

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 ー感覚器ー 002)

平成 17 年度 総括・分担報告書

平成 18 年 (2006 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. ムコ多糖症の遺伝子治療法の開発に関する研究

奥山 虎之 国立成育医療センター 遺伝診療科 8

2. オプチニューリン変異トランスジェニックマウス

岩田 岳 国立病院東京医療センター 臨床研究センター 10

3. 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 13

4. 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 17

5. 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

6. 眼の形態形成遺伝子を用いた網膜再生の研究

東 範行 国立成育医療センター 眼科 21

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 23

IV. 研究成果の刊行物、別刷 27

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。ニューロスフェア法にて作成した神経幹細胞を、生後早期の MPSVII マウスの脳室内に同系移植し、組織学的、機能的治療効果を評価し、将来のムコ多糖症中枢神経系合併症や眼疾患に対する細胞治療の可能性を検討した。海馬、大脳皮質、上皮細胞において、細胞質内の著名な空胞（ライソゾームの腫大）の減少を観察し、ムコ多糖症の中枢神経病変に対する治療法の開発に繋がり、同疾患に合併する眼疾患の治療にも示唆を与えたと考えられた。開放隅角緑内障原因遺伝子オプチニューリン（OPTN）の変異で、重篤な正常眼圧緑内障を引き起こす E50K 変異 OPTN とエクソン5欠損 OPTN を発現するトランスジェニックマウスを作製し、その病理学的解析を行った。眼の形成における中心的な役割を果たす PAX6 の様々な眼形成不全症を生じる変異型と野生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た。PAX6 のあるタイプのミスセンス変異は視神経形成不全を呈し、PAX2 のハプロ不全が呈するコロボーマに類似し、PAX6 と PAX2 との相互転写制御を検証した。また、別の疾患遺伝子 DRPLA（歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症）の研究で、塩基・アミノ酸配列の微細な差異が選択的スプライスによって形成される場合があることを見出したが、この現象（subtle alternative splicing）はヒトゲノムに普遍的に見られることを明らかにし、眼形成に係わる遺伝子における subtle alternative splicing による微細な差異を持つアイソフォームについても精査している。障害された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。さらに、網膜視細胞の分化を細胞外微少環境と関連づけて解析し、組織内再生や細胞移植による治療法の研究に利用する。再生医療の材料として期待されている胚性幹(ES)細胞を効率良く眼組織へと分化誘導する実験系を開発する目的で、本年度は、Pax6 を用いたマウス ES 細胞から神経細胞への分化誘導系の開発を行った。Pax6 アイソフォーム 5a 型(Pax6-5a)を発現する ES 細胞株が強い神経細胞分化誘導能を示すことを見出し、本神経細胞分化誘導系に関わる遺伝子をマイクロアレイ法により同定した。これらの結果は、再生医療に求められる幹細胞の試験管内培養法や眼組織への分化誘導系を確立する上で重要な知見を提供すると考えられる。鶏胚の網膜色素上皮細胞に眼の形態形成遺伝子 Pax6 を導入し、ほぼ完全な層構造をもつ神経網膜を作ることに成功した。孵化直前のほぼ成熟した色素上皮細胞からも再生が可能であり、成熟組織にも幹細胞が存在することが示唆された。マウス胚でも同様に色素上皮細胞から神経網膜を再生することができたが、その層構造は不完全であった。これらの再生網膜は、変性した網膜の下に移植して視覚を復元する治療に応用することが期待される。

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
岩田 岳	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター 研究室長
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
岡野 栄之	慶應義塾大学医学部生理学教室 教授
仁科 博史	東京医科歯科大学難病治療研究所 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え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かが行われていない。しかし、眼の疾患の多くがさまざまな組織内で別個に起こる以上、個々の組織に応じた治療が必要である。我々は、これまでに組織に固有な遺伝子のプロモータを用いて、組織特異的に発現させる遺伝子導入法を開発した。これを用いれば、角膜（疾患は混濁）、隅角（緑内障）、水晶体（白内障）あるいは網膜（ジストロフィ、腫瘍）で組織特異的かつ限局した遺伝子治療を行うことができる。また我々は、動物実験ではあるが、代謝性角膜混濁に酵素補充、遺伝子導入あるいは産生細胞移植を行って、角膜を透明化させることに成功した。さらに、幹細胞と形態形成遺伝子を用いて、水晶体や網膜の細胞あるいは組織を再生させる研究を行ってきた。近年、さまざまな臓器で再生医学の研究が行われているが、再生細胞の移植も補充療法

として行われるべきである。これら欠損した遺伝子、蛋白、細胞の補充や投与は、まず酵素欠損症やジストロフィ、緑内障などに対する効果が期待される。さらに、薬物代謝酵素が発現されるような遺伝子・細胞を用いれば、その部位に限って投与された薬物の効果を上げることができる。これらは内科的治療の側面であるが、さらに外科的操作へも応用が可能である。例えば限局してアポトーシス遺伝子を導入すれば、腫瘍を治療したり、顕微鏡手術器具が届かない微細な組織に切開を行うこともできる。これらは、**molecular surgery**（分子手術）、**cellular surgery**（細胞手術）とも呼ぶべきものである。

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

B. 研究方法

1) ムコ多糖症の遺伝子治療法に関する研究

(1) 神経幹細胞の作成

神経幹細胞はニューロスフェア法で作成した。受精後 14.5 日目の胎仔 GFP マウス線条体を EGF、FGF 加無血清培地で培養し、第 2-5 継代までのものを使用した。

(2) GUSB の定量、GUSB 染色

GUSB は、4 μ 法で測定した。GUSB 染色はナフトール AS-BI β -D-グルクロナイドを器質とした。

(3) 組織学的検討

脳切片はトルイジンブルー染色を行い、海馬、皮質、上衣細胞中の空胞の程度を評価した。皮質は、電子顕微鏡においても評価を行った。

2) オプチニューリン変異トランスジェニックマウス

(1) 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、total RNA サンプルを作成した。Oligo(dT)を用いて 1st strand 伸長反応を Super Script First-strand Synthesis System for RT-PCR を用いて行い cDNA を調製した。これを 1 μ l をテンプレートとして、PCR 反応をおこないマウス OPTN 遺伝子を増幅させた。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。

(2) OPTN 遺伝子変異体の作製

単離したマウス OPTN をテンプレートとし、Quick Change XL Site-Directed Mutagenesis kit を用いて PCR 反応を行い点変異を導入した。

(3) 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、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、尻尾から genomic DNA を抽出精製し、PCR 反応で 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。

