

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 一感覚器一 002)

平成 15 年度～17 年度総合報告書

(I)

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. 総合研究報告書

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. 研究成果の刊行に関する一覧表 18

III. 研究成果の刊行物、別刷 29

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与える遺伝子・細胞治療の開発を目的とした。ムコ多糖症の角膜病変に対する遺伝子治療を検討した。疾患モデルマウスの角膜を切開してアデノウイルスベクターを局所投与し、欠損酵素である β -グルクロニダーゼを遺伝子導入した。角膜混濁の原因である角膜細胞の空胞変性が短期間で正常化することが示された。また、同マウスの中枢および角膜内に神経幹細胞あるいは骨髄細胞を移植してムコ多糖沈着を除去する細胞治療を行った。複雑な構造をもつ眼の組織に特異的に与える遺伝子・細胞治療の開発を目的とし、各組織に局限して遺伝子治療を行うべくクリスタリン、ミオシリンあるいはオブシン遺伝子のプロモーター領域の遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを作成し、Cre 組み換え酵素により水晶体、隅角あるいは網膜でのみ導入遺伝子を発現できるシステムを構築した。ヒトの正常眼圧緑内障の病態を明らかにするため、緑内障原因遺伝子オプチニューリン (OPTN) の変異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。OPTN の変異体と Rab8 との相互作用の解析を行うために、Rab8 タンパク質の発現・精製法を確立した。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（歯状核赤核淡蒼球レイ体萎縮症）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。網膜視細胞再生のために、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。幹細胞の眼組織への分化誘導能を検討する目的で、マウスの各種幹細胞の生存・死・分化誘導能等細胞内情報伝達系である MAP キナーゼ (ERK や SAPK/JNK) 系や PAX6 遺伝子を用いた眼組織への分化誘導能の観点から検討した。その結果、ES 細胞の生存維持には ERK 系が、分化誘導に伴う遺伝子発現には SAPK/JNK 系が関与すること、p38MAP キナーゼが ES 細胞から外胚葉系の神経細胞分化誘導に対しては抑制的に制御すること、また、PAX6 遺伝子のアイソフォーム 5a 型が強い神経細胞分化誘導能を示すことを見出した。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成功した。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っても微細な眼組織では限界がある。しかも、疾患の原因を根本的に治すことができるものは少ない。

近年、分子生物学の進歩によって、多くの疾患で原因あるいは病態が分子レベルで明らかになりつつある。基礎医学でも、研究対象が設計図である遺伝子から蛋白の特性、さらにはこれを産生する細胞へと移りつつある。臨床においては、眼科以外の分野で、先天代謝異常に酵素補充療法あるいは遺伝子治療が行われ、腫瘍にも遺伝子治療が試みられている。細胞治療は、血液疾患で骨髄移植が行われ、神経変性疾患で幹細胞の移植が試みられている。これらは、疾患の原因を除くに近い治療法であるが、眼科領域では、研究レベルでもごくわずかし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ーを用いて、組織特異的に発現させる遺伝子導入法を開発した。これを用いれば、角膜（疾患は混濁）、隅角（緑内障）、水晶体（白内障）あるいは網膜（ジストロフィ、腫瘍）で組織特異的かつ限局した遺伝子治療を行うことができる。また我々は、動物実験ではあるが、代謝性角膜混濁に酵素補充、遺伝子導入あるいは産生細胞移植を行って、角膜を透明化させることに成功した。さらに、幹細胞と形態形成遺伝子を用いて、水晶体や網膜の細胞あるいは組織を再生させる研究を行

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

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

B. 研究方法

1) 先天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 4mu 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) 先天ムコ多糖症の角膜混濁に対する遺伝子治療

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

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

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

4) 眼内の各組織に特異的に遺伝子導入するためのベクターシステムの開発

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

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

(3) 網膜視細胞で特異的に発現するベクターの構築
オブシン(青、赤、緑)は視物質として網膜視細胞に特異的に発現する遺伝子である。同遺伝子の5'プロモーター領域1000塩基対のDNA断片をCre組み換え酵素遺伝子の5'領域に組み込んだアデノウイルスベクターAxOpsNCreをCOS-TPC法で構築した。このベクターとAxCALNLacZ(Cre組み換え酵素の存在下でLacZを発現するアデノウイルスベクター)をマウスの網膜に投与し、導入遺伝子の発現をLacZに対する活性染色を用いて評価した。

5) 緑内障原因遺伝子オプチニューリン(OPTN)の機能解析

(1) ヒトOPTN cDNAをクローニングしてこれに報告されている遺伝子変異および遺伝子多型配

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

(2) 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 ul 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。

