ近見視力でも新聞を読むために要した倍率が異なった。

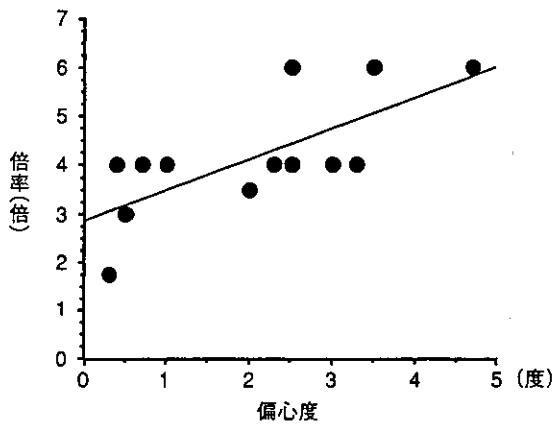


図 3 近見視力 0.2 の偏心度と倍率の関係。偏心度と倍率の間には有意な相関がみられた ( $r^2=0.514, p=0.004$ )。

相関がみられた(図 1)。新聞を読むのに必要としたエイドの倍率は、近見視力 0.5 では 1~2.5 倍、0.4 では 1.2~4 倍、0.3 では 1.7~5 倍、0.2 では 1.8~6 倍、0.1 では 2.5~12 倍、0.09 では 8 倍、0.08 では 10 倍であり、同じ視力でも必要とされる倍率が異なった(図 2)。各視力間で倍率と偏心度との関係を見たところ、0.5、0.4、0.3 の症例では倍率と偏心度の相関係数はそれぞれ 0.59、0.11、0.37 で、有意な相関はなかった ( $p>0.05$ )。0.2、0.1 の症例では倍率と偏心度に有意な相関がみられ、偏心度が大きい症例ほど高倍率を必要とした(図 3、4)。0.09、0.08 の症例は症例数が 1 例ずつと少ないため、統計的検討は行わなかった。

エイドの種類は近見視力 0.5 の 5 眼では至近距離眼鏡 4 眼、拡大鏡 1 眼、0.4 の 5 眼では至近距離眼鏡 3 眼、拡大鏡 2 眼、0.3 の 6 眼では至近距離眼鏡 1 眼、拡大鏡 5 眼、0.2 の 13 眼では至近距離眼鏡 1 眼、拡大鏡 11 眼、拡大読書器 1 眼、0.1 の 13 眼では拡大鏡 9 眼、拡大読

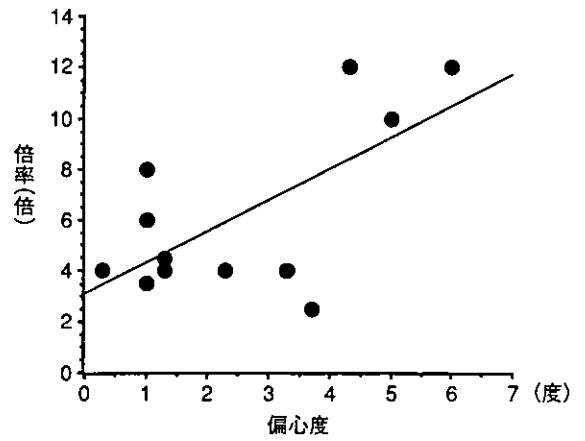


図 4 近見視力 0.1 の偏心度と倍率の関係。偏心度と倍率の間には有意な相関がみられた ( $r^2=0.474, p=0.007$ )。

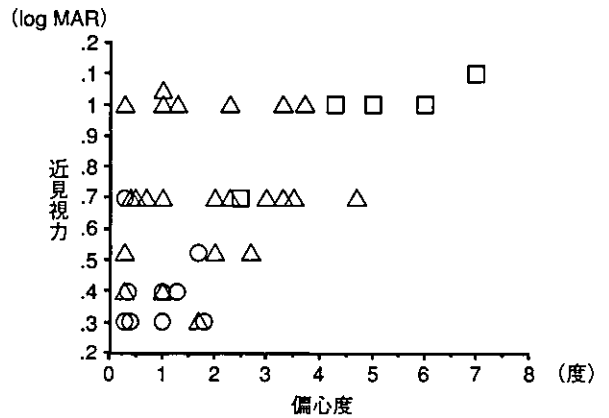


図 5 ロービジョンエイドの種類と近見視力、偏心度の関係。

○：至近距離眼鏡，△：拡大鏡，□：拡大読書器  
近見視力 0.2 以上，偏心度 2 度以内では至近距離眼鏡，近見視力 0.1 以上，偏心度 5 度以内では拡大鏡，近見視力 0.1 以下，偏心度 5 度以上では拡大読書器が選択された。

書器 3 眼、0.09 の 1 眼は拡大鏡、0.08 の 1 眼は拡大読書器を選択した(図 5)。エイドの種類と偏心度との関係は、至近距離眼鏡が偏心度 0.3~1.8 度、拡大鏡が 0.3~4.7 度、拡大読書器が 2.5~7.0 度であった。

選択されたエイドの種類を視力と偏心度の関係で見ると、おおまかに至近距離眼鏡は近見視力 0.2 以上、偏心度 2 度以内、拡大鏡は近見視力 0.1 以上、偏心度 5 度以内、拡大読書器は近見視力 0.1 以下、偏心度 5 度以上であった。

#### IV 考 按

両眼性 AMD で治療の可能性がなくなった症例にはロービジョンケアを行う。本症のロービジョンケアは、読書困難に対する近見視用エイドの選定が中心になる。ロービジョンエイドは、患者が読みたいと希望する大き

さの文字に合わせた適切な倍率が選定されなければならない。一般的に近見視用エイドの倍率の選定は、近見視力と患者が読みたいと思う読材料を読むために必要な視力の比率から求める。しかし、著者らはAMD症例では、近見視力を基準に選定されたエイドは、最終的に選定に至ったエイドの倍率より低く推定されることが多いこと、読書試験によって得られた臨界文字サイズを基準に、臨界文字サイズと患者が読みたいと希望する文字サイズの比率から決定した倍率は最終的に選定した倍率と近く、エイド選定までの時間が短縮できる可能性があることを報告<sup>9)</sup>した。本症で視力を基準とした倍率で予測より低かったことは、視力以外に倍率に影響する因子があることを推定している。AMDのPRLはSLO microperimetryによって正確に特定できるようになった<sup>1)</sup>。著者らは前報でSLO microperimetryを用いてPRLを測定し、PRLは網膜の状態にかかわらず中心窩から最も近い部位に移動すること、症例によって偏心度が同じでも視力が異なることを報告<sup>9)</sup>した。

今回の検討では、同じ近見視力でも選定されたエイドの倍率が異なった。PRLの近見視力および中心窩からの偏心度と倍率の関係をみると、近見視力0.3以上では偏心度と倍率に相関はみられなかったが、0.2以下では偏心度と倍率に相関がみられた。視力が0.3以上と比較的良好な症例では、偏心度も3度以内と小さく、倍率に偏心度の影響を受けにくかったが、0.2以下に視力が低下すると、同じ視力間でも偏心度にばらつきがみられ、偏心度が大きい症例ほど、高倍率のエイドを必要とした。同じ視力間で偏心度にばらつきがみられた理由として、AMDではPRLが中心窩近くにみられても、その部に網膜萎縮部があり視力が不良である場合やPRLが瘢痕萎縮部の辺縁の健全な網膜にあるが、偏心度が大きく視力が不良である場合が混在してくるためであると考えられた。また、今回の検討では、近見視力の測定には小数視力表を用いたが、小数視力は等差級数のため視角の変化が均等ではない。0.3以上の比較的良好な視力では視角と視力の変化がほぼ均等であるが、0.2と0.1では視角にすると2倍の差がある。同じ0.1と称する視力でも実際の視力の質には差がある。これも同じ視力で倍率が異なる原因の一つであると考えた。

エイドの種類は、大まかに近見視力が0.2以上、偏心度が2度以内の症例では至近距離眼鏡が選択された。至近距離眼鏡は加入度数を大きくすると、読材料と眼の距離を短くする必要があり、約2倍の倍率が限界であるため偏心度が小さく視力が良好な症例に限られるためと考えた。拡大鏡は低倍率から高倍率まで選択の幅があるが、近見視力が0.1未満、偏心度5度以上の症例では選択されなかった。Osakaら<sup>7)</sup>が読書には一視野に5文字入ることが必要であると述べているように、拡大鏡では高倍率になるほどレンズの口径が小さくなることから確

保できる視野が制限され、1文字は見えるが読書には適していないと考えられた。先に述べたが、偏心度が大きい場合には、限られた視野内の視対象を探すのが困難である。拡大鏡を選択しなかった例の偏心度から考えると、5度以内が拡大鏡の使用限界であると考えた。拡大読書器では拡大鏡と同じ倍率であっても、視野が広く視対象を探しやすい。また、高いコントラストが得られる。偏心度が大きくなるとコントラスト感が低下することが知られており、偏心度が大きい症例には高いコントラストが得られるエイドが有用である。そこで、偏心度が大きい症例では拡大読書器が選択されたと考えた。

今回はPRLをSLO microperimetryで固視灯を固視する部位とし、中心窩からPRLまでの偏心度とエイドの関係をみたが、視野の検討はしていない。固視灯を固視する以上に広い視野が必要とされる読書には、PRLを含むPRL周囲の広い視野を用いていると考えられる。Deruazら<sup>9)</sup>は黄斑疾患患者の読書時のPRLを調べ、PRLは複数存在すること、個々のPRLの機能には詳細を見分けるPRLと、単語、文章の長さ、単語、文章間のスペースなど、文章の全体をとらえるPRLとがあり、それらの複数のPRLを使って文章を読んでいることを報告した。また、患者に対し読書の訓練を行う際には、自然に獲得された単一のPRLとそこに隣接する領域の評価が必要で、患者には複数のPRLを合わせて用いることを助言することが必要であると述べている。今回のPRLは患者が自然に獲得したPRLであり、Deruazらの詳細を見分けるPRLに相当すると考える。今後は、読書に必要な視野を念頭におき、今回PRLとした部の、隣接領域の評価を行う必要があると考える。

