

第101回 日本眼科学会総会 宿題報告IV

眼の細胞生物学

網膜の変性・再生のメカニズムの解明と臨床応用への展望

梶原 一人

スタンフォード大学医学部神経生物学教室/慶應義塾大学医学部眼科学教室

協同研究者

岡野 栄之, 金子由樹子, 篠崎 尚史, Eric M Shooter, 高橋 伸子

樋田 哲夫, 平形 明人, 福田 稔(50音順)

要 約

網膜視神経障害による失明に対する治療法の確立には、失われた網膜神経細胞を補った上で機能的シナプスを作らせ、さらに中枢との連絡を回復させなければならない。このための基礎知識を得ることを目的として、成体でもほぼ完全な網膜再生が起こるアカハライモリを用いて、網膜変性・再生のメカニズムを解析した。眼球摘出・再移植後の網膜変性過程では、アポトーシスによる神経網膜の変性と貪食による変性細胞の処理、貪食細胞の挙動について詳述した。これに引き続き網膜再生過程においては、神経前駆細胞の誕生について、リボ核酸(RNA)結合タンパクである Musashi の発現について解析するとともに、前神経遺伝子群のクローニングと発現パターンの解析を行った。これらの結果から、網膜色素上皮細胞の増殖が起こると間もなく娘細胞に Musashi が発現さ

れ、網膜神経細胞の分化程度に応じた一部の前神経遺伝子(proneural gene)が発現されることが明らかとなった。網膜色素上皮細胞から網膜神経細胞への分化転換に必要な遺伝子群を明らかにすることにより、哺乳類などの高等脊椎動物にも網膜再生を起こさせるための基礎的知識や、網膜移植を成功させるための基礎的知識が得られるものと考えられた。(日眼会誌 101:987-1000, 1997)

キーワード：アカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*), 分化転換(transdifferentiation), 不均等分裂, Musashi, 前神経遺伝子(proneural gene)

Elucidation of the Mechanism of Retinal Degeneration and Regeneration and the Prospects for its Clinical Application

Kazuto Kajiwara

Department of Neurobiology, Stanford University School of Medicine

Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine

Abstract

In order to obtain the basic knowledge necessary to develop therapeutical intervention for blindness due to the damaged retina and optic nerve, the mechanism of retinal degeneration and regeneration in an amphibian model, *Cynops pyrrhogaster*, was studied. In the retinal degenerative process

following enucleation and reimplantation of the eye ball, evidence was found for active cell death of neural retinal cells. As the degeneration proceeded, Musashi, an ribonucleic acid (RNA)-binding protein, started its expression in the daughter cells of proliferating retinal pigment epithelium (RPE)

(平成9年8月18日受付,平成9年8月25日受理)

Reprint requests to: Kazuto Kajiwara, M.D. Department of Neurobiology, Fairchild Building, D 225, Stanford, CA 94305 USA

(Received August 18, 1997 and accepted August 25, 1997)

cells. messenger RNA (mRNA) expression of proneural genes with basic helix-loop-helix motif was then detected in the newly developing retina. These results suggest that transdifferentiation of RPE cells to neural retina involves at least partial cascade, if not entirely, of neural induction from uncommitted ectodermal tissue. Search for genes that are required for transdifferentiation of RPE cells to neural retinal cells, in addition to those mentioned above, will provide the basic knowledge

for successful retinal transplantation and retinal regeneration in higher vertebrates. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 987-1000, 1997)

Key words: Redbelly newt (*Cynops pyrrhogaster*), Transdifferentiation, Asymmetric cell division, Musashi, Proneural gene

I 緒 言

網膜視神経疾患では神経細胞が障害され、多くの場合、それは不可逆的な変化として恒久的な視機能の低下・消失を残す。特に変性疾患の場合は原因さえ不明なものが多く、予防法確立のために、まずその原因を解明することは急務である。近年の分子生物学的研究手法の発達と数多くの研究者の努力により、網膜色素変性^{1)~15)}と類縁疾患^{16)~21)}を含む一部の遺伝性網脈絡膜変性疾患^{22)~29)}、停止性夜盲^{30)~34)}、視神経症³⁵⁾、緑内障³⁶⁾の原因遺伝子が明らかにされてきた。神経細胞に恒久的な機能障害や進行性の変性をもたらすこれらの疾患のうち、これまでに原因遺伝子が同定された代表的疾患を表1にまとめた。この中には多遺伝子性疾患¹²⁾¹³⁾も含まれており、診断は必ずしも容易ではないが、原発緑内障のように慢性進行性であり、かつ治療法の存在する疾患に対して、原因遺伝子

の究明は非常に直接的な意義がある。すなわち、軽症または全く無症状である罹患者を遺伝子診断によって早期発見することができれば、従来の治療法を駆使することにより、長期視機能予後という観点からすれば治療成績は著しく向上すると考えられるからである。しかし、網膜視神経の変性疾患には有効な治療法がなく、進行予防という点では将来の遺伝子治療に望みがかかるが、現在のところ残念ながら遺伝子診断は直接的に治療法には結びつかない。また、予防的治療法が存在しても、神経細胞が二度と再生しない細胞である限り、神経細胞が障害を受ける疾患では、失われた視機能を回復するという根本的治療は存在し得ない。

このような疾患に対して根治的治療を考えるとすれば、三つの重要な目標を達成しなければならない。すなわち、①失われた網膜神経細胞を何らかの形で補うこと、②新しい神経細胞がシナプスを介したネットワークを

表1 神経細胞に機能障害や変性を来す代表的な遺伝性眼疾患の原因遺伝子

原因遺伝子座	タンパク産物の機能	表現型
rhodopsin	フォトトランスダクション	常染色体優性遺伝型網膜色素変性症 ¹⁻⁷⁾ 常染色体劣性遺伝型網膜色素変性症 ¹⁰⁾ 常染色体優性遺伝型先天停止性夜盲 ³⁰⁾
peripherin/RDS	視細胞外節円盤構造タンパク	常染色体優性遺伝型網膜色素変性症 ⁸⁻⁹⁾ 常染色体優性遺伝型白点状網膜炎 ¹⁶⁾ 常染色体優性遺伝型黄斑部変性症 ¹⁷⁻²⁰⁾ 二遺伝子性網膜色素変性症 ¹²⁻¹³⁾
ROM 1	視細胞外節円盤構造タンパク	二遺伝子性網膜色素変性症 ¹²⁻¹³⁾
β -PDE	フォトトランスダクション	常染色体劣性遺伝型網膜色素変性症 ¹¹⁾ 常染色体優性遺伝型先天停止性夜盲 ³¹⁾
α -PDE	フォトトランスダクション	常染色体劣性遺伝型網膜色素変性症 ¹⁴⁾
α -cGMP-gated channel protein	フォトトランスダクション	常染色体劣性遺伝型網膜色素変性症 ¹⁵⁾
α -rod transducin	フォトトランスダクション	常染色体優性遺伝型先天停止性夜盲 ³²⁾
ATP-binding cassette (ABC) transporter	細胞内輸送	Stargardt 病 ²¹⁾
Arrestin (S-antigen)	フォトトランスダクション	小口病 ³³⁾
Rhodopsin kinase	フォトトランスダクション	小口病 ³⁴⁾
CHM	細胞内輸送	コロイデレミア ²⁷⁾
myosin type VII	鞭毛運動	Usher 症候群 ²⁸⁻²⁹⁾
OTA	アルニチン・アミノトランスフェラーゼ	脳回転状網脈絡膜萎縮 ²²⁻²³⁾
Norrie gene	ムチン?	ノリエ病 ²⁴⁻²⁶⁾
mitochondrial DNA	酸化的りん酸化	Leber 視神経症 ³⁵⁾
TIGR	(不明)	若年性緑内障と原発性開放隅角緑内障 ³⁶⁾

形成し、最終的に中枢との接続を回復すること、③回復したネットワークを通じて、中枢が利用することのできる有用な視覚情報として入力信号を統合して送受信するシステムを回復することである。単純な網膜神経細胞の移植によっても第一の目標だけは達成されるが、移植細胞が移植先でシナプスを介したネットワークを形成せず、二番目以降の目標は達せられない。何故ならば、神経細胞は細胞分裂と分化という過程の中で隣接あるいは遠隔の他の神経細胞との役割分担を明確に確立しながらお互いを認識し合い、シナプスを介してネットワークを形成し、さらに不要な情報を与えるネットワークを除去して有用な情報だけを残す洗練されたシステムを発達の過程で構築して行くからである。したがって、①の目標は②、③の目標と切り離して考えることはできず、個体発生に極めて近い状況を再現することができなければ、これらすべてを達成することはできないのである。しかし、高度に機能分化した眼球組織の中であって、神経網膜だけにそのような現象を起こさせることは可能なのであろうか。

イモリやサンショウウオなどの一部の両生類では、成体においても神経網膜を切除、または変性させることにより、新しい神経網膜組織を再生させることができる。この現象は、非神経細胞である網膜色素上皮細胞(RPE)からすべての神経網膜細胞が作られる分化転換(trans-differentiation)³⁷⁾という極めて稀な現象であるとともに、これら限られた種に固有に見られる現象であり、これらの種が下等だからという単純な理由では説明できない(より下等な種でも、同様な現象を見ることはできない。また、魚類においては、rod precursor cell という細胞が網膜周辺部で継続的に分裂し眼球の成長に伴って神経網膜の容積を補っているが、神経網膜自体が失われれば新しい神経細胞を作ることはできず、全く異なる現象と考えられている)。この再生は、形態学的な再生にとどまらず、機能的な再生であり、上記のすべての目標を達成して視機能を回復する。したがって、ここに見られる網膜再生のメカニズムを解明することは、成体において網膜の個体発生を再現させる、すなわち機能的な再生を起こさせるためには何が必要なのかという疑問に答えることになり、不可逆的な網膜視神経障害に対する治療法開発に有用な基礎的知識を与えるものと考えられる。