(3) 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。

(4) 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。

(5) 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。

(6) 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。

(7) 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。

(8) 蛍光とレーザ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。

(9) pRSET(invitrogen)に導入した Rab8 を

BL21(DE3)pLysS に形質転換させ、可溶化 Rab8 を含むサンプルとした。Rab8 を含む画分 500 ul を AKTA system (amersham pharmacia) を用いて分画後、各画分を SDS-PAGE により分離しクマシーブルー染色によって検出した。

(10) 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。

(11) 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。

6) 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 結合能を解析した。

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

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

(4) 選択的スプライスによって、塩基配列あるいはアミノ酸配列に微細な変化を生じる例をデータベースなどから収集し、RT-PCR によって検証した。

7) 視細胞の分化調節機構に関する研究

マウス神経網膜を器官培養する方法を導入した。この方法ではマウス網膜の正常発生の過程をよく再現することが知られていた。これを利用し、外的因子である CNTF が、その下流のいずれのシグナル伝達機構を介し、視細胞の分化マーカーであるロドプシンの発現を抑制するかを解析した。そのために、周産期マウスの器官培養した網膜を、免疫染色法や *in situ hybridization* 法を用いて定性的に解析すると共に、イムノプロット法や real-time RT-PCR 法を用いて定量的にも解析した。この器官培養法を活用し、ノックアウトマウスの網膜組織と、エレクトロポレーションによる遺伝子導入法を用い、CNTF の影響の原因となった細胞内シグナル伝達機構を明らかにした。エレクト

ロポレーション法は、器官培養下の正常神経網膜に、直接遺伝子を導入する方法を新たに確立した。また、CNTF/gp130 の下流のシグナルがそれぞれ阻害された遺伝子改変マウスを交配により準備した。さらに、このシグナルの生体内での視細胞分化における機能に関し、定性的、定量的手法を用いてノックアウトマウスを解析した。

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。活性型 Notch および、細胞内で Notch を不活性化しうる分子 Numb を、正常網膜器官培養へ導入し、その解析を行った。

8) 遺伝性眼疾患の遺伝子・細胞治療に関する研究

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

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

9) 幹細胞から眼組織への分化に関する研究

(1) 阻害剤や遺伝子破壊法を用いてマウス ES 細胞における MAP キナーゼ系の役割をと Pax6 の神経細胞分化誘導に対する影響を検討した。

(2) 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。

10) 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)-Pax6 Δ C+ 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。

(倫理面への配慮) いずれの研究も、動物実験のみでヒトの材料を使った研究は行われていない。動物実験については、各施設における研究所動物実験指針に従った。培養細胞を用いた試験管内実験は倫理的な問題を生じない。一部はこれまでの患者を対象とした遺伝子解析によって得られた変異に基づいており、眼における PAX6 遺伝子解析は、(当時の) 国立小児病院倫理委員会に申請され、承認を得ており、国立成育医療センター改組後も承認されている。DNA 組換え実験については組換え DNA 安全委員会の承認を得ている。動物実験については各種の規定を遵守し、機関の承認を得ている。ES 細胞の取り扱い、大学動物実験委員会の承認を得、そのプロトコールに従って遂行された。

C. 研究結果および考察

1) 先天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) 先天ムコ多糖症の角膜混濁に対する遺伝子治療

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

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

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

3) 先天ムコ多糖症の角膜混濁に対する細胞治療

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

ムコ多糖症に対する全身的治療法では、骨病変や内臓病変における治療効果が認められるが、中枢神経病変や角膜病変に対する効果は期待できない。前者は、血液脳関門の存在が、後者は、無血管組織という角膜組織の特殊な構造が影響していると考えられ、局所療法が重要である。先に我々は、アデノウイルスベクターによって β -グルクロニダーゼ遺伝子を導入する遺伝子治療の有用性を示したが、恒久的治療を目指して今回は細胞治療を試みた。その結果、細胞の生存と、その周囲のムコ多糖沈着物の消失が確認されたが、なお長期間かつ多数の細胞を生存させる技術の向上が必要である。これが達成できれば、早期に

臨床応用できる可能性がある。

4) 眼内の各組織に特異的に遺伝子導入するためのベクターシステムの開発

(1) 隅角組織特異的な遺伝子発現

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

(2) 水晶体組織特異的な遺伝子発現

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

(3) 網膜視細胞特異的な遺伝子発現

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

眼は角膜、隅角、水晶体、網膜など異なった組織が集中して存在するきわめて複雑な構造を有する器官である。眼内の特定の組織にのみ導入遺伝子を発現できるシステムの開発は、遺伝子治療や再生医療を安全に行ううえで重要となる。今回の検討により、ミオシリンやクリスタリン、オプシンのような組織特異的な発現をする蛋白をコードする遺伝子のプロモーターを利用することにより隅角や水晶体などに導入遺伝子を特異的に発現できるベクターシステムの構築が可能であることが示された。このシステムを適切に利用することにより、正確で安全な遺伝子導入が可能となり、遺伝子治療や再生医療の臨床応用がより現実になることが期待される。