O'Connell<sup>10)</sup>は読書に一番効果的な訓練は読書を行うことであり、その際には文字の適切な拡大に対する助言が必要であると述べている。また、読書に必要な視野を患者に助言することが本症の読書に対するロービジョンケアに有用であると述べている。Nilssonら<sup>11)</sup>は固視訓練により、読書速度が上がることを報告している。個々の患者の視機能から適切なエイドを選定し、患者にとって一番望ましい読書環境を提供しエイドを使用して読書訓練をすることがquality of lifeの向上につながると考える。

本研究は厚生科学特別研究事業「加齢黄斑変性に対するロービジョンエイド」(H10-感覚器-007 代表:湯沢美都子)、厚生労働科学研究特定疾患対策研究事業「特定疾患のアウトカム研究会 班長:福原俊一」(H14-特定-44)の助成によって行われた。

## 文 献

- 1) Schuchard RA, Fletcher DC: Preferred retinal locus. A review with applications in low vision

- rehabilitation. *Ophthalmol Clin North Am* 7 : 243—256, 1994.
- 2) 湖崎 克 : 弱視レンズの処方と使用法. *眼科* 7 : 893—902, 1965.
  - 3) 東京都心身障害者福祉センター編 : 心身障害者の援助技術書 弱視レンズの選択と指導. 7—66, 1992.
  - 4) 中村仁美, 小田浩一, 藤田京子, 湯沢美都子 : MNREAD-J を用いた加齢黄斑変性患者に対するロービジョンエイドの処方. *日本視能訓練士協会誌* 28 : 253—261, 2000.
  - 5) 藤田京子, 湯沢美都子 : 加齢黄斑変性瘢痕期における preferred retinal locus. *日眼会誌* 107 : 602—606, 2003.
  - 6) Sloan LL, Brown DJ : Reading cards for selection of optical aids for the partially sighted. *Am J Ophthalmol.* 55 : 1187—1199, 1963.
  - 7) Osaka N, Oda K : Effective visual field size necessary for vertical reading during Japanese text processing. *Bulletin of Psychonomic Society* 29 : 345—347, 1991.
  - 8) Rijdsdijk JP, Kroon JN, van der Wildt GJ : Contrast sensitivity as a function of position on the retina. *Vision Res* 20 : 235—241, 1980.
  - 9) Deruaz A, Whatham AR, Mermoud C, Safran AB : Reading with multiple preferred retinal loci : Implications for training a more efficient reading strategy. *Vision Res* 42 : 2947—2957, 2002
  - 10) O'Connell WF : Eccentric Viewing. In : Cole RG, et al(Eds) : Remediation and management of low vision. Mosby, St Louis, 27—57, 1996.
  - 11) Nilsson UL, Frennesson C, Nilsson SE : Location and stability of a newly established eccentric retinal locus suitable for reading, achieved through training of patients with a dense central scotoma. *Optom Vis Sci* 75 : 873—878, 1998.

## 38. ラット高眼圧モデルにおける長期の網膜変化の検討

伊藤 忠、大黒 浩、大黒幾代、間宮和久、石川 太、目時友美、山崎仁志、中澤 満  
(弘前大)

### 研究要旨

目的) 緑内障の発生機序の一つに、慢性的な高眼圧状態が持続することによる網膜神経節細胞 (RGC) の障害があげられる。今回我々は、ラット高眼圧モデルを用いて、長期高眼圧下における RGC の変化、及びアポトーシス関連蛋白の遺伝子発現の変化について検討した。対象と方法) Wistar ラットの高眼圧モデルを作成し、1ヶ月後、3ヶ月後及び6ヶ月後にそれぞれラットの上丘より DiI 蛍光色素を注入し、蛍光顕微鏡下にて、ラベルされた RGC を測定し、両者を比較した。また、高眼圧ラット及びコントロールラットの網膜を用いて RT-PCR を行い、アポトーシス関連蛋白 (caspase3, caspase8, caspase9, bax, Bcl-2, Bcl-x) の発現変化を転写レベルで比較した。また、各種緑内障点眼薬を、高眼圧ラットに用いて同様の実験を施行した。結果) 1ヶ月後、3ヶ月後及び6ヶ月後のいずれにおいても、ラット高眼圧モデルの RGC 数は、コントロールラットと比べて減少していた。RT-PCR については、1ヶ月後及び3ヶ月後の高眼圧ラットで、caspase9 の発現が明らかに増大していた。6ヶ月後では、高眼圧ラットとコントロールラットの間に明らかな差はみられなかった。各種緑内障点眼薬の効果については、RGC 数では明らかな差は認めなかった。考察) ラット高眼圧モデルでは RGC が減少した。また、高眼圧発生後少なくとも3ヶ月間は caspase9 の発現が促進していたことから、この細胞減少には caspase 系を介したアポトーシスが関与している可能性が示唆された。

### A. 研究目的

緑内障は成人の失明の主要な原因のひとつである。本症の主体は特異な緑内障性視神経障害であるが、これには眼圧上昇に伴う原発および続発緑内障と眼圧が正常範囲内である正常眼圧緑内障の2種類がある。最近の研究によれば視神経障害の原因として RGC のアポトーシスが関与することが知られている<sup>1-5)</sup>が、緑内障のメカニズムの全貌は依然明らかにされておらず、その病態の一端を明らかにするためには動物の緑内障モデルの作成は重要な手がかりを与え

るものと期待される。今回我々は、ラットの高眼圧モデルを作成し RGC 数の変化およびアポトーシス関連タンパクの遺伝子発現の変化について検討した。また、各種緑内障点眼薬を高眼圧ラットに点眼した場合の変化についても検討した。

### B. 研究方法

Wistar ラットの上強膜静脈焼灼による高眼圧モデルを作成し、約6ヶ月間高眼圧を保持した。1ヶ月、3ヶ月および6ヶ月の高眼圧ラットおよびコントロールラットの上

丘から DiI 蛍光色素を注入することにより RGC を逆行ラベルした。蛍光色素注入から 72 時間後に眼球を摘出して固定した。網膜伸展標本を作成し、蛍光顕微鏡で観察した。高眼圧ラットとコントロールラットの蛍光色素でラベルされた RGC 数を比較検討した。また、高眼圧ラット及び正常コントロールラットの網膜から RNA を抽出して、逆転写して cDNA を合成し、TaqMan<sup>®</sup> PCR でアポトーシス関連タンパク (Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9, bcl-2, bcl-x, Bax) の mRNA の発現について検討した。また、高眼圧ラットに各種緑内障点眼薬 (マレイン酸チモロール、塩酸ブナゾシン、ラタノプロスト、ニブラジロール) を各々 1 回/日点眼を継続し、1 ヶ月、3 ヶ月で前述と同様に、網膜神経節細胞数の変化と、アポトーシス関連タンパクの mRNA の発現について検討した。

### C. 研究結果

高眼圧モデルラットと正常眼圧ラットの網膜神経節細胞を DiI 蛍光染色することによってその数を比較したところ、高眼圧ラットでは 1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月いずれもコントロールラットに比べて有意に減少していた。(P<0.05)

アポトーシス関連タンパクの mRNA 発現については、1 ヶ月の高眼圧モデルで Caspase-3、Caspase-9、Bax の亢進を、3 ヶ月の高眼圧モデルで Caspase-3、Caspase-9 の亢進を認めた。6 ヶ月の正常コントロールモデルと高眼圧モデルとの間に明らかな差はみられなかった。

網膜神経節細胞数は、各種緑内障点眼薬の間で明らかな差はみられなかった。

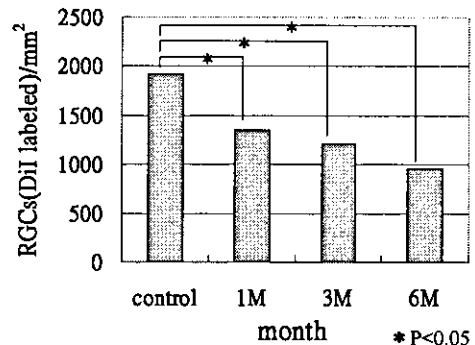


図 1 網膜神経節細胞数

TaqMan<sup>®</sup>PCR ではマレイン酸チモロールと他の 3 剤を比較したところ、3 剤とも 1 ヶ月の時点での Caspase 8 の mRNA の発現がマレイン酸チモロールと比較して亢進していた。

### D. 考察

高眼圧モデルラットにおいて、神経節細胞数の有意な減少を確認することができた。このことは、高眼圧モデルラットが緑内障モデルとなりうることを示唆している。1 ヶ月および 3 ヶ月の高眼圧ラットでは一部のアポトーシス関連タンパクの mRNA の発現の亢進がみられた。このことより、アポトーシス関連タンパクの発現が起こっていると考えられるが、今後タンパクレベルでの検討を要する。

緑内障点眼薬でのアポトーシス関連タンパクの発現については、マレイン酸チモロールと比較して、他 3 剤において Caspase 8 の mRNA の発現が亢進していたが、その他に関しては明らかな差はみられず、今後さらなる検討を要する。



## E. 結論

ラット高眼圧モデルを確立することは、今後の緑内障治療薬等の研究に有用になり得ると思われた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## 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

## I. 参考文献

1. Kerrigan LA, Zack DJ, Quigley HA, Smith SD, Pease ME.  
TUNEL-positive ganglion cells in human primary open-angle glaucoma. Arch Ophthalmol 115 :1031-1035, 1997.
2. Okisaka S, Murakami A, Mizukawa A, Ito J. Apoptosis in retinal ganglion cell decrease in human glaucomatous eyes. Jpn J Ophthalmol 41:84-88 , 1997
3. Kaushik S, Pandav SS, Ram J. Neuroprotection in glaucoma. J Postgrad Med 49:90-95, 2003.
4. Quigley HA, Nickells RW, Kerrigan LA,

Pease ME, Thibault DJ, Zack DJ.

Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. Invest Ophthalmol Vis Sci 36:774-786, 1995.

5. McKinnon SJ, Lebman DM, Kerrigan-Baumrind LA, Merges CA, Pease ME, Kerrigan DF, Ransom NL, et al. Caspase activation and amyloid precursor protein cleavage in rat ocular hypertension. Invest Ophthalmol Vis Sci 43:1077-1087, 2002.

## 39. 網膜虚血再灌流による網膜障害に対するD-アロースの保護作用

廣岡一行<sup>1)</sup>、宮本 修<sup>2)</sup>、板野俊文<sup>2)</sup>、馬場哲也<sup>1)</sup>、白神史雄<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup> 香川大、<sup>2)</sup> 香川大脳神経生物学)

**研究要旨** 希少糖（自然界に微量にしか存在しない単糖）の一つであるD-アロースには虚血再灌流時にグルタミン酸の放出を抑制することを報告した。in vivo 及び in vitro での虚血再灌流モデルを用いて研究を行った。再灌流後の硝子体酸素分圧は生食投与群では虚血前の値に戻るまでに10分程度要したのに対し、D-アロース投与群では再灌流後ただちに硝子体酸素分圧は上昇し、虚血前の約1.5倍の値にまで達した。また、過酸化水素の放出は虚血開始30分後よりみられるが、D-アロースを投与することにより過酸化水素の放出は抑制された。網膜虚血再灌流による網膜障害に対してD-アロースは虚血及び再灌流中の細胞外へのグルタミン酸の放出を抑制するのみならず、過酸化水素の放出を抑制することにより保護的に働く可能性が示唆された。

### A. 研究目的

昨年の本会議で筆者らは稀少糖の一つであるD-アロースにはラット一過性眼虚血モデルにおいて、虚血及び再灌流中の細胞外へのグルタミン酸の放出を抑制することにより、遅発性神経細胞死を抑制することを報告した。虚血再灌流障害には虚血そのものによる障害と再灌流によって引き起こされる障害がある。<sup>1)</sup> 再灌流時に活性酸素が放出されるが、今回活性酸素の一つである過酸化水素についてD-アロースの及ぼす影響について検討した。

### B. 研究方法

ラットの前房内圧を130 mmHgに上昇させることにより網膜虚血を45分間行った。虚血開始30分前に腹腔内に200 mg/kg D-アロースを投与した群と生食のみ投与した群に分け、虚血時及び再灌流後の硝子体酸素分圧を測定し、比較した。また網膜を酸素と

グルコースを添加しない人工脳脊髄液中におくことにより虚血状態を作りだし、ジメチルアミノアゾベンゼン法により過酸化水素の放出（茶色）を検討した。

### C. 研究結果

虚血時は生食投与群とD-アロース投与群両者とも酸素分圧は同程度の低値であったが、再灌流後の酸素分圧は生食投与群では虚血前の値に戻るまでに10分程度要したのに対し、D-アロース投与群では再灌流後ただちに酸素分圧は上昇し、虚血前の約1.5倍の値にまで達した（図1）。また過酸化水素の放出は、酸素とグルコースを添加しない人工脳脊髄液中に浸した約30分後から放出され、45分間の虚血の後、過酸化水素は加速的に放出されたが、D-アロース投与によりその放出は抑制された（図2）。

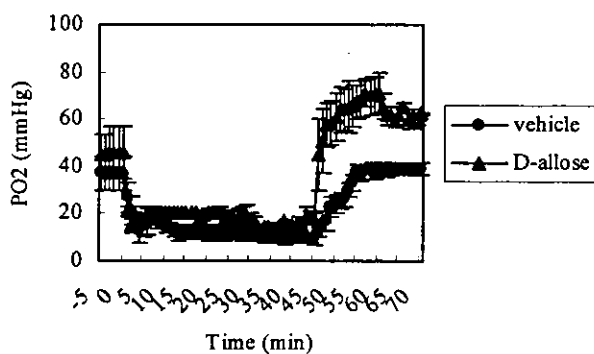


図1 硝子体酸素分圧

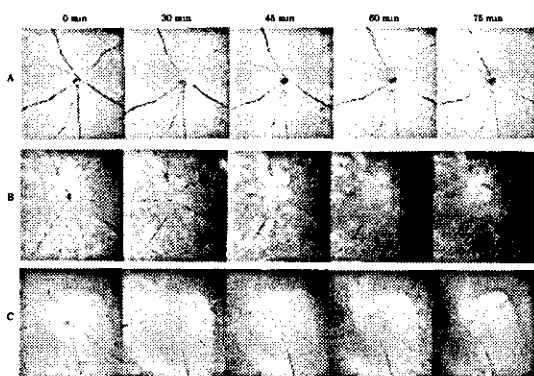


図2 過酸化水素の放出

A:コントロール、B:虚血—生食、C:虚血—  
D-アロース

#### D. 考察

過酸化水素が産生される時に、酸素が消費される。<sup>1)</sup> D-アロースを投与することにより、過酸化水素の放出が抑制され、そのため硝子体中の酸素分圧が再灌流時に上昇したと思われる。

#### E. 結論

網膜虚血再灌流による網膜障害に対してD-アロースは虚血及び再灌流中の細胞外へのグルタミン酸の放出を抑制するのみならず、過酸化水素の放出を抑制することにより保護的に働く可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

2003年5月22日に希少糖の生理活性作用の利用方法および希少糖を配合した組成物（生理番号：PCT-03-RS01）の名称で特許の出願を行った。

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

#### I. 参考文献

1. Gert J. Ter Horst and Jakob Korf. Clinical pharmacology of cerebral ischemia.

## 40. 急性障害時の成体網膜内在性幹細胞様細胞に対する Wnt3a の効果

大音壮太郎、万代道子、秋元正行、大石明生、吉村長久、高橋政代  
(京都大)

**研究要旨** 緒言：以前我々は哺乳類成体網膜におけるミューラー細胞が急性障害時に内在性幹細胞様の性質を獲得し、網膜神経細胞に分化しうることを報告した。今回幹細胞制御因子として知られている Wnt3a を用いてミューラー細胞の活性化を促進できないか調べた。

方法：6週齢の成体 DA ラットから網膜を採取し、網膜器官培養を行った。Wnt3a (100ng/ml) 及び BrdU (5 $\mu$ g/ml) を連日培養液に加え、標本作製し免疫染色法にて BrdU 陽性の分裂細胞の状態を検討した。

結果：Wnt3a を加えていないコントロールに比べ、Wnt3a を添加したものでは内顆粒層における分裂細胞が有意に増加した。これら分裂細胞の多くは Glutamine Synthetase 陽性のミューラー細胞であり、Wnt3a によりミューラー細胞の分裂が促進されることが示された。また Wnt3a を4日間添加した後培地交換を行い、Wnt3a を除去した状態で更に1週間培養したところ、分裂細胞の一部は外顆粒層へ遊走した。更に分裂細胞の一部には視細胞のマーカー Rhodopsin を発現するものも見られ、ミューラー細胞から網膜神経細胞への分化が示唆された。

結論：幹細胞の制御因子である Wnt3a によって分裂が増加することからも急性障害時のミューラー細胞が幹細胞様性質を獲得したことが示唆された。Wnt3a は内在性幹細胞による網膜再生を促進させる可能性がある。

### A. 研究目的

一般に成体哺乳類の網膜においては、神経再生は起こらないとされてきた。しかし我々はラット成体の網膜において、N-methyl-D-aspartate (NMDA) による網膜内層の急性障害に反応してミューラー細胞が分裂を開始し、一部は網膜神経細胞のマーカーを発現することを発見した (1)。しかしミューラー細胞がそうした内在性の幹細胞様の性質を獲得する割合は高いものではなかった。そこで今回我々は今回幹細胞制御因子として知られている Wnt3a を用いてミューラー細胞の活性化を促進できないか調べた。

### B. 研究方法

6週齢の成体 DA ラットから網膜を採取し、網膜器官培養を行った。Wnt3a (100ng/ml) 及び BrdU (5 $\mu$ g/ml) を4日間培養液に加え、その後4%パラホルムアルデヒドにて固定、凍結切片作製し免疫組織化学的手法にて BrdU 陽性の分裂細胞の状態を検討した。

#### (倫理面への配慮)

この研究における動物使用に関しては、京都大学医学研究科動物実験委員会の承認を得て、ガイドラインに準じて行った。

**C. 研究結果** Wnt3a を加えていないコントロールに比べ、Wnt3a を添加したものでは

内顆粒層における BrdU 陽性の分裂細胞が有意に増加した (図 1)。これら分裂細胞の多くはミュラー細胞のマーカー Glutamine Synthetase を発現していた。他の分裂細胞のマーカーである Ki67 を用いて検討したところ同様に Wnt3a により Ki67 陽性細胞が増加し、それらはミュラー細胞のマーカーを発現した。以上より Wnt3a によりミュラー細胞の分裂が促進されることが示唆された。次に Wnt3a を 4 日間添加した後培地交換を行い、Wnt3a を除去した状態で更に 1 週間培養し分化誘導を行ったところ、内顆粒層の BrdU 陽性細胞数が減少したのに対し外顆粒層の BrdU 陽性細胞数は増加し、分裂細胞の一部は内顆粒層から外顆粒層へ遊走したことが示唆された。更に免疫組織化学により BrdU 陽性細胞の一部には視細胞のマーカー Rhodopsin を発現するものも認められ、分裂細胞から網膜神経細胞への分化が示唆された。