これらの一部の両生類における網膜の再生という現象は一世紀以上昔から知られていた³⁸⁾。多くの研究が1950年代から70年代にかけて行われたが(Stone³⁹⁾⁴⁰⁾、Keefe^{41)~44)}ら)、新しく作られる神経網膜細胞の起源についての論争が一段落した後は、このモデルが神経発生学や生物学のテーマとして扱われることが非常に少なくなった。それは、同じ両生類でもアフリカツメガエルのように純系に近い状態で飼育することが難しく、遺伝的に異質な動物を用いなければならぬことから遺伝学上の

アプローチが困難であることに起因し、このことは、その後の分子生物学を用いた研究を大変難しくした。現在でも、アカハライモリやこれに近い種の遺伝子DNA配列の登録数は数えるほどに過ぎず、また当種の神経系で用いることのできる抗体も非常に少ない。「材料(実験動物)の手に入りやすさ」、「均一性」、「道具(抗体やDNAプローブ)の充実性」という条件からすれば、研究者が対象とするには無理の多い動物である。しかしながら成体においても、すべての網膜神経細胞が失われた後に、新しい神経細胞が作られ網膜が再生するという現象は、これら非常に限られた動物種にしかみられない現象である以上、神経発生学的学問上の興味からばかりでなく、失明救済という眼科学上の研究対象として、この動物モデルは我々眼科医にとって非常に重要な意味を持つ。

今回、アカハライモリ(*Cynops pyrrhogaster*)の成体を用いて、網膜再生過程とそれに先行する変性過程の変化を検討した。変性過程については、RPEによる変性網膜細胞の処理に関して形態学的観察を中心に行った。網膜再生過程については、RPEから網膜神経細胞の前駆細胞が作られる時期において、前駆細胞の誕生に深く関わっていると思われるリボ核酸(RNA)結合タンパクであるMusashiの発現を検討した。また、上述の研究方法論上の困難を少しずつでも埋め合わせて行くため、再生過程の眼球の相補性デオキシリボ核酸(cDNA)ライブラリーの作製により、将来の各種遺伝子のクローニングの準備を整え、実際に神経前駆細胞特異的遺伝子である前神経遺伝子(proneural gene)に属するいくつかの遺伝子のクローニングに成功し、その発現パターンの解析に取りかかった。本稿では、これらの研究過程から得られた基礎的結果を報告し、考察を加えた。

II 実験方法

組織切片の作製：アカハライモリ成体を0.3% MS-222により麻酔し、片眼を摘出後直ちに再移植した。正常眼および、一定時間経過後(術後2, 5, 8, 10, 12, 16, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90日)の眼球を同様の方法で摘出後、4%パラホルムアルデヒドで4°C一晩または1.25%グルタルアルデヒドで3時間固定後、パラフィンまたはエポキシ樹脂包埋し、6μmまたは1μm厚の切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色およびトルイジンブルー染色標本を用いて光学顕微鏡観察を行った。

免疫組織化学：上記と同様の方法で眼球を摘出後、液体窒素でオキシテトラサイクリン(OTC)中に冷凍し、-80°Cで保存した。12~16μmの凍結切片を作製し、4%パラホルムアルデヒドで10分間固定し、1×リン酸緩衝液(PBS)で10分間3回洗浄した。10%ヤギ血清処理(30分)、1×PBS洗浄(10分間3回)後、ラット抗マウスMusashiモノクローン抗体(H Okano)を4°Cで16時

間反応させた(1:100), 1×PBS洗浄(10分間3回)後, 抗ラットフルオレセイン・イソチオシアネイト(FITC)二次抗体(Boehringer Mannheim)を室温で1時間反応させた(1:250), 1×PBS洗浄(10分間3回)後, 蛍光顕微鏡(Nikon)で観察した。

ゲノム DNA ラダーの検出: 正常および術後1, 2, 3, 4, 6日の各5眼球を摘出し, 液体窒素中で乳鉢を乳棒を用いてホモゲナイズ後, DNA ZOL(GIBCO)と9,000 rpm×15分遠沈によってDNAを抽出後, 100%エタノールによって沈澱させた, 10 mM Tris-HCl(pH 7.6)/1 mM Ethylene diamine tetraacetic acid(1×TE)により約1 mg/mlに溶解後, 1%アガロースゲル上で電気泳動し, エチジウムブロマイドで染色し観察した。

cDNA ライブラリーの作製: 正常および術後20日と30日のアカハライモリ眼球から Pharmacia 社のプロトコールに従って得たメッセンジャーRNA(mRNA)の5 μgを鋳型とし, oligo d(T)プライミングにより λZAP Express フェージをベクターとして cDNA ライブラリーを作製した(Stratagene 社のプロトコールに従った)。

cDNA プロブの作製: ラット, マウス, アフリカツメガエル⁴⁵⁾の *neurogenin* 遺伝子 bHLH(basic helix-loop-helix)領域のアミノ酸配列(センス側: KTRRVKA, アンチセンス側: NYIWALS)を基にそれぞれ *Bam* HI と *Eco* RI 制限酵素認識配列を付加した完全縮重プライマー1対をデザインした。上記の術後20日と30日の眼球 cDNA ライブラリーを鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により下記の条件でアカハライモリの *neurogenin* 相同遺伝子の bHLH 領域を増幅した: 混合溶液総量 50 μl 中にテンプレート DNA 20 ng/μl, 各プライマー2.0 pM, dNTP(各0.2 mM), 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl(pH 8.6), 0.1 mg/ml BSA, 10% DMSO(dimethyl-sulfoxide), 0.1 μl AmpliTaq(Perkin Elmer Cetus 社)(変性温度 94°C×30秒, アニリング温度 55°C×30秒, 伸長温度 72°C×30秒, 35 サイクル後, 72°C×10分間で伸長を終了), 増幅産物を *Bam* HI と *Eco* RI によって切断後, 3%アガロース・ゲル電気泳動により単離し, RPC カラム(Schleicher & Schuell 社)により精製後, pBlueScript SK(-)をベクターとしてライゲーションを行った(Takara 社 DNA Ligation Kit Ver. 1 のプロトコールに従った), 通常の Blue/White selection により陽性と思われるクローンを無作為に選び, DNA mini preparation を行って, サブクローニングした PCR 産物について T3, T7 プライマーを用いて dideoxy 法により塩基配列を確認した(United States Biochemical 社のプロトコールに従った)。

プロブの放射性同位元素による標識: 上記 PCR 条件に, 以下の変更を加えて標識を行った。鋳型 DNA として, 上記クローンのうち *neurogenin* 相同アミノ酸配列

をもつものを 2 ng/μl 用いた。dNTP 混合液からは dCTP を削除し, 反応液中に 100 μCi の α-³²P dCTP を加えた。また, サイクルは 20 回で終了した。反応終了後, MicroSpin Column(Pharmacia 社)により未反応の放射性同位元素を除去した。

ライブラリー・スクリーニング: 術後20日と30日の眼球ライブラリーから合計100万クローンを上記プロブを用いてスクリーニングした(Stratagene 社のプロトコールに従った)。陽性クローンに対し, さらに2回の単離を行い, 最終的に陽性と判断されたクローンは *in vivo* excision によりプラスミドとして切り出した(Stratagene 社のプロトコールに従った)。

cRNA プロブの作製: 長さが約1 kb となるように適当な制限酵素でプラスミド・クローンを直鎖化し, Boehringer Mannheim 社のプロトコールに従って digoxigenin 標識センス, アンチセンスの cRNA プロブを作製し, 1%アガロース・ゲル上で確認した。

In situ hybridization: 免疫組織化学の項で述べた方法で眼球切片を準備, 固定後, アセチル化(0.15 M NaCl, 1.5% トリエタノールアミン, 0.3% 無水酢酸混合溶液, 室温10分)を行い, 1×PBS で洗浄後, 42°C で prehybridization(1時間), hybridization(16時間)を行った。Prehybridization, hybridization とともに以下の溶液組成のものを 50% ホルムアミド混合液として用いた: 1.2 M NaCl, 20 mM Tris-HCl(pH 7.6), 2% BSA, 2 mM EDTA, 20% dextran sulfate, 0.05% sodium pyrophosphate, 0.04% Ficoll(type 400), 0.04% polyvinylpyrrolidone, 0.1 mg/ml Yeast total RNA, 0.1 mg/ml Yeast tRNA, 0.2 mg/ml サケ精巢 DNA, 0.1 mg/ml poly(dA), 0.02 mg/ml DTT。

発色反応: hybridization 終了後, 55°C の 1×SCC 溶液(50% ホルムアミド)中で洗浄し(20分4回), さらに室温 TBS 溶液(0.1 M Tris-HCl pH 7.5, 0.15 M NaCl)中で10分間洗浄後, ブロッキングと抗 digoxigenin 抗体反応を行った。ブロッキングには TBS 溶液に 3% BSA, 0.3% Triton X-100 を混合し, また, 抗原抗体反応には BSA 濃度を 1% に落としアルカリフォスファターゼ標識抗 digoxigenin 抗体(Boehringer Mannheim 社)を希釈濃度 1:5,000 で混合し, 4°C で 16 時間反応させた。TBS 溶液で 10 分間 3 回洗浄後, アルカリ緩衝液(0.1 M Tris-HCl pH 9.5, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl₂)中で 0.45% Nitroblue tetrazolium(NBT), 0.35% 5-bromo-