(4) マウス眼底の観察

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。

(5) 網膜切片を用いた病理学的解析

網膜切片について TUNEL アッセイによる神経節細胞死の観察を行った。また、神経線維の萎縮を観察するために tublin β III 抗体を用いた免疫染色を行った。疾患マウスにおける OPTN の発現量を観察するために、抗 OPTN 抗体による免疫染色を行い、正常個体と比較した。

(6) マウスの眼圧測定

マウスの眼圧は特殊なトノペンとレーザーセンサーを用い、非接触法と接触法によって行った。

(7) 蛍光トレーサーを用いた逆走標識による生存神経節細胞数のカウント

神経節細胞数をフラットマウント法によって蛍光写真を撮影した。生存細胞数は網膜上の区画を決めソフトウェアによりカウントした。

(8) Rab8 タンパクの発現法の確立

pRSET(invitrogen)に導入した Rab8 を BL21(DE3)pLysS に形質転換させた。大腸菌を回収し、上清から可溶化 Rab8 を含むサンプルとした。

(9) Rab8 タンパクの精製法の確立

Rab8 タンパク質を含むサンプルを洗浄後、溶出した。Rab8 を含む画分を 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で検出した。

3) 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 (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培養細胞にトランスフェクトし、活性を測定し、転写調節能と DNA 結合能を解析した。

(2) 選択的プライスによって、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データベースなどから収集し、RT-PCR によって検証した。

4) 視細胞の分化調節機構に関する研究

マウス神経網膜を器官培養する方法を利用し、外的因子である CNTF が、その下流のいずれのシグナル伝達機構を介し、視細胞の分化マーカーで

あるロドプシンの発現を抑制するかを解析した。周産期マウスの器官培養した網膜の、免疫染色法や *in situ hybridization* 法を用いた定性的解析法、イムノブロット法や real-time RT-PCR 法を用いた定量的解析法を確立した。また、この器官培養法を活用し、器官培養下の正常神経網膜に、直接遺伝子を導入する方法としてエレクトロポレーションによる遺伝子導入法を確立した。

これらの方法を用いて、Notch-Numb シグナルの網膜細胞の分化調節に関する解析を行い、さらに、中枢神経系などで本シグナルに関連するとされる分子の、網膜での役割を解析した。

5) 幹細胞から眼組織への分化誘導能に関する研究

テトラサイクリンを用いた PAX6-5a 誘導可能なマウス ES 細胞を樹立して、神経細胞分化誘導能と神経細胞分化誘導に関与する遺伝子をマイクロアレイ法により検討した。細胞の取り扱いは、大学動物実験委員会の承認を得、そのプロトコルに従って遂行されている。

6) 眼の形態形成遺伝子を用いた網膜再生の研究

(1) 鶏胚網膜色素上皮への Pax6 遺伝子導入

2-20日鶏胚の網膜色素上皮に Pax6 遺伝子を電気穿孔法で導入した。Pax6 遺伝子の変異体 F258S、R26G、R128C および機能抑制体 En(s)-Pax6delC+ の導入も行った。導入後発生を進め、実体顕微鏡下と病理組織的に変化を検討した。

(2) マウス胚網膜色素上皮への Pax6 遺伝子導入

E12-15マウス胚の眼球を摘出し、網膜色素上皮近傍に Pax6 cDNA を電気穿孔法で導入した。導入後、器官培養を行って発生を進め、実体顕微鏡下と病理組織的に変化を検討した。

C. 研究結果および考察

1) ムコ多糖症の遺伝子治療法の開発に関する研究

(1) 神経幹細胞の GUSB 活性

神経幹細胞の GUSB 活性は高いことが明らかとなった。神経幹細胞は分化後、GUSB 活性値が 8 分の 1 程度に減少するが、それでも骨髄由来細胞の GUSB 活性と同程度であった。一方、培養上清でも同様の傾向が認められた。

(2) 脳内移植の効果

GFP マウスから作成した神経幹細胞を、生直後の MPSVII マウスの脳室内に移植し、移植後 24 時間時・3 週間時に、脳の GUSB 活性値を定量した。移植後 24 時間時には正常 C57Bl/6 マウス脳の 12.5~42.3%、3 週間時には 5.5~6.3%であった。これは文献上脳の病理所見を改善させるに足る酵素量であった。

(3) 組織学的検討

移植後2ヶ月時に、移植後、非移植マウスの各々の脳をトルイジンブルー染色し、海馬、脳実質、上衣細胞を、光学顕微鏡と電子顕微鏡(皮質のみ)で比較したところ、これら3領域で、著名な空胞(ライソゾームの腫大)の減少を観察した。さらに定量的に評価するため、各々の部位でライソゾーム腫大が著しい細胞の数を算出し、移植、非移植マウス間で比較したところ、未治療マウスでは、海馬と皮質の89.3%、42%の細胞に著しい空胞が観察されたのに対し、治療後マウスでは17.3%、15.3%にまで減少していた。

今回我々は、ニューロスフェア法で作成した神経幹細胞を生直後のMPSVIIマウスの脳室内に移植し、その効果を観察した。移植後2ヶ月時に、脳の病理所見は著明に改善し、幹細胞移植の有用性が示された。ムコ多糖症には、目にも同様の病理学的変化が認められる。今回の成果は、中枢神経系だけでなく、適切な細胞の移植により、眼病変の改善も期待できることを示唆している。

2) オプチニューリン変異トランスジェニックマウス

(1) OPTN 変異体遺伝子トランスジェニックマウスの作製

マウス OPTN 遺伝子点変異を導入した OPTN を受精卵にマイクロインジェクションし、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匹得た。現在、wild type のマウスと交配し F1 マウスを作製している。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は生存できなかつた。眼底観察で、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、OPTN 変異体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なった。神経節細胞の特異的な細胞死、神経線維の萎縮も観察された。逆走とレーザーによる生存神経節細胞数は疾患個体で約10-20%の細胞死が正常個体に比べて増加していることが明らかとなった。

眼圧測定の結果、疾患個体と正常個体の差はみられなかつた。

(2) 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、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。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°C 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。

OPTNE 50K 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、神経節細胞死、神経線維の萎縮などが観察され、変異体のもたらす影響を *in vivo* で確認することができた。今回の一連の研究から、我々は世界で初めての正常眼圧緑内障マウスの作製に成功したことになる。今後このマウスモデルを用いて正常眼圧緑内障の発症機序の解明と神経保護薬の開発に役立てていきたい。

3) 眼形成にかかわる疾患責任遺伝子産物の機能 (1) PAX6 による PAX2 転写調節:

約30種の培養細胞について、PAX2 および PAX6 の発現を RT-PCR で解析した。発現レベルはそれぞれの細胞株によって様々であった。これらの細胞に PAX6 発現ベクターを導入し、内在性 PAX2 の発現変化を RT-PCR で解析した。PAX2 発現が亢進した細胞株が多かったが、一部の細胞では逆に PAX2 発現量が低下した。認められる相互作用は、両者による単純な相互転写調節に加え、他因子も介在する複雑なものと想定された。