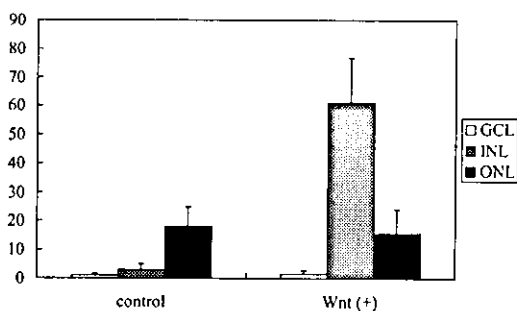


図 1 : 培養 4 日における BrdU 陽性細胞

#### D. 考察

Wnt は分泌性の糖タンパクで、体軸形成や中枢神経・四肢の器官形成に必須の情報伝達因子である。線虫から哺乳動物まで遺伝的に広く保存されていて、ヒトでは 19 種類の Wnt 遺伝子が存在し、大きな遺伝子ファ

ミリーを構成している。近年、Wnt が幹細胞の制御因子として働いていることがわかり、再生医学への応用が期待されている。Wnt2b はニワトリの毛様体辺縁部において前駆細胞の増殖、未分化状態維持に関与しているという報告がみられる (2)。また今回使用した Wnt3a は造血系幹細胞の自己複製に関与しているという報告や (3)、学会発表では哺乳類胎児網膜前駆細胞や成体毛様体由来前駆細胞の増殖に関与しているという報告がある。今回我々は Wnt3a が哺乳類成体網膜で神経前駆細胞としてのミュラー細胞の活性化・分裂を促進することを発見した。今回の結果からミュラー細胞が前駆細胞様の性質を獲得するメカニズムに Wnt が関与していることが示唆されるとともに、Wnt3a を用いた視細胞再生治療へとつながる可能性があると考えられる。

#### E. 結論

幹細胞の制御因子である Wnt3a によって分裂が増加することからも急性障害時のミュラー細胞が幹細胞様性質を獲得したことが示唆された。Wnt3a は内在性幹細胞による網膜再生を促進させる可能性がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Ooto S, Akagi T, Kageyama R, Akita J, Mandai M, Honda Y, Takahashi M. Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mammalian retina. Proc Natl Acad Sci

USA. 101:13654-13659, 2004

## 2. 学会発表

1. S.Ooto, T.Akagi, R.Kageyama, J.Akita, M.Mandai, Y.Honda, M.Takahashi.: Potential for neurotoxic injury in the adult mammalian retina. ARVO meeting 2004.5 (Florida)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

出願中 (特願 2005-010189)

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## I. 参考文献

1. Ooto, S., Akagi, T., Kageyama, R., Akita, J., Mandai, M., Honda, Y. & Takahashi, M. Proc Natl Acad Sci USA 101: 13654-136549, 2004.
2. Kubo, F., Takeichi, M. & Nakagawa, S. Development 130: 587-598, 2003.
3. Reya, T., Duncan, A. W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D. C., Willert, K., Hintz, L., Nusse, R. & Weissman, I. L. Nature 423: 409-414, 2003.

# Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mammalian retina

Sotaro Ooto\*, Tadamichi Akagi\*<sup>†</sup>, Ryoichiro Kageyama<sup>†</sup>, Joe Akita\*<sup>‡</sup>, Michiko Mandai\*<sup>‡</sup>, Yoshihito Honda\*, and Masayo Takahashi\*<sup>‡5</sup>

\*Departments of Ophthalmology and Visual Sciences and <sup>†</sup>Institute for Virus Research, Graduate School of Medicine, and <sup>‡</sup>Department of Experimental Therapeutics, Translational Research Center, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan

Edited by Fred H. Gage, The Salk Institute for Biological Studies, San Diego, CA, and approved July 30, 2004 (received for review March 26, 2004)

It has long been believed that the retina of mature mammals is incapable of regeneration. In this study, using the *N*-methyl-D-aspartate neurotoxicity model of adult rat retina, we observed that some Müller glial cells were stimulated to proliferate in response to a toxic injury and produce bipolar cells and rod photoreceptors. Although these newly produced neurons were limited in number, retinoic acid treatment promoted the number of regenerated bipolar cells. Moreover, misexpression of basic helix-loop-helix and homeobox genes promoted the induction of amacrine, horizontal, and rod photoreceptor specific phenotypes. These findings demonstrated that retinal neurons regenerated even in adult mammalian retina after toxic injury. Furthermore, we could partially control the fate of the regenerated neurons with extrinsic factors or intrinsic genes. The Müller glial cells constitute a potential source for the regeneration of adult mammalian retina and can be a target for drug delivery and gene therapy in retinal degenerative diseases.

The retina is a component of the central nervous system (CNS), and retinal neuronal death causes a severe loss of visual function. Although significant progress has been made in identifying factors that regulate retinal neurogenesis, no treatment is presently available to treat retinal degenerative diseases such as retinitis pigmentosa. Embryonic or adult retinal cells have been transplanted into patients with retinitis pigmentosa or age-related macular degeneration (1), but the outcomes of these procedures are not sufficient and the cell supplies are limited. Stem cell transplantation to retina has been under investigation; however, few donor cells expressed retinal neuronal markers in the host retina after transplantation (2–5). Therefore, a new strategy for retinal cell replacement is needed.

It has long been thought that the CNS is incapable of regeneration. However, recent efforts revealed that stem cells remain in the adult CNS and have the ability to produce new neurons and glia (6, 7). Furthermore, various injuries stimulate the proliferation of endogenous progenitors in locations where neurogenesis normally does not occur (8). Several studies have focused on neural regeneration after acute damage (9, 10). It is reasonable to hypothesize that, if inactive endogenous progenitors could be stimulated by some manipulation, they may produce new neurons and ultimately repair damaged compartments of the CNS.

When considering the adult mammalian retina, it has been believed that the retina of the mature mammal has no regenerative capacity. However, adult retinal stem cells have been identified in the nonpigmented ciliary margin of rodents (11, 12), implying that adult mammalian retina have some degree of regenerative potential. Furthermore, recent work has demonstrated that Müller glia play a role for regenerative responses of the fish and postnatal chicken retina (13–15).

Here we show that Müller glia in the central retina of adult mammals proliferate in response to neurotoxin-induced damage and generate new retinal neurons, which indicates the regenerative potential of the adult mammalian retina.

## Materials and Methods

**Animals.** The use of animals in this study was in accordance with the Guidelines for Animal Experiments of Kyoto University. All animal experiments in this study were conducted with the approval of the Animal Research Committee, Graduate School of Medicine, Kyoto University. Six-week-old male Sprague-Dawley rats were obtained from Shimizu Laboratory Supplies (Kyoto, Japan) and housed at room temperature on a cycle of 12 h light/12 h dark.

**Intraocular Injections.** Rats were anesthetized by inhalation of diethyl ether and i.p. injection of pentobarbital. The eyes were injected with 5  $\mu$ l of 40 mM *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) (total 200 nmol), 30 nmol BrdUrd, basic fibroblast growth factor (100 ng per injection), epidermal growth factor (100 ng per injection), retinoic acid (RA) (100 ng per injection), Activin-A (1–100 ng per injection), and bovine insulin (100 ng to 2  $\mu$ g per injection). All drugs were obtained from Sigma.

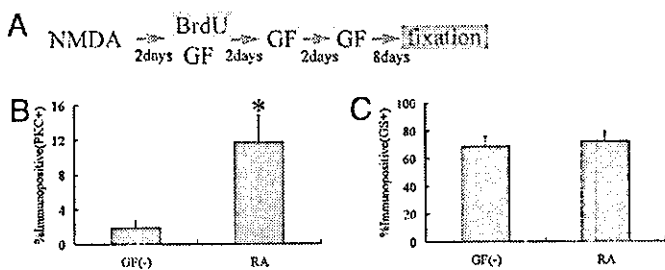
**Fixation, Sectioning, and Immunohistochemistry.** Tissue sectioning and immunohistochemistry were performed as described (5, 16). The primary antibodies and working dilutions in this study were as follows: mouse anti-BrdUrd (1:50, Roche Applied Science), rat anti-BrdUrd (1:10, Oxford Biotechnology, Kidlington, U.K.), mouse anti-glutamine synthetase (GS) (1:1,000, Chemicon), mouse anti-ED1 (1:100, Serotec), rabbit anti-GS (1:500, Sigma), rabbit anti-PKC (1:1,000, Sigma), mouse anti-PKC (1:500, Sigma), rabbit anti-neuron-specific enolase (NSE) (1:2, Immunotech, Luminy, France), rabbit anti-calbindin (1:200, Chemicon), mouse anti-calbindin (1:200, Sigma), mouse anti-HPC1 (1:2,000, Sigma), rabbit anti-Thy1.2 (PharMingen), mouse anti-RET-P1 (1:2,000, Sigma), rabbit anti-rhodopsin (1:1,000, LSL, Tokyo), rabbit anti-recoverin, mouse anti-Ki67 (1:200, PharMingen), mouse anti-nestin (1:1,000, PharMingen), rabbit anti-GFP (1:500, Molecular Probes), and mouse anti-Myc (Invitrogen). The secondary antibodies and working dilutions were as follows: labeled goat anti-mouse IgG antibodies (Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594, 1:500, Molecular Probes), labeled goat anti-rabbit IgG antibodies (Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594, 1:500, Molecular Probes), and labeled goat anti-rat IgG antibodies (Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594, 1:500, Molecular Probes). Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) assay was performed with a detection kit (Roche Diagnostics). The specimens were observed and photographed with a laser-scanning confocal microscope (Leica).

This paper was submitted directly (Track II) to the PNAS office.

Abbreviations: NMDA, *N*-methyl-D-aspartate; DAN, days after NMDA treatment; RA, retinoic acid; TUNEL, terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick end labeling; bHLH, basic helix-loop-helix; GS, glutamine synthetase; GCL, ganglion cell layer; IPL, inner plexiform layer; INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer; NSE, neuron-specific enolase; IRES, internal ribosome entry site.

<sup>5</sup>To whom correspondence should be addressed. E-mail: masataka@kuhp.kyoto-u.ac.jp.

