

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2006～2009
 課題番号：18390473
 研究課題名 (和文) 角膜疾患に対する遺伝子導入・細胞移植・再生医学による総合的治療
 研究課題名 (英文) Gene therapy, cellular transplantation and reproducing medicine for corneal diseases
 研究代表者 東 範行 (AZUMA, NORIYUKI)
 国立成育医療センター (研究所)・眼科・医長
 研究者番号：10159395

研究成果の概要 (和文)：角膜疾患に関する、遺伝子・細胞治療、再生医療の研究を行った。遺伝子・細胞治療では、角膜に lamellar keratotomy を行うことによる、効率の良い遺伝子導入、細胞移植の方法を開発した。これによって、ムコ多糖症モデルマウスの角膜混濁の治療に成功した。この方法は、ヒトへの応用が可能である。再生医療では、先天角膜形成異常で Pax6 遺伝子の新規変異を発見し、機能解析を行った。小児角膜組織から幹細胞を分離し、プロファイリングを行った。内皮を継代培養、株化し、機能解析を行って、これらの細胞が角膜固有の蛋白発現とポンプ機能を有することを確認したこれらの細胞は、内皮移植に有用と思われる。

研究成果の概要 (英文)：We investigated about gene therapy, cellular transplantation, reproducing medicine for corneal diseases. By lamellar keratotomy, gene induction and cellular transplantation were effectively performed into the cornea. By introducing β -glucuronidase gene or transplantation of bone marrow stem cell using this method, corneal opacity in the type VII mucopolysaccharidosis model mouse was successfully treated. The method may be applied for treatment of human corneal diseases. We identified novel Pax6 mutations in a variety of human anterior segment eye anomalies. Pluripotential stem cells were isolated from the infantile corneal tissues obtained by enucleation surgery, and cultured and profiled by gene tips. The corneal epithelia were continuously-cultivated, or strained by induction of immortal genes. In these culture cells, expression of proteins specific for the corneal epithelium was identified by immunohistochemistry and RTPCR study. Na-K ATPase dependent pumping function also was detected by Ussing chamber technique. These corneal cells may be useful for reproducing human cornea and transplantation of corneal epithelia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 18 年度	3,200,000.	960,000.	4,160,000.
平成 19 年度	3,700,000.	1,110,000.	4,810,000.
平成 20 年度	5,200,000.	1,560,000.	6,760,000.
平成 21 年度	3,000,000.	900,000.	3,900,000.
総計	15,100,000.	4,530,000.	19,630,000.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：角膜、遺伝子治療、細胞移植、再生医学、幹細胞、遺伝学

1. 研究開始当初の背景

角膜で、先天性や代謝疾患によって混濁が起これば、角膜移植が行われる。しかし、ドナー角膜が不足していることから、遺伝子治療や細胞治療、再生医療の開発が必要である。

眼組織に対する遺伝子治療は実験動物で試みられているが、大部分は網膜であり、角膜には殆ど行われていない。これは、角膜の表にボーマン膜、裏にデスメ膜の厚い基底膜が存在して、遺伝子の導入を阻止するためである。角膜内に細胞を移植した研究はない。

角膜の再生は、上皮のシート化や口腔粘膜の移植は臨床応用されつつあるが、実質や内皮の再生研究は主に動物実験に限られ、ヒトでは僅かである。ことに、ヒトの角膜内皮細胞は、他動物種と違って、出生後は殆ど分裂しないので、培養等の研究は行われていない。しかし、角膜内皮が障害される疾患は多い。角膜は免疫応答許容なので、他者からの再生組織を移植する治療を開発することは、有用と考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、再生医学と遺伝子・細胞治療の側面から角膜組織の治療法を開発することを目的とする。

再生医学では、間葉系細胞またはES細胞などを培養・分化させ、角膜を再生する技術を確認させる。最終的には、自らの細胞から作製した角膜を移植するという治療法を開発を目指す。自らの細胞から再生させた角膜を用いれば、移植後の拒絶反応という副作用を全く気にすることなく、移植が行うことが可能となる。

遺伝子・細胞治療では、角膜組織に起こる疾患に対処すべく、遺伝子や蛋白を特異的に発現させ、あるいは適切な細胞を移植することによって、角膜移植を行わずに角膜組織の治療法を開発することを目的とする。本研究により、角膜疾患の治療に大きく貢献できる。