表2 眼球摘出・再移植後の過程

1. 急速な網膜変性
2. 網膜色素上皮細胞の増殖
3. 神経前駆細胞の誕生
4. 神経前駆細胞から神経細胞への分化
5. 網膜層構造形成の完了

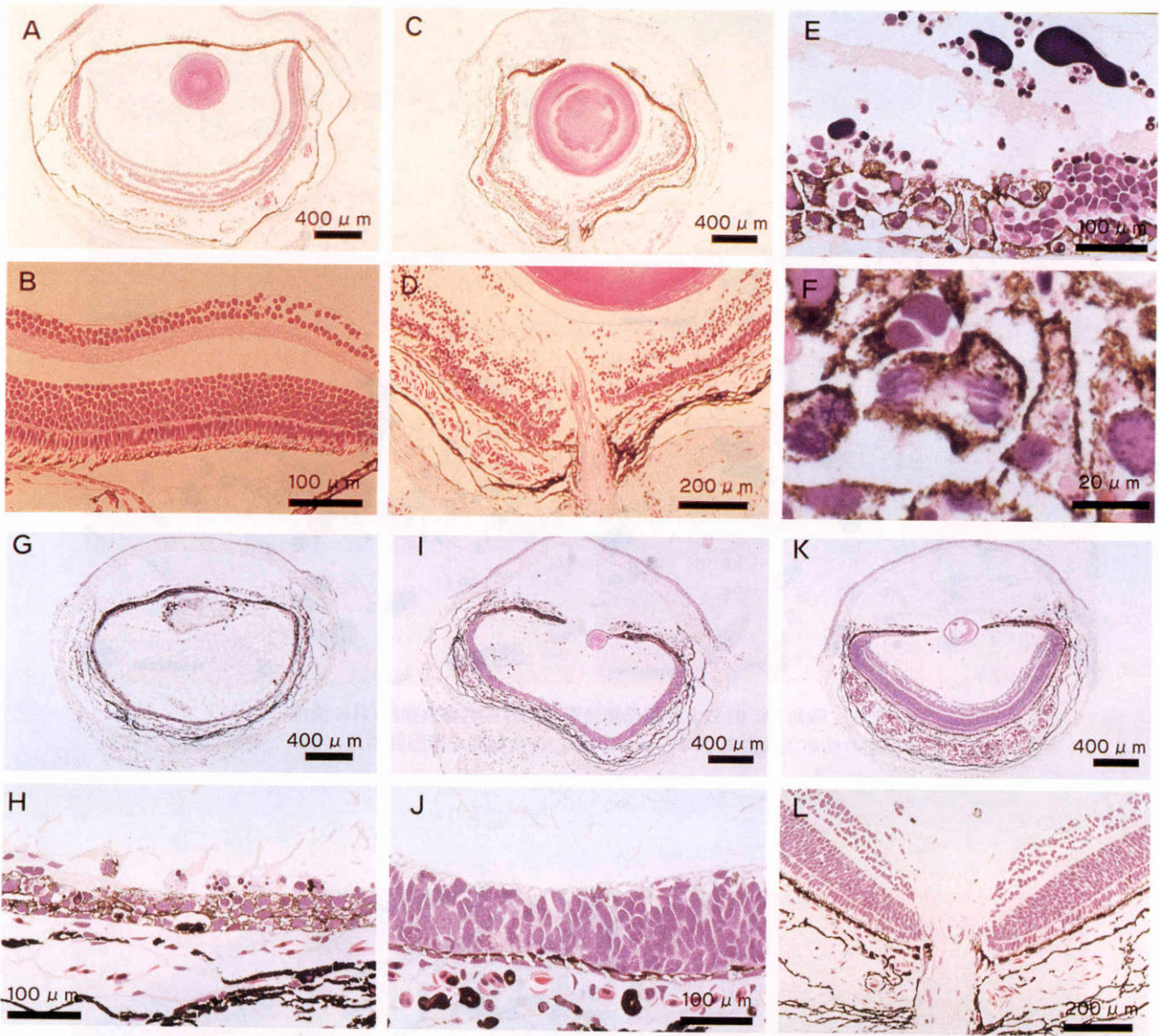


図1 眼球摘出・再移植後の網膜変性・再生過程の組織学的変化(ヘマトキシリン・エオジン, HE 染色).

A, B: 正常アカハライモリ眼球. C, D: 術2日後. 急速な神経網膜の変性が見られる. 神経節細胞層はほとんど消失し内顆粒層も多くの細胞が変性している. E, F: 術10日後. RPEは極性を失い増殖を開始している. G, H: 術20日後. RPEの増殖が進み4層から5層構造となっている. I, J: 術30日後. この時期増殖中のRPEは急速に色素を失いはじめ, 神経網膜への分化が始まっているものと考えられる. しかし, 最下層ではまだ細胞分裂が続いており, さらにその下には豊富な色素を含み本来のRPEの形態を取り戻した細胞が, 平坦な一層を形成している. 虹彩からは水晶体が再生してきている. K, L: 術40日後. 網膜特有の層構造が発達し, 視神経も明瞭に確認される. この時期神経網膜の層構造はほぼ完成するが, 正常網膜よりも厚く, 視機能はまだ回復していない. このあと余分な神経細胞が間引かれて正常な厚さに収束し, さらに20~30日かかって中枢との接続が整い, 視機能が回復する.

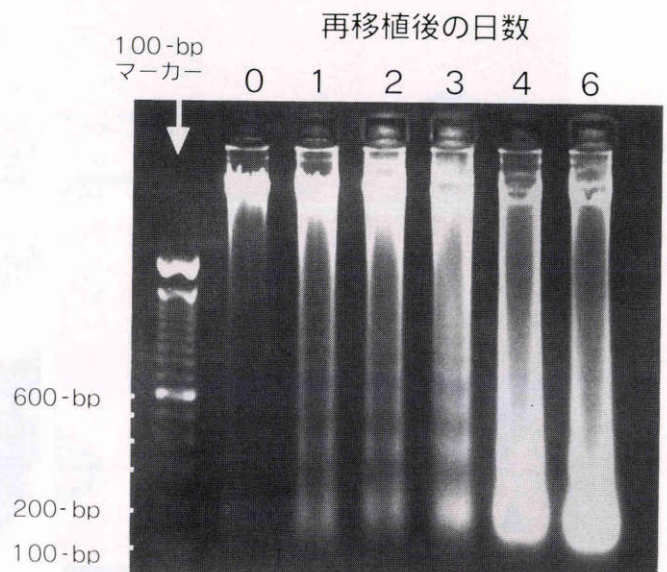


図2 デオキシリボ核酸(DNA)の断片化. 術翌日から, 約180-bpの整数倍の大きさに断片化されたゲノムDNAが, いわゆるDNA Ladderとなって現れている.

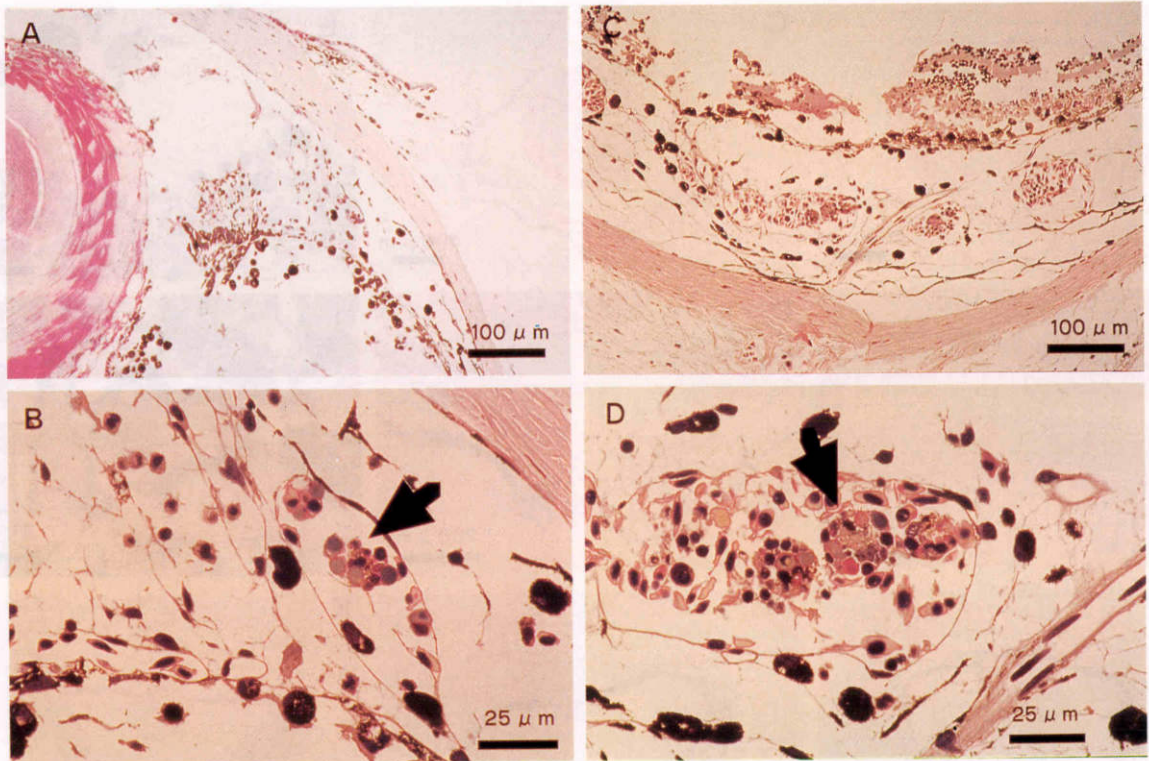


図3 隅角(A, B)および脈絡膜血管(C, D)中の貪食細胞(HE染色).
 変性した神経網膜細胞の核が多数貪食されている(矢印). 貪食細胞の細胞質にはメラニン顆粒が認められる.