© 2004 by The National Academy of Sciences of the USA



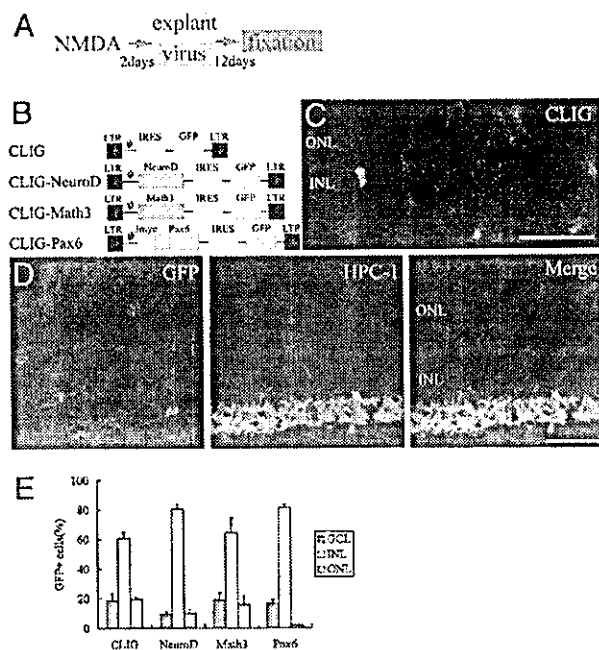
**Fig. 4.** RA treatment promotes bipolar cell differentiation. (A) Animal protocols. (B and C) Percentage of BrdUrd-labeled cells in the INL that expressed PKC (B) and GS (C). Cell counts were made from retinas treated with RA and control retinas (without growth factor treatment). \*,  $P < 0.01$  compared to the control retina. All data are mean  $\pm$  SD obtained from four animals. GF, growth factor.

cells located in INL and ONL among the retina after treatment with each growth factor (data not shown).

However, 1 week after the last injection of RA (DAN14), we found significantly increased numbers of BrdUrd/PKC positive cells in the INL of the central retina (Fig. 4B), whereas the overall BrdUrd-labeled cell number remained constant. In the control retinas (without growth factor treatment), BrdUrd/PKC-labeled cells comprised only  $2 \pm 1\%$  (312 cells examined,  $n = 4$  animals) of the population. We found that  $12 \pm 3\%$  (204 cells examined,  $n = 4$  animals) of the BrdUrd-labeled cells in the INL were immunoreactive for PKC in the RA-treated retina ( $P < 0.01$ ). RA treatment did not change the BrdUrd/GS-positive cell population (Fig. 4C), and we did not find any increase in the number of BrdUrd-labeled cells positive for other neuronal markers. BrdUrd-labeled cells in the INL were TUNEL-negative in the RA-treated retina (data not shown). These data suggest that RA predominantly promoted bipolar cell differentiation. Some of the uncommitted cells that would have remained immature may have been induced to differentiate into bipolar cells. We also examined another possibility that RA caused some fraction of the Müller glia to express PKC. However, we could not find double labeled cells for GS and PKC either in the RA-treated retina or the control retina (Fig. 8, which is published as supporting information on the PNAS web site).

**Math3 and NeuroD Promote Amacrine Cell Genesis.** Recent studies have demonstrated that the bHLH gene *Math3/NeuroD* and the homeobox gene *Pax6* regulate amacrine cell fate specification (20, 21). To define the role of intrinsic cues in the differentiation of Müller glia-derived cells, we misexpressed these genes in NMDA-treated retinas by using a retroviral expression system. We applied virus to retinal explants, which were isolated from adult Sprague–Dawley rat (postnatal 6–7 weeks) eyes at DAN2 (Fig. 5A). Retroviruses are infectious only to mitotic cells, so the cells that were infected on the second day after NMDA treatment and survived for 2 weeks should be derived from activated Müller glia. We used a replication-incompetent retrovirus, CLIG, which directs expression of GFP. *Pax6*, *Math3*, or *NeuroD* cDNA were inserted upstream of the internal ribosomal entry site (IRES) (Fig. 5B). After 14 days, we examined the fates of the infected cells by monitoring GFP-positive cells. When we applied the control virus CLIG,  $69 \pm 4\%$  (117 cells examined,  $n = 6$  animals) of the infected cells expressed GS, and only a small number of them expressed retinal neuronal markers (Fig. 5C). These data are similar to the results observed in the *in vivo* studies described above (Figs. 2E and 3).

When we applied CLIG-*NeuroD* and CLIG-*Math3*, we found the expression of HPC-1 in some GFP-labeled cells, suggesting that misexpression of *NeuroD* or *Math3* induced Müller glia-



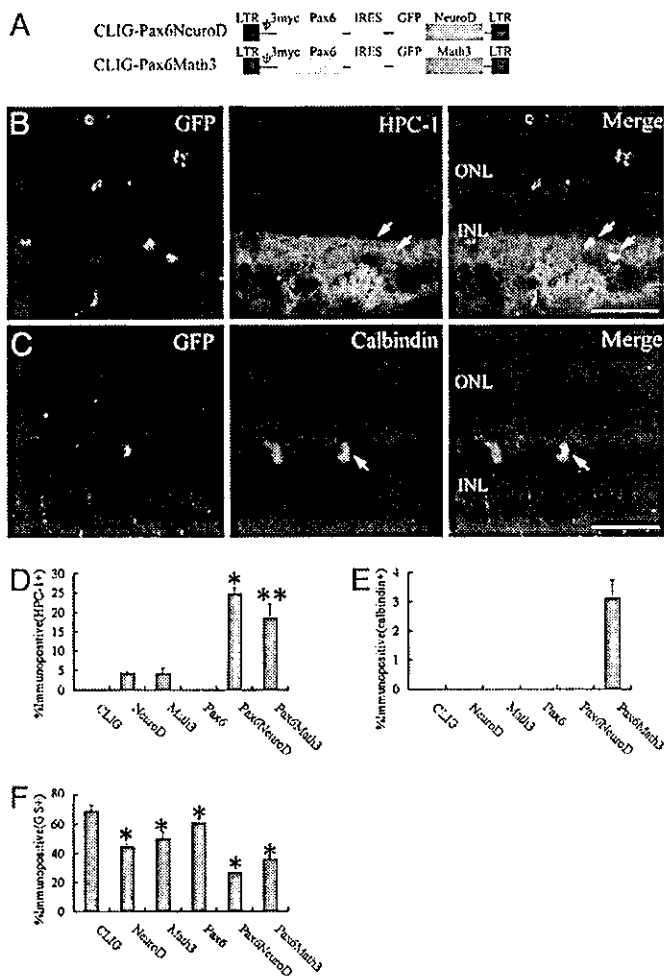
**Fig. 5.** *NeuroD* and *Math3* induce differentiation to amacrine cells. (A) Animal protocols. (B) Retroviral vectors. LTR, long terminal repeat. (C and D) Sections of retinal explants isolated from eyes and infected with CLIG (C) and CLIG-*NeuroD* (D) at DAN2. After 2 weeks of culture, the explants were subjected to immunohistochemistry with anti-GFP (green) and anti-HPC-1 (red) antibodies. GFP is expressed in the cytoplasm of the infected cell. Arrows, double labeling cells. (Scale bar, 100  $\mu$ m.) (E) Percentage of infected cells that were located in the GCL, INL, and ONL. All data are mean  $\pm$  SD obtained from at least three animals.

derived cells to differentiate to amacrine cells (Figs. 5D and 6D). When we applied CLIG-*Pax6*, we did not find HPC-1/GFP labeled cells. However, misexpression of *Pax6* promoted generation of INL cells (Fig. 5E). It is likely that *Pax6* alone prevents migration to the ONL and induces the generation of the INL cells, whereas most of these cells did not become mature interneurons.

Because the combination of homeobox and bHLH genes has been shown to be important for retinal cell type specification (21, 22), *Pax6* was coexpressed with *Math3* or *NeuroD* in the NMDA-treated retinal explant cultures. For coexpression of the two factors, the bHLH factors were fused with GFP and each was coexpressed with *Pax6* (Fig. 6A). More than 99% of the cells infected with these retroviruses coexpressed both bHLH and homeobox genes (data not shown). The majority of the infected cells were TUNEL-negative after 1 week of culture (data not shown). Coexpression of *NeuroD* and *Pax6* predominantly promoted the differentiation to amacrine cells (HPC-1+; Fig. 6B and D). A total of  $25 \pm 2\%$  of the infected cells expressed HPC-1 (331 cells examined,  $n = 4$  animals). Coexpression of *Math3* and *Pax6* promoted not only amacrine cell genesis ( $19 \pm 4\%$ , 329 cells examined,  $n = 4$  animals; Fig. 6D) but also the horizontal cell genesis ( $3 \pm 0.6\%$ , 192 cells examined,  $n = 4$  animals; Fig. 6C and E). In addition, these genes significantly decreased the population of Müller glia (Fig. 6F), suggesting that *Math3/NeuroD* and *Pax6* regulate the neuronal versus glial fate choice.