転写開始部位上流約1ないし2kbのDNA断片をCATあるいは luciferase 遺伝子に結合した PAX2 レポーターと PAX6 発現ベクターを MCF7 細胞に導入し、PAX6 による PAX2 発現調節部位に対する効果を解析した。一定範囲内の投与 PAX6 発現量に応じた PAX2 の活性上昇を認めた。ミスセンス変異(R26C, P68S, R128C, F258S, S363P, Q378R, M381V, T391A)を持つ PAX6 発現ベクターを導入した場合には、ほとんどは PAX2 の活性上昇を認めなく、逆にベクター対象より低下した場合も認めた。

PAX6 の3種類のDNA結合ドメインのそれぞれに対するコンセンサス配列(P6-con, P5a-con, HD-con)の支配下にCATあるいは luciferase レポーターを構築し、そのレポーターと PAX6 発現ベクターを MCF7 細胞に導入し解析した。野性型 PAX6 を導入するとレポーター活性の上昇が見られたが、これに対し、ミスセンス変異は特徴ある変化が認められた。ペアドドメインN側変異では P6-con 結合能が低下し、ペアドドメインC側変異では P5a-con 結合能が低下した。一方、PAX6 の中央部分以降の変異では P6-con および P5a-con に対する結合は余り変化せず、HD-con への結合能が低下していた。これらの変異はホメオドメインの構造を変化させ、結合能に影響していると考え

られる。PAX6のC末端側の領域のミスセンス変異では、トランスアクティベーション活性が低下していた。

ミスセンス変異によるコンセンサス配列への結合能は、3種どれも、PAX2レポーターアッセイの結果と完全に一致するものは存在しなかった。また、PAX2上流領域にコンセンサス配列に類似する配列はあるものの、特定配列が寄与していると同定できるものではなかった。

発生に働く転写因子は変異（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。

(2) 微細な差を生じる選択的スプライス *subtle alternative splicing* : リピート伸長が発症原因である神経変性疾患 DRPLA において、cDNA 配列に3塩基の有無という微細な差異があることを見出し、これが選択的スプライスによることを明らかにした。このように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たが注目されておらず、塩基配列決定あるいは人為的エラーとして処理されていることが多い。しかし公開データベースのソースを解析すると、1アミノ酸残基の有無の相違のような微細な差を生じる選択的スプライスは極めて多い。データベース収録例について RT-PCR によって 200 例以上を実験的に確認した。我々は *subtle alternative splicing* と命名したが、この現象が普遍的であるという事実は急速に広まってきている。

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ンプト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。

4) 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ところ、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うる Numb は同部位で同時期に、発現し

ていた。

(2) 生後0日マウス神経網膜を器官培養し、遺伝子導入を行い、導入された細胞での細胞の運命を解析した。活性型 Notch 遺伝子が導入されると、ミューラー（グリア）細胞と一部の介在ニューロンへの分化が増え、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。反対に、Numb 遺伝子をノックダウンすると視細胞への分化が抑制された。

(3) Notch-Numb シグナルが関与する、分裂直後の細胞にのみ、遺伝子の強制発現をすべく、網膜器官培養にレトロウイルスを感染させる系を確立した。その結果、Notch の活性化は視細胞への分化を阻害するが、それ以外の細胞にはグリア細胞に限らず分化しうることを、Numb の導入は視細胞への分化を許容することが明らかになった。

(4) 細胞分化の調節機構を探るため、視細胞マーカーであるロドプシンの上流転写因子、Crx の抗体を作成中である。この分子は視細胞の他の特異的機能的タンパクの上流にもあり重要だが、抗体作成が困難である。モノクローナル抗体作成の途中であり、有望なクローンを得るに至っている。

(5) これらとは別に、Notch 活性を阻害する薬剤の視細胞分化における役割も解析中である。視細胞に選択的に分化させられる可能性が高いが、網膜の層構造を乱す可能性があり、そのメカニズムを解析し、解消する方法を開発する必要がある。

胎生期の網膜 (*in vivo*) では STAT3 が活性化しており、ロドプシンの上流の転写因子 *crx* の発現抑制をすることで視細胞分化の時期を制御していることは既に報告した。同時に、視細胞分化のためには、活性化 STAT3 以外にも解除されるべき負の調節因子や、新たに発現すべき正の調節因子の存在する可能性が示唆されていた。

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、視細胞への分化のためには最終分裂後、直ちに不活性化される必要があることが明らかになった。

これに対し、Numb は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おり、実際に視細胞への分化を促進していた。そこで、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、また、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、などさらに解析する必要がある。またマーカー発現だけでなく、正常な視細胞を誘導し、層構造を形成させるために必要な情報を、さらに得る必要があると考える。

5) 幹細胞から眼組織への分化誘導能に関する研究

PAX6-5a が強い神経細胞分化誘導能を示すことを見出した。また、本誘導系において、転写制御因子の bHLHb2 や POU5F1 が必須の役割を果たしていることが示唆された。

ES 細胞から神経細胞を調製する試みが世界中で試みられているが、眼形成マスター遺伝子 PAX6-5a も有望な手段であることが示された。また、PAX6-5a の生理的な役割は未だ不明の点が多いが、本 PAX6-5a 発現誘導 ES 細胞株は標的遺伝子の同定などその機能の解明に有用であると考えられる。

6) 眼の形態形成遺伝子を用いた網膜再生の研究
鶏胚で Pax6 を導入した網膜色素上皮は神経網膜に変化していた。ほぼ完全な層構造の網膜になり、神経線維は視神経を通り中枢へ投射していた。この再生は孵化直前でも起こった。

En(s)-Pax6delC+導入では眼球および網膜はほとんど形成されず、3 種の変異体 F258S、R26G、R128C では不完全な層構造の網膜が形成され、今回得られた再生網膜は人工産物ではなく Pax6 遺伝子固有の機能によることが示された。変異体のうち、paired domain の変異体 R26G、R128C の方が、homeodomain の変異体 F258S より網膜の層構造形成が不完全であり、網膜再生には Pax6 の paired domain が関与していることが示唆された。

マウスでは、同様に色素上皮から神経網膜が再生されたが、層構造が不完全であった。

今回の研究によって、Pax6 遺伝子を用いれば、幼若網膜色素上皮細胞を幹細胞として神経網膜を作成できることが明らかになった。作られた神経網膜の神経線維は、視神経を通り中枢へ投射しており、網膜を再生させて視覚復元につながることを示された。Pax6 を導入すると、後期までほぼ完全な網膜を作れることが判明し、網膜に分化する能力をもつ幹細胞が成熟した色素上皮細胞内に存在することが明らかになった。