5) 緑内障原因遺伝子オプチニューリン(OPTN)の機能解析

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

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

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

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った。

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。

(3) 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った。

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

6) 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して想定された。

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。野生型 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。

(2) 眼形成過程で PAX6 のエクソン 5a 付加型アイソフォームの発現を解析した。網膜中心窩に相当する部位となる領域でエクソン 5a 付加型アイソフォームの発現が亢進していた。ニワトリ胚に発現ベクターを導入したところ、両アイソフォームに顕著な違いが見られた。エクソン 5a 付加型アイソフォームを強発現した場合には、網膜の平面方向への伸展が著しく促進され、分化が進行していた。これらのことは、エクソン 5a 付加型 PAX6 アイソフォームは網膜の分化を強く促進すること示している。

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。

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

(4) DRPLA と RERE の発現様式: DRPLA およびそのホモログである RERE が形態形成に関与するか否かを明らかにするために、発生時における発現様式を検討した。RT-PCR 法では 9.5 日マウス胚

以降で検出され、それ以降量的な変動はあるが、出生時およびそれ以降も持続した。In situ ハイブリッド法により発現部位を特定した。比較的初期の胚では、予想通り、神経管を中心に強い発現が認められ、それに加えて肢芽でも高い発現を認めた。肢芽での発現はショウジョウバエにおける羽の形成異常との関係で興味深い知見である。

(5) DRPLA と RERE の転写調節能：発現ベクター導入とレポーター活性によって転写調節を検討した。これまで解析した培養細胞では、上皮系細胞では DRPLA は強い転写促進効果があり、RERE は弱い転写促進効果を示したが、神経系由来の培養細胞では逆に、RERE が強い転写抑制効果を示し、DRPLA は弱い転写抑制効果を示した。ショウジョウバエでは co-repressor とされ、共同して作用する他因子の存在が示唆されている。ヒト DRPLA と RERE の場合も、まだ直接の作用か間接の効果かの解析は済んでいない。上皮系と神経系で異なる方向の作用をする点も合せ解析を進めたい。いずれにしても、転写調節に関与することは確かとなったので、眼で作動する転写調節因子(PAX6 を含む)や他の遺伝子との調節関係を解析していきたい。

(6) 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ーブ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つ、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。

7) 視細胞の分化調節機構に関する研究

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

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

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

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

正常より早期に、活性化 STAT3 の低下が生じる網膜特異的 STAT3 conditional KO マウスで、正常より早期に *crx* の発現上昇があったことから、活性化 STAT3 の発現低下は視細胞の分化時期を決定する因子の一つとして関与していると考えられた。ただし、網膜特異的 STAT3 conditional KO マ

ウスでも、ロドプシンの発現開始時期に変化は無く、視細胞分化のためには、活性化 STAT3 以外にも解除されるべき負の調節因子や、新たに発現すべき正の調節因子の存在する可能性が示唆された。

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

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

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

(7) 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。

(8) 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。

(9) 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*) で高値を示す CNTF の活性が出生後急激に下降するのと同期して、視細胞の最終分化マーカーロドプシンの発現が開始すること、*in vitro* において CNTF を添加すると、ロドプシンの発現が抑制されることは従来知られていたが、CNTF/gp130 レセプター下流の主な 2 つのシグナル伝達経路のうち、STAT3 の活性化を介して生じ、ロドプシンの上流の転写因子 *crx* の発現抑制を伴っていることは既に報告した。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、直ちに不活性化を受ける必要がある。それにより、速やかに未分化維持に関わる下流の分子の発現を低下させ、タイミング良くその他の因子の影響も受け、視細胞への分化がおこる可能性がある。これに対し、Numb は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、細胞の分化を促進していたが、エンドサイトーシスによる Notch シグナル抑制能を持つことが知られている。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。

8) 遺伝性眼疾患の遺伝子・細胞治療に関する研究

ニューロスフィア法で分離した神経幹細胞は、ニューロンだけでなくアストロサイトおよびオリゴデンドロサイトにも分化することが、免疫染色法で確認された。これは、分離した細胞の「多分化能」を示すものであり、今回分離した細胞が確かに神経幹細胞であることを示していた。神経幹細胞の脳内移植を適切に行うことにより、種々の先天異常症の治療につながる可能性が期待されている。昨年度の検討で、神経幹細胞の移植がリソゾーム蓄積症の治療に有用である可能性が明らかとなった。しかし、先天異常症の細胞治療においては、アロ移植が遺伝的に改変した自家移植のどちらかが必要になる。今回の検討で、アロ移植としての有用性が示された。