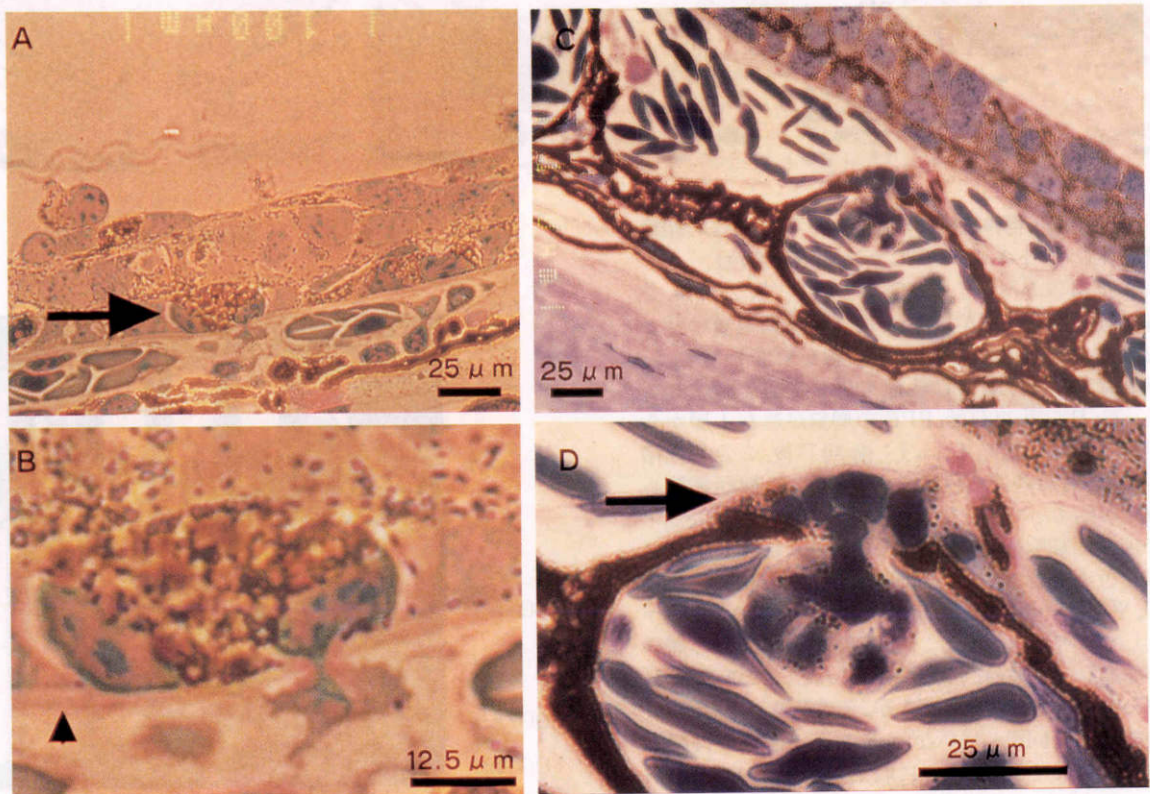


図4 貪食細胞の移動(トルイジンブルー染色).
 A, B: メラニン顆粒陽性の細胞が Bruch 膜を貫通している. C, D: Bruch 膜下に出た貪食細胞は, 脈絡血管内皮細胞の間隙から細胞体のほぼ半分を血管内に侵入させている. 矢印: 貪食細胞. 矢じり: Bruch 膜.

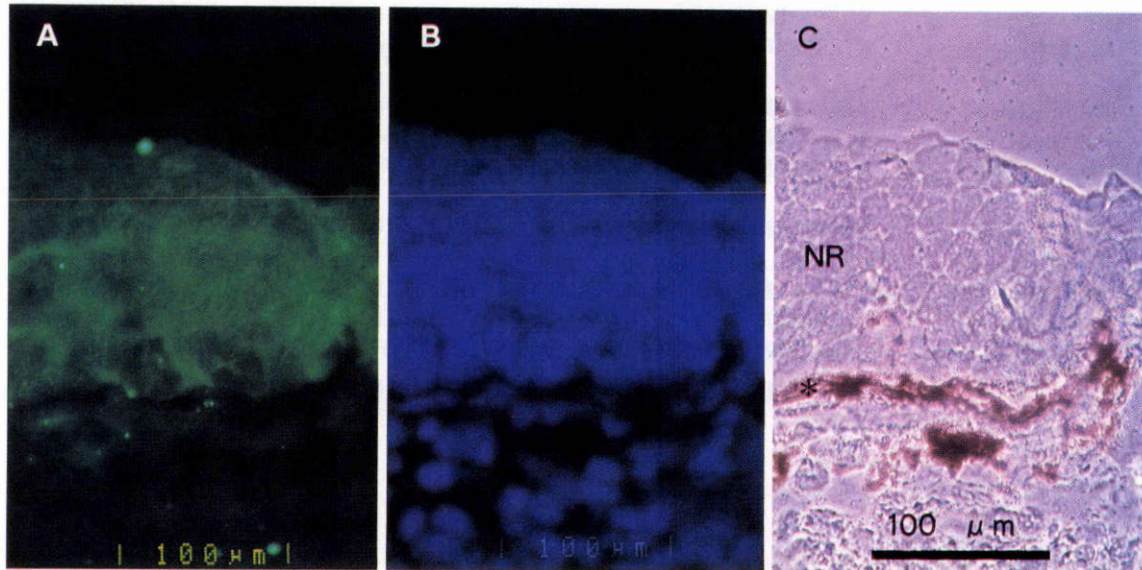


図5 網膜再生過程における Musashi タンパクの発現(術後 35 日).

A: Musashi 抗原は増殖中の新しい神経網膜側(NR)のみに局在し(FITC 陽性),最下層の網膜色素上皮細胞(RPE) (*)には認められない. B: Hoechst 核染色. C: 位相差顕微鏡写真.

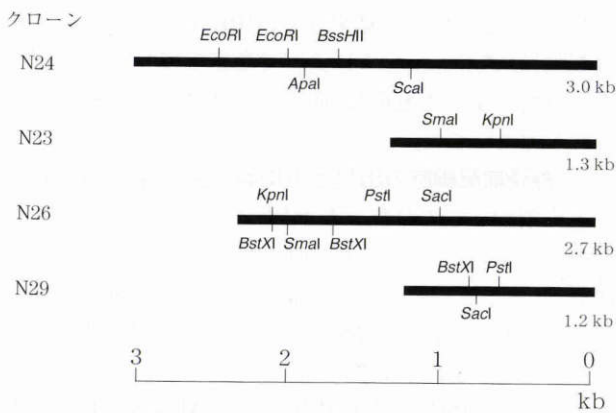


図6 4種類の遺伝子の制限酵素地図(重複してクローニングされたものについては,最長の相補性デオキシリボ核酸(cDNA)を示してある). 左側が5'端,右側が3'端を示す.

4-chloro-3-indolyl-phosphate toluidinium salt (BCIP)により発色を行った.

III 結 果

1. 網膜変性過程に見られるアポトーシスと RPE による変性細胞の処理

両生類に見られる網膜の再生過程は,その種によって微妙な時間的差異がある.そこでまず,アカハライモリにおける再生過程の組織学的概略を検討した.眼球摘出・再移植後の主な変化は,表2のごとくにまとめることができる.また,その典型的な形態像として,正常および術後2, 10, 20, 30, 40日の網膜再生過程を図1に示す.術後2日から,神経網膜の急速な変性が明瞭に観察される.その後もこの変性は急速に進み,10~12日でほとんどの神経網膜由来の細胞は変性し,RPEによって貪食される.

RPEはこの網膜変性に伴って次第に極性を失い始めるとともに細胞増殖を開始する.術後10日には明瞭な分裂像を呈するようになり,次第に多層構造をとり始める.術後20日頃には4~5層となるが,このころRPEはまだ多くのメラニン顆粒を保持している.30日後になるとこれらのメラニン顆粒は急速に失われ始めるが,最下層の細胞は色素を失うことなく,次第に細胞体の高を縮ませ始め,RPE本来の平坦な形態を取り戻して行く.術後40日前後で網膜特有の層構造はほぼ完成するが,細胞の数は正常に比べはるかに多く,神経網膜は厚い.その後,次第に細胞数を減らして本来の厚さに戻る.

初期の神経網膜の急速な変性は虚血による壊死と考えるにはあまりに急速であるため,細胞死プログラムによる能動的細胞死が疑われた.いわゆる programmed cell deathの判断基準として最も重要なゲノムDNAのラダリングの検出を試みたところ,典型的な階段上のバンドがアガロース電気泳動上に確認された(図2).このDNAの断片化は,TUNEL(TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling)法によっても検出でき,またアポトーシスを支持するアポトーシス小体も観察された.これらの事実から,初期の急速な神経細胞変性は虚血による壊死ではなく,主にアポトーシスによる能動的な変性であると考えられた.