3. 研究の方法

1) 遺伝子・細胞治療関連

① 角膜内への安全な遺伝子導入・細胞移植法の開発

角膜は表と裏に厚い基底膜があって、遺伝子導入が困難なので、表層切開を行って、実質内に直接遺伝子導入、細胞移植を行った。

② 先天ムコ多糖症の角膜混濁に対する遺伝子治療

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し、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1)の方法で遺伝子を導入した。その効果を活性

染色法を用いた組織学的方法で検討した。

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、上記1)の方法で移植した。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。

2) 再生医学関連

① 角膜先天異常の遺伝子解析

ヒトの様々な前眼部の先天異常疾患において、形態形成遺伝子Pax6の変異の解析を行った。さらに生化学検討、変異体の動物へのin vivo導入実験を行った。

② 小児眼組織から角膜前駆細胞の単離

倫理委員会の承認のもとに、網膜芽細胞種等により摘出した小児の眼球から、角膜の上皮、実質、内皮、および強膜の多分化能をもつ前駆細胞を単離した。

③ 角膜と強膜細胞のプロファイリング

ヒト角膜の性質を明らかにするために、ヒト強膜細胞およびヒト角膜実質細胞を初代培養し、細胞表面マーカー、gene chip(Affymetrix)を用いたプロファイリングを行い、発生学的に由来を同じくする角膜と強膜の違いを検討した。

④ 角膜内皮の継代培養

角膜を輪部より切除し、デスメ膜とともに角膜内皮を分離した。TypeIV collagenでコートした30mm培養皿上に培養液(DMEM/F12(GIBCO 11320), 15%FBS, 20ng/ml bFGF) 0.8mlで培養した。

⑤ 角膜内皮の株化

角膜内皮の初代培養細胞に、レトロウイルスベクターを用いて不死化遺伝子HPV16 E6E7、hTERT、cdk4、cyclinD1を、単独あるいは種々の組み合わせで導入して、不死化し株化した。

⑥ 継代培養および株化した角膜内皮細胞の機能解析

蛍光抗体免疫染色によりZo-1、Na-k ATPaseの蛋白発現が、RT-PCR法によりNa-k ATPase、keratin12、vdac3、clcn3、slc4a mRNAの発現を確認した。内皮のNa-K ATPaseのポンプ機能を検討するために、Ussing chamberを用いて電位の変化を評価した。

3) 倫理的側面

先天奇形症候群の遺伝子解析に関して

(国立成育医療センター研究所、受付番号39、平成15年承認)、ヒト細胞の培養研究に関して(国立成育医療センター研究所、受付番号25、26、27、平成15年承認、受付番号49、平成15年承認、受付番号55、平成15年11月承認、受付番号88、89、90、

91 平成 16 年承認、受付番号 55、平成 16 年 11 月承認、受付番号 146、平成 17 年承認、受付番号 156、平成 17 年承認、受付番号 197、201、平成 18 年承認、受付番号 237、238、平成 19 年承認）、既に倫理審査を受け、承認を受けている。実験動物を用いる研究については、国立成育医療センター研究所動物実験指針に準拠して研究を実施する(承認番号 2003-002,2005-003)。

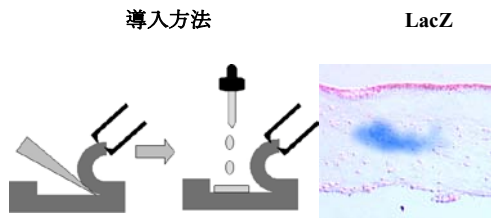
ムコ多糖症の遺伝子治療は既に承認された(承認番号 163、2005 年)。今後の研究で、動物実験で有効性があり安全性が十分に確認された場合は、倫理委員会の承認を得た後に臨床応用を検討する。

4. 研究成果

1) 遺伝子・細胞治療関連

① 角膜内への安全な遺伝子導入・細胞移植法の開発

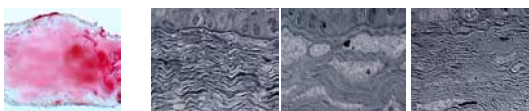
角膜は表と裏に厚い基底膜があって、遺伝子導入が困難なので、マウス角膜に表層切開を行って、実質内に直接遺伝子導入、細胞移植を行った。AxCALacZ を角膜実質内に投与した場合、投与部位に限局して LacZ 陽性細胞が認められた。これに対して、AxCAhGUS を投与した角膜では、角膜全層にわたって GUSB 陽性細胞が認められた。GFP 発現骨髄細胞を角膜実質内に移植した場合、2 週間までは、セルトラッカーの蛍光顕微鏡下観察で、細胞の生存が確認された。