9) 幹細胞から眼組織への分化に関する研究

(1) MAP キナーゼ系が ES 細胞の生存維持や分化誘導に必須の役割を果たすこと、またニワトリ同様、マウスにおいても色素上皮には Pax6 感受性の幹細胞が存在し網膜組織へと分化誘導可能であることを見出した。ショウジョウバエの眼形成には MAP キナーゼによる Eya を含む転写因子のリン酸化が遺伝子発現の制御に関与していることが示されている。マウス眼形成においても眼形成関連の転写因子を制御している可能性が示唆された。また、哺乳動物においても幹細胞から網膜組織を構築できることが示唆された。

(2) 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。

10) 眼の形態形成遺伝子を用いた網膜再生の研究

(1) 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。

(2) 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

ムコ多糖症では、骨髄移植療法や酵素補充療法など全身的治療法で骨病変や内臓病変において治療効果が認められるが、中枢神経病変や角膜病変に対する効果は期待できない。これは血液脳関や無血管組織という特殊構造が関係している。いずれの組織においても、局所療法が重要と考えられ、中枢では神経幹細胞の脳内移植により治療効果が得られる。今回の検討で角膜病変への直接的な遺伝子治療、細胞治療の有用性が示された。

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

正常眼圧緑内障の原因である OPTN 変異体 458 G>A は RAB8 と相互作用できないことが明らかとし、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の調節能を解析した。微細な差違を生じるスプライスは普遍的で、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ブとしての活用が考えられ、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、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。

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。

神経幹細胞が、アロ移植のドナー細胞として有用であることが示された。

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

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に成功した。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

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

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

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

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

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

M. Takahashi, N.J. Deb, Y. Kawashita, S.W. Lee, J. Furgueil, T. Okuyama, N. Roy-Chowdhury, B. Vikram, J. Roy-Chowdhury, & C. Guha. A novel strategy for in vivo expansion of transplanted hepatocytes using preparative hepatic irradiation and FasL-induced hepatocellular apoptosis. *Gene Ther* 2003; 10: 304-313

M. Takahashi, H. Saito, K. Atsukawa, H. Ebinuma, T. Okuyama, & H. Ishii. Bcl-2 prevents doxorubicin-induced apoptosis of human liver cancer cells. *Hepatol Res* 2003; 25,:192-201

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

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

Connie Darmanin, Takeshi Iwata, Deborah A. Carper, Lindsay G. Sparrow, Roland P.-T. Chung, and Ossama El-Kabbani. Expression, purification and preliminary crystallographic analysis of human sorbitol dehydrogenase. *Acta Crystallographica D*59:558-560 (2003)

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

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

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

K. Fujii, T. Miyashita, T. Omata, K. Kobayashi, J.-I. Takanashi, K. Kochi, M. Yamada & Y. Kohno. Gorlin syndrome with ulcerative colitis in a Japanese