変性した神経網膜の細胞はRPEに貪食される(その他のマクロファージ様の細胞の関与も否定はできない).貪食細胞は増殖中のRPEの層中にも認められ,また硝子体中にも多数遊走している.メラニン顆粒を豊富に持ったこれらの貪食細胞は,眼内に長く留まることなく,変性した神経網膜細胞の消失とともに眼内から消失する.これらの細胞が眼外へ出るとすれば,隅角または脈

	< basic >< Helix 1 >< Loop >< Helix 2 >	
Newt N24	KTRRL <u>K</u> ANNRERNRMHNLNSALDT <u>L</u> RG <u>V</u> LPAN <u>P</u> EA <u>A</u> PD <u>T</u> RLTKIETLRFAYNYIWALSET	
XNGNR-1a	KTRRVKANNRERNRMHNLNSALDSLREVLPSLPEDA	KLTKIETLRFAYNYIWALSET
XNGNR-1b	KTRRVKANNRERNRMHNLNYALDSLREVLPSLPEDA	KLTKIETLRFAYNYIWALSET
Mouse NGN	RSRRVKANDRERNRMHNLNAALDALRSVLPSPDDT	KLTKIETLRFAYNYIWALET
Newt N26	K <u>V</u> RRQKANARERNRMHDL <u>N</u> SALDNLKVVPCYSKTQ	KLSKIETLRLAKNYIWALSET
Mouse NeuroD	KLRRQKANARERNRMHDLNAALDNLKVVPCYSKTQ	KLSKIETLRLAKNYIWALSEI
Mouse NeuroD2	KLRRQKANARERNRMHDLNAALDNLKVVPCYSKTQ	KLSKIETLRLAKNYIWALSEI
Mouse NeuroD3	RSRRVKANDRERNRMHNLNAALDALRSVLPSPDDT	KLTKIETLRFAYNYIWALET

図7 クローン N 24 と N 26 の bHLH 領域のアミノ酸配列, および各種動物の *neurogenin*, *neuroD* の bHLH 領域を比較して示す。

下線部は, 他種と異なるアミノ酸を示す. Newt N 24 と N 26 : クローニングされたアカハライモリ bHLH 遺伝子, XNGNR-1 : *Xenopus neurogenin*-related gene, Mouse NGN : mouse *neurogenin*.

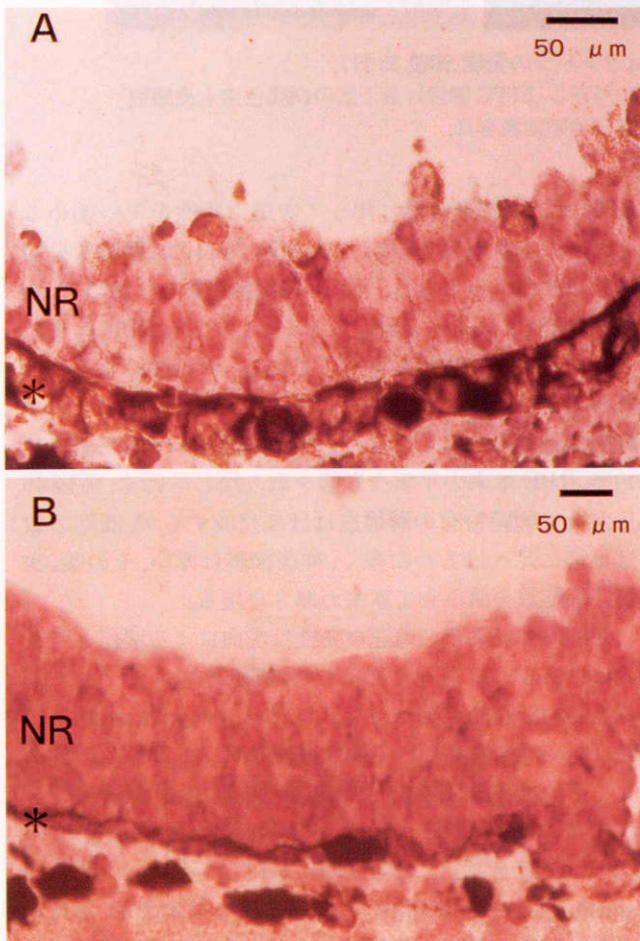


図8 クローン N 24 の術 30 日後 (A) および 40 日後 (B) の発現パターン。

A : 個々の細胞により発現レベルに大きな差がある. これは, 網膜神経細胞の分化程度の差を反映しているものと考えられる. B : 層構造が構築される直前に相当する時期では, 内層での発現が減弱しており, これは神経節細胞の分化が完了に近づいたことを反映していると考えられた。

絡膜血管から静脈系へ入るものと考えられる. そこで, 隅角, 脈絡膜の血管を観察した. 隅角の線維柱帯に相当する

部位には, 変性網膜細胞を貪食したメラニン顆粒陽性の細胞が多数確認された (図 3 A, B). また, 脈絡膜血管内にも全く同様な細胞が多数確認された (図 3 C, D). さらに, 貪食細胞が Bruch 膜を通過し (図 4 A, B), 脈絡膜血管内皮細胞の間隙を通過する像 (図 4 C, D) も確認することができた. これらの結果から, RPE 由来と思われる貪食細胞は, アポトーシスによって急速に変性した神経網膜を貪食によって処理し, 血管系を利用して眼外へ出るものと考えられた。

2. 神経前駆細胞の出現と不均等分裂関与の可能性

上皮細胞として分化した RPE から神経細胞としての網膜が作られる過程では, 網膜の各細胞に分化できる多機能な, そして細胞分裂能を有した神経前駆細胞が作られる必要がある. 再生過程における神経前駆細胞のマーカーとして, Musashi タンパクの発現を検討した. 術後 35 日の蛍光顕微鏡写真を図 5 に示す. Musashi 抗原は増殖中の新しい神経網膜側だけに局在して認められ, その起源である最下層の RPE には求められなかった. 再生早期においても Musashi は RPE には認められず, 増殖した娘細胞のみに認められた. この結果から, もともとの RPE は神経前駆細胞とはなり得ず, 娘細胞がその後増殖して神経前駆細胞となるものと考えられた. Musashi タンパクは細胞の不均等分裂にも関係していると考えられ, 娘細胞のその後の分化過程はもとより, RPE から娘細胞が産み出される段階でも不均等分裂が関与している可能性が示唆された。

3. 再生過程 cDNA ライブラリー

術後 20, 30 日の cDNA ライブラリーは, とともに 1.0×10^9 pfu/ml 以上の titer が得られ, 無作為に選んだ 10 クローンの挿入遺伝子断片の長さは, 2.0 kb 以上であった。

4. Proneural gene (前神経遺伝子) 群のクローニングと発現パターンの検討

術後 20 日と 30 日の眼球 cDNA ライブラリーから, 各 50 万クローン (計 100 万クローン) をアカハライモリ

neurogenin の bHLH 領域の DNA 配列をプローブとしてスクリーニングを行った(方法参照), 強陽性 18 クローン, 弱陽性 36 クローンを得, このうち強陽性 8 クローンの解析を行った結果, 4 種類の遺伝子が存在することが明らかとなった(その制限酵素地図を図 6 に示す). そのうち, 解析の進んでいる二つのクローン, N 24 と N 26 の bHLH 領域を, 他種の *neurogenin*, *neuroD* 遺伝子の bHLH 領域との比較で図 7 に示す. クローン N 26 の bHLH 領域は, 他種の *neuroD* の同領域のアミノ酸配列と極めて近く, このクローンは *neuroD* 遺伝子のアカハライモリ相同遺伝子であると考えられた. クローン N 24 については, 既知の遺伝子の中では *neurogenin* との相同性が最も高かったが, loop 領域のアミノ酸が他種に比べ 3 個多く, また近傍のアミノ酸の種類も異なっており, *neurogenin* 遺伝子ファミリーに属する未だに報告のない未知の遺伝子である可能性が示唆された.

この 2 種類の遺伝子の mRNA の発現パターンを *in situ* hybridization により検討した. 両 mRNA とも術後 25 日頃から再生網膜に発現が認められた. その後, 40 日後まで再生中の神経網膜全層の細胞で発現が認められたが, それ以降網膜内層での発現は減弱した. クローン N 24 の術後 30 日および 40 日の発現パターンを図 8 に示す.

IV 考 按

1. 眼球摘出・再移植後の神経網膜の変性と変性細胞の処理

イモリやサンショウウオでは, 強膜を切開して神経網膜を RPE から剝離して網膜全摘出を行うか, あるいは眼球摘出・再移植によって神経網膜を変性させると, RPE から新たな神経網膜全層が再生される. 後者の場合, 網膜の再生という現象に加えて, 眼組織には死滅した神経細胞の速やかな除去という作業が課せられる. 再生に先行する神経網膜の変性は眼球摘出・再移植による血管の切断, すなわち虚血によるものと考えられている⁴⁶⁾が, 虚血による壊死で死滅した細胞は lysosomal enzyme, その他の毒性のある物質を周囲に放出するため, 他の眼組織, とりわけ新しい神経網膜を産み出す RPE に障害を与えないように, 変性細胞は限られた時間内に徹底して除去されなければならない. 実際, 当モデルにおける網膜変性は, 摘出眼球を培養液中で器官培養した場合に比べて極めて速く, むしろ能動的に起こっていることが予測された. すなわち, この網膜変性は programmed cell death に基づいて起こる現象と考え, アポトーシスの証拠を求めた. その結果, 図 2 に示す DNA の断片化がアガロース電気泳動上で証明されたことに加え, TUNEL 染色によってもこの断片化が陽性であり, さらにアポトーシス小体の存在, 電子顕微鏡による核濃縮なども認められて, この変性過程が虚血による壊死で

はなく, アポトーシスによるものであることを示すに十分な証拠が得られた(投稿準備中).