② 先天ムコ多糖症の角膜混濁に対する遺伝子治療

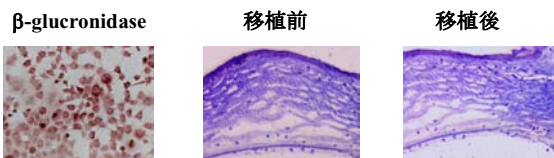
ムコ多糖症マウスの角膜には、細胞内に多量のグリコアミノグリカンが蓄積する。組織学的には、細胞内空胞として検出される。アデノウイルスを投与したマウスでは、投与一週間後にはこの細胞内空胞がほぼ完全に消失することが示された。今回の検討で、遺伝子治療による角膜病変の治療の有用性が示された。今後は、さらに長期間の効果やベクターの角膜組織への毒性などを検討し、臨床応用をめざす必要がある。

β-glucuronidase **コントロール** **導入前** **導入後**



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。現在、遺伝子発現や細胞生存の長期化を図る研究を進めており、移植細胞は骨髄由来より健全角膜実質が効率的であることが判明している。一方で、骨髄・子宮内膜・臍帯血由来の間葉系細胞を単離、培養し、細胞表面マーカー、gene chip(Affymetrix)を用いプロファイリングによって細胞の有する性格を詳細に検討し、上記の移植に適する細胞を選定した。

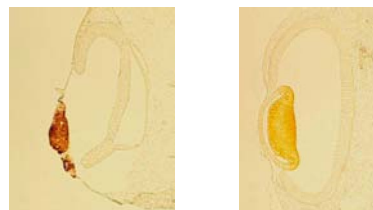


2) 再生医学関連

① 角膜先天異常の遺伝子解析

先天角膜混濁を伴うさまざまな前眼部形成不全54例中9例(家族性1家系、孤発例8例)で以下のPAX6変異がみつかった。Ex5; A509→C (アミノ酸置換E31A)、insG888 (frameshift)、3'intron 10塩基挿入、Ex5a; T20→A (V7D)、Ex11; 5'C-7'intron→T、Ex12; T1504→C (S363L)、Ex13; A1682→G (Q422R)。V7Dは3例の異なる家系にみられた。これらに遺伝子型と表現型に相関はなかった。また、他施設で発見された前眼部先天異常のPax6変異R26Gをin vivo electroporationで鶏胚に導入したところ、角膜と水晶体の分離異常を伴う前眼部形成不全が形成された。

R26G変異導入 **コントロール**

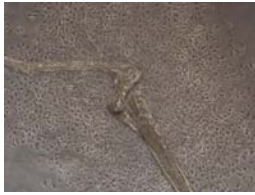


② 小児眼組織から角膜前駆細胞の単離

片眼の網膜芽細胞腫に罹患し、患眼の摘出に至った眼球を、インフォームドコンセントを得て研究試料とした。眼球の角膜上皮、実質、内皮を顕微鏡下で単離し培養した。いずれも単離・

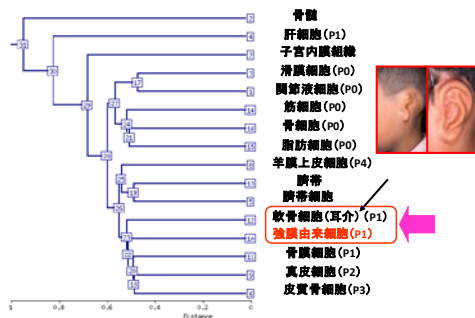
培養できたが、ことに内皮細胞は分裂、再生は不可能と考えられていたの、以下4)のように単離・継代培養に成功したのは大きな成果である。