- Girl. *Am. J. Med. Genet.*, 121A, 65-68, 2003.
- K. Fujii, Y. Kohno, K. Sugita, M. Nakamura, Y. Moroi, K. Urabe, M. Furue, M. Yamada & T. Miyashita. Mutations in the human homologue of *Drosophila* patched in Japanese nevoid basal cell carcinoma syndrome patients. *Human Mutation*, 21, 451-452, 2003.
- Y. Shikama, M. Yamada & T. Miyashita. Caspase-8 and caspase-10 activate NF- κ B through RIP, NIK and IKK α kinases. *Eur. J. Immunol.* 33, 1998-2006, 2003.
- A. Miyahara, Y. Okamura-Oho, T. Miyashita, A. Hoshika & M. Yamada. Genomic structure and alternative splicing of the insulin receptor tyrosine kinase substrate of 53 kDa protein. *J. Hum. Genet.* 48, 410-414, 2003.
- Tonchev AB, Yamashima T, Zhao, L, Okano HJ, Okano, H: Proliferation of neural and neuronal progenitors after global brain ischemia in young adult macaque monkeys. *Mol Cell Neurosci* 23: 292-301, 2003
- Kayahara T, Sawada M, Takaishi S, Fukui H, Seno H, Fukuzawa H, Suzuki K, Hiai H, Kageyama R, Okano H, Chiba T: Candidate markers for stem and early progenitor cells, *Musashi-1* and *Hes1*, are expressed in crypt base columnar cells of mouse small intestine. *FEBS Letter* 535: 131-135, 2003
- Sasaki T, Kitagawa K, Sugimura S, Omura-Matsuoka E, Tanaka S, Yagita Y, Okano H, Matsumoto M, Hori M: Implication of Cyclooxygenase-2 on Enhanced Proliferation of Neural Progenitor Cells in the Adult Mouse Hippocampus After Ischemia. *J Neurosci Res* 72: 461-471, 2003
- Nakamura Y, Yamamoto M, Oda E, Yamamoto A, Kanemura Y, Hara M, Suzuki A, Yamasaki M, Okano H: Expression of tubulin beta II in neural stem/progenitor cells and radial fibers during human fetal brain development. *Lab Invest* 83: 479-489, 2003
- Yuasa Y, Okabe M, Yoshikawa S, Tabuchi K, Xiong W-C, Hiromi Y, Okano H: *Drosophila* homeodomain protein REPO controls glial differentiation by cooperating with ETS and BTB transcription factors. *Development* 130: 2419-2428, 2003
- Uchida K, Okano H, Hayashi T, Mine Y, Tanioka Y, Nomura T, Kawase T: Grafted swine neuroepithelial stem cells can form myelinated axons and both efferent and afferent synapses with xenogeneic rat neurons. *J Neurosci Res* 72: 661-669, 2003
- Kokuzawa J, Yoshimura S, Kitajima H, Shinoda J, Kaku Y, Iwama T, Morishita R, Shimazaki T, Okano H, Kunisada T, Sakai N: Hepatocyte growth factor promotes proliferation and neural differentiation of neural stem cells from mouse embryos. *Mol Cell Neurosci* 24: 190-197, 2003
- Ishizuya-Oka A, Shimizu K, Sakakibara SI, Okano H, Ueda S: Thyroid hormone-upregulated expression of *Musashi-1* is specific for progenitor cells of the adult epithelium during amphibian gastrointestinal remodeling. *J Cell Sci* 116: 3157-3164, 2003
- Kanuka H, Kuranaga E, Hiratou T, Igaki T, Nelson B, Okano H, Miura, M: Cytosol-endoplasmic reticulum interplay by *Sec61alpha* translocon in polyglutamine-mediated neurotoxicity in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 11723-11728, 2003
- Baker H, Kobayashi K, Okano H, Saino-Saito S: Cortical and striatal expression of tyrosine hydroxylase mRNA in neonatal and adult mice. *Cell Mol Neurobiol* 23: 503-518, 2003
- Tamaki T, Akatsuka A, Okada Y, Matsuzaki, Y., Okano, H. and Kimura, M: Growth and differentiation potential of main- and side-population cells derived from murine skeletal muscle. *Exp Cell Res* 291: 83-90, 2003
- Miyanomori Y, Kobayashi H, Watanabe M, Nagata T, Imai T, Uesugi, S, Okano H, Katahira M: Origin of higher affinity to RNA of the N-terminal RNA-binding domain than that of the C-terminal one of a mouse neural protein, *musashi1*, as revealed by comparison of their structures, modes of interaction, surface electrostatic potentials, and backbone dynamics. *J Biol Chem* 278: 41309-41315, 2003
- Yoshida T, Tokunaga A, Nakao K, Okano, H: Distinct expression patterns of splicing isoforms of *mNumb* in the endocrine lineage of developing pancreas. *Differentiation* 71: 486-495, 2003
- Hu QD, Ang BT, Karsak M, Hu WP, Cui XY, Duka T,