哺乳類では、完全な層構造をもつ網膜の再生にはいまだ成功していない。また、完全な層構造をもつ網膜を作成したとしても、これを傷害された網膜に移植で置き換えることは技術的に困難であり、シナプスが形成して脳の視中枢内に神経が投射するとは思えない。しかし、近年、網膜色素変性症モデルマウスに正常マウス胎児網膜を移植して視覚が改善し、ヒト網膜色素変性症患者の網膜下に胎児網膜を色素上皮ごと移植し視力が改善したと報告されている。未熟な胎児網膜を移植すれば、レシピエント内で分化しシナプスを形成すると思われる。胎児組織の使用に大きな制限があるので、今回の我々の研究で得られた再生

網膜がこのような治療に応用されることは期待できる。哺乳類でいまだ不完全な網膜組織が得られていないが、完全な層構造を必要とせず幼若な組織でもよい。

D. 結論

神経幹細胞の脳内移植による治療効果を、ムコ多糖症モデルマウスを用いて検証した。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。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、転写調節能を解析し、形態形成の分子機構を明らかにした。微細な差を生じるスプライスは普遍的で、病態におけるスプライスパターン変動解析の活用が考えられ、患者における変異による criptic スプライス部位の活性化機構、スプライスを使用する治療法開発につながると考える。視細胞(rod)の分化マーカーである *crx* およびロドプシンの発現には、活性化 STAT3 の発現低下が必要であることが明らかになった。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、調節していることが明らかになった。PAX6-5a がニワトリの網膜形成誘導を有するのみならず哺乳動物神経細胞への分化誘導能も有することを明らかにした。ES 細胞を用いた将来の網膜再生医療への重要なツールになると考えられる。眼形成遺伝子 Pax6 を色素上皮細胞に導入して神経網膜を作ること成功した。網膜を再生、移植して視覚を復元する治療に応用が期待できる。

E. 健康危険情報

該当する危険はなし

F. 研究発表

1. 論文発表

Fukuhara Y, Li XK, Kitazawa Y, Inagaki M, Matsuoka K, Kosuga M, Kosaki R, Shimazaki T, Endo H, Umezawa A, Okano H, Takahashi T, and Okuyama T. Histopathological and Behavioral Improvement of Murine Mucopolysaccharidosis Type VII by Intra-cerebral Transplantation of Neural Stem Cells. *Molecular Therapy*. (in press).

Umeda S, Ayyagari R, Allikmets R, Suzuki MT, Karoukis AJ, Ambasudhan 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

Umeda S, Suzuki MT, Okamoto H, Ono F, Mizota A,

Terao K, Yoshikawa Y, Tanaka Y, and Iwata T. Molecular composition of drusen and possible involvement of anti-retinal autoimmunity in two different forms of macular degeneration in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *FASEB J* 2005 19:1683-1685

Tadokoro K, Yamazaki-Inoue M, Tachibana M, Fujishiro M, Nagao K, Toyoda M, Ozaki M, Ono M, Miki N, Miyashita T, Yamada M. Frequent occurrence of protein isoforms with or without a single amino acid residue by subtle alternative splicing: the case of Gln in DRPLA affects subcellular localization of the products. *J Hum Genet*, 50:382-394, 2005.

Nagao K, Togawa N, Fujii K, Uchikawa H, Kohno Y, Yamada M, Miyashita T. Detecting tissue-specific alternative splicing and disease-associated aberrant splicing of the PTCH gene with exon junction microarrays. *Hum Mol Genet*, 14:3379-3388, 2005.

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

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(2004) 258-270

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

Masataka Asagiri, Kojiro Sato, Takako Usami, Sae Ochi, Hiroshi Nishina, Hiroki Yoshida, Ikuo Morita, Erwin F. Wagner, Tak W. Mak, Edgar Serfling, and Hiroshi Takayanagi (2005) Autoamplification of NFATc1 determines its essential role in bone homeostasis *J. Exp. Med.* 202, 1261-1269.

Saito K, Araki Y, Kontani K, Nishina H, Katada T. (2005) Novel role of the small GTPase Rheb: Its implication in endocytic pathway independent of the activation of mammalian target of rapamycin. *J. Biochem.* 137, 423-430.

Tsuyoshi Ishikawa, Shuji Terai, Yohei Urata, Yoshio Marumoto, Koji Aoyama, Isao Sakaida, Tomoaki Murata, Hiroshi Nishina, Koh Shinoda, Shunji Uchimura, Yoshihiko Hamamoto, and Kiwamu Okita (2005) Fibroblast growth factor 2 facilitates the differentiation of transplanted bone marrow cells into hepatocytes. *Cell Tissue Res.* 14, 1-11.

Shuji Terai, Isao Sakaida, Hiroshi Nishina, and Kiwamu Okita (2005) Lesson from the GFP/CC14 model—Translational Research Project: the development of cell therapy using autologous bone marrow cells in patients with liver cirrhosis. *J. Hepat. Panc. Surg.* 12, 203-207.

Saito, K., Kajiho, H., Araki, Y., Kurosu, H., Kontani, K., Nishina, H., and Katada, T. Purification and analysis of RIN family – novel Rab5 GEFs. *Methods Enzymol.* 403: pp276-283 (2005).

Nishina H, Katada T (2005) [book] The Biological Function of JNKs (MKK4/MKK7 Knockout Mice) in The JNK Signaling Pathway (Anning Lin, eds) pp41-49, Landes Bioscience, Texas.

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, 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, Nakafuku M. Transdifferentiation of the retinal pigment epithelia to the neural retina by transfer of the Pax6 transcriptional factor. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 1059-1068.

Kawase E, Nishina S, Kumagai K, Azuma N. infantile case for occlusive microvascular retinopathy after bone marrow transplantation. *Jpn J Ophthalmol* 2005; 49: 318-320.

Suzuki Y, Nishina S, Azuma N. Two case with different features of congenital optic disc anomalies in each eye. *Graefe Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006 In press

Goto K, Yasuda M, Sugawara A, Itou T, Azuma N, Ito M. Small eye phenotypes observed in a human tau gene transgenic rat. *Current Eye Reserch* 2006; 31:107-110.

G. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

- 1 特許申請
色覚不全動物の色覚復元方法
(出願番号2001-168376)
発明者：東 範行、半田 宏、
実験動物中央研究所
出願人：東 範行、半田 宏、
実験動物中央研究所
- 2 実用新案登録 なし
- 3 その他 なし

ムコ多糖症の遺伝子治療法の開発に関する研究

分担研究者 国立成育医療センター 遺伝診療科 奥山 虎之

研究要旨：ニューロスフェア法にて作成した神経幹細胞を、生後早期の MPSVII マウスの脳室内に同系移植し、組織学的、機能的治療効果を評価し、将来のムコ多糖症中枢神経系合併症や眼疾患に対する細胞治療の可能性を検討した。神経幹細胞は受精後 14.5 日目の胎仔マウス線状体からニューロスフェア法を用いて作成し、生直後の MPSVII マウスの脳室内に 1×10^5 移植した。2 ヶ月時に、海馬、大脳皮質、上衣細胞において、細胞質内の著名な空胞（ライソゾームの腫大）の減少を観察した (n=2)。本研究の成果は、ムコ多糖症の中枢神経病変に対する治療法の開発に繋がるものであり、同疾患に合併する眼疾患の治療にも示唆を与えるものである。

A. 研究目的

ムコ多糖症 VII 型 (Mucopolysaccharidosis type VII: 以下、MPSVII と略す) はライソゾーム酵素の β -グルクロニダーゼ (β -glucuronidase: 以下、GUSB と略す) が欠損しているため、全身のライソゾーム内に GUSB の基質であるムコ多糖が過剰蓄積し、中枢神経系を含む多臓器に障害をきたす疾患である。本研究の目的は、ニューロスフェア法で作成した神経幹細胞を、生後早期の MPSVII マウスの脳室内に同系移植する実験を通し、組織学的、機能的な治療効果の検討を行い、将来のムコ多糖症の中枢神経系合併症への細胞治療の可能性を探ることである。

B. 研究方法

1. 神経幹細胞の作成

神経幹細胞はニューロスフェア法で作成した。受精後 14.5 日目の胎仔 GFP マウス線条体を EGF、FGF を加えた無血清培地で培養し、第 2 継代から第 5 継代までのものを実験に使用した。

2. GUSB の定量、GUSB 染色

GUSB は、4mu 法で測定した。GUSB 染色すなわち、組織切片中の GUSB の検出には、ナフトール AS-BI β -D-グルクロナイドを器質として使用した。

3. 組織学的検討

脳の切片は、2 ヶ月時にトルイジンブルー染色を行い、海馬、皮質、上衣細胞中の空胞（ライソゾームの腫大）の程度を評価した。皮質に関しては、電子顕微鏡においても評価を行った (n=2)。

C. 研究結果

1. 神経幹細胞の GUSB 活性

神経幹細胞の GUSB 活性は 840.3 U/mg protein と高いことが明らかとなった (正常 C57Bl/6 マウス脳 28.1 U/mg protein)。神経幹細胞は分化後、GUSB 活性値が 8 分の 1 程度に減少するが、それでも骨髄由来細胞の GUSB 活性と同程度であった。一方、培養上清でも同様の傾向が認められた。

2. 脳内移植の効果

GFP マウスから作成した神経幹細胞 1×10^5 を、生直後の MPSVII マウスの脳室内に移植し、移植後 24 時間時・3 週間時に、脳の GUSB 活性値を定量した。移植後 24 時間時には正常 C57Bl/6 マウス脳の 12.5~42.3%、3 週間時には 5.5~6.3%であった。これは文献上脳の病理所見を改善させるに足る酵素量であった。

4. 組織学的検討

移植後 2 ヶ月時に、移植後、非移植マウスの各々の脳(n=2)をトルイジンブルー染色し、海馬、脳実質、上衣細胞を、光学顕微鏡と電子顕微鏡 (皮質のみ) で比較したところ、これら 3 領域で、著名な空胞 (ライソゾームの腫大) の減少を観察した。さらに定量的に評価するため、各々の部位で (各 300 細胞)、ライソゾーム腫大が著しい細胞の数を算出し、移植、非移植マウス間で比較したところ、未治療マウスでは、海馬と皮質の 89.3%、42%の細胞に著しい空胞が観察されたのに対し、治療後マウスでは 17.3%、15.3%にまで減少していた。

D. 考察

今回我々は、ニューロスフェア法で作成した神経幹細胞を生直後の MPSVII マウスの脳室内に移植し、その効果を観察した。移植後 2 ヶ月時に、脳

の病理所見は著明に改善し、幹細胞移植の有用性が示された。ムコ多糖症には、目にも同様の病理学的変化が認められる。今回の成果は、中枢神経系だけでなく、適切な細胞の移植により、眼病変の改善も期待できることを示唆している。

E. 結論

神経幹細胞の脳内移植による治療効果を、ムコ多糖症モデルマウスを用いて検証した。

F. 健康危険情報

なし

C. 研究発表

1. 論文発表

(1) Fukuhara Y, Li XK, Kitazawa Y, Inagaki M, Matsuoka K, Kosuga M, Kosaki R, Shimazaki T, Endo H, Umezawa A, Okano H, Takahashi T, and Okuyama T. Histopathological and Behavioral Improvement of Murine Mucopolysaccharidosis Type VII by Intra-cerebral Transplantation of Neural Stem Cells. Molecular Therapy. (in press)

2. 学会発表

(1) 福原康之, 李小康, 小須賀基通, 小崎里華, 島崎琢也, 岡野栄之, 奥山虎之

ムコ多糖症 VII 型マウスに対する神経幹細胞脳室内投与治療

ドナー細胞の脳内分布と組織所見の考察

第 4 回日本再生医療学会、平成 17 年 3 月 1 日、

大阪国際会議場

(2) 福原康之, 李小康, 小須賀基通, 小崎里華, 島崎琢也, 岡野栄之, 奥山虎之

神経幹細胞脳内移植による MPSVII マウスの脳組織所見・行動の改善

第 11 回日本ライソゾーム病研究会、平成 17 年 12 月 2 日、東京

D. 知的財産権の出願・登録

本年度は特に予定していない。

オプチニューリン変異トランスジェニックマウス

分担研究者： 岩田岳 国立病院機構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) は開放隅角緑内障原因遺伝子として発見された2つ目の遺伝子である。Rab8を含む、複数のタンパク質と相互作用が確認されている。本研究では重篤な正常眼圧緑内障を引き起こすE50K変異OPTNとエクソン5欠損OPTNを発現するトランスジェニックマウスを作製し、その病理学的解析を行った。

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。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の検討を行った。