角膜内皮前駆細胞の単離



③ 角膜と強膜細胞のプロファイリング
ヒト角膜の性質を明らかにするために、ヒト強膜細胞およびヒト角膜実質細胞を初代培養し、細胞表面マーカー、gene chip(Affymetrix)を用いたプロファイリングを行い、発生学的に由来を同じくする角膜と強膜の違いを検討した。強膜細胞に強く発現していた遺伝子は、cartilage paired class homeoprotein 1, eyes absent homolog 2, glypican 4, prostaglandin E receptor 1, secreted frizzled-related protein 2, Microfibril-associated glycoprotein-2, elastin, collagen, typeVIII, XI, XV などであり、角膜実質細胞に強く発現していた遺伝子は、neuritin 1, chemokine ligand 2, 3, 5, interleukin 8, annexin A10 などであった。これらのデータを角膜実質の再生に役立てる。

GeneChipによる全遺伝子の階層型クラスター解析



④ 角膜内皮の継代培養

摘出眼から、角膜を輪部より切除し、デスマ膜とともに角膜内皮を分離した。Type IV collagenでコートした30mm培養皿上に培養液 (DMEM/F12(GIBCO 11320), 15%FBS, 20ng/ml bFGF) 0.8mlで培養した。培養3日目には内皮細胞がデスマ膜より増殖し始め、7日目に継代し培養を継続した。P4にて、その遺伝子発現、蛋白発現、機能を解析した。RT-PCRにおいては、角膜内皮細胞に発現する、Na-k ATPase, SLC4A4, CLCN3, VDAC3の発現を認めた。DNA microarrayにおいて細胞膜能動的輸送、細胞骨格、細胞内小器官、細胞周期、細胞増殖等に関して遺伝子発現プロ

ファイルを作成した。蛋白発現は、細胞が密になり、さらに角膜内皮の形態である多角形になったday40に免疫染色を行った。Tight junctionを染色するZo-1は、多角形の細胞間に一致して染色された。Na-k ATPaseは細胞全体が染色され陽性であった。内皮機能の分析はUssing chamberを用いた。簡潔には、小孔のある直径12mmのポリエステル膜をTypeIV collagenでコートし、その膜上で内皮細胞をシート状に培養した後、Na-K ATPaseの能動輸送によって生じる電流を測定する。結果、平均183mAの電流が測定され、培養細胞は、内皮細胞としての蛋白、遺伝子発現のみならず、ポンプ機能を十分に保持していることが確認された。

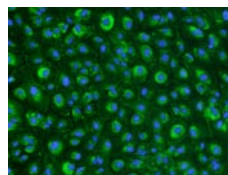
継代培養によって作成した角膜シート



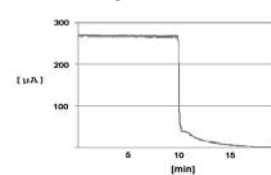
⑤ 角膜内皮の株化

摘出眼球の角膜内皮を顕微鏡下で単離し培養した。初代培養細胞にレトロウイルスベクターを用いて不死化遺伝子HPV16 E6E7, hTERT, cdk4, cyclinD1を、単独あるいは種々の組み合わせで導入し、全10種類の遺伝子導入細胞をクローニングした。全10種類(#1~#10)の遺伝子導入細胞における導入遺伝子の発現を、Western blot法で解析した。各遺伝子の蛋白発現は下記の如くであった。#1 cdk4/cyclinD1、#2 cdk4/cyclinD1/ hTERT、#3 cdk4 #4 cdk4/ hTERT、#5 cdk4/cyclinD1、#6 cdk4/cyclinD1、#7 cdk4/cyclinD1/ hTERT、#8 HPV16 E6E7、#9 HPV16 E6E7/ hTERT、#10 hTERT。このうち、#4、#5、#6は、世代を経ても分裂速度に変化がなく不死化した。全10種類の遺伝子導入細胞で、蛍光抗体免疫染色によりZo-1、Na-k ATPaseの蛋白発現が、RT-PCR法によりNa-k ATPase, keratin12, vdac3, clcn3, slc4a mRNAの発現が確認された。遺伝子導入細胞のポンプ機能はUssing chamberを用いて評価した。ウアバイン0.1mMを添加し、電位差を確認した。平均電位差は、2.0mVであった。以上の特徴から、樹立した細胞株は角膜内皮の特性を備えていることが確認できた。

角膜株の Zo-1 染色



Ussing による電流



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 90 件) 代表的な論文

Suzuki Y, Kawase E, Nishina S, Azuma N. Two patients with different features of congenital optic disc anomalies in the two eyes. Graef Arch Clin Exp Ophthalmol 244, 259~261, 2006.