- Takeda Y, Chia W, Natesan S, Ng YK, Ling EA, Israel A, Maciag T, Small D, Trifonova R, Kopan R, Okano H, Nakafuku M, Chiba S, Hirai H, Schachner M, Pallen CJ, Watanabe K, Xiao ZC: F3/Contactin acts as a functional ligand for Notch during oligodendrocyte maturation. *Cell* 115: 163-175, 2003
- Kishimoto, H. et al. Different Properties of SEK1 and MKK7 in Dual Phosphorylation of Stress-induced Activated Protein Kinase SAPK/JNK in Embryonic Stem Cells. *J. Biol. Chem.* 278, 16595-16601 (2003).
- Okamura-Oho, Y. et al Dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA) protein is phosphorylated by c-Jun NH₂-Terminal Kinase. *Hum. Mol. Genet.*, 12, 1535-1542 (2003).
- Saibil, SD. et al Weak agonist self-peptides promote selection and tuning of virus-specific T cells. *Eur. J. Immunol.* 33, 685-696 (2003).
- Nishina, H. et al. Activation Mechanism and Physiological Roles of Stress-Activated Protein Kinase/c-Jun NH₂-Terminal Kinase in Mammalian Cells. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* (2003)
- Momose, H. et al. Dual Phosphorylation of Phosphoinositide 3-Kinase Adaptor Grb2-Associated Binder 2 Is Responsible for Superoxide Formation Synergistically Stimulated by Fcγ and Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine Receptors in Differentiated THP-1 Cells. *J. Immunol.*, 171, 4227-4234 (2003).
- Terai, S. et al. An invivo model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J. Biochem.*, 134, 551-558 (2003).
- Kamata Y, Tanabe A, Kanaji A, Kosuga M, Fukuhara Y, Li X-K, Suzuki S, Yamada M, Azuma N, Okuyana T. Long-term normalization in the central nervous system, ocular manifestations, and skeletal deformities by a single systemic adovirus injection into neonatal mice with mucopolysaccharoidosis VII. *Gene Therapy*,10:406-414, 2003.
- Ohtake Y, Tanino T, Suzuki Y, Miyata H, Taomoto M, Azuma N, Tanihara H, Araie M, Mashima Y. Phenotype of cytochrome P4501B1 gene (CYP1B1) mutations in Japanese patients with primary congenital glaucoma. *Br J Ophthalmo*, 87:302-304, 2003.
- Azuma N, Yamaguchi Y, Handa H, Tadokoro K, Asaka A, Yamada M. Mutations of the PAX6 gene detected in patients with a variety of optic nerve malformations. *Am J Hum Genet*, 72:1565-1570, 2003.
- Siozawa N, Tazima S, Azuma N, Hiroki K, Kono T, Ito M. Histological study of the hypertrophic placentas and open eyelid observed in cloned fetuses. *J Reprod. Dev*, 49:221-226, 2003.
- Azuma N, Kawase E, Suzuki Y, Yamada M. Mutation of PAX6 gene detected in patients with congenital optic nerve anomalies. *European Society of Ophthalmology*, 337-343, 2003.
- 東 範行. 視線と視野の成り立ち. *日本視能訓練士協会誌*, 32:33-34, 2003.
- 東 範行. 網膜光障害の分子メカニズム. *日本の眼科*, 74:223-224, 2003.
- 東 範行. 先天白内障の原因遺伝子. *日本の眼科*, 74:113-114, 2003.
- 大西克尚・東 範行・雨宮次生. 小児の悪性腫瘍. *眼科*, 45:753-756, 2003.
- 東 範行. 画像ファイリングシステム NAVIS. *眼科診療プラクティス*, 文光堂, 東京, 6: 170-174, 2003.
- 東 範行. 眼組織. *Critical Neuroscience*. 中外医学社, 21, 1187-1191, 2003.
- 東 範行. 未熟児網膜症の管理. *眼科診療の最前線*, 金原出版(株), 東京, 223-230, 2003.
- 川瀬英理子・東 範行. 学校保健. *小児眼科のABC*. 日本医事新報社, 東京, 174-177, 2003.
- 東 範行(編). 視神経乳頭のみかた. *眼科診療プラクティス*, 文光堂, 東京, 2003.
- 東 範行. 目の異常. *最新保育保健の基礎知識*. 日本小児医事出版社, 東京, 298-300, 2003.

東 範行. 感覚器疾患. 新体系看護学 29 小児看護
②健康障害をもつ小児の看護. メジカルフレンド
社, 東京, 338-343, 2003.

野田英一郎・東 範行. 眼疾患 結膜炎. 実践小児
診療. 日本医師会, 東京, 318. 2003.

野田英一郎・東 範行. 眼疾患 睫毛内反. 実践小
児診療. 日本医師会, 東京, 318. 2003.

鈴木由実・東 範行. 眼疾患 屈折異常. 実践小児
診療. 日本医師会, 東京, 318. 2003.

芝 大介・東 範行. 眼疾患 斜視. 実践小児診療.
日本医師会, 東京, 319. 2003.

鈴木由実・東 範行. 眼疾患 眼異物. 実践小児診
療. 日本医師会, 東京, 319. 2003.

芝 大介・東 範行. 眼疾患 眼振. 実践小児診療.
日本医師会, 東京, 320. 2003.

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

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

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

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

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

Obazawa M, Mashima Y, Sanuki N, Noda S, Kudoh J,

Shimizu N, Tanaka Y, and Iwata T. Comparable
Analysis of Porcine Optineurin and Myocilin
Expression in Trabecular Meshwork Cells and
Astrocytes from Optic Nerve Head. *Invest Ophthal
Vis Sci* 2004 45:2652-2659