B. 研究方法

1) マウスOPTN遺伝子のクローニング

C57/BL6マウス脳500mgをホモジナイズし、TRIzol (invitrogen) 10mlと懸濁し氷上に1時間静置した。次にクロロホルム2mlを加え5000×g, 30分間遠心後、上清をイソプロパノール5ml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500ulの超純水で溶解しtotal RNAサンプルとした。このtotal RNA 5ug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 1ulをテンプレートとして、ExTaq (takara) 1.25 U, primer(CCCAAGCTTCCACCATGTCCATCAACCTCTGCTCTAGAGCTCAAATGATGCAGTCCATCA) 0.5 uM, dNTP 0.2 mM, の条件で94℃ 0.5分間, 58℃ 0.5分間, 72℃ 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。

2) 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。

3) 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。

4) マウス眼底の観察

マウス眼球にミドリン P を滴下した後にネプ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。

5) 網膜切片を用いた病理学的解析

網膜切片について TUNEL アッセイによる神経節細胞死の観察を行った。また、神経線維の萎縮を観察するために tublin β III 抗体を用いた免疫染色を行った。疾患マウスにおける OPTN の発現量を観察するために、抗 OPTN 抗体による免疫染色を行い、正常個体と比較した。

6) マウスの眼圧測定

マウスの眼圧は特殊なトノペンとレーザーセンサーを用いて、非接触法と接触法によって行った。測定は毎朝午前 9 - 12 時の間に 16 回反復して行い、その平均値を算出した。

7) 蛍光トレーサーを用いた逆走標識による生存神経節細胞数のカウント

蛍光とレーザーによる生存している神経節細胞数を正常と疾患個体についてそれぞれ 6 匹行い、フラットマウント法によって蛍光写真を撮影した。生存細胞数は網膜上の区画を決めてソフトウェアによるカウントを行った。

8) 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 $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 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。

9) 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 D_2O 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 $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ pH5.2, 500mM NaCl, 50 mM imidazole)で洗浄し、溶出バッファー(50 mM $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 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

1) 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。

さらに、神経節細胞の特異的な細胞死が観察され、神経線維の萎縮も同時に観察された。逆走とレーザーによる生存神経節細胞数は疾患個体で約 10 - 20% の細胞死が正常個体に比べて増加していることが明らかとなった。

眼圧測定の結果、疾患個体と正常個体の差はみられなかった。何れも 15mmHg \pm 2mmHg の範囲の眼圧が観察された。

2) 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°C 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、神経節細胞死、神経線維の萎縮などが観察され、変異体のもたらす影響を *in vivo* で確認することができた。今回の一連の研究から、我々は世界で初めての正常眼圧緑内障マウスの作製に成功したことになる今後このマウスモデルを用いて正常眼圧緑内障の発症機序の解明と神経保護薬の開発に役立てていきたい。

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

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

Umeda S, Suzuki MT, Okamoto H, Ono F, Mizota A, Terao K, Yoshikawa Y, Tanaka Y, and Iwata T. Molecular composition of drusen and possible involvement of anti-retinal autoimmunity in two different forms of macular degeneration in

cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *FASEB J* 2005 19:1683-1685

2. 学会発表

M. Shibuya, Y. Tanaka, V.N. Reddy, J. Utsumi, T. Iwata. Differential Proteome Analysis by Isotope Ethanol Tagging of Proteins Extracted From RPE Cells Treated With Retinal Pigment Epithelial Cells Factor-1 (REF-1). Association for Research in Vision and Ophthalmology, Ft. Lauderdale, Florida, USA

S. Umeda, M.T. Suzuki, H. Okamoto, F. Ono, K. Terao, A. Mizota, Y. Yoshikawa, Y. Tanaka, T. Iwata. Molecular Composition of Drusen Observed in Hereditary Macular Degeneration in Cynomolgus Monkey (*Macaca Fascicularis*): Similarities to Age-Related Macular Degeneration in Human. Association for Research in Vision and Ophthalmology, Ft. Lauderdale, Florida, USA

H. Okamoto, S. Umeda, M.T. Suzuki, K. Terao, Y. Yoshikawa, Y. Tanaka, T. Iwata. Comparative Proteome Analysis of Macula versus Peripheral Retina in Cynomolgus Monkey. Association for Research in Vision and Ophthalmology, Ft. Lauderdale, Florida, USA

M. Akahori, M. Obazawa, S. Noda, T. Noda, Y. Tanaka, T. Iwata. Development and Characterization of Normal Tension Glaucoma Mouse Over Expressing Mutant of OPTN (E50K). Association for Research in Vision and Ophthalmology, Ft. Lauderdale, Florida, USA

K. Izumi, D. Kurosaka, T. Iwata, K. Nakamura, Y. Ohashi, Y. Oguchi, Y. Tanaka, K. Tsubota, Y. Mashima. Corneal Epithelial Cells Are Essential for Prevention of Myodifferentiation of Corneal Fibroblasts in a Coculture System. Association for Research in Vision and Ophthalmology, Ft. Lauderdale, Florida, USA

T. Iwata, M. Akahori, M. Obazawa, T. Noda, Y. Tanaka. Characterization of normal tension glaucoma mouse over expressing mutant OPTN (E50K). Society for Neuroscience, Washington DC, USA

岩田岳、赤堀正和、野田節子、田中靖彦 正常眼圧緑内障マウスの作成とその病理学的解析、分子生物学的解析 日本眼科学会 京都

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

- | | |
|----------|----|
| 1 特許取得 | あり |
| 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

研究要旨：PAX6 は眼の形成における中心的な役割を果たす転写因子をコードする。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。特に、PAX6 のあるタイプのミスセンス変異は視神経形成不全を呈し、同じ PAX 遺伝子群に属する PAX2 のハプロ不全が呈するコロボーマに類似する。この事実から、PAX6 と PAX2 との相互転写制御を想定し、実験的に検証した。また、別の疾患遺伝子 DRPLA（神経変性疾患 1 つの歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症）の研究で、塩基・アミノ酸配列の微細な差異が選択的スプライスによって形成される場合があることを見出したが、この現象（subtle alternative splicing）はヒトゲノムに普遍的に見られることを明らかにした。眼形成に係わる遺伝子における subtle alternative splicing による微細な差異を持つアイソフォームについても精査している。

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 末半分の介して眼の外側、C 末半分の介して内側（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、PAX6 の発現ベクターを構築し、試験管内反応や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、我々がこれまでに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も構築し、変異の位置と種類から、PAX6 の機能ドメインを明らかにする。

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)。この分野では神経細胞死の分子機構

の解明が重要課題であり、ポリグルタミンの凝集傾向によって最終的にアポトーシスが誘導されることが明らかとなってきたが、神経細胞死の生じる部位は遺伝子産物の機能との関係で決定されると考えられ、DRPLA 産物の機能解析を進めてきた。その過程で、選択的スプライスによって、きわめて微細な差異を生じることを明らかにしたが、この現象 (subtle alternative splicing) はヒトゲノムで普遍的であることを見出した。