一般に, アポトーシスによって死滅した細胞は周囲の細胞, またはマクロファージによって貪食されることで除去される. 当モデルにおいても主に RPE によって貪食されている. Keefe⁴²⁾⁴³⁾も, この貪食は主に RPE によってなされるとしているが, 後期にはメラニンのみを処理する melanophage という細胞の存在を想定している. しかし, メラニン顆粒は病的状態で⁴⁷⁾⁴⁸⁾, あるいは加齢変化として⁴⁹⁾しばしば autophagy によって RPE 自身によって細胞質内で自己消化されることが知られている. また, イモリの虹彩色素上皮細胞を *in vitro* で水晶体細胞に分化転換させる際にも, 上皮細胞内での autophagy が認められている⁵⁰⁾. これまでの当研究過程では, RPE がメラニン顆粒を細胞外に放出してそれを再び貪食する melanophage のごとき細胞は全く認められなかった. また, *in vitro* での実験が示唆するように, 自己消化したメラニンを細胞外へ放出するような像も全く認められなかった. しかしながら, 変性した網膜細胞を貪食した細胞は, 術後 8~10 日以降急速に眼内での数を減らし始めている. これらの結果から, これらの貪食細胞は全身血流に入って眼外へ出ていることが疑われ, その流出口として隅角および脈絡膜血管系を詳細に観察した結果, 隅角および脈絡膜血管内に変性細胞の核を貪食した無数の遊走細胞を認めた(図 3). 図 4 に示したように, 硝子体腔内あるいは増殖中の RPE の層内の貪食細胞が遊走して Bruch 膜を貫通する像, 脈絡膜下へ出た貪食細胞が血管内皮細胞の間隙をぬって血管内へ侵入する像も捕らえることができ, また電子顕微鏡により Bruch 膜や血管内皮細胞との微細な関係も明らかにすることができ(投稿準備中), アポトーシス後の変性網膜細胞の処理の道筋が明らかとなった. ヒトの加齢変化としての drusen 形成には, RPE が Bruch 膜へ向かって発芽することが初期変化として関わっており⁴⁹⁾, RPE には Bruch 膜の基底膜を破って侵入する能力が潜在的に備わっていると考えられるが, 血管内皮細胞を認識して全身血に入るといった報告はなく, これらの貪食・遊走細胞がすべて RPE で説明がつくかどうかを結論付けるためには, 生物学的マーカーを用いての詳細な検討を待たねばならないと考えられた.

2. RNA 結合タンパク Musashi の発現と神経前駆細胞の誕生

個体における神経発生では, 神経前駆細胞または神経幹細胞の誕生が必須であり, RPE から新しい神経網膜が再生する過程においてもこの神経前駆細胞の誕生は不可欠である. RPE 増殖のきっかけは明らかに神経網膜の損失または変性であるが, 神経前駆細胞の誕生は細胞自律的に定められた運命であるのか, あるいは何らかの細胞外シグナルにより誘導されるのかは重要な問題である.

前者の例として、ショウジョウバエの外感覚器の不均等分裂に不可欠な Musashi タンパクの発現があげられる。ショウジョウバエの外感覚器は一つの感覚器前駆細胞 (sensory organ precursor, SOP) が不均等分裂を二度繰り返して 4 種類の異なる細胞に分化する。このうちの 2 種類は神経系の neuron と glia であり、残る 2 種類は shaft と socket と呼ばれる支持細胞である。Musashi 遺伝子の無発現変異体では、高率で neuron と glia が欠損し、通常より多くの shaft と socket 細胞が生まれるため、Musashi タンパクは神経系へ分化するための不均等分裂に関与するものと考えられている⁵¹⁾。マウス Musashi タンパクは 39 kD の RNA 結合タンパクで、中枢神経系の幹細胞とその娘細胞、すなわち分裂能を有する多機能な神経前駆細胞に特異的に発現し、分化して分裂能を失った細胞では、その発現が抑制されることから神経前駆細胞の特異的なマーカーと考えられる⁵²⁾。ショウジョウバエとマウスでの研究結果から、哺乳類においても Musashi タンパクは、不均等分裂に関わる他の遺伝子あるいは他の神経特異的遺伝子の mRNA に結合して、標的 mRNA の安定性またはタンパクへの翻訳レベルを調節していることが類推されている。

図 5 に示すように、Musashi タンパクは最下層の RPE には発現せず、分裂中の娘細胞、すなわち網膜神経細胞の前駆細胞あるいは網膜芽細胞と呼ぶべき細胞に発現が認められた。同様の局在は、さらに早期の再生過程でも見られ、もともとの RPE 自身は神経前駆細胞とはなり得ず、細胞分裂によって娘細胞にのみその可能性が生じることが示唆された (投稿準備中)。ただし、RPE から娘細胞への分裂時に不均等分裂が関わっているかについては、今回の結果からのみでは結論できず、細胞外からのシグナルが関わっていることは否定できない。例えば、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) は、神経前駆細胞を誘導または維持する機能が知られており⁵³⁾。ニワトリ胎生では神経網膜切除後の硝子体腔内 bFGF 投与により神経網膜を誘導するという報告⁵⁴⁾⁵⁵⁾があり、アカハライモリにおける神経網膜変性後の RPE からの神経前駆細胞の誘導にも、bFGF 様の細胞外シグナルの関与を想定することには、何ら矛盾が生じない。これらの問題を検証するためには、Musashi 遺伝子の mRNA が娘細胞だけでなく、RPE 自身でも発現されているか否かを検討することと、再生初期の RPE などの眼組織中に bFGF あるいはその受容体の発現が見られるかを検討すること、さらに BrdU の pulse labeling などによって分化転換直前の RPE の細胞系譜の追跡を行うことが重要であると考えられる。

一般的に、分化転換が起こる場合には、まず脱分化過程を経て本来の分化した機能や形態が失われ、その後他の表現型の細胞の機能や形態を獲得する再分化過程が起こると考えられている。イモリの網膜再生過程において

も、RPE が上皮としての形質を捨てて多機能な細胞へといったん脱分化したのち神経系への細胞へと再分化して行くものと考えられている。しかし、本稿で検討したモデルにおける RPE は、神経網膜変性に伴う細胞増殖の段階で基底膜側・神経網膜側の明らかな極性が失われるものの、その後の大きな変化は増殖の結果生じた娘細胞側を中心にみられ、RPE は直ちにメラニン顆粒を増やすとともに平坦な単層構造に戻って行く。Musashi タンパクの発現が RPE 側に見られず、娘細胞側だけに認められたことも、RPE 自身の著明な脱分化よりは、RPE とは大きく形質が異なる娘細胞を産み出している可能性を示唆するものと考えられる。事実、マウス食道筋の発生過程で起こる平滑筋から横紋筋への分化転換では、平滑筋特異的なミオシン light chain を発現している細胞がその発現を停止することなく、横紋筋特異的ミオシン heavy chain を発現し始め、この分化転換過程にはほとんど脱分化過程が生じないことが示されている⁵⁶⁾。分化・脱分化という現象自体が相対的なものであるので、指標とするものによってその程度の評価は異なるに違いないが、RPE の分化転換における脱分化の関与がどの程度のものか検討することは、網膜再生のメカニズムを知る上で重要である。現在、分化した RPE に特異的な抗原と神経前駆細胞特異的な Musashi を指標として、この問題を検討中である。

3. Proneural gene (前神経遺伝子) 群の発現

上皮細胞として最終分化を遂げた RPE が、神経網膜という全く異なる集団へと分化をやり直す分化転換という極めて稀有な現象が起こるためには、神経組織を作るために必要な数多くの遺伝子を統合して働かせる、強力な「指揮官」が必要と考えられる。このような機能をもつ転写因子は筋組織で初めて明らかとなり⁵⁷⁾、その後、様々な転写因子がクローニングされ、その機能が明らかにされたが、これらの転写因子に共通する特徴は、ベーシック・ヘリックス・ループ・ヘリックス (bHLH) という共通のモチーフをもった DNA 結合タンパクであるということである。bHLH タンパクの機能は、HLH 領域を使って複数の転写因子同士で homodimer または heterodimer を作り、ベーシック領域を使って標的 DNA の E-box と呼ばれる特定の DNA 配列 (CANNTG) に結合して、その遺伝子の発現を調節することである。近年、神経発生においても、筋組織の発生とよく似たシナリオが明らかとなってきた。すなわち、*neurogenin*⁴⁵⁾ と呼ばれる bHLH タンパクの発現が始まると、それより下流にある *neuroD*⁵⁸⁾ を含む bHLH に属する様々な転写因子がカスケードとして活性化され、そのそれぞれが神経細胞への分化に必要な多くの遺伝子を発現させて行くというのである。これらの bHLH は、ショウジョウバエの proneural gene (前神経遺伝子) 群に相当する脊椎動物の遺伝子であると考えられており、これが正しいとすれば、

RPE から神経前駆細胞が作られる際には少なくとも部分的に同じカスケードが使われるであろうという仮説が成り立つ。この仮説に基づいて、網膜再生過程にある眼球組織より作製した cDNA ライブラリーから、bHLH をもつ遺伝子群をクローニングした。図7に示すように、この遺伝子群は *neurogenin/neuroD* ファミリーに属する転写因子と思われ、そのタンパク産物は下流の数多くの神経特異的遺伝子のエンハンサー領域に結合して、それらを選択的に発現させることにより「網膜の再生を指揮」しているものと考えられる。術後30日の再生網膜では、発現している細胞と発現していない細胞に明瞭な差があり、この差は神経としての分化程度の差を反映していると考えられた。術後40日では再生網膜全層に広く発現が見られたが、最内層では発現の減弱が認められた。これは、最も早期に分化する神経節細胞の分化が完了に近づいているに伴う発現抑制を反映しているものと考えられた。クローン N24 と N26 は、ほぼ同様の空間的発現パターンを示したが、時間的発現パターンとしては、N26 は既に術後20~25日頃からわずかながら発現しているのに対して、N24 はこの時期の発現がほとんど認められなかった。多くの bHLH 遺伝子が階層構造を成していることから考えると、N26 は N24 の上流にある遺伝子である可能性がある。しかし、今回 *in situ* hybridization に使用した cRNA プロブは約1 kb と比較的長く、非特異的な塩基配列によると思われる高い背景発色が解釈を困難にしているとも考えられるので、複数のプロブを作り直して上記の点に関して再度検討する必要があると考えられた。