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

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

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

岩田 岳、真島 行彦. インベーター法を用いた
緑内障の遺伝子解析. *Bio Medical Quick Review
Net* 2004 記事番号 4001

http://www.medicaldo.co.jp/application_r.html, 株式
会社メディカル デウ

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

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

- Yamashima T, Tonchev BA, Seki T, Sawamoto, K, Okano H: Vascular adventitia generates neuronal progenitors in monkey hippocampus after ischemia. *Hippocampus* In press, 2004
- Matsuzaki Y, Kinjo K, Mulligan RC, Okano H : Unexpectedly efficient homing capacity of purified murine hematopoietic stem cell. *Immunity* 20: 87-93, 2004
- Murata J, Murayama A, Horii A, Doi K, Harada T, Okano H, Kubo T: Expression of Musashi1, a neural RNA-binding protein, in the cochlear of young adult mice. *Neuroscience Letter* 354: 201-204, 2004
- Ieda M, Fukuda K, Kimura K, Hisaka Y, Kawaguchi H, Shimoda K, Takeshita E, Okano H, Kurihara Y, Kurihara H, Ishida J, Fukamizu A, Salamone L, Howard J.F, Ogawa S: Endothelin-1 regulates cardiac sympathetic nerve innervation in the rodent heart by controlling nerve growth factor expression. *J Clin Invest* In press, 2004
- Watanabe K, Nakamura M, Iwanami A, Fujita Y, Kanemura Y, Toyama Y, Okano H: Comparison between fetal spinal cord-and forebrain-derived neural stem/progenitor cells as a source of transplantation for spinal cord injury. *Dev Neurosci*. In Press, 2004
- Ohba H, Chiyoda T, Endo E, Yano M, Hayakawa Y, Sakaguchi M, Darnell RB, Okano HJ, Okano H: Sox21 is a repressor of neuronal differentiation and is antagonized by YB-1. *Neurosci Lett* In Press, 2004
- Mikami Y, Okano H, Sakaguchi M, Nakamura M, Shimazaki T, Okano HJ, Kawakami Y, Toyama Y, Toda M: Implantation of dendritic cells in the injured adult spinal cord results in activation of the endogenous neural/progenitor cells for denovo neurogenesis and axonal regeneration, leading to functional recovery. *J Neurosci Res* In Press, 2004
- Sakaguchi H, Yaoi T, Suzuki T, Okano H, Hisa Y, Fushiki N.: Spatiotemporal patterns of Musashi1 expression during inner ear development. *Neuroreport* In Press, 2004
- Tokunaga A, Kohyama J, Yoshida T, Nakao K, Sawamoto K, Okano H: Mapping spatio-temporal activation of Notch signaling during neurogenesis and gliogenesis in the developing mouse brain. *J Neurochem*, 2004
- Ozawa, Y., Nakao, K., Shimazaki T., Takeda, J., Akira S., Ishihara Hirano T., Oguchi, Y. and Okano, H.: Downregulation of STAT3-activation is required for presumptive rod photoreceptor cells to differentiate in the postnatal retina. *Mol.Cell.Neurosci* 26:258-270 (2004)
- Yamamoto, N. et al. A subpopulation of bone marrow cells depleted by a novel antibody, anti-Liv8, is useful for cell therapy to repair damaged liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 1110-1118 (2004).
- Nishitai, G. et al. Stress induces mitochondria-mediated apoptosis independent of SAPK/JNK activation in ES cells. *J. Biol. Chem.* 279, 1621-1626 (2004).
- Wada, T. et al. MKK7 couples stress signaling to G2/M cell cycle progression and cellular senescence. *Nat. Cell Biol.* in press (2004).
- Nishina, H. et al. (2004) [book] SAPK/JNK signaling participates in embryonic hepatoblast proliferation via a pathway different from NF- κ B-induced anti-apoptosis. in *Stem Cell and Liver Regeneration*. pp. 1-14, Springer-Verlag Tokyo, Inc., Tokyo.
- Wada, T. et al. MKK7 couples stress signaling to G2/M cell cycle progression and cellular senescence. *Nat. Cell Biol.* 6, 215-226 (2004).
- Matsuoka, M. et al. Requirement of MKK4 and MKK7 for CdCl₂- or HgCl₂-induced Activation of c-Jun NH₂-terminal Kinase in Mouse Embryonic Stem Cells. *Toxicol. Lett.* 152, 175-181 (2004).
- Sakaida, I. et al. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 40, 1304-1311 (2004).
- Furutani-Seiki, M. et al. Asystematic genome-wide screen for mutations affecting organogenesis in Medaka, *Oryzias latipes*. *Mech. Dev.* 121, 647-658 (2004).
- Kitagawa, D. et al. Genetic dissection of the formation of the forebrain in Medaka, *Oryzias latipes*. *Mech. Dev.* 121, 673-685 (2004).