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2万~2万5千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 についてもエクソン 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ことを提唱した。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。

A. 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) 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データベースなどから収集し、RT-PCR によって検証する。これらの事例から、微細選択的スプライスの事例を確立し、それに伴う普遍原理を明らかにする。

(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遺伝子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。

B. 研究結果

(1) PAX6 による PAX2 転写調節 :

1-1 この研究は3年間にわたる研究であるが、現在まで、原著論文として報告していない部分が多いので、少し詳細に記載する。

1-2 各種の小児腫瘍由来の細胞株など、約30種の培養細胞について、PAX2 および PAX6 の発現を RT-PCR で解析した。発現レベルはそれぞれの細胞株によって様々であった。この事は、細胞株の由来する組織の特徴を反映し、また、腫瘍化に伴う発現量の変動を反映していると考えられる。次に、これらの細胞に PAX6 発現ベクターを導入し、内在性 PAX2 の発現変化を RT-PCR で解析した。PAX2 発現が亢進した細胞株が多かったが、一部の細胞では逆に PAX2 発現量が低下した。これらのことは、PAX6 と PAX2 の間に一定の相互作用が存在することを示唆する。胎仔発生の比較的早い時期に PAX2 と PAX6 発現領域が住み分けられていることは以前から報告されている。認められる相互作用は、両者による単純な相互転写調節に加え、他因子も介在する複雑なものと想定された。

1-3 両者の関係を解析するために、内在性 PAX2・PAX6 の両者ともに比較的小~中程度のレベルを示す MCF7 細胞 (乳がん由来 adenocarcinoma) を選択し、以下の実験を行った。転写調節領域を含むと考えられる、転写開始部位上流約1ないし2kbのDNA断片を、CATあるいは luciferase 遺伝子に結合し、レポーターを構築した。PAX2 レポーターと PAX6 発現ベクターを MCF7 細胞に導入し、PAX6 による PAX2 発現調節部位に対する効果をレポーターアッセイによって解析した。一定範囲内の投与 PAX6 発現量に応じた PAX2 レポーターの活性上昇を認めた。

1-4 上記の実験系で、同定したミスセンス変異 (R26C, P68S, R128C, F258S, S363P, Q378R, M381V, T391A の内の1個) を持つ PAX6 発現ベクターを導入した場合には、ほとんどのコンストラクトによる PAX2 レポーターの活性上昇を認めなく、逆にベクター対象より低下した場合も認めた。

1-5 PAX6 には前述のように3種類のDNA結合ドメインが存在する。ペアドドメインN側半分、ペアドドメインC側半分、ホメオドメインのそれ

それぞれに対するコンセンサス配列 (P6-con, P5a-con, HD-con) の支配下に CAT あるいは luciferase 遺伝子を結合してレポーターを構築した。これらのレポーターと PAX6 発現ベクターを MCF7 細胞に導入し、レポーターアッセイによって解析した。この解析結果は、PAX6 のそれぞれの DNA 結合ドメイン毎の DNA 結合能を代表すると考えられる。野性型 PAX6 発現ベクターを導入すると、想定されるレポーター活性の上昇が見られ、従来から報告されている結果に一致した。それらに対し、同定したミスセンス変異を持つ PAX6 発現ベクターに対しては、特徴ある変化が認められた。まず、ペアドドメイン N 側半分に変異があるコンストラクトでは P6-con 結合能が低下し、ペアドドメイン C 側半分に変異があるコンストラクトでは P5a-con 結合能が低下していた。これらの結果は (我々の報告例を含み) 従来知見に一致した。一方、PAX6 の中央部分以降に変異を持つコンストラクトでは P6-con および P5a-con に対する結合は余り変化しなかったのに対し、HD-con への結合能が低下していた。これらの変異はホメオドメインの構造を変化させて、その結合能に影響していると考えられる。PAX6 の C 末端側はトランスアクティベーション活性を持つとされていた。実際、この領域にミスセンス変異を持つコンストラクトでは、トランスアクティベーション活性が低下していた。しかし、ペアドドメインを介する DNA 結合能とトランスアクティベーション活性とを完全に解離させることは困難で、両者の活性の影響を測定している可能性が高い。

1-6 同定したミスセンス変異によるコンセンサス配列への結合能の結果は、3 種のうちどれも、PAX2 レポーターアッセイの結果と完全に一致するものは存在しなかった。また、PAX2 上流領域にそれらのコンセンサス配列に類似する配列はあるものの、それらのうちの特異配列が寄与していると同定できるものではなかった。

1-7 これらの結果から、PAX6 によって PAX6 発現が変動する事実はあるものの、その機構は完全に解明できなかつた。

(2) 微細な差を生じる選択的スプライス *subtle alternative splicing* : 我々が以前にリポート伸長が発症原因であると同定した神経変性疾患 DRPLA において、報告された cDNA 配列に 3 塩基の有無という微細な差異があることを見出し、これが選択的スプライスによることを明らかにした。このように 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たが、一般には注目されておらず、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。しかし公開データベースのソースを独自

に解析し、1 アミノ酸残基の有無の相違などのような微細な差違を生じる選択的スプライス例は極めて多く、普遍的であることを認めた。我々はデータベース収録例について RT-PCR によって 200 例以上を実験的に確認して 2005 年 8 月に報告した。一方、他研究室から、バイオインフォマテイクス解析によって同様の事実が報告された

(Hiller et al. *Nature Genetics*, 2004 年 12 月)。我々は *subtle alternative splicing* と命名したが、この現象が普遍的であるという事実は急速に広まってきた。

C. 考察

(1) PAX6 の転写調節能 : 一連の解析によって膨大な結果を得た。一部の変異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、今後も解析が必要とされる。

(2) 微細な差を生じる選択的スプライス : *subtle alternative splicing* はヒトゲノムに普遍的であり、ヒトゲノムのアノテーションに大きな問題を提起した。従来配列解釈に変更を加える必要も生じている。また、スプライス部位選択の問題はまだ完全に解決しておらず、その解明に寄与するものである。この事は同時に、臨床遺伝子診断で変異を見出した場合、その変異によってスプライスに影響するか否かを予測するうえでも重要な手がかりを与える。

D. 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。

E. 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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 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, Nakafuku M. The Pax6 isoform bearing an alternative spliced exon promotes the development of the neural retinal structure. *Hum Mol Genet*, 14:735-745, 2005.

2) Azuma N, Tadokoro K, Asaka A, Yamada M, Yamaguchi Y, Handa H, Matsushima S, Watanabe T, Kida Y, Ogura T, Torii M, Shimamura K, Nakafuku M. Transdifferentiation of the retinal pigment epithelia to the neural retina by transfer of the Pax6 transcriptional factor. *Hum Mol Genet*, 14:1059-1068, 2005.