Azuma N, Ishikawa K, Hama Y, Hiraoka M, Suzuki Y, Nishina S. Early vitreous surgery for aggressive posterior retinopathy of prematurity. Am J Ophthalmol 142, 636-643, 2006.

Goto K, Yamada M, Sugawara A, Itou T, Azuma N, Itou M. Small eye phenotypes observed in a human tau gene transgenic rat. Current Eye Reseach 31, 107-110, 2006.

Suzuki Y, Nishina S, Azuma N. Scleral window surgery and topical mitomycin C for nanophthalmic uveal effusion complicated by retinal failure. Graef's Arch Clin Exp Ophthalmol, 2007; 245: 755-757

Nishina S, Noda E, Azuma N. Outcome of early surgery for bilateral congenital cataracts in eyes with microcornea Am J Ophthalmol 2007; 144: 276-280.

Nishina S, Suzuki Y, Azuma N. Exdative retinal detachment following cataract surgery in Hallermann-Streiff syndrome. Graef's Arch Clin Exp Ophthalmol, 2008; 246: 453-455

Yokoi T, Nishina S, Azuma N. Glial extrusion from the regressed retinoblastoma after conservative treatment. Acta Ophthalmol Scand 2008; 86:462-464.

Hiraoka M, Nishina S, Nakagawa A, Matsuoka K, Azuma N. Case of aggressive posterior retinopathy of prematurity with atypical neovascular growth. Jpn J Ophthalmol 2008; 417-419.

Nishina S, Suzuki Y, Azuma N. Exudative retinal detachment following cataract surgery in Hallermenn-Steiff syndrome. Graefe Arch Clin Exp Ophthalmol 2008; 246:453-455.

Seko Y, Azuma N, Takahashi Y, Makino H, Morito T, Muneta T, Matsumoto K, Saito H, Sekiya I, Umezawa A. Human sclera maintains common characteristics with

cartilage throughout evolution. PLoS ONE. 2008;3(11):e3709. Epub 2008 Nov 12.

Iso M, Fukami M, Horikawa R, Azuma N, Kawashiro N, Ogata T. SOX10 mutation in Warrdenburg syndrome type II. Am J Med Genet 2008;146A:2162-2163.

Azuma N, Hida T, Kohsaka S. Hypovascular glial overgrowth from the optic nerve head in fetuses of 16 weeks gestation. Acta Ophthalmol Scand 2009; 87(3):355-357.

Kobayashi Y, Yamada K, Ohba S, Nishina S, Okuyama M, Azuma N. Ocular manifestations and prognosis of shaken baby syndrome in two Japanese children's hospitals. Jpn J Ophthalmol. 2009, 53: 384-388.

Yokoi T, Yokoi T, Kobayashi Y, Hiraoka M, Nishina S, Azuma N. Evaluation of scleral buckling for stage 4A retinopathy of prematurity by fluorescein angiography. Am J Ophthalmol. 2009;148:544-550.

Yokoi T, Hiraoka M, Miyamoto M, Yokoi T, Kobayashi Y, Nishina S, Azuma N. Vascular abnormalities in aggressive posterior retinopathy of prematurity detected by fluorescein angiography. Ophthalmology 2009; 116: 1377-1382.

Nishina S, Yokoi T, Yokoi T, Kobayashi Y, Hiraoka M, Azuma N. Effect of early vitreous surgery for aggressive posterior retinopathy of prematurity detected by fluorescein angiography. Ophthalmology 2009; 116:2442-2447.

Suzuki Y, Yokoi T, Hiraoka M, Nishina S, Azuma N. Congenital rotated macula with good vision and binocularity. Jpn J Ophthalmol 2009; 53:452-454.

Yokoi T, Nakagawa A, Matsuoka K, Koide R, Azuma N. Analysis of pathology in type I Stickler syndrome. Graefe Arch Clin Exp Ophthalmol 2009 247:715-718.

Shimizu N, Watanabe H, Kubota J, Wu J, Saito R, Yokoi T, Era T, Iwatsubo T, Watanabe T, Nishina S, Azuma N, Katada T, Nishina H.. Pax6-5a promotes neuronal differentiation of murine embryonic stem cells. Biol Pharm Bull 2009 32:999-1003.