- Watanabe, T. Mutations affecting liver development and function in Medaka, *Oryzias latipes*, screened by multiple criteria. *Mech. Dev.* 121, 791-802 (2004).
- Nishina H. et al. [review] Physiological roles of SAPK/JNK signaling pathway. *J. Biochem.* 136: 123-126 (2004).
- Nishina S, Azuma N, Miyauchi J and Kaneko T. Surgical treatment of recurrent juvenile xanthogranuloma of the eyelid. *Jpn J Ophthalmol*, 2004; 48:598-599.
- 東 範行. 水晶体の形成遺伝子とその変異. 日本白内障学会誌, 2004; 16:13-22.
- 東 範行. 完全ペーパーレス電子カルテの現状と問題点. 新しい眼科, 2004; 21:867-872.
- 東 範行. 未熟児網膜症. 小児科診療, 2004; 8:1217-1223.
- 鈴木由美, 川瀬英理子, 仁科幸子, 東 範行. 乳頭ぶどう腫の光干渉断層像. 臨眼, 2004; 58, 1241-1243.
- 仁科幸子, 東 範行. 臨床の場における弱視の治療方針. 日本の眼科, 2004; 75, 157-161.
- 東 範行. 視交叉の謎. 日本の眼科, 2004; 75, 447-448.
- 東 範行. 網膜の再生と移植. 日本の眼科, 2004; 75, 1223-1224.
- 仁科幸子, 東 範行. 先天白内障. 臨眼, 2004; 58 増刊, 264-267.
- 東 範行. 緑内障の原因遺伝子. 日本の眼科, 2004; 76, (印刷中)
- 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).
- K. Nagao, M. Toyoda, K. Takeuchi-Inoue, K. Fujii, M. Yamada & T. Miyashita. Identification and characterization of multiple isoforms of a murine and human tumor suppressor, Patched, having distinct first exons. *Genomics*, 85, 462-471, 2005.
- 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.
- 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.
- 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
- M Asagiri, K Sato, T Usami, S Ochi, H Nishina, H Yoshida, I Morita, E F Wagner, TW Mak, E Serfling, H 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.
- T Ishikawa, S Terai, Y Urata, Y Marumoto, K Aoyama,

I Sakaida, T Murata, H Nishina, K Shinoda, S Uchimura, Y Hamamoto, K Okita (2005) Fibroblast growth factor 2 facilitates the differentiation of transplanted bone marrow cells into hepatocytes. *Cell Tissue Res.* 14, 1-11.

S Terai, I Sakaida, H Nishina, K Okita (2005) Lesson from the GFP/CCI4 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).

H Nishina, T Katada (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

仁科幸子・鎌田裕子・平形恭子・越後貫滋子・赤池祥子・東 範行. 水平筋上方移動施術施行例の検討. *眼科臨床医報* 2005; 99: 320-325.

東 範行. 未熟児網膜症の国際分類改訂版. *日本の眼科*. 2005; 76: 1179-1180.

東 範行. 緑内障の原因遺伝子. *日本の眼科* 2005; 76: 363-354.

東 範行. 総合病院での電子カルテ化と眼科部門システム. *臨床眼科* 2005; 59: 345-353.

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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Nishina, H. et al.	SAPK/JNK signaling participates in embryonic hepatoblast proliferation via a pathway different from NF- κ B-induced anti-apoptosis.		Stem Cell and Liver Regeneration.	Springer-Verlag Tokyo, Inc.	Tokyo	2004	1-14
東 範行	未熟児網膜症の管理		眼科診療の最前線	金原出版	東京	2003	223-230
岩田 岳、 真島 行彦	インペーダー法を用いた緑内障の遺伝子解析		Bio Medical Quick Review Net	メディカルデウ	東京	2004	記事番号 4001
岩田 岳、 渋谷 昌彦	REF-1の機能解析: Applied Biosystems 1700ケミルミネッセントマイクロアレイアナライザを用いた網膜色素上皮細胞増殖因子REF-1の機能解析.		バイオビート	日本アプライドバイオシステムズ	東京	2004	
Nishina H, Katada T	The Biological Function of JNKKs (MKK4/MKK7 Knockout Mice).	Lin A	The JNK Signaling Pathway	Landes Bioscience	Texas	2005	41-49

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kamata Y, Tanabe A, Kanaji A, Kosuga M, Fukuhara Y, Li XK, Suzuki S, Yamada M, Azuma N, Okuyama T.	Long-term normalization in the central nervous system, ocular manifestations, and skeletal deformities by a single systemic adenovirus injection into neonatal mice with mucopolysaccharidosis VII.	Gene Ther	10	406-414	2003
Kanaji A, Kosuga M, Li XK, Fukuhara Y, Tanabe A, Kamata Y, Azuma N, Yamada M, Sakamaki T, Toyama	Improvement of skeletal lesions in mice with mucopolysaccharidosis type VII by neonatal adenoviral gene transfer.	Mol Ther.	8	718-725	2003