3) Tadokoro K, Yamazaki-Inoue M, Tachibana M, Fujishiro M, Nagao K, Toyoda M, Ozaki M, Ono M, Miki N, Miyashita T, Yamada M. Frequent occurrence of protein isoforms with or without a single amino acid residue by subtle alternative splicing: the case of Gln in DRPLA affects subcellular localization of the products. *J Hum Genet*, 50:382-394, 2005.

4) Nagao K, Togawa N, Fujii K, Uchikawa H, Kohno Y, Yamada M, Miyashita T. Detecting tissue-specific alternative splicing and disease-associated aberrant splicing of the PTCH gene with exon junction microarrays. *Hum Mol Genet*, 14:3379-3388, 2005.

5) Nagao K, Toyoda M, Takeuchi-Inoue K, Fujii K, Yamada M, Miyashita T. Identification and characterization of multiple isoforms of a murine and human tumor suppressor, patched, having distinct first exons. *Genomics*, 85:462-471, 2005.

2. 学会発表

詳細は省略

G. 知的所有権の取得状況

無し。

視細胞の分化調節機構に関する研究

分担研究者 岡野 栄之 慶應義塾大学医学部生理学教室 教授

研究要旨：原発性・続発性に障害された神経網膜、特に網膜視細胞の再生を可能にするために、マウス網膜を用いて網膜視細胞の分化誘導に関与する調節機構の一部を明らかにし、論文を発表した。さらに、網膜視細胞の分化を細胞外微小環境と関連づけて解析し、組織内再生や細胞移植による治療法の研究に利用する。

A. 研究目的

視細胞の分化には、外的因子および内的因子の相互関係が関与するとされている。損傷網膜においては、その活性が上昇しているとされ、再生医学の見地からも興味深い外的因子 *Ciliary neurotrophic factor* (CNTF) が、網膜視細胞前駆細胞の内的因子に負の影響を与えるメカニズムを解析し論文を発表した。さらに、再生医学においては、未分化細胞を分化誘導する必要があるが、未分化維持シグナルとして重要視されている *Notch* シグナルが、網膜視細胞の分化調節機構にいかに関与しているかの解析を開始した。再生医療の見地からは、これらの情報を、組織内再生や細胞移植などの新規治療法の開発の基礎として役立てることを目的とする。

B. 研究方法

我々はマウス神経網膜を器官培養する方法を導入した。この方法ではマウス網膜の正常発生の過程をよく再現することが知られていた。我々は既にこれを利用し、外的因子である CNTF が、その下流のいずれのシグナル伝達機構を介し、視細胞の分化マーカーであるロドプシンの発現を抑制するかを解析した。その際に、我々は、周産期マウスの器官培養した網膜の、免疫染色法や *in situ hybridization* 法を用いた定性的解析法、イムノプロット法や *real-time RT-PCR* 法を用いた定量的解析法を確立した。また、この器官培養法を活用し、器官培養下の正常神経網膜に、直接遺伝子を導入する方法としてエレクトロポレーションによる遺伝子導入法を確立した。

これらの方法を用いて、我々は、*Notch-Numb* シグナルの網膜細胞の分化調節に関する解析

を行っている。さらに、中枢神経系などで本シグナルに関連するとされる分子の、網膜での役割を解析している。

(倫理面への配慮)

動物の飼育・管理は慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインを遵守して行われている。

C. 研究結果

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ところ、*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うる *Numb* は同部位で同時期に、発現していた。

2) 生後0日目のマウス神経網膜を器官培養し、遺伝子導入を行い、導入された細胞での細胞の運命を解析した。活性型 *Notch* 遺伝子が導入されると、ミューラー（グリア）細胞と一部の介在ニューロンにも分化する細胞が増え、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。反対に、*Numb* 遺伝子をノックダウンすると視細胞への分化が抑制される傾向があった。

3) そこで次に、実際に *Notch-Numb* シグナルが関与する、分裂直後の細胞にのみ、遺伝子の強制発現をすべく、網膜器官培養にレトロウイルスを感染させる系を確立した。遺伝子導入とともに、細胞を標識し、導入された細胞に限定した表現系の解析を可能にした。その結果、*Notch* の活性化は視細胞への分化を阻害するが、それ以外の細胞にはグリア細胞に限らず分化しうることを、*Numb* の導入は視細胞への分化を許容することが明らかになった。

4) さらに、これらの細胞分化の調節機構を詳細に探るため、視細胞マーカーであるロドプシンの上流転写因子、Crx の抗体を作成中である。この分子は視細胞の他の特異的機能的タンパクの上流にもあり、重要な分子である。しかし、その抗体は作成が困難で、多数の研究者が作成を試みたものの安定した供給をしえないのが現状である。我々は、そのモノクローナル抗体の作成の途中であり、有望なクローンを得るに至っている。

5) これらとは別に、Notch 活性を阻害する薬剤の視細胞分化における役割も解析中である。視細胞に選択的に分化させられる可能性が高いが、網膜の層構造を乱す可能性があり、そのメカニズムを解析し、解消する方法を開発する必要がある。

D. 考察

胎生期の網膜 (*in vivo*) では STAT3 が活性化しており、ロドプシンの上流の転写因子 *crx* の発現抑制をすることで視細胞分化の時期を制御していることは既に報告した。同時に、視細胞分化のためには、活性化 STAT3 以外にも解除されるべき負の調節因子や、新たに発現すべき正の調節因子の存在する可能性が示唆されていた。

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、視細胞への分化のためには最終分裂後、直ちに不活性化される必要があることが明らかになった。

これに対し、Numb は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おり、実際に視細胞への分化を促進していた。そこで、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、また、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、などさらに解析する必要がある。またマーカー発現だけでなく、正常な視細胞を誘導し、層構造を形成させるために必要な情報を、さらに得る必要があると考える。

E. 結論

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った。さらに、STAT3 は単独で最終分化マーカー、ロドプシンの発現を調節するものではなく、他の因子も共に関与する可能性が考えられた。そして、STAT3 と同様、細胞の未分化維持に働き、さらに STAT3 と相互作用をして機能しうることが報告されている、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、調節していることが明らかになった。組織再生のためには、未分化細胞を分化誘導して利用する必要がある。視細胞の再生医療に向けては、この機構をさらに明らかにする必要があるといえた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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(2004) 258-270

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

2. 学会発表

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

Ozawa, Y., Nakao, K., Shimazaki T., Oguchi, Y. and Okano, H.: Downregulation of STAT3-activation is required for presumptive rod photoreceptor cells to differentiate in the postnatal retina. *ARVO* 2005 U.S.A.

H. 知的財産の出願・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