Saito R, Yamasaki T, Nagai Y, Wu J, Kajiho H, Yokoi T, Noda E, Nishina S, Niwa H, Azuma N, Katada T, Nishina H. CrxOS

maintains self-renewal of murine embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 390: 1129-1135.

Dateki S, Kosaka K, Hasegawa K, Tanaka H, Azuma N, Yokoya S, Muroya K, Adachi M, Tajima T, Motomura K, Kinoshita E, Moriuchi H, Fukami M, Ogata T. Heterozygous OTX2 mutations are associated with variable pituitary phenotype. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95:756-764.

Yokoi T, Yokoi T, Kobayashi Y, Nishina S, Azuma N. Risk Factors for Recurrent Fibrovascular Proliferation in Aggressive Posterior Retinopathy of Prematurity after Early Vitreous Surgery. *Am J. Ophthalmol* 2010, in press.

Wu J, Kubota J, Hirayama J, Nagai Y, Nishina S, Yokoi T, Asaoka Y, Seo J, Shimizu N, Kajiho H, Watanabe T, Azuma N, Katada T, Nishina H. p38 mitogen-activated protein kinase controls a switch between cardiomyocyte and neuronal commitment of murine embryonic stem cells by activating MEF2C-dependent BMP2 transcription. *Stem Cells Dev* 2010, in press.

東 範行. 重症未熟児網膜症に対する早期硝子体手術. *日本の眼科* 77:1113-1120, 2006.

東 範行. 重症未熟児網膜症の早期硝子体手術. *日眼会誌* 110: 822-829, 2006.

東 範行. 重症未熟児網膜症の治療. *日本小児科学会雑誌* 110: 1616-1623, 2006.

東 範行. 未熟児網膜症の早期手術. *眼科診療プラクティス みんなの硝子体手術*. 文光堂 2007; 199-200.

東 範行: 血管成長のガイドランス. *日本の眼科* 2007; 78: 599-600

東 範行: 網膜浮腫の発生機序と薬物治療. *日本の眼科* 2007; 78: 1639~1640

東 範行: 黄斑を形成する遺伝子システムと再生医療への応用. *医学のあゆみ* 2008;226:965-972.

伊藤-清水里美・仁科幸子・赤池祥子・越後貫滋子・東 範行: 液晶視力表システムチャート SC-2000 によるロービジョン児のコントラスト視力測定と遮光レンズの効果. *眼臨紀* 2010 ; 3:70-73.

伊藤-清水里美・仁科幸子・赤池祥子・越後貫滋子・東 範行: 国立成育医療センターにおける小児ロービジョンケアの特徴. *眼臨紀* 2010 ; 3: in press.

東 範行: 未熟児網膜症の最新の医療. *医療* 2010;62: In press

東 範行: 未熟児網膜症の診断と治療. *日本眼科医会* 2010; In press.

平岡美依奈・東 範行: 未熟児網膜症. *Current Therapy* 2009;27:902-906.

東 範行: 未熟児網膜症診療—最近の考え方. *あたらしい眼科* 2009; 26: 433.

東 範行: II型/Aggressive Posterior ROPに対する硝子体手術の適応と時期. *あたらしい眼科* 2009; 26: 473-480.

Nagayoshi K, Ohkawa H, Yorozu K, Higuchi M, Higashi S, Kubota N, Fukui H, Imai N, Gojo S, Hata J, Kobayashi Y, Umezawa A. Increased mobilization of c-kit+ Sca-1+ Lin- (KSL) cells and colony-forming units in spleen (CFU-S) following de novo formation of a stem cell niche depends on dynamic, but not stable, membranous ossification. *J Cell Physiol.* 208(1):188-194, 2006.

Toyoda M, Cui CH, Umezawa A. Myogenic transdifferentiation of menstrual blood-derived cells. *Acta Myol.* 26(3):176-178, 2007.

Nishiyama N, Miyoshi S, Hida N, Uyama T, Okamoto K, Ikegami Y, Miyado K, Segawa K, Terai M, Sakamoto M, Ogawa S, Umezawa A. The significant cardiomyogenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Stem Cells.* 25(8):2017-2024, 2007.

Okamoto K, Miyoshi S, Toyoda M, Hida N, Ikegami Y, Makino H, Nishiyama N, Tsuji H, Cui CH, Segawa K, Uyama T, Kami D, Miyado K, Asada H, Matsumoto K, Saito H, Yoshimura Y, Ogawa S, Aeba R, Yozu R, Umezawa A. 'Working' cardiomyocytes exhibiting plateau action potentials from human placenta-derived extraembryonic mesodermal cells. *Exp Cell Res.* 313(12):2550-2562, 2007.