**Coexpression of Crx and NeuroD Promotes Rhodopsin Expression.** It has been shown that the homeobox gene *Crx* and the bHLH gene *NeuroD* code for photoreceptor specification (20, 23–25). We misexpressed each gene in the NMDA-treated retina. *Crx* cDNA was inserted upstream of the IRES in the CLIG retroviral vector (Fig. 7A). We applied CLIG-*Crx* and CLIG-*NeuroD* to NMDA-

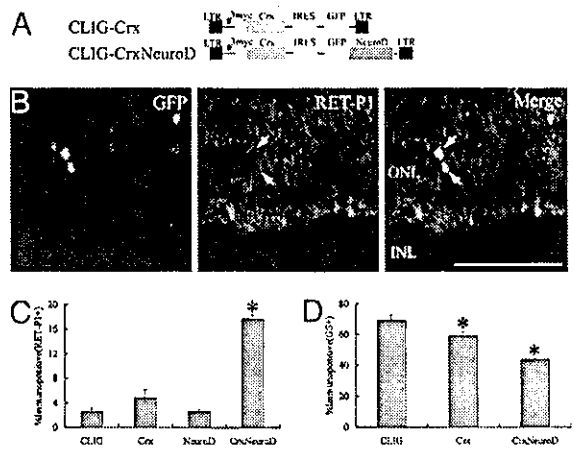




**Fig. 6.** *NeuroD/Math3* together with *Pax6* promote differentiation to amacrine cells. (A) Structures of the recombinant retrovirus. The bHLH genes were fused with GFP, and *Pax6* has three repeats of Myc tag. (B and C) Sections of retinal explants isolated (DAN2) and infected with CLIG-*Pax6-NeuroD* (B) and CLIG-*Pax6-Math3* (C) (DAN2). After 2 weeks of culture, the explants were subjected to immunohistochemistry with anti-GFP (green), anti-HPC-1 (B; red), and anti-calbindin (C; red) antibodies. GFP gene is fused with each bHLH gene, so GFP is expressed in the nucleus of the infected cell. Arrows, double labeling cells. (Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ .) (D–F) Percentage of cell types induced by misexpression of bHLH genes and *Pax6*. (D) HPC-1+ cells; \*,  $P < 0.001$  compared to *NeuroD*; \*\*,  $P < 0.01$  compared to *Math3*. (E) Calbindin+ cells. (F) GS+ cells; \*,  $P < 0.05$  compared to CLIG. All data are mean  $\pm$  SD obtained from at least three animals.

treated retinal explants. When we applied CLIG,  $3 \pm 0.5\%$  (182 cells examined,  $n = 6$  animals) of the infected cells expressed RET-P1 (rhodopsin; rod photoreceptors; Fig. 6C), which is identical with the results of the *in vivo* studies described above (Fig. 3 C and D). When we applied CLIG-*Crx* or CLIG-*NeuroD*, we found a decreased population of GS-positive Müller glial cells (Fig. 7D). However, *Crx* or *NeuroD* alone did not promote rhodopsin expression significantly (Fig. 7C).

We next examined the effects of combined expression of *Crx* and *NeuroD* on Müller glia differentiation. For coexpression of the two genes, *NeuroD* was fused with GFP and coexpressed with *Crx* (Fig. 7A). Coexpression of *Crx* and *NeuroD* significantly increased the expression of rhodopsin (Fig. 6 B and C). A total of  $18 \pm 0.6\%$  of the infected cells expressed rhodopsin ( $P < 0.001$ , 174 cells examined,  $n = 4$  animals). The majority of the infected cells were TUNEL-negative after 1 week of culture



**Fig. 7.** Coexpression of *Crx* and *NeuroD* promotes rhodopsin expression. (A) Retroviral vectors. (B) Sections of retinal explants isolated (DAN2) and infected with CLIG-*Crx-NeuroD* (DAN2). After 2 weeks of culture, the explants were subjected to immunohistochemistry with anti-GFP (green) and anti-RET-P1 (red) antibodies. GFP gene is fused with *NeuroD* gene, so GFP is expressed in the nucleus of the infected cell. Arrows, double labeling cells. (Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ .) (C and D) Percentage of cell types induced by expression of *Crx*, *NeuroD*, and *Crx-NeuroD*. (C) RET-P1+ cells. (D) GS+ cells. All data are mean  $\pm$  SD obtained from at least three animals. \*,  $P < 0.01$  and  $< 0.05$  compared to CLIG in C and D, respectively.

(data not shown). Thus, the increased rhodopsin expression induced by *Crx* and *NeuroD* was not the result of apoptosis of other cell types. These data suggest that the combination of *Crx* and *NeuroD* is important for the expression of photoreceptor-specific phenotype from Müller glia-derived cells.

## Discussion

We demonstrated that Müller glia of adult mammalian retina proliferated in response to acute damage with NMDA, and some of the proliferated cells expressed bipolar-specific or rod photoreceptor-specific markers. RA treatment increased bipolar cell genesis. Misexpression of homeobox and bHLH genes promoted the regeneration of various retinal neural cells.

There have been some reports that indicate the participation of glial cells in neural regeneration. Radial glial cells of rat embryo are considered as neuronal progenitors, and after neurogenesis, they shift toward the exclusive generation of astrocytes (26). They also act as migrational guides for their neuronal progeny (27). The subventricular zone astrocytes of the adult mammalian brain act as neural stem cells in both the normal and regenerating brain (28).

With regard to the retina, it has been proposed that Müller glial cells might behave as stem cells after retinal injury in chicken and fish (13–15). In this study, we found Müller glia of adult mammalian retina also have a potential to dedifferentiate and produce retinal neurons. Müller glia recognize a variety of neuronal signals and actively control levels of  $\text{K}^+$ ,  $\text{H}^+$ , and neurotransmitters in the extracellular space. Beyond that, in response to retinal damage, Müller glia could play a role as retinal progenitors and regenerate some retinal neurons. In this study, the number of nestin-positive Müller glial cells were higher than that of BrdUrd-positive ones. It is likely that many Müller glial cells became active glia, but only a part of them underwent proliferation. It also should be thought that we could not detect all proliferative cells by a single BrdUrd injection.

It has been shown that interactions between the progenitor cells and their microenvironment play an essential role in the determination of cell phenotype (29–34). RA can influence the development of rod photoreceptor cells in retinal cell cultures (35). Several studies have shown that RA may have a role in the

**Retinal Explant Culture.** The retinal explant culture was conducted as described (17). Briefly, the retina without pigmented epithelium was placed on a Millicell chamber filter (Millipore, 0.4- $\mu$ m culture plate insert and 30-mm diameter) with the ganglion cell layer (GCL) upwards. The Millicell-CM chamber was moved to a six-well culture plate. Each well contained 1 ml of culture medium [50% minimum essential medium with Hepes (Invitrogen)/25% Hanks' solution (Invitrogen)/25% heat-inactivated horse serum/200  $\mu$ M L-glutamine/5.75 mg/ml glucose]. Explants were cultured at 34°C in 5% CO<sub>2</sub>, and the media were changed every other day.

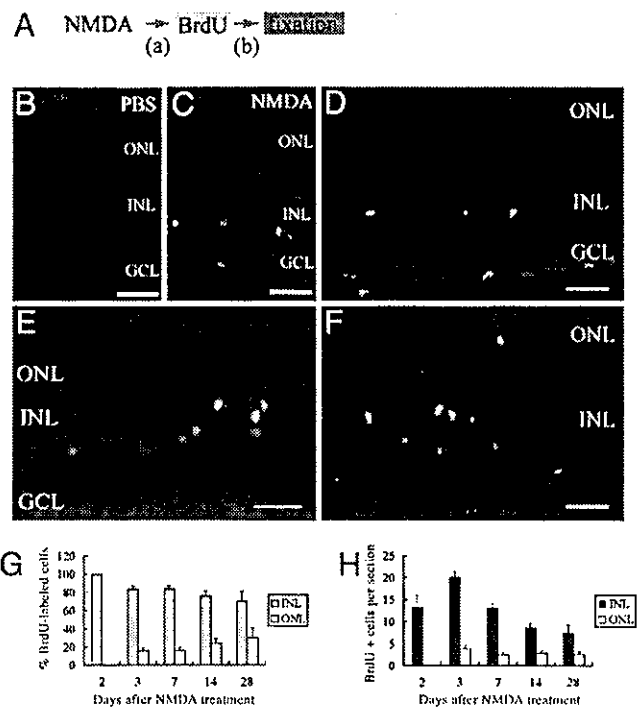
**Preparation and Infection of Recombinant Retrovirus.** The method for construction of recombinant retrovirus CLIG, CLIG-*Pax6*, CLIG-*Crx*, CLIG-*Math3*, CLIG-*NeuroD*, CLIG-*Pax6-Math3*, CLIG-*Pax6-NeuroD*, and CLIG-*Crx-NeuroD* genes was described (17). For construction of CLIG-*Math3*, CLIG-*NeuroD*, CLIG-*Pax6*, and CLIG-*Crx*, cDNAs were cloned into the *Eco*RI site of pCLIG, which directs expression of the cloned genes together with enhanced GFP from the upstream LTR promoter. For construction of CLIG-*Pax6-Math3*, CLIG-*Pax6-NeuroD*, and CLIG-*Crx-NeuroD*, the basic helix-loop-helix (bHLH) genes were cloned into the *Bsr*GI and *Cla*I sites of pCLIG-*Pax6* and pCLIG-*Crx*, which are located in the 3' region of GFP gene, so that GFP gene is fused in frame with each bHLH gene. The retroviral DNAs were transfected with LopofectAMINE (GIBCO/BRL) into the ectopic packaging cells. Two days later, the media were collected and concentrated with Centricon Plus-20 (Amicon). The explants were infected with 40  $\mu$ l of the virus containing 20 mg/ml polybrene for 3 h at 34°C. After viral infection, the media were replaced.

## Results

**Müller Glia Could Be Endogenous Progenitors.** To induce neurotoxic injury, we injected 200 nmol NMDA into the vitreous chamber of adult Sprague-Dawley rat (postnatal 6–7 weeks) eyes. In the adult rat, this dose of NMDA is known to cause loss of the cells in the GCL and a reduction in the thickness of the inner plexiform layer (IPL) without affecting other retinal layers (18). To observe dividing cells, we injected BrdUrd into the vitreous chamber (30 nmol) and i.p. space (150 mg/kg body weight) 5 h before death at 1, 1.5, 2, 2.5, 3, and 4 days after NMDA treatment (DAN) (Fig. 1A). As a control, we injected PBS into the vitreous chamber instead of NMDA, and found no BrdUrd-labeled cells (Fig. 1B).

When we injected BrdUrd at DAN1, -1.5, -3, and -4, there was no difference between NMDA- and control-treated rats (data not shown). However, when we injected BrdUrd at DAN2, increased numbers of BrdUrd-positive cells were detected in the central retina (Fig. 1C). Most of the BrdUrd-positive cells were found in the inner nuclear layer (INL). Some of the cells in the GCL were labeled with BrdUrd, but TUNEL assay indicated that these cells were labeled in the process of apoptosis (Fig. 1D). BrdUrd-labeled cells in the INL were negative for TUNEL. Moreover, cells immunoreactive for Ki-67, a nuclear antigen expressed by proliferating cells, were also found in the INL, but not in the GCL (Fig. 1E). These data suggest that at DAN2 some cells in the INL entered the mitotic cell cycle.