現在のところ、最も早期に神経細胞への運命を決定するのに必要な遺伝子が *neurogenin* と考えられているが⁴⁵⁾、*neurogenin* 遺伝子の発現を調節している分子については何も明らかになっていない。*neurogenin/neuroD* よりも上流に他の転写因子が存在する可能性が高く、その転写因子も bHLH 型の遺伝子であることは十分考えられる。したがって、本研究のライブラリー・スクリーニング過程で、これまでにクローニングされている残りの遺伝子の解析を急ぐとともに、術後20日より以前の再生早期の cDNA ライブラリーを作製して同様なアプローチで bHLH 遺伝子のクローニングを行い、このカスケードの上流へ上流へと遡って、RPE から神経細胞への誘導を起こす最も重要な転写因子を同定する作業を始めている。

4. 臨床応用への展望

冒頭で述べた通り、網膜視神経の障害に対して根治的治療を考えるとすれば、①失われた網膜神経細胞を何らかの形で補うこと、②新しい神経細胞がシナプスを介したネットワークを形成し、最終的に中枢との接続を回復すること、③回復したネットワークを通じて、中枢が利用することのできる有用な視覚情報として入力信号を統

合して送受信するシステムを回復する、という三つの目標を達成しなければならない。そして、この三つは通常切り離して考えることができないことも述べた。アカハライモリにみられる網膜の再生は、神経生物学で普通示す軸索の再生ではなく、失われた網膜神経細胞が RPE の分化転換によって補われ、しかも機能的なシナプスを作って中枢へと視覚情報を送ることができるたぐいまれな神経再生モデルであり、上記の三つの目標を完全に達成している。このような現象をヒトを含む他の動物に起こさせたいと考えたとき、このモデルにおける神経誘導のメカニズムを分子レベルで解明することは不可欠である。特に、RPE から神経前駆細胞が産み出される過程における初期の遺伝子発現が大きな鍵を握っているものと考えられる。本稿においては、これまでの研究過程の中から特に不均等分裂の関与と bHLH 型の転写因子の発現に焦点を絞ったが、この他にホメオボックス型の転写因子や細胞表面・細胞外シグナルの関与も重要であると考えられる。これらを網羅するための一つの方法として、再生過程に特異的に発現する遺伝子をクローニングする目的で、いわゆる subtractive hybridization と differential display 法を検討している。

アカハライモリに見られるような完全な網膜再生を起こさせることは究極の理想であるが、その分子メカニズムを明らかにしようとする研究過程の中で得られる知識は、網膜移植にも応用可能であると考えられる。神経網膜移植の最大の問題点は、移植細胞が移植先でシナプスを作らないことである。それには神経細胞の分化過程が大きく影響しており、例えば分化度の低い胎児の視細胞を移植しても、移植先の細胞の分化度が高くシナプス形成に応じなければ、情報交換は行われぬ。移植によって神経網膜を補うことを考える場合にも、これを成功に導くためには、移植に適した網膜細胞の分化・脱分化程度を遺伝子レベルで明らかにし、遺伝子レベルでの修飾を可能にすることが必須である。通常、個体発生の過程においては、胚葉を越えて多数の細胞がお互いに影響し合い、形態形成が行われる。眼球の場合も、神経外胚葉に加え、表皮外胚葉と中胚葉、神経堤由来の細胞の関与が大きい。したがって、網膜の発生を研究する場合にも、純粋に網膜の発生だけに必要な因子を扱うことは事実上不可能である。しかし、当動物モデルにおける神経網膜の再生は、神経網膜以外のすべての眼球構造は保たれたまま、神経網膜だけの発生を追うことができ、この意味では通常の網膜発生モデルに比べて焦点が絞りやすい。この点を生かして、これまでに述べた転写因子以外にも、細胞表面・細胞外シグナルを同定して、これらを組み合わせて修飾することにより、移植に適した分化程度の網膜を得ることが期待できる。

イモリという特殊な動物モデルを使うことによる研究上の不利益は大きいですが、上記の利点や網膜が再生する

という事実は、多大な労力と引き換えにそれに見合うだけの医学・科学上の知識を与えてくれるものと思われる。DNAプローブや抗体などの研究道具を地道に増やして行くことにより、その困難は克服できると考えられる。

この論文の要旨は、第101回日本眼科学会総会宿題報告で発表しました。本発表の機会を与えて下さいました日本眼科学会評議員の皆様ならびに小口芳久先生(慶應義塾大学医学部教授)に感謝申し上げます。本研究は、日本眼球銀行協会海外留学助成金、アジア地域眼科医研修基金、日本失明予防協会、上原記念財団リサーチフェローシップ、西眼科病院、株式会社ニデックの支援を受けました。また、ファルマシア・アプリケーション株式会社、参天製薬株式会社、ノボ ノルディスクファーマ株式会社より深い御理解をいただきました。下記の皆様からの慶應義塾大学医学部網膜再生研究への寄付に心より深謝いたします：慶應義塾大学医学部眼科学教室同窓会(原 裕、樋田富雄、原 孜、野崎道雄、秋山健一、大沢満雄、山田耕太郎、平川和夫、小澤博子、富田 香、尾羽澤大、渡邊静子、安達章子、松井久和、小向正純、酒井利彦、宇津見義一、高山東洋、本橋昭男、坪田一男、藤野 貞、天沼 宏、天沼恭子、野口昌彦、西 妙子、依田初栄、水口勇臣、脇泰三郎、森実秀子、大崎千壽、佐賀歌子、手代木由紀子、下山順司、小川葉子、佐藤静雄、武田和夫、敬称略・順不同)、患者さんおよびご家族(古矢利夫、山川助雄、林久美子、高村照郎、鹿島恵美子、池田烈也、中村善暁、長岡 保、小笠原三興、森谷玲子、小泉茂雄、柴田寿子、大窪融、田中晋作、中丸忠次、郷 明博、岩佐浩二、敬称略・順不同)、協力者(本橋孝彦、梶原将義、小山秀人、岩鶴睦子、井上邦夫、小林清吉、武末佳子、小林英二、小林久子、奈良迫ミチ、服部俊和、上原善雄・光子、宮田典男、西村考子、西村哲也、西村美保子、西村昭三、永瀧恵美子、永瀧喜三、倉橋雅夫、佐々木サタ、中川義野、坂本修子、順不同・敬称略)、日本アルコン、日本盲人専門家協会(池田敏郎会長)からは、スタンフォード大学医学部神経生物学教室に御寄付をいただきました。謹んで御礼申し上げます。実験用アカハライモリの捕獲・輸送に多大なご尽力をいただいた貴田正治氏(株式会社キダ商事)、飼育に協力いただいた梶原睦子氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Dryja TP, McGee TL, Reichel E, Hahn LB, Cowley GS, Yandell DW, et al: A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature* 343: 364-366, 1990.
- 2) Hotta Y, Shiono T, Hayakawa M, Hashimoto T, Kanai A, Nakajima A, et al: Molecular biological study of the rhodopsin gene in Japanese patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 96: 237-242, 1992.
- 3) Fujiki K, Hotta Y, Hayakawa M, Sakuma H, Shiono T, Noro M, et al: Point mutations of rhodopsin gene found in Japanese families with autosomal dominant retinitis pigmentosa (ADRP). *Jpn J Hum Genet* 37: 125-132, 1992.
- 4) Nakazawa M, Kikawa-Araki E, Shiono T, Tamai M: Analysis of rhodopsin gene in patients with retinitis pigmentosa using allele-specific polymerase chain reaction. *Jpn J Ophthalmol* 35: 386-393, 1991.
- 5) Hayakawa M, Hotta Y, Imai Y, Fujiki K, Nakamura A, Yanashima K, et al: Clinical features of autosomal dominant retinitis pigmentosa with rhodopsin gene codon 17 mutation and retinal neovascularization in a Japanese patient. *Am J Ophthalmol* 115: 168-173, 1993.
- 6) Shiono T, Hotta Y, Noro M, Sakuma T, Tamai M, Hayakawa M, et al: Clinical features of Japanese family with autosomal dominant retinitis pigmentosa caused by point mutation in codon 347 of rhodopsin gene. *Jpn J Ophthalmol* 36: 69-75, 1992.
- 7) Nakazawa M: A molecular biological study on retinitis pigmentosa. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 97: 1394-1405, 1993.
- 8) Kajiwara K, Hahn LB, Mukai S, Travis GH, Berson EL, Dryja TP: Mutations in the human retinal degeneration slow gene in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nature* 354: 480-483, 1991.
- 9) Farrar GJ, Kenna P, Jordan SA, Kumar-Singh R, Humphries MM, Sharp EM, et al: A three-base-pair deletion in the peripherin-RDS gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature* 354: 478-480, 1991.
- 10) Rosenfeld PJ, Cowley GS, McGee TL, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP: A null mutation in the rhodopsin gene causes rod photoreceptor dysfunction and autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nature Genet* 1: 209-213, 1992.
- 11) McLaughlin ME, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP: Recessive mutations in the gene encoding the beta-subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa. *Nature Genet* 4: 130-134, 1993.
- 12) Kajiwara K, Berson EL, Dryja TP: Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. *Science* 264: 1604-1608, 1994.
- 13) Dryja TP, Hahn LB, Kajiwara K, Berson EL: Dominant and digenic mutations in the peripherin/RDS and ROM1 genes in retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 1972-1982, 1997.
- 14) Huang SH, Pittler SJ, Huang X, Oliverira L, Berson EL, Dryja TP: Autosomal recessive retinitis pigmentosa caused by mutations in the alpha subunit of rod cGMP phosphodiesterase. *Nat Genet* 11: 468-471, 1995.
- 15) Dryja TP, Finn JT, Peng YW, McGee TL, Berson EL, Yau KW: Mutations in the gene encoding the alpha subunit of the rod cGMP-gated channel in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10177-