Toyoda M, Takahashi H, Umezawa A. Ways for a mesenchymal stem cell to live on its own: maintaining an undifferentiated state ex vivo. *Int J Hematol.* 86(1):1-4, 2007.

Cui CH, Uyama T, Miyado K, Terai M, Kyo S, Kiyono T, Umezawa A. Menstrual blood-derived cells confer human dystrophin expression in the murine model of Duchenne muscular dystrophy via cell fusion and myogenic transdifferentiation. *Mol Biol Cell*. 18(5):1586-1594, 2007.

Sugiki T, Uyama T, Toyoda M, Morioka H, Kume S, Miyado K, Matsumoto K, Saito H, Tsumaki N, Takahashi Y, Toyama Y, Umezawa A. Hyaline cartilage formation and enchondral ossification modeled with KUM5 and OP9 chondroblasts. *J Cell Biochem*. 100(5):1240-1254, 2007.

Yamada Y, Sakurada K, Takeda Y, Gojo S, Umezawa A. Single-cell-derived mesenchymal stem cells overexpressing Csx/Nkx2.5 and GATA4 undergo the stochastic cardiomyogenic fate and behave like transient amplifying cells. *Exp Cell Res*. 313(4):698-706, 2007.

Miyado K, Yoshida K, Yamagata K, Sakakibara K, Okabe M, Wang X, Miyamoto K, Akutsu H, Kondo T, Takahashi Y, Ban T, Ito C, Toshimori K, Nakamura A, Ito M, Miyado M, Mekada E, Umezawa A. The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(35):12921-12926, 2008.

Hida N, Nishiyama N, Miyoshi S, Kira S, Segawa K, Uyama T, Mori T, Miyado K, Ikegami Y, Cui C, Kiyono T, Kyo S, Shimizu T, Okano T, Sakamoto M, Ogawa S, Umezawa A. Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells. *Stem Cells*. 26(7):1695-1704, 2008.

Kami D, Shiojima I, Makino H, Matsumoto K, Takahashi Y, Ishii R, Naito AT, Toyoda M, Saito H, Watanabe M, Komuro I, Umezawa A. Gremlin enhances the determined path to cardiomyogenesis. *PLoS One*. 3(6):e2407, 2008.

Miyagawa Y, Okita H, Nakajima H, Horiuchi Y, Sato B, Taguchi T, Toyoda M, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata J, Umezawa A, Kiyokawa N. Inducible expression of chimeric EWS/ETS proteins confers Ewing's family tumor-like phenotypes to human mesenchymal progenitor cells. *Mol Cell Biol*. 28(7):2125-2137, 2008.

Tanigawa M, Miyamoto K, Kobayashi S, Sato M, Akutsu H, Okabe M, Mekada E, Sakakibara K, Miyado M, Umezawa A, Miyado K. Possible involvement of CD81 in acrosome reaction of sperm in mice. *Mol Reprod Dev*. 75(1):150-155, 2008.

Kawakita A, Sato K, Makino H, Ikegami H, Takayama S, Toyama Y, Umezawa A. Nicotine acts on growth plate chondrocytes to delay skeletal growth through the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *PLoS One*. 3(12):e3945, 2008.

Seko Y, Azuma N, Takahashi Y, Makino H, Morito T, Muneta T, Matsumoto K, Saito H, Sekiya I, Umezawa A. Human sclera maintains common characteristics with cartilage throughout evolution. *PLoS One*. 3(11):e3709, 2008.

Nagata S, Toyoda M, Yamaguchi S, Hirano K, Makino H, Nishino K, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Nakagawa M, Yamanaka S, Akutsu H, Umezawa A, Tada T. Efficient reprogramming of human and mouse primary extra-embryonic cells to pluripotent stem cells. *Genes Cells*. 14(12):1395-1404, 2009.

Takahashi H, Toyoda M, Birumachi J, Horie A, Uyama T, Miyado K, Matsumoto K, Saito H, Umezawa A. Shortening of human cell life span by induction of p16ink4a through the platelet-derived growth factor receptor beta. *J Cell Physiol*. 221(2):335-342, 2009.