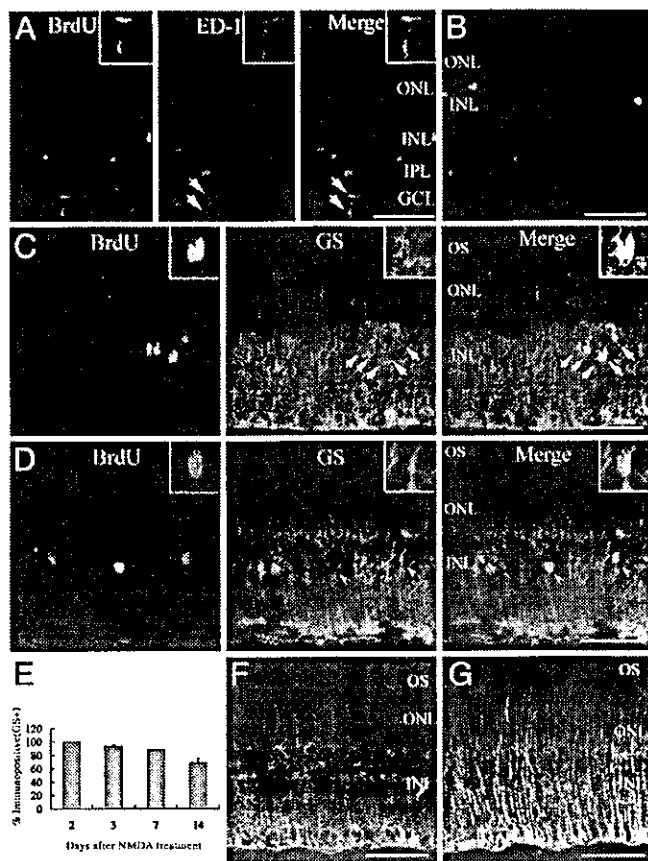
When we injected BrdUrd at DAN2.5, we found some BrdUrd-labeled cells in the INL, but the numbers of cells were smaller than that seen at DAN2. In all following experiments, we injected BrdUrd at DAN2, and followed the fate of BrdUrd-positive cells by killing the rats at different intervals (3–28 days) after NMDA treatment. At DAN3, some BrdUrd-labeled cells were detected in the outer nuclear layer (ONL) (Fig. 1F). The percentage of BrdUrd-labeled cells in the ONL increased by degrees (Fig. 1G), suggesting that proliferating cells in the INL migrated to the ONL. At DAN2, none of the BrdUrd-labeled



**Fig. 1.** Some cells undergo proliferative response to NMDA-induced neurotoxic damage. (A) Animal protocols. (B) Section of retina treated with PBS and BrdUrd. (C–E) Sections of retina treated with NMDA and BrdUrd (2 days after NMDA treatment; DAN2) and fixed (DAN2) (i.e., a = 2 days and b = 5 h in A). (C) BrdUrd-labeling (green) was detected in the INL and GCL. (D) BrdUrd-labeled cells (green) in the GCL were positive for TUNEL (red) whereas those in the INL were negative. (E) Ki-67-labeled cells (green) were detected in the INL, but not in the GCL. (F) Sections of retina treated with NMDA and BrdUrd (DAN2) and fixed (DAN3) (i.e., a = 2 days and b = 1 day in A). Some BrdUrd-labeled cells (green) were detected in the ONL. (G) Percentage of BrdUrd-labeled cells in the INL and ONL at different times after NMDA treatment. (H) Numbers of BrdUrd-labeled cells in the INL and ONL per section at different times after NMDA treatment. All data are mean  $\pm$  SD obtained from at least four animals. (Scale bar, 50  $\mu$ m.)

cells were detected in the ONL (524 cells, 40 sections examined,  $n = 15$  animals), but at DAN14, 24  $\pm$  5% (324 cells, 29 sections examined,  $n = 5$  animals) of the BrdUrd-labeled cells were in the ONL. The total number of BrdUrd-labeled cells increased at DAN3, and from that day decreased gradually (Fig. 1H), which might be due to the cell death. It is likely that most BrdUrd-labeled cells in the INL divided only once. BrdUrd-labeled cells remained for at least 9 months after NMDA treatment (data not shown).

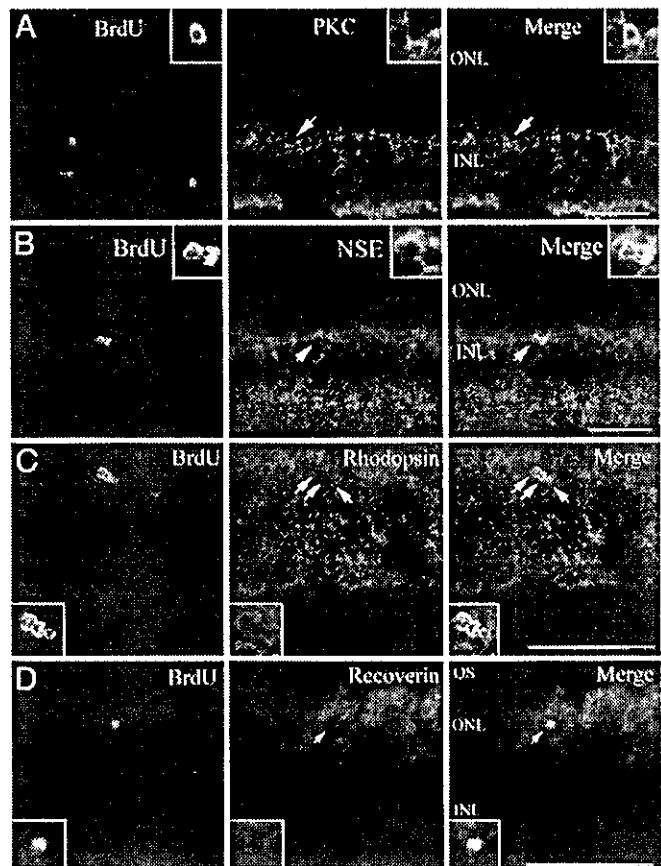
To identify the cell type that was labeled with BrdUrd, we next performed immunohistochemistry double staining for BrdUrd and cell-specific markers. At DAN2, some BrdUrd-labeled cells in the GCL and IPL expressed ED-1 (marker for activated phagocytes; Fig. 2A), consistent with previous reports that microglia are activated after neurotoxic damage (19). However, none of the BrdUrd-labeled cells in the INL expressed ED-1. At DAN14, the number of ED-1-labeled activated microglia significantly decreased, and few BrdUrd-labeled cells expressed ED-1 (Fig. 2B). Thus, microglia were activated in the early period after neurotoxic injury, but most of them did not exist longer than 2 weeks. We next used anti-GS (Müller glial marker). At DAN2, all of the BrdUrd-labeled cells in the INL expressed GS (Fig. 2C, 126 cells examined,  $n = 6$  animals). Thus, Müller glia reentered the cell cycle at DAN2 in the adult rat retina, which is identical to results obtained in the chick (15). Furthermore, we found that some BrdUrd-labeled cells did not express GS at DAN3 (Fig.



**Fig. 2.** Müller glia proliferate, become active, and convert to other cell types. (A) At DAN2, some BrdUrd-labeled cells (green) in the GCL and IPL expressed ED-1 (red). (B) At DAN14, most BrdUrd-labeled cells (green) did not express ED-1 (red). (C) At DAN2, all BrdUrd-labeled cells (green) in the INL expressed GS (red). Note that GS labeling is detected from GCL to ONL, but not in OS (outer segments of photoreceptors). (D) At DAN3, some BrdUrd-labeled cells (green) did not express GS (red). Arrowhead, BrdUrd-positive/GS-negative cell. (Inset) Magnified view. (E) Percentage of BrdUrd-labeled cells in the INL that expressed GS at different times after NMDA treatment. Data are mean  $\pm$  SD obtained from at least four animals. (F) Sections of retina treated with PBS and labeled with nestin (green) and GS (red). (G) Sections of retina obtained at DAN2 and labeled with nestin (green) and GS (red). (Insets in A and C) Magnified view of double labeling cells (arrows). (Scale bar, 100  $\mu$ m.)

2D). We followed the percentage of BrdUrd-labeled cells in the INL positive for GS (Fig. 2E). At DAN3,  $93 \pm 2\%$  (137 cells examined,  $n = 6$  animals) of BrdUrd-positive cells expressed GS, whereas only  $69 \pm 7\%$  (125 cells examined,  $n = 4$  animals) of BrdUrd-positive cells were GS positive at DAN14, suggesting that the proliferating Müller glial cells converted to some other cell type. We next used the anti-nestin (marker for progenitors) antibody for immunofluorescent analysis. In control retinas (treated with PBS), only a small number of cells expressed nestin (Fig. 2F), but numerous nestin-positive cells were detected in the retinal sections after NMDA treatment (Fig. 2G). Many nestin-labeled cells coexpressed GS, suggesting that Müller glial cells became active.