- 10181, 1995.
- 16) **Kajiwara K, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP**: A null mutation in the human peripherin/RDS gene in a family with autosomal dominant retinitis punctata albescens. *Nature Genet* 3: 208–212, 1993.
 - 17) **Nichols BE, Sheffield VC, Vandenburgh K, Drack AV, Kimura AE, Stone EM**: Butterfly-shaped pigment dystrophy of the fovea caused by a point mutation in codon 167 of the RDS gene. *Nature Genet* 3: 202–207, 1993.
 - 18) **Wells J, Wroblewski J, Keen J, Inglehearn C, Jubb C, Eckstein A**, et al: Mutations in the human retinal degeneration slow (RDS) gene can cause either retinitis pigmentosa or macular dystrophy. *Nature Genet* 3: 213–218, 1993.
 - 19) **Wroblewski JJ, Wells JA, Eckstein A, Fitzke F, Jubb C, Keen TJ**, et al: Macular dystrophy associated with mutations at codon 172 in the human retinal degeneration slow gene. *Ophthalmology* 101: 12–22, 1994.
 - 20) **Weleber RG, Carr RE, Murphey WH, Sheffield VC, Stone EM**: Phenotypic variation including retinitis pigmentosa, pattern dystrophy, and fundus flavimaculatus in a single family with a deletion of codon 153 or 154 of the peripherin/RDS gene. *Arch Ophthalmol* 111: 1531–1542, 1993.
 - 21) **Allikmets R, Singh N, Sun H, Shroyer NF, Hutchinson A, Chidambaram A**, et al: A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat Genet* 15: 236–246, 1997.
 - 22) **Inana G, Totsuka S, Redmond M, Dougherty T, Nagle J, Shiono T**, et al: Molecular cloning of human ornithine aminotransferase mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 1203–1207, 1986.
 - 23) **Mitchell GA, Brody LC, Looney J, Steel G, Suchanek M, Dowling C**, et al: An initiator codon mutation in ornithine-delta-aminotransferase causing gyrate atrophy of the choroid and retina. *J Clin Invest* 81: 630–633, 1988.
 - 24) **Berger W, Meindl A, van de Pol TJ, Cremers FP, Ropers HH, Doerner C**, et al: Isolation of a candidate gene for Norrie disease by positional cloning. *Nat Genet* 1: 199–203, 1992.
 - 25) **Chen ZY, Hendriks RW, Jobling MA, Powell JF, Breakefield XO, Sims KB**, et al: Isolation and characterization of a candidate gene for Norrie disease. *Nat Genet* 1: 204–208, 1992.
 - 26) **Meindl A, Berger W, Meitinger T, van de Pol D, Achatz H, Dorner C**, et al: Norrie disease is caused by mutations in an extracellular protein resembling C-terminal globular domain of mucins. *Nat Genet* 2: 139–143, 1992.
 - 27) **Cremers FP, van de Pol DJ, van Kerkhoff LP, Wieringa B, Ropers HH**: Cloning of a gene that is rearranged in patients with choroideremia. *Nature* 347: 674–677, 1990.
 - 28) **Weil D, Blanchard S, Kaplan J, Guilford P, Gibson F, Walsh J**, et al: Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B. *Nature* 374: 60–61, 1995.
 - 29) **Gibson F, Walsh J, Mburu P, Varela A, Brown KA, Antonio M**, et al: A type VII myosin encoded by the mouse deafness gene shaker-1. *Nature* 374: 62–64, 1995.
 - 30) **Dryja TP, Berson EL, Rao VR, Oprian DD**: Heterozygous missense mutation in the rhodopsin gene as a cause of congenital stationary night blindness. *Nat Genet* 4: 280–283, 1993.
 - 31) **Gal A, Orth U, Baehr W, Schwinger E, Rosenberg T**: Heterozygous missense mutation in the rod cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene in autosomal dominant stationary night blindness. *Nat Genet* 7: 64–67, 1994.
 - 32) **Dryja TP, Hahn LB, Reboul T, Arnaud B**: Missense mutation in the gene encoding the alpha subunit of rod transducin in the Nougaret form of congenital stationary night blindness. *Nat Genet* 13: 358–360, 1996.
 - 33) **Fuchs S, Nakazawa M, Maw M, Tamai M, Oguchi Y, Gal A**: A homozygous 1-base pair deletion in the arrestin gene is a frequent cause of Oguchi disease in Japanese. *Nat Genet* 10: 360–362, 1995.
 - 34) **Yamamoto S, Sippel KC, Berson EL, Dryja TP**: Defects in the rhodopsin kinase gene in the Oguchi form of stationary night blindness. *Nat Genet* 15: 175–178, 1997.
 - 35) **Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM**, et al: Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 242: 1427–1430, 1988.
 - 36) **Stone EM, Fingert JH, Alward WLM, Nguyen TD, Polansky JR, Sunden SLF**, et al: Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. *Science* 275: 668–670, 1997.
 - 37) **Eguchi G, Kodama R**: Transdifferentiation. *Curr Opin Cell Biol* 5: 1023–1028, 1993.
 - 38) **Griffini L, Marchio G**: *La Riforma Medica* 5: 86–93, 1889.
 - 39) **Stone LS**: Neural retinal degeneration followed by regeneration from surviving retinal pigment cells in grafted adult salamander eyes. *Anat Rec* 106: 89–109, 1950.
 - 40) **Stone LS**: The role of retinal pigment cells in regenerating neural retinae of adult salamander eyes. *J Exp Zool* 113: 9–31, 1950.
 - 41) **Keefe JR**: An analysis of urodelian retinal regeneration. I. Studies of the cellular source of retinal regeneration in *Notophthalmus viridescens* utilizing ³H-thymidine and colchicine. *J Exp Zool* 184: 185–206, 1973.
 - 42) **Keefe JR**: An analysis of urodelian retinal regeneration. II. Ultrastructural features of retinal regeneration in *Notophthalmus viridescens*.

- cens. *J Exp Zool* 184 : 207—232, 1973.
- 43) **Keefe JR** : An analysis of urodelian retinal regeneration. III. Degradation of extruded melanin granules in *Notophthalmus viridescens*. *J Exp Zool* 184 : 233—238, 1973.
- 44) **Keefe JR** : An analysis of urodelian retinal regeneration. IV. Studies of the cellular source of retinal regeneration in *Triturus cristatus carnifex* using ^3H - thymidine. *J Exp Zool* 184 : 239—258, 1973.
- 45) **Ma Q, Kintner C, Anderson DJ** : Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell* 87 : 43—52, 1996.
- 46) **Hitchcock PF, Raymond PA** : Retinal regeneration. *Trends Neurosci* 15 : 103—108, 1992.
- 47) **Burns MS, Tyler NK, Bellhorn RW** : Melanosome abnormalities of ocular pigmented epithelial cells in beagle dogs with hereditary tapetal degeneration. *Curr Eye Res* 7 : 115—123, 1988.
- 48) **Feeney-Burns L, Mixon RN** : Development of amelanotic retinal pigment epithelium in eyes with a tapetum lacidum : Melanosome autophagy and termination of melanogenesis. *Dev Biol* 72 : 73—88, 1979.
- 49) **Ishibashi T, Patterson R, Ohnishi Y, Inomata H, Ryan SJ** : Formation of drusen in the human eye. *Am J Ophthalmol* 101 : 342—353, 1986.
- 50) **Yamada T, Dumont JN, Moret R, Brun JP** : Autophagy in dedifferentiating newt iris epithelial cells *in vitro*. *Differentiation* 11 : 133—147, 1978.
- 51) **Nakamura M, Okano H, Blendy JA, Montell C** : Musashi, a neural RNA-binding protein required for *Drosophila* adult external sensory organ development. *Neuron* 13 : 67—81, 1994.
- 52) **Sakakibara S, Imai T, Hamaguchi K, Okabe M, Aruga J, Nakajima K, et al** : Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell. *Dev Biol* 176 : 230—242, 1996.
- 53) **Johe KK, Hazel TG, Muller T, Dugich-Djordjevic MM, McKay RDG** : Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev* 10 : 3129—3140, 1996.
- 54) **Park CM, Hollenberg MJ** : Basic fibroblast growth factor induces retinal regeneration *in vivo*. *Dev Biol* 134 : 201—205, 1989.
- 55) **Park CM, Hollenberg MJ** : Induction of retinal regeneration *in vivo* by growth factors. *Dev Biol* 148 : 322—333, 1991.
- 56) **Patapoutian A, Wold BJ, Wagner RA** : Evidence for developmentally programmed transdifferentiation in mouse esophageal muscle. *Science* 270 : 1818—1821, 1995.
- 57) **Weintraub H** : The MyoD family and myogenesis : Redundancy, networks, and thresholds. *Cell* 75 : 1241—1244, 1993.
- 58) **Lee JE, Hollenberg SM, Snider L, Turner DL, Lipnick N, Weintraub H** : Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD , a basic helix-loop-helix protein. *Science* 268 : 836—844, 1995.