Makino H, Toyoda M, Matsumoto K, Saito H, Nishino K, Fukawatase Y, Machida M, Akutsu H, Uyama T, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Fujino T, Ishikawa Y, Nakamura T, Umezawa A. Mesenchymal to embryonic incomplete transition of human cells by chimeric OCT4/3 (POU5F1) with physiological co-activator EWS. *Exp Cell Res*. 315(16):2727-2740, 2009.

Akutsu H, Miura T, Machida M, Birumachi JI, Hamada A, Yamada M, Sullivan S, Miyado K, Umezawa A. Maintenance of pluripotency and self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of tetraspanin CD9. *Differentiation*. 78(2-3):137-142, 2009.

Miyagawa Y, Okita H, Itagaki M, Toyoda M, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata J, Umezawa A, Kiyokawa N. EWS/ETS regulates the expression of the Dickkopf family in Ewing family tumor cells. *PLoS One*. 4(2):e4634, 2009.

〔学会発表〕（計 120 件）代表的な発表
東 範行. 視覚器の形態形成と再生医療. 医学学会総会 2007.4.

東 範行. 眼の形態形成遺伝子. 東京医科歯科大学難病治療研究所セミナー. 東京 2007.5

東 範行. 眼の形態形成遺伝子. 東京大学医

科学研究所セミナー. 東京 2007.7
東 範行. 眼の発生と先天異常 第 112 回日本眼科学会総会 生涯教育講座 2008. 4.

東 範行. ファイザー賞受賞講演 眼の形態形成遺伝子 第 62 回日本臨床眼科学会, 東京, 2008.10

東 範行. 網膜・神経形成における Pax6 の選択スプライスの働き 第 1 回 Retina Research Meeting 東京 2008.11

世古裕子. 近視発症の分子機構 —ヒト強膜前後軸の網羅的遺伝子発現解析から. 第 24 回日本眼内レンズ屈折手術学会総会シンポジウム 東京 2009.6.

Azuma N. Role of the Pax6 gene in the formation of highly organized eye architectures. Retinal Degeneration and Stem Cells. OIST Okinawa 2009.11.

〔図書〕(計 8 件) 代表的な図書

東 範行. 今日の小児医療指針 第 14 版 25 眼疾患 —先天硝子体、網膜疾患 医学書院 2008

東 範行: 眼疾病学 丸尾敏夫・栗屋忍 視能矯正学 改訂第2版増補 金原出版 125-137 2008.

東 範行・平岡美依奈: 未熟児網膜症眼底アトラス. エルゼヴィア 2009.

東 範行: 未熟児網膜症. 視能訓練士用語解説辞典 メディカル葵 2010; In press.

東 範行: 網膜裂孔. 視能訓練士用語解説辞典 メディカル葵 2010; In press.

〔産業財産権〕

○出願状況 なし

○取得状況 なし

〔その他〕

学会開催 第 65 回日本弱視斜視学会総会・第 34 回日本小児眼科学会総会 合同学会 東京 2008.7.4-5.

第 4 回 Pfizer Ophthalmic Award Japan 受賞 2009.11

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東 範行 (AZUMA NORIYUKI)
国立成育医療センター (研究所)・眼科・医長
研究者番号: 1 0 1 5 9 3 9 5

(2) 研究分担者

仁科 幸子 (NISHINA SACHIKO)
国立成育医療センター (研究所)・眼科・医員
研究者番号: 4 0 2 3 7 9 5 4

横井 匡 (YOKOI TADASHI)
国立成育医療センター (研究所)・眼科・レジデント
研究者番号: 8 0 5 1 4 0 2 5

梅澤 明弘 (UMEZAWA AKIHIRO)
国立成育医療センター (研究所)・生殖・細胞医療研究部・部長
研究者番号: 7 0 2 1 3 4 8 6

秦 順一 (HATA JYUNICHI)
国立成育医療センター (研究所)・名誉総長
研究者番号: 9 0 0 5 1 6 1 4

石川 薫 (ISHIKAWA KAORU)
N T T 北関東病院・眼科・非常勤
研究者番号: 1 0 3 3 8 1 2 1

奥山 虎之 (OKUYAMA TORAYUKI)
国立成育医療センター (研究所)・生殖・細胞医療研究部・共同研究員
研究者番号: 4 0 1 7 7 1 9 2

(3) 連携研究者 該当者なし