To further identify the fate of BrdUrd-labeled cells that did not express GS, we examined whether BrdUrd-positive cells expressed neuronal markers. We used anti-protein kinase C (PKC; marker for bipolar cells), anti-NSE (in the INL, specifically expressed by bipolar cells), anti-rhodopsin (marker for rod photoreceptors), and anti-recoverin (marker for rod photoreceptors, cone photoreceptors, and cone bipolar cells). At DAN14 or -28, we found the expression of PKC, NSE, rhodopsin,



**Fig. 3.** Some BrdUrd-labeled cells express neuronal markers. Shown are sections of retina obtained at DAN14. Double labeling with BrdUrd (green) and PKC (red in A), NSE (red in B), rhodopsin (red in C), and recoverin (red in D). (Inset) Magnified view of double labeling cells (arrows). (Scale bar, 100  $\mu$ m.)

and recoverin in some BrdUrd-labeled cells (Fig. 3), suggesting that Müller glia-derived cells differentiated to bipolar cells and rod photoreceptors. Interestingly, the nuclei of the rhodopsin and recoverin-labeled cells were round and small, which is characteristic of rod photoreceptors. We also labeled with anti-calbindin (marker for horizontal cells), anti-HPC-1 (marker for amacrine cells), and Thy1.2 (marker for ganglion cells), but did not find BrdUrd labeling in these cell types (data not shown). Assuming that factors required to generate all cell types are absent in the adult retina, we next examined whether intrinsic cues and extrinsic signals control the differentiation of Müller glia-derived cells.

**RA Promotes Bipolar Cell Genesis.** To induce the differentiation of neural cells more effectively, we tested whether exogenous growth factors stimulate neural regeneration. We injected BrdUrd along with growth factors into the vitreous chamber of adult Sprague-Dawley rat (postnatal 6–7 weeks) eyes at DAN2. From that day, we performed three injections of growth factors every other day, and killed rats at DAN14 (Fig. 4A). We selected fibroblast growth factor 2 (FGF-2), epidermal growth factor (EGF), RA, Activin-A, and bovine insulin for analysis. We also tested the combinations of FGF-2/EGF and FGF-2/bovine insulin. We could not find any increase of BrdUrd-labeled cells either in the central or peripheral region of the retina after treatment with each growth factor (data not shown). There was no significant difference in the percentage of BrdUrd-labeled

control of phenotypic choice in the developing retina *in vivo* (36, 37). In this study, RA predominantly promoted the differentiation of bipolar cells from stimulated Müller glia *in vivo*. We could not find an increase in rod photoreceptor differentiation. This discrepancy could be due to different experimental conditions: *in vitro* embryonic retinal cell cultures (35) and *in vivo* adult retina after acute injury (this study).

Recent studies have demonstrated that the differentiation of retinal neurons is controlled by intrinsic cues, such as bHLH and homeobox-type transcription factors (20–25, 38, 39). This study indicated that *Math3* and *NeuroD* induce amacrine cell genesis from Müller glia, the combination of *Math3* or *NeuroD* with *Pax6* promoted amacrine genesis, and the combination of *Math3* and *Pax6* induced horizontal cells. In addition, the combination of *Crx* and *NeuroD* promoted the expression of photoreceptor-specific phenotype. These data suggest that the bHLH genes and homeobox genes control the differentiation of Müller glia-derived progenitors. Homeobox and bHLH genes might give the different information on cells. Misexpression of *Pax6* promoted generation of INL cells, but most of them were immature interneurons or Müller glia. Thus, *Pax6* is not sufficient to generate mature amacrine or horizontal cells. *Pax6* may provide the INL-specific identity to Müller glia-derived progenitors. Although *Math3* and *NeuroD* alone can induce amacrine cell genesis, their effect is still small. However, they can more effectively specify the neuronal subtypes when the homeobox

gene *Pax6* is coexpressed. *NeuroD* and *Math3* may give the neuronal lineage information, whereas *Pax6* gives the position-specific identity.

In conclusion, the adult mammalian retina has the potential for regeneration. Müller glia could proliferate after neurotoxic damage, and produce new neurons in the adult mammalian retina. Intrinsic and extrinsic cues promoted and partially controlled the differentiation of these cells into retinal neurons. Our results may provide an alternative strategy for cell replacement therapies that make use of the regenerative capacity of endogenous progenitors. Müller glia may become a target for drug delivery and gene therapies for retinal degenerative diseases. However, we did not confirm whether the produced neurons integrated into the retinal neuronal circuit. Further investigations to efficiently activate Müller glia to produce more neurons and make them integrate in the retinal circuit would expand the possibility of retinal regeneration therapies.

We thank Masato Nakafuku for technical advice, Peter Gruss (Max Planck Institute of Biophysical Chemistry, Göttingen, Germany) for *Pax6* cDNA, and J. F. McGinnis (University of Oklahoma Health Sciences Center, Norman) and R. J. Elias (University of Manitoba, Winnipeg, Canada) for anti-recoverin antibody. This study was performed through the Advanced and Innovative Research program in Life Sciences from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology (MEXT), Japan.

- Lund, R. D., Kwan, A. S., Keegan, D. J., Sauve, Y., Coffey, P. J. & Lawrence, J. M. (2001) *Prog. Retin. Eye Res.* **20**, 415–449.
- Takahashi, M., Palmer, T. D., Takahashi, J. & Gage, F. H. (1998) *Mol. Cell. Neurosci.* **12**, 340–348.
- Young, M. J., Ray, J., Whiteley, S. J., Klassen, H. & Gage, F. H. (2000) *Mol. Cell. Neurosci.* **16**, 197–205.
- Nishida, A., Takahashi, M., Tanihara, H., Nakano, I., Takahashi, J. B., Mizoguchi, A., Ide, C. & Honda, Y. (2000) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41**, 4268–4274.
- Akita, J., Takahashi, M., Hojo, M., Nishida, A., Haruta, M. & Honda, Y. (2002) *Brain Res.* **954**, 286–293.
- Temple, S. (2001) *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 513–520.
- Gould, E. & Gross, C. G. (2002) *J. Neurosci.* **22**, 619–623.
- Johansson, C. B., Momma, S., Clarke, D. L., Rislung, M., Lendahl, U. & Frisen, J. (1999) *Cell* **96**, 25–34.
- Magavi, S. S., Leavitt, B. R. & Macklis, J. D. (2000) *Nature* **405**, 951–955.
- Nakatomi, H., Kuriu, T., Okabe, S., Yamamoto, S., Hatano, O., Kawahara, N., Tamura, A., Kirino, T. & Nakafuku, M. (2002) *Cell* **110**, 429–441.
- Tropepe, V., Coles, B. L., Chiasson, B. J., Horsford, D. J., Elia, A. J., McInnes, R. R. & van der Kooy, D. (2000) *Science* **287**, 2032–2036.
- Ahmad, I., Tang, L. & Pham, H. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**, 517–521.
- Braisted, J. E., Essman, T. F. & Raymond, P. A. (1994) *Development (Cambridge, U.K.)* **120**, 2409–2419.
- Raymond, P. A. & Hitchcock, P. F. (1997) *Adv. Neurol.* **72**, 171–184.
- Fischer, A. J. & Reh, T. A. (2001) *Nat. Neurosci.* **4**, 247–252.
- Ooto, S., Haruta, M., Honda, Y., Kawasaki, H., Sasai, Y. & Takahashi, M. (2003) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 2689–2693.
- Hatakeyama, J. & Kageyama, R. (2002) *Methods* **28**, 387–395.
- Siliprandi, R., Canella, R., Carmignoto, G., Schiavo, N., Zanellato, A., Zanoni, R. & Vantini, G. (1992) *Vis. Neurosci.* **8**, 567–573.
- Fischer, A. J., Seltner, R. L., Poon, J. & Stell, W. K. (1998) *J. Comp. Neurol.* **393**, 1–15.
- Morrow, E. M., Furukawa, T., Lee, J. E. & Cepko, C. L. (1999) *Development (Cambridge, U.K.)* **126**, 23–36.
- Inoue, T., Hojo, M., Bessho, Y., Tano, Y., Lee, J. E. & Kageyama, R. (2002) *Development (Cambridge, U.K.)* **129**, 831–842.
- Hatakeyama, J., Tomita, K., Inoue, T. & Kageyama, R. (2001) *Development (Cambridge, U.K.)* **128**, 1313–1322.
- Furukawa, T., Morrow, E. M. & Cepko, C. L. (1997) *Cell* **91**, 531–541.
- Furukawa, T., Morrow, E. M., Li, T., Davis, F. C. & Cepko, C. L. (1999) *Nat. Genet.* **23**, 466–470.
- Haruta, M., Kosaka, M., Kanegae, Y., Saito, I., Inoue, T., Kageyama, R., Nishida, A., Honda, Y. & Takahashi, M. (2001) *Nat. Neurosci.* **4**, 1163–1164.
- Malatesta, P., Hartfuss, E. & Gotz, M. (2000) *Development (Cambridge, U.K.)* **127**, 5253–5263.
- Noctor, S. C., Flint, A. C., Weissman, T. A., Dammerman, R. S. & Kriegstein, A. R. (2001) *Nature* **409**, 714–720.
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M. & Alvarez-Buylla, A. (1999) *Cell* **97**, 703–716.
- Reh, T. A. & Levine, E. M. (1998) *J. Neurobiol.* **36**, 206–220.
- Anchan, R. M. & Reh, T. A. (1995) *J. Neurobiol.* **28**, 133–145.
- Fuhrmann, S., Kirsch, M. & Hofmann, H. D. (1995) *Development (Cambridge, U.K.)* **121**, 2695–2706.
- Altshuler, D., Lo Turco, J. J., Rush, J. & Cepko, C. (1993) *Development (Cambridge, U.K.)* **119**, 1317–1328.
- Jensen, A. M. & Wallace, V. A. (1997) *Development (Cambridge, U.K.)* **124**, 363–371.
- Davis, A. A., Matzuk, M. M. & Reh, T. A. (2000) *Mol. Cell. Neurosci.* **15**, 11–21.
- Kelley, M. W., Turner, J. K. & Reh, T. A. (1994) *Development (Cambridge, U.K.)* **120**, 2091–2102.
- Ruberte, E., Dolle, P., Chambon, P. & Morriss-Kay, G. (1991) *Development (Cambridge, U.K.)* **111**, 45–60.
- Hyatt, G. A., Schmitt, E. A., Marsh-Armstrong, N. R. & Dowling, J. E. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 8293–8297.
- Kageyama, R. & Nakanishi, S. (1997) *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**, 659–665.
- Cepko, C. L. (1999) *Curr. Opin. Neurobiol.* **9**, 37–46.